

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

ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA

**NOVOS ASPECTOS DA AÇÃO DE DROGAS ANTIEPILÉPTICAS:
EFEITOS ANTIOXIDANTES E MODULAÇÃO DOS SISTEMAS
COLINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO**

Fortaleza

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

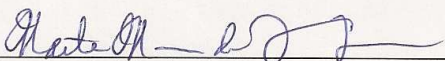
ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA

NOVOS ASPECTOS DA AÇÃO DE DROGAS ANTIEPILÉPTICAS: EFEITOS ANTIOXIDANTES E MODULAÇÃO DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E DOPAMINÉRGICO

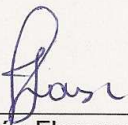
Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Aprovada em 15/07/2010

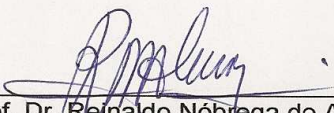
BANCA EXAMINADORA



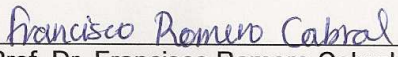
Prof. Dra. Marta Maria de França Fonteles – Orientadora
Universidade Federal do Ceará – UFC



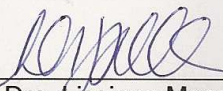
Prof. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa – Co-Orientadora
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Universidade Federal da Paraíba – UFPB



Prof. Dr. Francisco Romero Cabral
Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein /
Instituto do Cérebro



Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará – UFC

ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA

NOVOS ASPECTOS DA AÇÃO DE DROGAS ANTIEPILÉPTICAS: EFEITOS
ANTIOXIDANTES E MODULAÇÃO DOS SISTEMAS COLINÉRGICO E
DOPAMINÉRGICO

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Co-orientador: Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa

Fortaleza

2010

O45n Oliveira, Aline de Albuquerque

**Novos aspectos da ação de drogas antiepilépticas: efeitos antioxidantes e modulação dos sistemas colinérgico e dopaminérgico / Aline de Albuquerque Oliveira. – Fortaleza-Ce, 2010.
242f. : il.**

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França

Fonteles

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza-Ce; 2010**

**1. Clonazepam 2. Melatonina 3. Pilocarpina 4.
Convulsões I. Fonteles, Marta Maria de França (Orient.) II.
Título.**

CDD: 616.853

A Deus, razão da minha existência, A minha mãe Lucíola, meu esposo Herbert,
minha família e amigos, por todo apoio, dedicação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por me dar forças para superar as dificuldades e me amparar em todos os momentos da minha vida.

À Prof^ª. Dra. *Marta Maria de França Fonteles*, minha orientadora (desde sempre), não tenho palavras para agradecer pela compreensão, exemplo, apoio, incentivo, dedicação e amizade.

À Prof^ª. Dra. *Francisca Cléa Florenço de Sousa*, minha co-orientadora, muito obrigada pelo apoio, pela acolhida carinhosa e pela amizade, tão valiosos para mim.

Aos Professores. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida e Francisco Romero Cabral o meu sincero agradecimento por, prontamente, terem aceito o convite para participar da minha banca examinadora.

À Profa. Dra. *Lissiana Vasconcelos Aguiar*, por quem minha estima é imensurável, pela imprescindível presença constante em minha vida e por ter aceito o convite para participar da minha banca examinadora.

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

À *minha mãe, meu esposo, minha avó, meus tios e primos, meus sogros, cunhados e sobrinhos* que compõem uma grande e amada família, alicerce imprescindível para meu crescimento pessoal e profissional.

Às Profas. Dras. *Silvânia Vasconcelos e Danielle Macêdo*, por quem tenho grande admiração e apreço, pela contribuição, incentivo, disponibilidade e amizade.

À Isabel Linhares, Alyne Mara e Brinell, que, durante seus anos de iniciação científica, estiveram ao meu lado na construção dessa tese, a ajuda de vocês foi extremamente valiosa!

A todos do Laboratório de Neurofarmacologia e aos amigos e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Departamento de Farmácia, em especial: Carla Thiciane, Flávio Maia, Prof. Hélio Nobre, Profa. Juvênia, Profa. Geanne, Patrícia Freire, Patrícia Gomes, Isabel, Jeferson pela ajuda, apoio e amizade.

À técnica do Laboratório de Neurofarmacologia *Vilani e à Jaqueline*, cujo trabalho foi (e é) essencial para a realização não somente dessa tese, mas de toda produção científica do LabNeuro.

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

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

RESUMO

Novos aspectos da ação de drogas antiepilépticas: efeitos antioxidantes e modulação dos sistemas colinérgico e dopaminérgico. ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA. Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2010.

Levetiracetam (LEV), nova droga antiepiléptica, apresenta eficácia na terapia adicional das convulsões e em modelos experimentais. Clonazepam (CNZP) é um benzodiazepínico utilizado no tratamento de convulsões mioclônicas e crises generalizadas. Melatonina (MEL), hormônio pineal, demonstra atividade anticonvulsivante em diversos modelos animais. Objetivando investigar novos mecanismos relacionados aos efeitos dessas drogas, foi realizado estudo comparativo, a partir da análise da influência do pré-tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre o estresse oxidativo neuronal e sobre a modulação de sistemas de neurotransmissão (colinérgico e dopaminérgico) durante as convulsões induzidas por pilocarpina (400mg/Kg; P400). Camundongos Swiss, machos, 25-30g receberam LEV, 200 mg/Kg, CNZP, 0,5mg/Kg ou MEL, 25mg/Kg, i.p., (doses escolhidas à partir de curvas dose-resposta) 30min antes de P400. Hipocampo e corpo estriado foram removidos para as análises neuroquímicas. Experimentos *in vitro*, onde homogenatos cerebrais foram incubados com as drogas em estudo (50, 100 ou 200µg/mL), também permitiram analisar alterações no estresse oxidativo após a indução de choque térmico e, ainda, a densidade de receptores muscarínicos no hipocampo. Os estudos sobre os efeitos sobre o sistema de neurotransmissores colinérgicos demonstraram que o pré-tratamento com LEV, CNZP ou MEL causou redução nos tremores induzidos por oxotremorina e elevou a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo. LEV e CNZP alteraram o *binding* dos receptores muscarínicos hipocampais *in vivo*, revertendo a *downregulation* induzida por P400, e ensaios *in vitro* demonstraram alteração no *binding* muscarínico hipocampal pela prévia incubação com LEV, CNZP ou MEL. Os ensaios de *binding* demonstraram, ainda, a *downregulation* dos receptores D₂ hipocampais nos animais tratados LEV, CNZP ou pré-tratados com MEL antes de P400. As análises para investigação da atividade antioxidante de LEV e CNZP e do papel da ação antioxidativa da MEL na proteção contra as convulsões permitiram observar que a associação com vitamina E potencializou os efeitos anticonvulsivantes de todas as drogas estudadas. A administração prévia de LEV, CNZP ou MEL, antes de P400, reverteu o aumento nos níveis de peroxidação lipídica e nitrito-nitrato e normalizou a atividade da catalase e os níveis fisiológicos do antioxidante glutationa em hipocampo e/ou corpo estriado. Nos experimentos de stress oxidativo *in vitro*, o aumento da peroxidação lipídica, dos níveis de nitrito-nitrato e da atividade da catalase nos homogenatos cerebrais submetidos ao choque térmico, foram alterados de forma significativa pela incubação prévia com LEV, CNZP ou MEL, onde estas drogas foram capazes de reduzir os níveis de MDA, de nitrito-nitrato e, ainda, estabilizar a atividade da catalase, potencializando, assim, a atividade enzimática antioxidante endógena e a capacidade de inativação de radicais livres. Dessa forma, o estudo sugere uma ação moduladora, exercida por LEV, CNZP e MEL sobre o funcionamento dos sistemas muscarínico e dopaminérgico, em nível central, como mecanismo alternativo para a proteção contra as convulsões no modelo de P400, bem como a participação de propriedades antioxidantes diretas ou indiretas dessas drogas, através da capacidade de modificar a resposta ao estresse oxidativo neuronal.

Palavras-chave: Levetiracetam. Clonazepam. Melatonina. Antioxidante. Muscarínico. Pilocarpina. Convulsões.

ABSTRACT

New aspects of antiepileptic drugs action: antioxidant effects and modulation of cholinergic and dopaminergic systems. ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA. Supervisor: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles. Doctorate's thesis. Post-graduation Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2010.

Levetiracetam (LEV), a new antiepileptic drug, shows efficacy in the treatment of additional seizures and in experimental models. Clonazepam (CNZP) is a benzodiazepine used to treat myoclonic seizures and generalized seizures. Melatonin (MEL), the pineal hormone, shows anticonvulsant activity in several animal models. To investigate new mechanisms related to the effects of these drugs, comparative study was conducted, from the analysis of the influence of pretreatment with LEV, CNZP or MEL on the oxidative stress and neuronal modulation of neurotransmitter systems (cholinergic and dopaminergic) during seizures induced by pilocarpine (400mg/Kg; P400). Male Swiss mice, 25-30g received LEV, 200 mg / kg, CNZP, 0.5 mg / kg or MEL, 25mg/kg, ip (doses chosen from the dose-response curves) 30min before P400. Hippocampus and striatum were removed for neurochemical analysis. *In vitro* experiments, where brain homogenates were incubated with drugs under study (50, 100 ou 200µg/mL) also allowed us to analyze changes in oxidative stress after induction of heat shock and also the density of muscarinic receptors in the hippocampus. Studies on the muscarinic modulation demonstrated that pretreatment with LEV, CNZP or MEL resulted in lower oxotremorina induced tremors and increased acetylcholinesterase activity in the hippocampus. LEV and CNZP altered the binding of hippocampal muscarinic receptors *in vivo*, reversing the P400-induced downregulation and *in vitro* tests showed changes in hippocampal muscarinic binding by previous incubation with LEV, CNZP or MEL. The binding assays also showed a downregulation of hippocampal D2 receptors in treated animals LEV, CNZP or pretreated with MEL before P400. Analyses to investigate the antioxidant activity of LEV and CNZP and role of antioxidative action of MEL in the protection against seizures propose that the association with vitamin E increased the anticonvulsant effects of all studied drugs. The prior administration of LEV, MEL or CNZP before P400, reversed the increased levels of lipid peroxidation and nitrite-nitrate and normalized the activity of catalase and the physiological levels of the antioxidant glutathione in the hippocampus and / or striatum. According to *in vitro* experiments, increased lipid peroxidation, levels of nitrite-nitrate and catalase activity in brain homogenates subjected to thermal shock were significantly altered by incubation with LEV, CNZP or MEL, where these drugs were able to reduce the levels of MDA, nitrite-nitrate, and also stabilize the activity of catalase, enhancing thus the endogenous antioxidant enzyme activity and the ability to inactivate free radicals. Thus, the study suggests a modulatory action exerted by LEV, CNZP and MEL on the functioning of muscarinic and dopaminergic systems in the central nervous system as an alternative mechanism to protect against seizures in the model P400, and the participation of direct and indirect antioxidant properties of these drugs, through the ability to modify the neuronal response to oxidative stress.

Keywords: Levetiracetam. Clonazepam. Melatonin. Antioxidant. Muscarinic. Pilocarpine. Seizures.

LISTA DE FIGURAS

1	Canais e íons envolvidos com as situações patológicas da convulsão.	24
2	Estrutura molecular do clonazepam.	26
3	Estrutura molecular do levetiracetam.	32
4	Estrutura molecular da melatonina.	36
5	Esquemas representativos da síntese de melatonina pela glândula pineal de mamíferos.	37
6	Vias colinérgicas no sistema nervoso central.	52
7	Principais vias dopaminérgicas no SNC.	54
8	Protocolo experimental de tratamento dos animais.	84
9	Retirada do encéfalo.	87
10	Retirada do hipocampo.	88
11	Retirada do corpo estriado.	88
12	Potencialização da atividade anticonvulsivante de: A. Levetiracetam (LEV 30mg/Kg); B. Clonazepam (CNZP 0,25mg/Kg) e C. Melatonina (MEL 5mg/Kg) pela associação com acetato de tocoferol (Vit.E, 400 U.I.).	111
13	Efeitos do LEV (<i>in vitro</i>) sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo.	117
14	Efeitos do CNZP (<i>in vitro</i>) sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo.	117
15	Efeitos da MEL (<i>in vitro</i>) sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo.	118
16	Efeitos do LEV sobre a atividade da AChE em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.	120
17	Efeitos do CNZP sobre a atividade da AChE em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos durante as convulsões	121

	induzidas por P400.	
18	Efeitos da MEL sobre a atividade da AChE em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.	122
19	Efeitos do LEV sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	128
20	Efeitos do CNZP sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	130
21	Efeitos da MEL sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	132
22	Influência do LEV sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	134
23	Influência do CNZP sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	136
24	Influência da MEL sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	138
25	Ação do LEV sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	140
26	Ação do CNZP sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	142
27	Ação da MEL sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	144
28	Influência do LEV sobre os níveis de GSH em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	146
29	Influência do CNZP sobre os níveis de GSH em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	148
30	Influência da MEL sobre os níveis de GSH em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400.	150

31	Efeitos do levetiracetam (A), clonazepam (B) e melatonina (C) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	153
32	Efeitos do levetiracetam (A) e da melatonina (B) sobre os níveis de nitrito-nitrato em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	155
33	Efeitos do clonazepam sobre os níveis de nitrito-nitrato em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	156
34	Efeitos do levetiracetam (A) e do clonazepam (B) sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	158
35	Efeitos da melatonina sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	159
36	Efeitos do levetiracetam (A), clonazepam (B) e melatonina (C) sobre níveis de GSH (glutationa) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	161

LISTA DE TABELAS

1	Efeitos do LEV nas alterações comportamentais e convulsões induzidas por P400 em camundongos.	106
2	Efeitos do CNZP nas alterações comportamentais e convulsões induzidas por P400 em camundongos.	107
3	Efeitos da MEL nas alterações comportamentais e convulsões induzidas por P400 em camundongos.	108
4	Efeitos de LEV, CNZP e MEL na intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina.	109
5	Efeitos do LEV, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos.	113
6	Efeitos do CNZP, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos.	114
7	Efeitos da MEL, administrada antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos.	115
8	Efeitos do LEV sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos.	124
9	Efeitos do CNZP sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos.	125
10	Efeitos da MEL sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos.	126

LISTA DE QUADROS

1	Classificação das crises epiléticas.	45
2	Precusores e enzimas envolvidas na síntese e na metabolização da acetilcolina (ACh), e metabólitos formados.	49
3	Localização dos receptores muscarínicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e segundos mensageiros.	50
4	Efeitos da estimulação colinérgica sobre os níveis dos segundos mensageiros	51
5	Precusores e enzimas necessárias para a síntese de dopamina (DA), enzimas metabolizadoras e metabólitos formados.	55
6	Localização no Sistema Nervoso Central (SNC) dos receptores dopaminérgicos e segundos mensageiros.	56
7	Modelos experimentais para avaliação de drogas com propriedades anticonvulsivantes.	62
8	Parâmetros comportamentais observados	85
9	Grupos experimentais- Potenciação da atividade protetora da Vitamina E.	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh	- Acetilcolina
AChE	- Acetilcolinesterase
ATC	- Acetiltiocolina
AMPA	- Propionato de α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxale
AMPC	- 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
ANOVA	- Análise de variância
ATP	- Adenosina tri-fosfato
BSA	- Albumina sérica bovina
CNZP	- Clonazepam
COMT	- Catecol-O-metil transferase
DA	- Dopamina
DAE	- Drogas antiepilépticas
DOPAC	- Ácido 3,4 diidroxifenilacético
EEG	- Eletroencefalograma
EPM	- Erro padrão da média
EROS	- Espécies reativas do oxigênio
GABA	- Ácido γ -amino butírico
GABA-T	- GABA transaminase
GSH	- Glutathiona reduzida
GSH-Px	- Glutathiona peroxidase
H₂O₂	- Peróxido de hidrogênio
[³H]-NMS	- [³ H] N-metil escopolamina
HVA	- Ácido homovanílico
KW-6002	- Istradefilina
L-DOPA	- L-3,4-dihidroxifenilalanina
LEV	- Levetiracetam
LOO[•]	- Radical Peroxil
LTP	- Potenciação a longo prazo
MAO	- Monoamina oxidase
MDA	- Malonildialdeído
MEL	- Melatonina
NA	- Noradrenalina
NE	- Norepinefrina
NMDA	- N-metil-D-aspartato
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NSQ	- Núcleo supraquiasmático
•OH	- Radical hidroxila
ONOO-	- Peroxinitrito
Oxo	- Oxotremorina
P400	- Pilocarpina, 400mg/Kg
PKC	- Proteína quinase C
SNC	- Sistema Nervoso Central
SOD	- Superóxido dismutase

- TBA** - Ácido tiobarbitúrico
- TBARS** - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- Vit. E** - Vitamina E ou acetato de tocoferol

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	21
1 Considerações gerais	21
2 Drogas Antiepilépticas	23
2.1 Clonazepam	25
2.1.1 Descrição	26
2.1.2 Farmacocinética	26
2.1.3 Eficácia	27
2.1.4 Indicações	28
3 Novos compostos com atividade antiepiléptica	28
3.1 Levetiracetam	29
3.1.1 Descrição	32
3.1.2 Farmacocinética	33
3.1.3 Eficácia	33
3.1.4 Tolerabilidade	34
3.1.5 Outras indicações	35
3.2 Melatonina	35
3.2.1 Metabolismo	38
3.2.2 Mecanismos de Ação	38
4 Epilepsia	42
4.1 Classificação das Crises Epilépticas	42
4.1.1 Crises epilépticas parciais	43
4.1.2 Crises epilépticas generalizadas	43
4.1.3 Síndromes epilépticas	46
4.2 Fisiopatologia da epilepsia	47
4.2.1 O sistema colinérgico muscarínico e a epilepsia	48
4.2.2 O sistema dopaminérgico e a epilepsia	52
4.2.3 Outros neurotransmissores	57
4.2.4 Aspectos genéticos	59
4.3 Modelos experimentais de epilepsia:	59

4.3.1 Modelo colinérgico de convulsão	64
4.4 As áreas cerebrais e o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina	68
5 Espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e a epilepsia	69
5.1 Radicais livres e “espécies reativas de oxigênio” e mecanismos de defesa antioxidante	69
5.2 Estresse oxidativo e epilepsia	75
6 Relevância e Justificativa	76
II OBJETIVOS	79
III MATERIAL E MÉTODOS	81
1 Equipamentos utilizados nos experimentos	81
2 Animais	82
3 Preparação das drogas	82
3.1 Levetiracetam	82
3.2 Clonazepam	82
3.3 Melatonina	82
3.4 Pilocarpina	83
3.5 Oxotremorina	83
3.6 Atropina	83
3.7 Vitamina E	83
4 Tratamento dos grupos experimentais	83
4.1 Curva dose-resposta para as drogas em estudo	83
4.1.1 Estudo comportamental- Avaliação das alterações comportamentais após indução de convulsões e estado epiléptico pela administração de pilocarpina.	84
4.2 Estudo da potencialização da atividade antioxidante do acetato de tocoferol (Vit. E)	85
4.3 Teste dos tremores induzidos por oxotremorina (avaliação dos efeitos colinérgicos):	86
5 Dissecção das áreas cerebrais em estudo	86
6 Determinação da densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -, M_1 - e M_2 - símile)	89
7 Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos (D_1 - e D_2 - símile)	91

8 Dosagem de proteína	95
9 Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE)	96
10 Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)	97
11 Determinação da produção de nitrito	99
12 Determinação da atividade enzimática da Catalase	100
13 Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)	101
14 Avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> em modelo de estresse oxidativo por choque térmico.	103
15 Análise estatística	103
IV RESULTADOS	104
1 Estudo comportamental	106
1.1 Alterações comportamentais induzidas por pilocarpina em camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam (LEV), clonazepam (CNZP) ou melatonina (MEL).	104
1.2 Efeitos do pré-tratamento com LEV, CNZP e MEL nos tremores induzidos por oxotremorina	109
1.3 Efeitos da associação LEV, CNZP ou MEL com Acetato de tocoferol (Vit.E) sobre as convulsões induzidas por pilocarpina.	110
2 Efeitos de LEV, CNZP E MEL sobre o sistema colinérgico muscarínico	112
2.1 Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -, M_1 -, M_2 - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV e administrados ou não com pilocarpina.	112
2.2 Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -, M_1 -, M_2 - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com CNZP e administrados ou não com pilocarpina.	114
2.3 Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com MEL e administrados ou não com pilocarpina.	115
2.4 Ensaios de binding <i>in vitro</i> . Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -símile) em homogenatos de hipocampo de camundongos pré-incubados com LEV,	116

CNZP ou MEL.

2.5 Efeitos de LEV, CNZP E MEL sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	119
3 Efeitos de LEV, CNZP E MEL sobre o sistema dopaminérgico	123
3.1 Densidade de receptores dopaminérgicos (D ₁ - e D ₂ - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV e administrados ou não com pilocarpina.	123
3.2 Densidade de receptores dopaminérgicos (D ₁ - e D ₂ - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com CNZP e administrados ou não com pilocarpina.	125
3.3 Densidade de receptores dopaminérgicos (D ₁ - e D ₂ - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com MEL e administrados ou não com pilocarpina.	126
4 Efeitos antioxidantes do pré-tratamento com LEV, CNZP E MEL no modelo de convulsões induzidas por P400.	127
4.1 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no modelo de P400.	127
4.1.1 Efeitos do LEV sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	127
4.1.2 Efeitos do CNZP sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	129
4.1.3 Efeitos da MEL sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	131
4.2 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a produção de nitrito-nitrato no modelo de P400.	133
4.2.1 Efeitos do LEV sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	133
4.2.2 Efeitos do CNZP sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo	135

estriado de camundongos tratados ou não com P400.	
4.2.3 Efeitos da MEL sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	137
4.3 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a atividade da catalase no modelo de P400.	139
4.3.1 Efeitos do LEV sobre a atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	139
4.3.2 Efeitos do CNZP sobre a atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	141
4.3.3 Efeitos da MEL sobre a atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.	143
4.4 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no modelo de P400.	145
4.4.1 Efeitos do LEV sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) após a administração de P400 em hipocampo e corpo estriado de camundongos.	145
4.4.2 Efeitos do CNZP sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) após a administração de P400 em hipocampo e corpo estriado de camundongos.	147
4.4.3 Efeitos da MEL sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) após a administração de P400 em hipocampo e corpo estriado de camundongos.	149
5 Avaliação da capacidade antioxidante de LEV, CNZP E mel em modelo de estresse oxidativo induzido por choque térmico (<i>in vitro</i>).	151
5.1 Efeitos do LEV, CNZP e MEL sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	152
5.2 Influência do LEV, CNZP e MEL sobre os níveis de nitrito em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	154
5.3 Efeitos do LEV, CNZP e MEL sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	157
5.4 Efeitos do LEV, CNZP e MEL sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.	160
V DISCUSSÃO	162

VI CONCLUSÕES	189
VII REFERÊNCIAS	192

I INTRODUÇÃO

1 Considerações gerais

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos mais comuns e apresenta uma prevalência em torno 0,5-1% da população mundial (HACHINSKI, 1998) e uma incidência cumulativa para toda a vida em cerca de 3- 4% (BROWNE; HOLMES, 2001). A incidência e a prevalência da epilepsia são mais elevadas nos países da América Latina em relação aos países do hemisfério Norte. Estima-se que, no Brasil, cerca de três milhões de pessoas apresentem alguma forma de epilepsia e, aproximadamente, cem mil novos casos somam-se a cada ano (BURNEO *et al.*, 2005). Caracteriza-se por alterações crônicas, recorrentes e paroxísticas na função neuronal, decorrentes de anormalidade na atividade elétrica cerebral. A disfunção neurológica na sua fase aguda é chamada de crise epiléptica, e pode se manifestar através de alterações sensitivas, emocionais ou cognitivas (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2007).

Dentre os eventos que acompanham os quadros de epilepsia, o mais dramático é a convulsão, estando associado à atividade hipersincrônica e repetitiva de um grupamento neuronal do córtex cerebral e estruturas hipocâmpais, cuja distribuição anatômica e duração da atividade determinam a natureza da crise (AVANZINI; FRANCESCHETTI, 2003). Os mecanismos envolvidos no aparecimento desta atividade elétrica exacerbada são bastante variados, podendo ser deflagrados de diferentes maneiras, o que torna o estudo desta doença extremamente difícil.

As causas de epilepsia compreendem a predisposição genética, lesões cerebrais, intoxicação e tumores. Estimativas indicam que mais de 80% das pessoas com epilepsia vivem em países em desenvolvimento, onde há mais desnutrição, doenças infecciosas e deficiência no atendimento médico, e grande número de pacientes pode permanecer sem tratamento (OMS, 2001). Nesses países, 60 a 90% das pessoas com epilepsia permanecem sem tratamento adequado, devido às deficiências do sistema de saúde e ao estigma social, prejudicando seriamente a qualidade de vida do epiléptico (BEAGLEHOLE *et al.*, 1996). Além disso, a refratariedade ao tratamento farmacológico é elevada na epilepsia. Somente 25 a 45% das

pessoas que recebem tratamento para epilepsia estão completamente livres de crises após 12 meses de tratamento (MATTSON *et al.*, 1992).

Pelo menos 50% dos casos de epilepsia começam na infância ou adolescência, pelo aumento na vulnerabilidade a infecções do sistema nervoso central (meningite), acidentes (traumatismos do crânio) e doenças como sarampo, varicela e caxumba, cujas complicações podem causar crises epiléticas. O problema também poderá se manifestar com o envelhecimento e suas complicações vasculares (LEONARD *et al.*, 1994). Se um episódio convulsivo inicial contribui para o desenvolvimento da epilepsia, o tratamento após a primeira convulsão pode ser um fator de extrema importância para redução deste risco (MUSICCO *et al.*, 1997; FUCHS *et al.*, 2004).

O tratamento com drogas antiepiléticas é base da terapêutica da epilepsia. A decisão de iniciar uma terapia com anticonvulsivantes é tomada apenas quando os riscos de novas convulsões superam os riscos do tratamento (SIRVEN, 2002). A farmacoresistência e um número considerável de reações adversas dificultam o tratamento, deixando uma grande parcela de portadores da doença sem um tratamento adequado (MELDRUM; ROGAWSKI, 2007).

Um paciente com epilepsia deve iniciar o tratamento em monoterapia, com droga escolhida para atuar de acordo com o tipo de crise principal, levando também em consideração o mecanismo de ação da droga, seu perfil de efeitos adversos, bem como as características do paciente em questão, como a idade e co-morbidades. No entanto, aproximadamente, apenas a metade a dois terços dos pacientes responde, inicialmente, à monoterapia (KWAN; BRODIE, 2000). Se a substituição do fármaco por outro, com mecanismo distinto, não produz resultados, novos fármacos são adicionados a terapia. A triste realidade da prática clínica demonstra que a boa parte dos pacientes é tratada com dois ou mais fármacos simultaneamente (politerapia), resultando em mais efeitos adversos e colaterais (PELTOLA *et al.*, 2008).

2 Drogas Antiepilépticas

Apesar do importante progresso na compreensão das crises convulsivas nas últimas décadas, as bases celulares da epilepsia no homem permanecem ainda desconhecidas. O tratamento convencional das crises convulsivas é realizado, principalmente, pelo uso clínico de drogas antiepilépticas (DAE). Uma DAE pode ser definida como uma substância que quando administrada pode, por um determinado período, diminuir a incidência ou severidade das convulsões que acometem pacientes epiléticos (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006).

Atualmente, existe um vasto arsenal de DAE utilizado na clínica, entretanto, cerca de 30% dos pacientes não consegue ter um tratamento adequado com esses fármacos e, além disso, seu uso prolongado carrega um risco considerável de morbidade (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002). As DAE de primeira (fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, diazepam e valproato de sódio), segunda (lamotrigina, vigabatrina, tiagabina, topiramato, gabapentina e levetiracetam) e terceira geração foram, inicialmente, estudadas em modelos animais. Estes estudos permitem avaliar os efeitos dessas drogas em tipos específicos de convulsão, bem como os mecanismos controladores do aparecimento dessas convulsões (SMITH *et al.*, 2007).

A descoberta do fenobarbital em 1912 marcou o início da farmacoterapia moderna da epilepsia. Nos anos seguintes, fenitoína, carbamazepina, valproato de sódio e uma série de benzodiazepínicos tornaram-se disponíveis e efetivaram-se como drogas antiepilépticas consagradas (BRODIE; DICHTER, 1996).

Embora os mecanismos de ação das drogas antiepilépticas comercializadas atualmente ainda não sejam completamente entendidos, de modo geral, envolvem alteração no balanço entre excitação e inibição neuronais (WHITE, 1999). A nível celular, são conhecidos três mecanismos básicos: modulação de canais iônicos dependentes de voltagem (Na^+ , Ca^{++} , K^+); aumento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA; e atenuação da neurotransmissão excitatória, particularmente a mediada pelo glutamato (**Figura 1**) (MELDRUM, 1996).

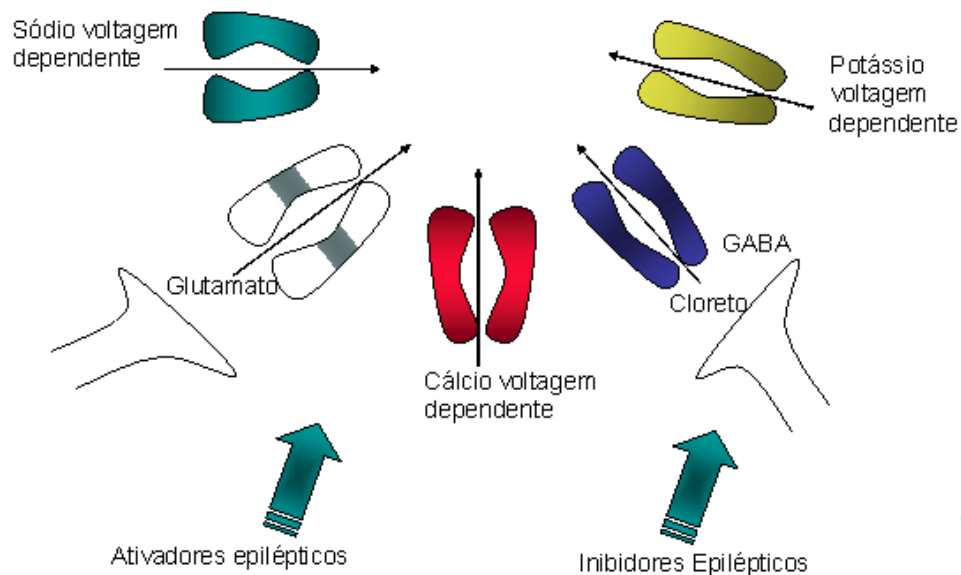


Figura 1. Canais e íons envolvidos com as situações patológicas da convulsão.

Fonte: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=6&materia_id=89&materiaver=1

Mais de 50 benzodiazepínicos quimicamente distintos são comercializados ao redor do mundo. Diazepam, lorazepam, clobazam e clonazepam são os mais comumente utilizados como antiepilépticos (BRODIE; DICHTER, 1996) e possuem um amplo espectro de atividade clínica, com eficácia em crises epilépticas parciais e generalizadas e para tratamento agudo do estado epiléptico (TREIMAN *et al.*, 1998). Os benzodiazepínicos ligam-se a um sítio específico no cérebro, a subunidade alfa do receptor GABA_A, facilitando abertura dos canais de Cl⁻ (STUDY; BARKER, 1981). Ao contrário dos barbitúricos, os benzodiazepínicos não são capazes de ativar diretamente o receptor GABA_A na ausência de GABA (WHITE, 1999).

Os benzodiazepínicos apresentam eficácia antiepiléptica em diversos modelos animais de epilepsia, inclusive nos modelos de eletrochoque máximo (MES), convulsões induzidas por pentilenotetrazol e modelos de abrasamento (*kindling*). Já demonstraram eficácia em convulsões parciais e generalizadas em humanos, inclusive nas crises tônico-clônicas, de ausência e mioclônicas, todavia, o desenvolvimento de tolerância aos seus efeitos farmacológicos tem

restringido seu uso em regimes crônicos de tratamento (BRODIE; DICHTER, 1996; LÖSCHER, 2002).

2.1 Clonazepam

O clonazepam (CNZP) é um modulador positivo do receptor GABA_A, que potencializa a ação inibitória do GABA na atividade neural, através de interações com sítios receptores específicos. Estes sítios são estruturas moleculares complexas e reguladoras dos receptores GABA_A, que é um receptor ionotrópico, cuja ativação aumenta a condutância do íon cloreto na membrana, elevando o limiar para o potencial de ação celular (BOWERY, 1989). Estes receptores possuem cinco subunidades, e sua função varia dependendo de sua constituição, a partir da combinação destas subunidades, e sua localização no SNC (RUDOLPH; MOHLER, 2006).

Agonistas da subunidade α_1 dos receptores GABA_A medeiam a sedação, e portanto, esses sítios são alvos para hipnóticos. Agonistas seletivos para as subunidades α_2 e α_3 podem ser ansiolíticos, sem provocar sedação, o que ocorre inversamente para agonistas α_5 . Agonistas seletivos para a subunidade α_3 podem ser úteis no tratamento de déficits motores presentes em doenças psiquiátricas. (RUDOLPH; MOHLER, 2006).

CNZP atua no receptor GABA_A através de sua interação com a subunidade alfa de forma inespecífica, provocando, assim, efeitos sedativos e ansiolíticos. Como os demais benzodiazepínicos, suas interações medicamentosas incluem o ácido valpróico, o qual pode potencializar seu efeito hipnótico, produzindo estado de ausência em alguns pacientes. Além disso, a carbamazepina, por ser indutora do sistema microsomal hepático, aumenta sua biotransformação, acarretando diminuição dos níveis séricos de CNZP (NARDI; PERNA, 2006).

Sua atividade antidepressiva ainda não está bem estudada. A vantagem no emprego do CNZP estaria no fato do mesmo possuir apenas um metabólito ativo e ser menos tóxico nos seus efeitos, uma vez que atua somente em receptores centrais. Sua indicação como antidepressivo conta com a vantagem de sua meia-vida elevada, que facilita a interrupção do tratamento, em

caso de aparecimento de efeitos colaterais (NARDI e PERNA, 2006). É utilizado em combinação com inibidores da recaptação da serotonina em pacientes com depressão. (MORISHITA, 2004).

2.1.1 Descrição

O CNZP (**Figura 2**) é um derivado 7-nitro-benzodiazepínico, com fórmula química 5-(2-clorofenil)-1,3-dihidro-7-nitro-2H-1,4-benzodiazepino-2-ona. Foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) em 1976, para uso como droga antiepiléptica. É comercializado no Brasil em duas formas farmacêuticas: comprimido (2mg) e solução oral (2,5mg/mL), com nome comercial de Rivotril[®] (Roche). Possui como principal propriedade uma inibição de várias funções do sistema nervoso, permitindo uma ação anticonvulsivante, leve sedação, relaxamento muscular e efeito tranqüilizante. Em estudos feitos em animais CNZP foi capaz de inibir crises convulsivas de diferentes tipos, tanto por agir diretamente sobre o foco epiléptico como por impedir que este interfira na função do restante do sistema nervoso (ROCHE, 2010).

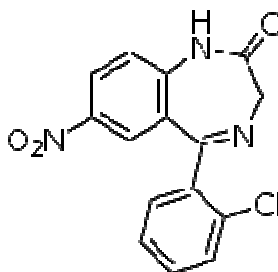


Figura 2. Estrutura molecular do clonazepam (Fonte: Turski *et al*, 1987).

2.1.2 Farmacocinética

CNZP é quase completamente absorvido após administração oral. A biodisponibilidade absoluta dos comprimidos é maior do que 90%. Concentrações plasmáticas máximas são alcançadas em 2-3 horas após a administração oral. É eliminado por biotransformação, com a eliminação subsequente de metabólitos na urina e bile. Menos de 2% do CNZP inalterados são excretados na urina. Os citocromos P-450 da família 3A desempenham um importante papel no

metabolismo de CNZP. A meia-vida de eliminação é de 33 a 40 horas. A ligação às proteínas plasmáticas é de 82% a 88%. A farmacocinética do CNZP é dose-independente (ROCHE, 2010).

Em estudo de fase III, as variáveis cinéticas do CNZP foram determinadas em voluntários saudáveis. A meia-vida de absorção foi de 24 minutos, a meia-vida de eliminação foi de 40 horas e o clearance foi de 72 mL/minuto, demonstrando que esta via de administração é bem efetiva (GREENBLATT *et al.*, 2005).

Este fármaco sofre biotransformação hepática em cinco metabólitos já identificados, e a rota bioquímica de sua transformação ocorre em duas etapas. Na primeira, o grupo nitro sofre redução, produzindo o metabólito ativo 7-aminoclonazepam. Na segunda fase, o metabólito é acetilado em diferentes posições e, posteriormente, eliminado na urina. Possui meia-vida plasmática que varia de 32 a 38 horas (KOROLKOVAS, 2004).

Devido à eficácia do CNZP no tratamento de convulsões generalizadas, novas formas farmacêuticas estão sendo desenvolvidas. Por exemplo, estudos em modelos animais com micro emulsões para uso intranasal demonstraram ser maior e mais rápida a disponibilidade no sistema nervoso central em relação à administração intravenosa (VYAS *et al.*, 2006).

2.1.3 Eficácia

CZP demonstra maior eficácia em convulsões mioclônicas e crises de ausência generalizadas, além do uso como adjuvante nas crises tônico-clônicas generalizadas. Em alguns pacientes com crises tônico-clônicas, podem ser exacerbadas, assim como na epilepsia mioclônica juvenil (OBEID *et al.*, 1999).

CNZP é utilizado como anticonvulsivante e no tratamento de distúrbios neurológicos, como mioclonias, tremor cerebelar, espasmo facial, acatisia induzida por neurolépticos, na síndrome de pernas inquietas e na síndrome da boca ardente. Também possui indicação clínica no tratamento de transtornos do humor, como o transtorno afetivo bipolar, a depressão maior e o transtorno do pânico (MC NAMARA, 2001).

Atualmente, o CNZP tem sido utilizado no tratamento do bruxismo. Estudo controlado com placebo demonstrou que a administração aguda de CNZP melhorou os sintomas do bruxismo, assim como a qualidade do sono dos pacientes submetidos ao protocolo (SALETU *et al.*, 2005). Outra aplicação na área de odontologia é como alternativa a carbamazepina na neuralgia do trigêmeo ou em associação com outras drogas para esta mesma doença (SINDRUP; JENSEN, 2002). O CNZP também se mostrou útil no tratamento da dor neuropática, sozinho ou em associação com outros anticonvulsivantes (COVINGTON, 1998).

2.1.4 Indicações

Está indicado isoladamente ou como adjuvante no tratamento das crises epiléticas mioclônicas, acinéticas, ausências típicas (pequeno mal), ausências atípicas (síndrome de Lennox-Gastaut). Como droga de segunda linha em espasmos infantis (Síndrome de West). Em crises epiléticas clônicas (grande mal), parciais simples, parciais complexas e tônico-clônico generalizadas secundárias, está indicado como tratamento de terceira linha.

No tratamento dos transtornos de ansiedade. Como ansiolítico em geral. Para distúrbio do pânico com ou sem agorafobia; transtornos do humor; transtorno afetivo bipolar; tratamento da mania; depressão maior; como coadjuvante de antidepressivos (depressão ansiosa e na fase inicial de tratamento); em síndromes psicóticas. No tratamento da acatisia e outros (ROCHE, 2010).

3 Novos compostos com atividade antiepilética

Apesar do indiscutível benefício da expansão do arsenal farmacológico para o tratamento da epilepsia, esta pode, todavia, dificultar a escolha do fármaco (ou associação farmacológica) mais adequado para cada paciente, individualmente. Considerando a experiência clínica limitada com esses novos agentes, o conhecimento preciso sobre o mecanismo de ação de cada um deles pode ser um importante critério no processo de escolha da terapia adequada (KWAN; BRODIE, 2000).

3.1 Levetiracetam

O levetiracetam (LEV) é uma nova droga antiepiléptica, aprovada pelo FDA em dezembro de 1999, análogo do piracetam e cuja estrutura e mecanismo de ação difere das outras drogas de mesma classe terapêutica. Está disponível na Europa há muitos anos. Apresenta baixo potencial de interação com outras drogas e reduz efetivamente as convulsões parciais em pacientes com epilepsia (MENACHEM *et al.*, 2003). Estudos recentes mostraram que, pela boa tolerabilidade e eficácia, LEV pode ser particularmente útil no tratamento de pacientes que não respondem ao tratamento com outros agentes antiepilépticos (HOVINGA, 2001).

Observações experimentais demonstram que LEV oferece potente proteção contra convulsões epilépticas numa variedade de modelos animais de epilepsia crônica, inclusive os de crises induzidas pela pilocarpina e cainato, bem como em ratos desprovidos de amígdala. Esta variação indica que esta droga tem grande potencial de eficácia tanto em crises parciais quanto nas generalizadas. Interessantemente, LEV não demonstrou eficácia em dois modelos animais padronizados para triagem de drogas antiepilépticas: o eletrochoque máximo e o modelo com pentilenotetrazol (LÖSCHER; HÖNACK, 1993).

Embora tenha se mostrado destituído de atividade anticonvulsivante em dois modelos animais clássicos para estudo de drogas antiepilépticas (convulsões induzidas por eletrochoque máximo ou por pentilenotetrazol em roedores) (LÖSCHER; HÖNACK, 1993), LEV exerce atividade anticonvulsivante, com alto índice terapêutico, em vários modelos animais de epilepsia, incluindo convulsões induzidas por ácido caínico ou pilocarpina em camundongos e ratos; modelos genéticos de epilepsia; e epilepsia induzida por *kindling*, que podem refletir os processos patológicos subjacentes a epilepsias parcial crônica e primária generalizada em humanos, sugerindo um amplo espectro de ação (LÖSCHER *et al.*, 1998, 2000; KLITGAARD, 1998, 2001, 2003; GLIEN *et al.*, 2002; MOTAMEDDI *et al.*, 2003).

Mesmo com extensas investigações experimentais e clínicas, objetivando identificar o mecanismo através do qual LEV exerce seus efeitos anticonvulsivantes, seu mecanismo preciso de ação permanece não esclarecido. Sabe-se, no entanto, que sua ação não parece estar ligada a

nenhum dos principais mecanismos conhecidos para drogas antiepilépticas convencionais (MARINI *et al.*, 2004).

LEV não exerce nenhum tipo de efeito convencional sobre o sistema GABAérgico, embora exerça efeito anticonvulsivo em alguns modelos de convulsão que, sabidamente, envolvem alterações nesse sistema (FRAZER *et al.*, 1997; SILLS *et al.*, 1997; RIGO *et al.*, 2000). Alguns achados indicam que não interfere na síntese ou metabolismo do GABA nem nas concentrações cerebrais de GABA, glutamato ou glutamina e não está relacionado à modulação neuronal dos canais de Na⁺ voltagem-dependentes ou canais de Ca²⁺ ativados por baixa voltagem (tipo T) (SILLS *et al.*, 1997; ZONA *et al.*, 2001).

Estudos demonstraram que LEV reduz a atividade dos canais de Ca²⁺ ativados por alta voltagem no hipocampo (NIESPODZIANY *et al.*, 2001), exerce um bloqueio seletivo dos canais de cálcio tipo N (LUKYANETZ *et al.*, 2002), retarda as correntes de K⁺ nos neurônios hipocampais (MADEJA *et al.*, 2003) e se liga especificamente a proteína 2A das vesículas sinápticas (SV2A), alterando a exocitose de neurotransmissores na fenda sináptica (FUKS *et al.*, 2003; LYNCH *et al.*, 2004). Segundo Klitgaard (2003) LEV pode neutralizar alterações induzidas por convulsões nas concentrações de aminoácidos e suprimir a sincronização do pico neuronal e explosão da atividade elétrica no hipocampo de ratos, sem afetar a excitabilidade neuronal normal.

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

Em estudos prévios acerca do mecanismo de ação de LEV, relatamos sua capacidade de induzir alterações na densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos, sugerindo uma atenuação da atividade convulsiva mediada pelos receptores M_1 , através da sua ação sobre os receptores inibitórios M_2 , no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos, fornecendo indícios de um novo mecanismo de ação atenuante do processo convulsivo (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

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

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

3.1.1 Descrição

O LEV (Keppra[®]) é uma nova droga antiepiléptica, quimicamente relacionada ao piracetam (um agente nootrópico) (**Figura 3**). Enquanto piracetam e outras drogas que melhoram a função cognitiva apresentam pouca ou nenhuma atividade anticonvulsivante, LEV apresenta grande eficácia na terapia adicional das convulsões parciais, com ou sem generalização secundária e foi aprovado para o tratamento dessas convulsões em adultos com epilepsia (CEREGHINO *et al.*, 2000; SHORVON *et al.*, 2000; HOVINGA, 2001; NASH; SANGHA, 2001; BIALER *et al.*, 2004).

Em abril de 2000, os Estados Unidos da América (EUA) tornaram-se o primeiro país a aprovar o LEV para o tratamento das convulsões parciais, seguido pela Suíça, em maio de 2000. Em setembro de 2000, a Comissão Europeia (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) autorizou a introdução do LEV no mercado de toda a União Européia, com base nas evidências de adequadas eficácia e segurança, apresentadas pelo Comitê das Especialidades Farmacêuticas em junho do mesmo ano. LEV atualmente está disponível em 46 países, incluindo Argentina, Áustria, Bélgica, Bulgária, República Tcheca, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Hong-Kong, Irlanda, Itália, Luxemburgo, México, Holanda, Noruega, Polônia, Singapura, África do Sul, Espanha, Suécia, Suíça, Reino Unido, Estados Unidos e Canadá (MENACHEM *et al.*, 2003). Estudos recentes mostraram que, pela boa tolerabilidade e eficácia, LEV pode ser particularmente útil no tratamento de pacientes que não respondem ao tratamento com outros agentes antiepilépticos (HOVINGA, 2001).

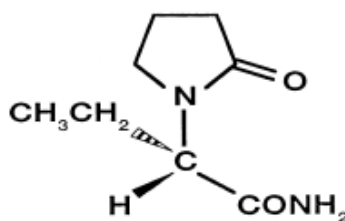


Figura 3. Estrutura molecular do levetiracetam (Fonte: Bialer *et al.*, 2004).

3.1.2 Farmacocinética

É rapidamente e quase completamente absorvido após administração oral, com picos de concentração plasmática após aproximadamente 1 hora. A biodisponibilidade oral não é afetada pela alimentação, liga-se fracamente às proteínas plasmáticas (menos de 10%) e seu volume de distribuição é próximo ao volume dos líquidos intra e extracelulares. Tem características farmacocinéticas favoráveis (boa biodisponibilidade, farmacocinética linear, baixa ligação às proteínas plasmáticas) e baixo potencial de interação com outras drogas antiepilépticas (fenitoína, carbamazepina, ácido valpróico, fenobarbital, lamotrigina, gabapentina, primidona), não sendo necessário o ajuste da dosagem de LEV de acordo com a medicação concomitantemente prescrita para tratamento da epilepsia (PERUCCA *et al.*, 2003). Do LEV administrado oralmente, 66% são excretados inalterados na urina. A principal via metabólica envolve hidrólise do grupo acetamida e não depende da enzima citocromo P450 hepática (COUPEZ *et al.*, 2003). Os metabólitos não têm atividade farmacológica conhecida e são excretados pelos rins. A meia-vida plasmática é de aproximadamente 6-8h. Os aspectos farmacocinéticos do LEV têm se mostrado constantes e, independente da dose administrada, semelhantes aos observados em estudos previamente conduzidos em voluntários saudáveis e em pacientes com epilepsia (PERUCCA *et al.*, 2003).

3.1.3 Eficácia

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

Os dados de eficácia que resultaram na autorização da comercialização do LEV vêm sendo confirmados em diversos estudos e ensaios clínicos. De todos os pacientes que estavam em monoterapia com outro fármaco antiepiléptico antes da adição de LEV, 19,8% tornaram-se livres das convulsões após sua introdução no esquema posológico por, pelo menos, seis meses

(MENACHEM *et al.*, 2003). De todos os pacientes (1422), 65% tornaram-se totalmente livres das convulsões desde o primeiro até o último dia de tratamento ou final dos ensaios. A duração média do período sem convulsões foi 385 dias. A melhora na qualidade de vida (medida por QOLIE-31) se manteve estável por um longo prazo, após tratamentos com duração de, em média, mais de quatro anos (CRAMER *et al.*, 2003).

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

Um estudo prospectivo forneceu evidências preliminares da eficácia do LEV na população pediátrica contra diferentes tipos de convulsão, com 47% dos pacientes mostrando uma redução na frequência das convulsões de mais de 50%. LEV foi iniciado na dose de 10 mg/Kg/dia, sendo aumentada a cada 4 dias até uma dose máxima de 60 mg/Kg/dia (LAGAE *et al.*, 2003). Um estudo sugere, ainda, que LEV possui eficácia no tratamento de pacientes com epilepsia idiopática generalizada (KRAUSS *et al.*, 2003).

3.1.4 Tolerabilidade

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

Os efeitos colaterais mais frequentemente observados estão relacionados à ação central: astenia, sonolência e tonturas (EMEA, 2001). Estudos em modelos experimentais e estudos

clínicos demonstraram que, ao contrário da maior parte das drogas antiepilépticas, LEV não exerce impacto negativo na função cognitiva (aprendizado) e na memória, mesmo em doses superiores às necessárias para ação anticonvulsivante (LAMBERTY *et al.*, 2000).

3.1.5 Outras indicações

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

3.2 Melatonina

Em 1958, Aaron Lerner e colaboradores isolaram de glândulas pineais bovinas uma substância que alterava a cor da pele de anfíbios. O nome melatonina descreve a atividade sobre melanóforos dermais (mela- melanóforos) e o produto que inicia a via biossintética (tonina – serotonina) (LERNER *et al.*, 1958). Esta é uma molécula altamente conservada ao longo da cadeia evolutiva, apresentando funções decorrentes de sua produção noturna em todos os grupos de seres vivos, desde organismos unicelulares até o homem e seu estudo tem tido um crescimento exponencial (ARENDRT, 2007). Nos últimos 20 anos, efeitos da melatonina não relacionados à ritmicidade do organismo têm sido descritos, bem como a produção extra-pineal desta indolamina (MARKUS *et al.*, 2007).

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MEL) (**Figura 4**) é um produto do metabolismo da serotonina, que é produzido por um número limitado de órgãos nos mamíferos, incluindo a glândula pineal, retina e o trato gastrointestinal. Secretada pela glândula pineal durante a noite, é responsável pela sincronia entre o sistema circadiano e o ciclo ambiental claro-escuro (REITER, 1991; VANECEK, 1998). Além disso, parece exercer um importante papel em muitos processos comportamentais, incluindo aqueles relacionados às propriedades ansiolítica, sedativo-

hipnótica e anticonvulsivante (GREEN *et al.*, 1982; SUDGEN, 1983; 1995; GOLOMBECK *et al.*, 1992 a, b; 1993; BOROWICZ *et al.*, 1999; KOOP *et al.*, 2000).

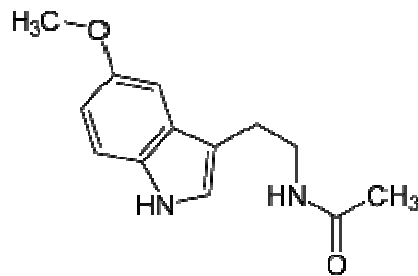


Figura 4. Estrutura molecular da melatonina (Fonte: Caniato *et al.*, 2003).

A síntese da MEL é controlada pelo núcleo supraquiasmático (NSQ), situado no hipotálamo, que constitui o relógio biológico mestre no organismo dos mamíferos. As fibras nervosas da retina captam a luminosidade do ambiente e transmitem essa informação para o NSQ. Durante o dia, a síntese de MEL, bem como o fluxo da atividade simpática, está reduzida. No momento em que escurece, ocorre a ativação simpática e liberação de noradrenalina que, através dos receptores β -adrenérgicos nos pinealócitos, ativa a proteína cinase A, que aumenta a síntese de adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Este por sua vez, ativa a N-acetiltransferase que catalisa a síntese da MEL (**Figura 5**).

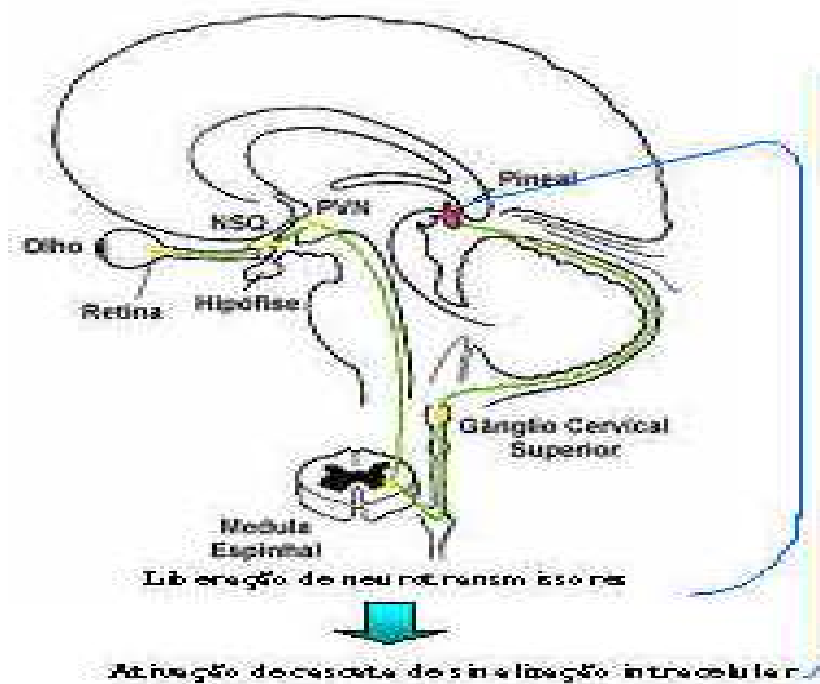
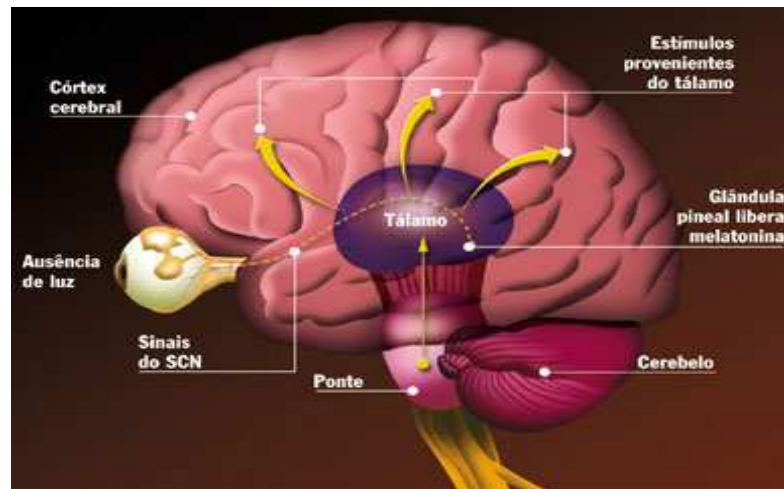


Figura 5. Esquemas representativos da síntese de melatonina pela glândula pineal de mamíferos. Situado na parte anterior do hipotálamo, o núcleo supraquiasmático (NSQ) funciona como relógio biológico. Na ausência de luminosidade, ele envia sinais para a glândula pineal, que passa a liberar a melatonina para o cérebro. Esses sinais são bloqueados quando o nervo óptico é estimulado por luz e, então, não ocorre produção do hormônio. Fibras pré-ganglionares simpáticas projetam-se sobre o gânglio cervical superior, que, por sua vez, projeta-se sobre a pineal. Os neurotransmissores simpáticos (noradrenalina e ATP) participam da síntese de melatonina.

Fonte: www.crono.icb.usp.br/glandp4.jpg

3.2.1 Metabolismo

Uma vez sintetizada na glândula pineal, a MEL é rapidamente liberada no sistema vascular, atingindo outros fluidos corporais tais como saliva, líquidos cerebrospinal, seminal, amniótico, etc. A rápida difusão da MEL está ligada à sua propriedade de ser uma molécula altamente lipofílica, passando através das membranas dos pinealócitos e das células endoteliais que recobrem os capilares. Após pinealectomia, os níveis plasmáticos de MEL não são detectáveis, mostrando que a produção pela pineal é responsável pela manutenção das concentrações plasmáticas desse hormônio (REITER, 1995).

As duas principais vias de metabolização da MEL ocorrem no fígado e no cérebro, apenas 1% da MEL é excretada inalterada na urina. A maior parte é metabolizada no fígado, por hidroxilação, formando 6-hidroximelatonina; esta é então conjugada com sulfato ou glicuronato e excretada na urina, sendo mais comum a forma sulfatada. No cérebro, MEL pode ser convertida a N-gama-acetil-N-2-formilmetoxiquinurenamina, que é, então, degradada à N-gama-acetil-5-metoxiquinurenamina. Outras vias menos importantes são a sua desmetilação, formando então a N-acetilserotonina, que é o próprio precursor da MEL nas estruturas que possuem a enzima N-acetiltransferase, e a formação de 2-hidroximelatonina cíclica, ocorrendo em várias células (REITER, 1995).

O metabolismo resulta em uma rápida cinética de eliminação. Em humanos a eliminação ocorre em duas fases: a primeira com meia vida de 3 minutos e a segunda de 45 minutos. A ação fisiológica dos metabólitos da MEL ainda não está determinada, mas, sabe-se que a N-acetilserotonina possui alta afinidade por um dos subtipos de receptores de membrana da MEL (MARKUS; LOPES, 1998).

3.2.2 Mecanismos de Ação

Quando liberada de forma rápida e passiva na corrente sanguínea, MEL pode afetar o funcionamento de células neurais através de, pelo menos, três mecanismos:

- Ativação de receptores específicos acoplados à proteína G;
- Ação antioxidante, incluindo: eliminação dos radicais livres hidroxila (OH•) e peroxinitrito (ONOO-); ativação de enzimas antioxidantes; e inibição da nNOS em neurônios cerebelares e hipocámpais de ratos e
- Ação antiinflamatória, inibindo a adesão e o rolamento de leucócitos .

Embora possua reconhecidas funções hormonais e cronobiológicas, a função de neuroproteção da MEL contra a ação de radicais livres é um achado recente, assim como sua ação antiinflamatória e de seu precursor N-acetil-serotonina em processos agudos e sua ação moduladora em processos neurais e imunológicos (REITER, 1997). Ações neuroprotetoras da melatonina foram observadas em diferentes modelos como: doença de Parkinson, doença de Alzheimer, isquemia global, injúria traumática cerebral, sendo essas ações atribuídas principalmente às propriedades antioxidativas da molécula de melatonina (ACUNA-CASTROVIEJO *et al.*, 1997; CHO *et al.*, 1997; PAPPOLLA *et al.*, 1997; MÉSENGE *et al.*, 1998) .

A relação entre epilepsia e função da glândula pineal tem sido bastante estudada, e muitos mecanismos já são conhecidos. Considerando essa atividade anticonvulsivante, a efetividade da MEL foi demonstrada frente a diferentes estímulos convulsivos em várias espécies de roedores, incluindo modelos de convulsões induzidas por pentilenotetrazol, quinolato, cainato, glutamato, N-metil-D-aspartato, L-cisteína, cianida, eletrochoque maximal e estimulação elétrica da amígdala -"kindling" (ALBERTSON *et al.*, 1981; CHAMPNEY *et al.*, 1996; YAMAMOTO; TANG, 1996; LAPIN *et al.*, 1998; BOROWICZ *et al.*,1999). Alguns autores demonstraram, ainda, que a pinealectomia leva à atividade convulsiva em gerbilos, que pode ser revertida pelo pré-tratamento com MEL (RUDEEN *et al.*, 1980). Um aumento dos danos cerebrais após convulsões excitotóxicas em ratos pinealectomizados também foi observado (MANEV *et al.*,1996).

Muitos dos efeitos da MEL são mediados por receptores de membrana de alta afinidade acoplados a proteínas que ligam GTP. O padrão de distribuição em mamíferos é bastante restrito,

enquanto que vertebrados não-mamíferos apresentam uma quantidade muito maior desses sítios de ligação (VANECEK, 1998). Embora a presença desses receptores encontre-se descrita em vários tecidos, principalmente no SNC, muitos autores acreditam que os efeitos primários da MEL sejam decorrentes de suas propriedades antioxidativas, isto é, da sua capacidade de neutralizar radicais livres, especialmente o radical hidroxil (OH⁻) (REITER, 1993; HARDELAND *et al.*, 1993, REITER *et al.*, 1997; MÉSENGE *et al.*, 1998). Essa questão permanece bastante controversa, uma vez que a ação antioxidante da MEL está relacionada a concentrações farmacológicas desse hormônio, que não são atingidas mesmo no período noturno.

Vale ressaltar, que a MEL modula a transmissão em vários sistemas, o que também pode estar relacionado às suas ações neuroprotetoras. Existem evidências de modulação da transmissão GABAérgica pela MEL, aumentando o déficit de memória em ratos tratados com diazepam (SHAJI; KULKARNI, 1998). Sabe-se que os receptores de GABA (ácido gama-aminobutírico) no SNC possuem um importante papel modulador em vários processos, uma vez que o GABA é o principal transmissor inibitório das vias centrais.

Os efeitos da MEL sobre o sistema colinérgico no SNC ainda não estão estabelecidos. Até o momento, sabe-se que a MEL é capaz de modular a população de receptores nicotínicos em tecidos periféricos. Em ducto deferente de rato, há o aparecimento de uma nova população de receptores nicotínicos com alta afinidade e baixa funcionalidade, determinando uma maior responsividade do órgão ao transmissor no período noturno do ciclo claro/escuro ambiental (CARNEIRO; MARKUS, 1990; CARNEIRO *et al.*, 1991; CARNEIRO *et al.*, 1994; MARKUS *et al.*, 1996). Em músculo esquelético, a MEL causa uma redução no número de sítios de ligação para [¹²⁵I]- α -bungarotoxina (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002). Com relação aos colinoceptores muscarínicos, não é conhecida a influência da MEL sobre esses receptores.

Em sistemas químicos isolados foi demonstrado que a molécula da MEL reage com radicais livres de forma direta (POEGGELER *et al.*, 2002). Ensaio *in vitro* demonstram que a interação de radicais \cdot OH com a MEL resulta na formação de 3-hidroxi-melatonina, o qual pode ser encontrado na urina, o que sugere que esta ligação também ocorra *in vivo* (TAN *et al.*, 1998). A interação da MEL com radicais \cdot OH também pode formar outros metabólitos, tais como o

AFMK (N¹-acetil-N²-formil-5-metoxiquinuramina) e a 6-hidroxi-melatonina (HORSTMAN *et al.*, 2002). Além disso, a interação da MEL com o peroxinitrito (ONOO⁻) também promove a formação de 6-hidroxi-melatonina. No entanto, as constantes de dissociação destas reações são relativamente baixas, o que implicaria na necessidade de atingir concentrações consideradas suprafisiológicas de MEL circulante durante o pico noturno de produção pela pineal (ZHANG *et al.*, 1999).

Além das ações diretas sobre os radicais, MEL promove os efeitos antioxidantes por interferir na atividade das enzimas envolvidas nas vias metabólicas que geram ou que reduzem os radicais livres. Atua, por exemplo, influenciando a ação de enzimas antioxidantes, como a superóxido desmutase e a catalase, que têm, sob ação da MEL, sua atividade aumentada em diversos tecidos (LIU; NG, 2000). A atividade da enzima glutatona peroxidase também é aumentada pela MEL, como observado em cérebros de ratos (BARLOW-WALDEN *et al.*, 1995).

Sabe-se, ainda, que a MEL modula a liberação de dopamina em células de retina de coelho em cultura, quando estimuladas eletricamente, ou com cloreto de potássio (DUBOCOVICH, 1983). Face ao exposto, fica claro que a melatonina possui um largo espectro de ação, entretanto, a caracterização precisa dos seus efeitos e os mecanismos de ação envolvidos permanecem, na maioria dos casos, desconhecidos. Desta maneira, a melatonina surge como uma molécula de grande potencial terapêutico em diferentes doenças neurológicas, com uma grande vantagem, que consiste na sua baixa toxicidade, uma vez que está presente naturalmente no organismo.

4 Epilepsia

4.1 Classificação das Crises Epilépticas

Crise epiléptica é definida como a manifestação excessiva e/ou hipersincrônica resultante da atividade epiléptica, autolimitada ou não, de neurônios cerebrais. Quando as mesmas não apresentam curso autolimitado são denominadas crises contínuas e configuram o quadro de estado epiléptico. O Estado epiléptico pode ser definido como uma crise duradoura, que não mostra sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual da maioria das crises recorrentes sem que a função do sistema nervoso central retorne ao período interictal (entre as crises convulsivas) (ENGEL, 2001).

Quanto à etiologia, a epilepsia idiopática não tem causa conhecida, exceto fatores hereditários, considerando-se epilepsia sintomática a que está associada a uma lesão cerebral (malformação, por exemplo, tumor ou asfixia perinatal) (SCHEFFER; BERKOVIC, 2003).

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

As crises parciais ou focais, clínica e eletroencefalograficamente, são caracterizadas pela ativação de uma parte do cérebro, sendo subdividas em crises parciais simples, quando há preservação da consciência e crises parciais complexas, quando há comprometimento da mesma. As características da crise focal refletem a região cortical envolvida. Por exemplo, descargas epileptiformes no córtex motor produzem espasmos clônicos, enquanto convulsões do lobo temporal podem ser acompanhadas de aura perceptível ou sensação de “déjà vu” seguida de perda de consciência e automatismos orais (movimentos automáticos da boca e de deglutição).

As crises focais podem, ainda, ser acompanhadas de generalização secundária. Convulsões focais com generalização secundária ocorrem quando uma convulsão focal evolui para crise generalizada tônico-clônica por causa da propagação da atividade epileptiforme para todo o córtex (SCHEFFER; BERKOVIC, 2003).

Crises generalizadas são aquelas em que há envolvimento, desde o início, de amplas áreas de ambos os hemisférios cerebrais. São associados à descarga bilateral epileptiforme sincrônica, que emana simultaneamente de todo o córtex. São consideradas não classificáveis, as crises que não se enquadram nos dois subtipos acima (ENGEL, 2001; SCHEFFER; BERKOVIC, 2003)

4.1.1 Crises epiléticas parciais

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

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

4.1.2 Crises epiléticas generalizadas

- *Crises tônico-clônicas*: anteriormente denominadas “grande mal”, acompanham rigidez, espasmos ou contrações, e perda de consciência. Podem se iniciar com um grito, acompanhado de perda da consciência com queda ao solo, endurecimento do corpo e abalos musculares generalizados. Pode ocorrer perda de saliva com sangue devido à mordedura da língua, coloração

arroxeados dos lábios, respiração ruidosa. Pode ocorrer também aumento da micção. A duração é de poucos minutos e, após a crise, há sonolência, podendo o indivíduo acordar apresentando vômitos, dor de cabeça e dores musculares.

- Crises tônicas: ocorre perda da consciência, queda ao solo, o corpo fica endurecido, com a respiração irregular, aumento da salivação, coloração arroxeadas da pele.

- Crises mioclônicas: tem como característica principal ser de curta duração e manifestar-se principalmente após o despertar, com movimentos bruscos de todo o corpo, semelhantes a um choque ou susto, principalmente nos membros superiores.

- Crises de ausência: a crise pode se manifestar como um desligamento com o ambiente externo. Há interrupção da fala e das atividades motoras por alguns segundos (em torno de vinte segundos), voltando o indivíduo, logo a seguir, à atividade que estava realizando antes da crise. Essas crises podem se repetir várias vezes ao dia, ocorrendo perda de consciência de forma parcial ou completa.

- Crises atípicas de ausência: caracterizada pela ocorrência de ataques com aparecimento e término mais rápidos do que o habitual para as crises de ausência, associados a um EEG mais heterogêneo.

- Crises atônicas: caracterizada pela perda do tônus postural, com inclinação da cabeça e queda devido à perda do equilíbrio.

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

Quadro 1: Classificação das crises epilépticas.

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

Fonte: Engel, 2001.

4.1.3 Síndromes epilépticas

Síndromes epilépticas compreendem um conjunto de tipos de crises que se iniciam em uma idade característica e estão associados a padrões eletroencefalográficos específicos. O conhecimento a respeito dessas síndromes é útil na determinação da escolha da droga antiepiléptica, do prognóstico e, por vezes, da etiologia da doença.

- Síndromes generalizadas

Incluem aquelas que acompanham ondas de atividade elétrica generalizada no eletroencefalograma (EEG). A frequência do pico dessas ondas varia dependendo da síndrome. Os indivíduos experimentam uma combinação de ausência, mioclonia e crises tônico-clônicas.

- Epilepsia de ausência na infância ocorre quando uma criança de 4-8 anos de idade apresenta muitas crises de ausência por dia, associadas a ondas típicas de 3 Hz no EEG.

- Epilepsia mioclônica juvenil começa na adolescência. Ocorrem crises mioclônicas e tônico-clônicas, algumas vezes, acompanhadas de episódios de ausência. O EEG registra ondas rápidas de 4–6 Hz.

- Síndromes focais

Incluem síndromes que emanam de diferentes regiões corticais. Por exemplo, a epilepsia do lobo frontal inclui convulsões do lobo frontal acompanhadas de ataques hipercinéticos ou eventos tônicos que se agrupam em um padrão noturno, frequentemente, com descargas do lobo frontal no EEG.

- Síndromes especiais

Convulsões febris relacionadas a crises acompanhadas de febre ($>38^{\circ}\text{C}$) em crianças entre 3 meses e 6 anos de idade (SCHEFFER; BERKOVIC, 2003).

4.2 Fisiopatologia da epilepsia

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

A hiperexcitabilidade, o desequilíbrio entre sistemas de neurotransmissão excitatórios e inibitórios, e alterações na função e sincronicidade sinápticas são comuns a todas as doenças neurodegenerativas, incluindo a epilepsia. Embora muitos mecanismos individuais possam operar no desenvolvimento de lesão neuronal, um desequilíbrio entre o sistema glutamatérgico (excitotoxicidade) e o sistema GABAérgico é considerado um mecanismo proeminente de correlação entre a morte celular e um grande número de desordens agudas e degenerativas, como a epilepsia, doença de Alzheimer, parkinsonismo, isquemia e uma variedade de tipos de encefalopatia. Alterações em canais iônicos ativados por voltagem ou por ligantes, bem como na neurotransmissão colinérgica também têm sido implicadas na epilepsia experimental e humana (MARTIN *et al.*, 2001).

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

Desde a descoberta, em 1955, da primeira mutação gênica relacionada à epilepsia idiopática, tem sido demonstrado que a maioria dos genes associados a esta condição é responsável pela codificação tanto de canais iônicos voltagem-dependentes como canais dependentes de ligantes. E esta relação tem se tornado cada vez mais complexa, à medida que

mais genes são descobertos e relações genótipo-fenótipo são desenhadas. Por exemplo, uma mutação específica de um canal Na^+ pode ser associada a síndromes epiléticas que variam de benigna, distúrbios autolimitados, tais como convulsões febris, a epilepsias graves, com convulsões intratáveis e deficiência intelectual. Em contraste, mutações em diferentes genes causam síndromes que são indistinguíveis clinicamente. Portanto, a classificação das epilepsias, seus conceitos genéticos e compreensão de sua neurobiologia tem mudado rapidamente nos últimos anos (SCHEFFER; BERKOVIC, 2003).

4.2.1 O sistema colinérgico muscarínico e a epilepsia

Diversos estudos sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na epilepsia humana (TURSKI *et al.*, 1983a; JOPE *et al.*, 1986; HIRSCH *et al.*, 1992; NATHANSON *et al.*, 1999; MICHOTTE *et al.*, 2000; PERSINGER *et al.*, 2001). Este sistema tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A estimulação cerebral induzida pela ACh ocorre através da ativação dos receptores colinérgicos cerebrais. 99% destes são muscarínicos (M_1 , M_4 e M_5) e 1% nicotínicos (PEPEU *et al.*, 1963; ELGOYHEN *et al.*, 2000). Assim, a maioria dos efeitos de ativação colinérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM).

Os RCM estão amplamente distribuídos em todo corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autônomo (**Figura 6**) (JOPE, 1979; LEFKOWITZ *et al.*, 1996). No cérebro, são importantes na memória e na fisiopatologia das doenças afetivas e na esquizofrenia (DAVIS *et al.*, 1975; 1980). No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 5 subtipos de RCM (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , e M_5) (BONNER *et al.*, 1987; LIAO *et al.*, 1989; NATHANSON *et al.*, 1999). Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. Os subtipos M_1 , M_3 , e M_5 transmitem sinais através da mobilização de Ca^{++} no SNC (FISHER; AGRANOFF, 1987). Um determinado estímulo faz com que o receptor ative uma enzima efetora, a fosfolipase C (PLC), através de uma proteína G (ELGOYHEN *et al.*, 2000). A PLC promove uma cascata de eventos, finalizando com a produção de dois segundos mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) que vão transmitir a informação do receptor para o interior da

célula. Os subtipos M₂ e M₄ agem por inibição da adenilil ciclase (AC), diminuindo os níveis de AMPc (EHLERT *et al.*, 1995). O **Quadro 2** sumariza as informações gerais sobre a acetilcolina e o **Quadro 3** sobre os receptores muscarínicos e o **Quadro 4** sobre os segundos mensageiros.

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

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

Fonte: Ehlert *et al.*, 1995.

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

SUBTIPOS DE RECEPTORES	LOCALIZAÇÃO NO SNC	SEGUNDOS MENSAGEIROS
M ₁	↑ hipocampo ↑ córtex frontoparietal ↑ caudado-putamen núcleo accumbens, amígdala	IP ₃ + DAG
M ₂	↓ cérebro	AMPc canais de K ⁺
M ₃	↑ córtex ↑ hipocampo ↓ corpo estriado	IP ₃ + DAG
M ₄	↑ córtex ↑ hipocampo ↑ corpo estriado	AMPc
M ₅	↓ menos do que 2% do cérebro	IP ₃ + DAG

Abreviaturas:

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

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

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

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

Abreviaturas:

PI: metabolismo dos fosfoinositídeos;

AC: adenilil ciclase;

PG: proteína G;

PKC: proteína quinase C;

Fonte: Ehlert *et al.*, 1995.

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

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

pilocarpina, está o intenso aumento observado na síntese e liberação da ACh), podendo, ainda, produzir alterações nos níveis de outros neurotransmissores (noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e GABA), embora pouco se conheça sobre estas alterações (MICHOTTE *et al.*, 2000; DELORENZO *et al.*, 2000; RAOL *et al.*, 2001; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

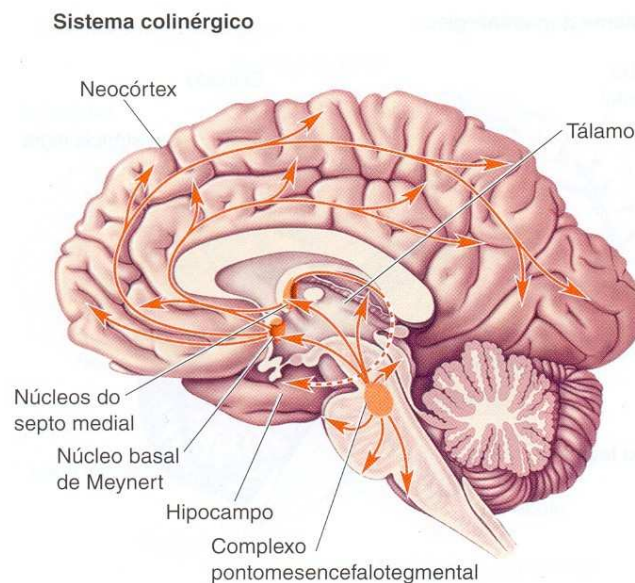


Figura 6. Vias colinérgicas no sistema nervoso central.

Fonte: www.unisinos.br/acetilcolina.jpg

4.2.2 O sistema dopaminérgico e a epilepsia

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

um complexo de proteína G_I para inibir a produção de AMPc (COOPER *et al.*, 1991; CIVELLI *et al.*, 1993).

Estudos indicam que os receptores dopaminérgicos podem influenciar a função celular através de outros mecanismos, além de estimular ou inibir a adenilil ciclase. O receptor D_1 parece fazer também um efeito estimulatório no “turnover” dos fosfoinositídeos. Enquanto o receptor D_2 , além de inibir a adenilil ciclase, aumenta a condutância para o K^+ e modula o metabolismo dos fosfoinositídeos (COOPER *et al.*, 1991; CIVELLI *et al.*, 1993).

O avanço da biologia molecular (incluindo clonagem de genes) e o aperfeiçoamento de técnicas de radioligantes possibilitaram a identificação de quatro subtipos de receptores D_2 (D_{2c} , D_{2L} , D_3 e D_4) e um subtipo de receptor D_1 (D_5). O receptor D_2 foi dividido em dois subtipos: D_{2c} (curto) e o D_{2L} (longo), onde o D_{2L} se diferencia do D_{2c} por possuir 29 aminoácidos a mais na sua estrutura. Esses dois subtipos parecem ter uma farmacologia idêntica. Um terceiro subtipo de receptor D_2 determinado foi D_3 , encontrado em altos níveis em certas regiões do sistema límbico cerebral, enquanto, baixos níveis são observados no corpo estriado. O perfil farmacológico do subtipo D_3 é similar, mas não idêntico ao D_2 . O mecanismo efetor do subtipo D_3 ainda não é conhecido (COOPER *et al.*, 1991). O quarto subtipo de receptor D_2 recentemente clonado foi D_4 . O gene desse receptor possui alta homologia para os genes dos receptores D_2 e D_3 . As características farmacológicas desse subtipo lembram as do D_2 e D_3 e o mecanismo efetor do D_4 também é desconhecido (CIVELLI *et al.*, 1993). O subtipo de receptor D_1 encontrado, chamado de D_5 , é farmacologicamente similar ao receptor D_1 , porém sua afinidade por agonistas endógenos (dopamina) é cerca de dez vezes maior. Similar ao D_1 , o subtipo D_5 estimula a ativação da adenilil ciclase, sendo esse o seu mecanismo efetor. Localiza-se principalmente nas áreas límbicas (SOKOLOFF *et al.*, 1995).

A ação da dopamina foi descoberta e interpretada através das suas interações com somente dois receptores. A descoberta de D_{2c} , D_{2L} , D_3 , D_4 e D_5 imediatamente revelou a possibilidade de que a atividade desses novos receptores tenha sido disfarçada pelos receptores clássicos D_1 e D_2 (CIVELLI *et al.*, 1993). Tendo em vista as dúvidas remanescentes quanto à nova classificação de receptores dopaminérgicos em D_1 , D_2 , D_3 , D_4 e D_5 , alguns pesquisadores

preferem agrupar esses subtipos em D₁-símile e D₂-símile, já que as propriedades farmacológicas e estruturais desses subtipos clonados (D_{2c}, D_{2L}, D₃, D₄ e D₅) não são suficientemente divergentes daquelas já existentes (D₁ e D₂).

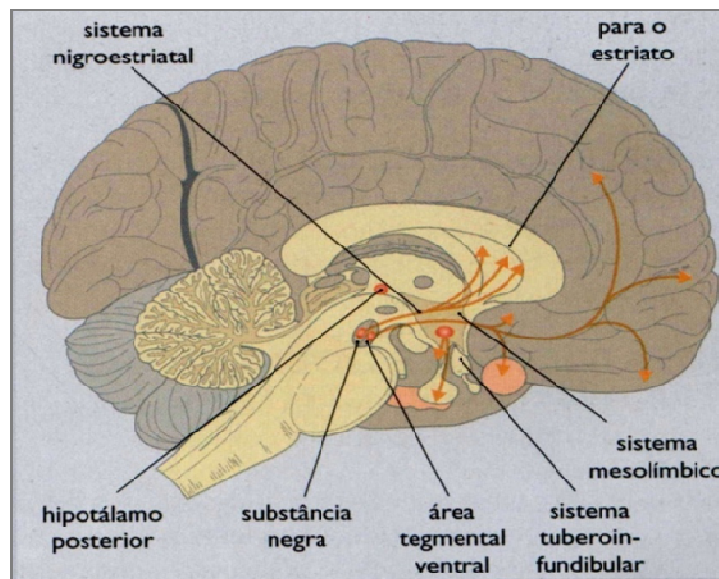


Figura 7. Principais vias dopaminérgicas no SNC

Fonte: Kerwin *et al.*(1999)

A dopamina está presente na maioria das regiões do SNC, sendo originada de longos axônios que partem da substância negra e área tegmentar ventral e inervam os núcleos da base, partes do sistema límbico e o córtex frontal (KEBABIAN; CALNE, 1979). O sistema dopaminérgico compreende três vias neuronais principais: nigroestriatal, mesocorticolímbica, tuberoinfundibular. A via nigroestriatal está envolvida com disfunções extrapiramidais. Esta via é responsável por 75% da dopamina cerebral, sendo constituída por neurônios que se projetam da substância negra para o corpo estriado. A via nigroestriatal tem importante papel na locomoção (**Figura 7**) (CIVELLI *et al.*, 1993).

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2.3 Outros neurotransmissores

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

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

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

de Parkinson, além das alterações associadas à isquemia cerebral, traumatismo cerebral e encefalopatia devido a SIDA (MELDRUM *et al.*, 1990).

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

O sistema serotoninérgico parece estar também envolvido na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (PEROUTKA, 1988). Seu neurotransmissor, a serotonina (5-HT), tem importante efeito inibitório em muitas áreas do Sistema Nervoso Central (SNC) (JULIUS, 1991). A estimulação inibitória induzida pela 5-HT ocorre através da ativação de muitas vias em neurônios da rafe ou nas regiões da parte superior do tronco cerebral. A 5-HT está presente em fibras não-mielinizadas que inervam difusamente muitas regiões do SNC, mas a sua densidade de inervação é diferente para as áreas cerebrais (PEROUTKA, 1988). Os receptores serotoninérgicos, principalmente o 5-HT₁ exercem efeitos predominantemente inibitórios e estão relacionados com o humor e o comportamento (COOPER *et al.*, 1991). Acredita-se que a maioria dos efeitos de ativação serotoninérgica no cérebro ocorra, provavelmente, devido à estimulação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT_{1A}. Janusz e Kleinrok (1989) sugerem que a inibição das convulsões induzidas por pilocarpina pode ser mediada pela estimulação e pelo bloqueio, respectivamente, dos receptores 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}, provavelmente localizados nas terminações colinérgicas.

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

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

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

4.2.4 Aspectos genéticos da epilepsia

Desde a descoberta, em 1955, da primeira mutação gênica relacionada à epilepsia idiopática, tem sido demonstrado que a maioria dos genes associados a esta condição é responsável pela codificação tanto de canais iônicos voltagem-dependentes como canais dependentes de ligantes. E esta relação tem se tornado cada vez mais complexa, à medida que mais genes são descobertos e relações genótipo-fenótipo são desenhadas. Por exemplo, uma mutação específica de um canal Na^+ pode ser associada a síndromes epilépticas que variam de benigna, distúrbios autolimitados, tais como convulsões febris, a epilepsias graves, com convulsões intratáveis e deficiência intelectual. Em contraste, mutações em diferentes genes causam síndromes que são indistinguíveis clinicamente. Portanto, a classificação das epilepsias, seus conceitos genéticos e compreensão de sua neurobiologia tem mudado rapidamente nos últimos anos (SCHEFFER; BERKOVIC, 2003).

4.3 Modelos experimentais de epilepsia:

Na tentativa de aproximar os modelos animais dos fenômenos observados em humanos, várias técnicas têm sido desenvolvidas mimetizando tipos específicos de epilepsia (FISHER, 1989). Para que um modelo experimental seja classificado como um modelo de epilepsia ele deve preencher os seguintes requisitos: demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros

eletroencefalográficos e clinicamente apresentar uma atividade semelhante às aquelas observadas durante uma crise epilética. Em modelos genéticos, o aparecimento das crises epiléticas espontâneas ou induzidas está relacionado com aspectos associados à formação e ao desenvolvimento do sistema nervoso; e em não genéticos, as crises epiléticas são desencadeadas através da estimulação química ou elétrica do sistema nervoso em animais "normais" (MELLO *et al.*, 1986).

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

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

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

A impraticabilidade e os próprios preceitos éticos demonstram ser perigoso testar, inicialmente, a ação de drogas em portadores de epilepsia, sem antes se fazer uma triagem e ensaios biológicos pré-clínicos. Os métodos laboratoriais continuam sendo desenvolvidos para tal

finalidade. Além disso, testes que embora sejam considerados clássicos, como os testes de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol e eletrochoque máximo, que se baseiam no efeito anticonvulsivante do tipo “tudo ou nada”, continuam apresentando boa correlação na atividade clínica de DAE.

Além disso, o desenvolvimento atual de novas DAE caminha no horizonte de drogas com potencial anticonvulsivante alto, controlando de forma seletiva os diversos tipos de epilepsias, e que apresentem baixa toxicidade. Mas, o fato de poder estudar, preliminarmente, em simples modelos animais, continua sendo uma ferramenta importante na pesquisa (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2007).

Quadro 7 – Modelos experimentais para avaliação de drogas com propriedades anticonvulsivantes

MODELO EXPERIMENTAL (ANO DA DESCRIÇÃO)	TIPO DE EPILEPSIA	SITUAÇÃO
<i>Estimulação química</i>		
Estricnina (1900)	Crises com foco cortical	Agudo. Extensões tônicas. Antagonismo competitivo da glicina. Excitabilidade reflexa da medula aumentada.
Pentilenotetrazol (PTZ) (1960)	Pequeno mal e crises generalizadas	Agudo. Crises generalizadas de ausência ou mioclônicas e crises tônico-clônicas. Inibição de canais de cloreto associados ao GABA _A .
Picrotoxina (1960)	Epilepsias do lobo temporal (*)	Agudo e crônico (*). Epilepsia focal recorrente. Crises parciais ou de ausência. Antagonismo dos receptores GABAérgicos.
Bicuculina (1970)	Epilepsia de longa duração (*)	Agudo e crônico (*). Epilepsia de longa duração. Antagonismo de GABA _A .
Substâncias colinomiméticas (1949)	Epilepsias focais e do lobo temporal	Agudo e crônico. A administração sistêmica de pilocarpina pode desenvolver <i>status epilepticus</i> . Mimetiza a epilepsia do lobo temporal nos achados histopatológicos, eletrográficos, manifestações comportamentais e padrão de resposta à terapêutica.
<i>Modelos com predisposição genética</i>		
Crise audiogênica em	Crises tônico-clônicas	Agudo.

camundongo (1924)		Alterações bioquímicas presentes na maioria das epilepsias. Convulsões conduzidas por intensas estimulações auditivas
Fotossensibilidade genética (1966)	Crises centro-encefálicas	Agudo. O balbuíno senegalês <i>Papio papio</i> apresenta atividade paroxística e motora em resposta a estimulação luminosa intermitente. Mimetiza crises de origem centroencefálica no homem.
<i>Estimulação elétrica</i>		
Eletrochoque (1870)	Epilepsia focal Crises tônico-clônicas	Agudo. Muito usado na triagem de antiepilépticos. Estimulação por pulsos elétricos repetitivos.
<i>Kindling</i> (1969)	Crises parciais e generalizadas, pequeno mal e auras	Agudo e crônico. Estimulações elétricas (ou administrações de PTZ) contínuas, em limiares subconvulsivantes, resultam em quadro progressivo de convulsões. Desencadeam-se convulsões espontâneas. Avalia a epilepsia e a epileptogênese.
<i>Neurotoxinas</i>		
Ácido caínico (1970)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico. Injeção intraventricular produz crise comportamental, acompanhada por lesão cerebral semelhante a da epilepsia do lobo temporal.

Legenda: (*) quando aplicada na amígdala.

Fontes: Adaptados de Queiroz *et al.*, 2002; Quintans-Júnior *et al.*, 2007.

4.3.1 Modelo colinérgico de convulsão

Em condições fisiológicas, a estimulação colinérgica induzida por ACh é importante para os processos cerebrais como memória e aprendizagem (BARTUS *et al.*, 1982). No entanto, altas concentrações de ACh (como ocorre depois de uma exposição por organofosforados, que são agentes anticolinesterásicos ou colinérgicos indiretos) apresentam intensos efeitos sobre a energia celular (PAZDERNIK *et al.*, 1985; EL-ETRI *et al.*, 1993) e metabolismo dos fosfoinositídeos (FLYNN; WECKER, 1987; MARINHO *et al.*, 1998; CHAMBERLAIN *et al.*, 2000). Essas mudanças estão associadas a uma hiperexcitação elétrica dos neurônios (MORRISETT *et al.*, 1987a,b) e, freqüentemente, são acompanhadas por convulsões (PIREDDA; GALE, 1985; JOPE *et al.*, 1987; SAVOLAINEN *et al.*, 1988 a,b; TURSKI *et al.*, 1983 a,b,c).

A ACh, os anticolinesterásicos e análogos da ACh são efetivos agentes epileptogênicos quando aplicados intracerebralmente (CAVALHEIRO *et al.*, 1983; COHEN *et al.*, 1981) ou sistemicamente (LUNDY; SHAW, 1983; TURSKI *et al.*, 1983d; CAVALHEIRO *et al.*, 1996; 1999). Injeções diretas na amígdala (TURSKI *et al.*, 1983b) e no hipocampo (TURSKI *et al.*, 1983c) de agonistas colinérgicos muscarínicos e colinomiméticos, em ratos, mostram ocorrências eletroencefalográficas e comportamentais de convulsões límbicas acompanhadas por lesões cerebrais semelhantes àquelas produzidas por ácido caínico (BEN-ARI *et al.*, 1980; 1981) e folatos (OLNEY *et al.*, 1986).

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

A pesquisa sobre epileptogênese colinérgica tem favorecido o conhecimento das propriedades excitatórias da ACh (SAVOLAINEN; HIRVONEN, 1992). Vários modelos animais de convulsões induzidas por agentes colinérgicos têm sido desenvolvidos para explorar esses

mecanismos e o papel do sistema colinérgico cerebral na fisiopatologia da epilepsia humana (TURSKI *et al.*, 1983 a,b,c; JOPE *et al.*, 1986; FISHER, 1989; HIRSCH *et al.*, 1992; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002).

O lítio é capaz de potencializar *in vivo* a ação da fisiostigmina, e ratos tratados com lítio e colinomiméticos apresentam convulsões (SAMPLES *et al.*, 1977; DAVIS; HATOUN, 1980). A administração de doses subconvulsivas de pilocarpina seguida por cloreto de lítio resulta em convulsões (JOPE *et al.*, 1986; MARINHO *et al.*, 1998). As alterações comportamentais dos animais que exibem convulsões com lítio-pilocarpina são semelhantes às aquelas observadas com altas doses de pilocarpina (CLIFFORD *et al.*, 1987; MARINHO *et al.*, 1998).

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

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

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

🌟 **Primeira fase:** período agudo, de 1 a 2 dias de duração que corresponde ao modelo de convulsões límbicas repetidas e *status epilepticus*;

- ✿ **Segunda fase:** período sem convulsão (período silencioso), caracterizado por um progressivo retorno ao EEG e comportamento normal, compreendendo a duração de 4 - 44 dias;
- ✿ **Terceira fase:** período de convulsões espontâneas recorrentes, começando entre 5 - 45 dias depois da administração da pilocarpina e permanecendo por toda a vida do animal (LEITE *et al.*, 1990; CAVALHEIRO *et al.*, 1991).

Na fase aguda podem ser identificados compostos com eficácia no tratamento da epilepsia refratária e/ou neuroproteção contra danos induzidos por convulsões sustentadas (JOPE *et al.*, 1986; CAVALHEIRO *et al.*, 1987, TURSKI *et al.*, 1987; HIRSCH *et al.*, 1992; LEITE *et al.*, 2002).

Vários estudos foram realizados utilizando esse modelo para entender a atividade convulsiva e o papel dos sistemas dos neurotransmissores nesse processo (STARR; STARR, 1993; CAVALHEIRO *et al.*, 1994; FUJIKAWA, 1996; DELORENZO *et al.*, 2000; FREITAS *et al.*, 2003a). Em geral, as convulsões parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas (SIMONIC *et al.*, 2000; NAFFAH-MAZZACORATTI *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2002), do metabolismo dos fosfoinosítídeos (MARINHO *et al.*, 1998), como também da participação de outros sistemas de neurotransmissão dopaminérgico (KULKARNI; GEORGE, 1996), serotoninérgico (CAVALHEIRO *et al.*, 1995), GABAérgico (LOUP *et al.*, 1999; COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002) e glutamatérgico (MASSIEU *et al.*, 1994; CHAMBERLAIN *et al.*, 2000), sendo, portanto, um modelo adequado para se investigar e esclarecer melhor a fisiopatologia das convulsões.

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

Os efeitos da pilocarpina sobre o sistema dopaminérgico são opostos de acordo com o tipo de receptor ativado. A ativação do receptor D₂, mas não D₁, tem atividade anticonvulsivante

induzida por eletrochoque ou por pentilenotetrazol em roedores (BARONE *et al.*, 1990a,b). Al-Tajir *et al* (1990a,b,c) estudaram a expressão das convulsões motoras, e demonstraram que receptores D₁ e D₂ medeiam efeitos pró-convulsivantes e anticonvulsivantes em ratos tratados com pilocarpina, respectivamente. Um aumento na concentração e uma diminuição da taxa de metabolização da dopamina foram identificados no hipocampo, sugerindo que a liberação de dopamina nesta área pode estar diminuída durante o estado epiléptico, período silencioso e no período crônico do processo convulsivo (CAVALHEIRO *et al.*, 2004). El-Etri *et al* (1993) demonstraram efeitos contrários no *locus ceruleus*, sugerindo que, após as convulsões e estado epiléptico, as alterações nos níveis dos neurotransmissores nas áreas cerebrais podem ocorrer de forma diferente.

As consequências da administração de pilocarpina sobre o sistema noradrenérgico hipocampal são semelhantes independente da fase da convulsão estudada. Foi verificada no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em alta dose, uma diminuição nos níveis da noradrenalina. Da mesma forma, foi vista uma redução no conteúdo deste neurotransmissor durante a convulsão parcial em roedores (CAVALHEIRO *et al.*, 2004). Parece haver, ainda, algum tipo de interação com o sistema serotoninérgico, uma vez que a ativação do receptor serotoninérgico do tipo 5-HT₁ pode inibir a estimulação colinérgica, sendo, assim, um mecanismo compensatório para inibir ou cessar as convulsões (PEROUTKA, 1988).

A pilocarpina também altera os níveis de GABA no cérebro, onde sua concentração está aumentada após o estado epiléptico e diminuída após 24h da fase aguda das convulsões (EL-ETRI *et al.*, 1993) e parece interagir de forma indireta com o sistema glutamatérgico, uma vez que a ativação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA pode estar aumentada durante as convulsões em resposta ao estímulo colinérgico. Pode ocorrer um aumento da concentração do cálcio intracelular, havendo, em reposta a esse efeito, uma diminuição da resposta dos receptores GABA_A, que são capazes de inibir o aparecimento das convulsões quando estimulado por seus agonistas (ISOKAWA, 1998).

Dessa forma, o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em altas doses poderá auxiliar no esclarecimento das ações dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico,

glutamatérgico e GABAérgico, que interagem de forma direta ou indireta com o sistema colinérgico no processo convulsivo.

4.4 As áreas cerebrais e o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina

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

A literatura sugere o hipocampo como sítio de origem da atividade convulsiva induzida por pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1983a,b). Outros achados sugerem como sítio inicial dessas convulsões o pálido ventral ou *nucleo accumbens* (CLIFFORD *et al.*, 1987). Estudos eletroencefalográficos e autoradiográficos, realizados posteriormente, sugeriram ambas as áreas como locais de início das convulsões (LABANDEIRA-GARCIA *et al.*, 1994; KULKARNI; GEORGE, 1995).

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

O modelo de epilepsia com pilocarpina tem sido extensivamente analisado, uma vez que exhibe convulsões recorrentes espontâneas e pode esclarecer muitas das alterações vistas na

epilepsia do lobo temporal. As mudanças histopatológicas observadas no hipocampo reproduzem muitas destas alterações em humanos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do sistema nervoso (MELLO *et al.*, 1996; AVOLI *et al.*, 1994; MARINHO *et al.*, 1997).

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

5 Espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e a epilepsia

5.1 Radicais livres e “espécies reativas de oxigênio” e mecanismos de defesa antioxidante

Os radicais livres têm sido implicados na toxicidade de numerosos agentes químicos e na patogênese de muitas doenças, tais como doenças inflamatórias, doença de Parkinson, de Alzheimer e epilepsia, dentre outras. A lista dessas doenças é cada vez maior e isso se deve, pelo menos em parte, ao fato de que essas moléculas reativas podem produzir a maior parte das alterações teciduais identificadas em uma grande variedade de processos danosos. Muitas dessas alterações, porém, podem ser consequência e não causa do dano (KEHRER, 1993).

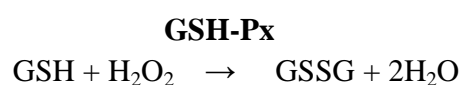
Radical livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Em geral, são instáveis e têm vida muito curta, devido à natureza livre de seus elétrons, que os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons (HALLIWELL, 1994). Essas moléculas causam danos teciduais por interagirem com carboidratos, ácidos nucleicos (DNA), lipídios e proteínas.

Por sua elevada reatividade, os radicais livres, formados a partir de transferências de elétrons, podem reagir e formar uma série de espécies reativas, como as espécies reativas do oxigênio (ROS) e, quando não neutralizadas, podem levar ao estresse oxidativo, exacerbar a inflamação e promover dano tecidual. Dentre esses radicais estão as espécies reativas do oxigênio (ROS), como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$); radical hidroxila (OH^{\cdot}); radical peróxido (ROO^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); bem como as espécies reativas do nitrogênio (RNS), como o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) e espécies reativas do cloro (RCS) como o ácido hipocloroso ($HOCl$) (MOSLEY *et al.*, 2006).

Essas espécies químicas são abundantes na natureza, produzidas normalmente no metabolismo celular e encontradas no meio ambiente. São facilmente formadas com exposição excessiva a luz solar, poluição, álcool, inseticidas, radiação, exercício intenso, etc. No entanto, existem enzimas antioxidantes protetoras e mecanismos que neutralizam os radicais livres, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase e redutase, a vitamina E, a vitamina C, dentre outras substâncias capazes de inativar ou reduzir a formação dos radicais livres (MOSLEY *et al.*, 2006).

A catalase é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (SCOTT *et al.*, 1991). Pode ser encontrada no cérebro, no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Sua atividade é dependente de NADPH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As glutathione peroxidases (GSH-Px) são as principais enzimas responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio gerado pelas SOD no citosol e mitocôndria e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis, à custa da conversão da glutathione reduzida a glutathione oxidada (GSSG) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Elas promovem a redução de H_2O_2 , à custa de GSH, para formar GSSG e água, de acordo com a seguinte reação:



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

O dano oxidativo ocorre nos organismos celulares devido ao desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes celulares. Através da respiração celular normal ou da respiração mitocondrial desregulada, grandes quantidades de ROS podem ser produzidos e desencadearem efeitos deletérios no delicado equilíbrio neuronal do SNC. O estresse oxidativo está realmente implicado como sendo a principal causa da injúria neuronal em várias doenças neurológicas, incluindo a epilepsia. (ALFAVARO *et al.*, 2004; MOSLEY *et al.*, 2006).

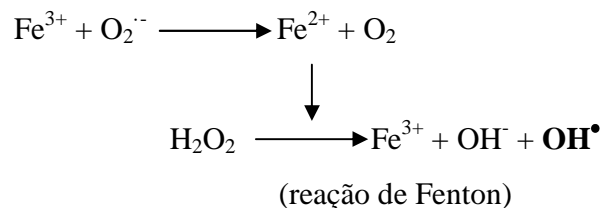
Alguns dos mais destrutivos radicais livres gerados no organismo derivam do oxigênio (O_2). Então, a molécula mais importante para a manutenção da vida pode também provocar danos celulares, podendo levar a destruição de órgãos e do próprio organismo. O acúmulo dos danos ao longo da vida causados por moléculas vitais em órgãos está relacionado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (NICHOLLS, 2008).

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o produto da adição de um elétron a molécula de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Muitas moléculas biológicas como, por exemplo, a hemoglobina (MISRA; FRIDOVICH, 1972a), mioglobina (GOTOH; SHIKAMA, 1976), catecolaminas (MISRA; FRIDOVICH, 1972b) a alguns constituintes dos sistemas de transporte de elétrons mitocondriais (TURRENS *et al.*, 1985) e microssômicos (JAKOBY; ZIEGLER,

1990) reagem com o O_2 convertendo-o em $O_2^{\cdot-}$. Adicionalmente, fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) geram o $O_2^{\cdot-}$ em grande quantidade, com a finalidade de destruir microorganismos estranhos ao organismo. Esse mecanismo de proteção natural pode tornar-se nocivo nos processos de inflamação crônica (MOSLEY *et al.*, 2006).

O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é a espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos; age rapidamente no local em que é produzido, sendo potencialmente capaz de causar alterações nas bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou a mutação do DNA, inibir diversas proteínas (constituintes das membranas celulares e enzimas) através da oxidação dos seus grupamentos sulfidrílica (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciar a peroxidação de lipídeos, especialmente ácidos graxos poliinsaturados de membranas e lipoproteínas (MOSLEY *et al.*, 2006).

Radicais do tipo hidroxila são gerados nos sistemas biológicos principalmente por radiações ionizantes e através da reação que envolve um metal de transição, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio. Devido ao alto teor de água das células, sua exposição às radiações ionizantes (raios X e gama), pode resultar na formação do radical hidroxila, através do processo de radiólise da água (HALLIWELL, 1994). Os íons metálicos (de ferro ou cobre) possuem a habilidade de mover elétrons, o que constitui a base para a iniciação e propagação de muitas das reações de radicais livres mais nocivas. Assim, o OH^{\bullet} é formado pela interação entre um íon metálico (Fe^{3+}), o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 , de acordo com a seguinte equação:

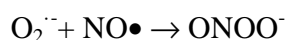


O H_2O_2 não é especialmente tóxico, a menos que esteja em altas concentrações nas células. Outra característica dessa molécula é que ela possui a capacidade de se difundir rapidamente através das membranas celulares podendo então se distribuir por sítios distantes dos

quais ela foi gerada. Além disso, na presença de metais de transição, mais comumente o Fe^{2+} , mas também o Cu^{1+} , o H_2O_2 é reduzido à radical hidroxil (OH^\bullet) via reações de Haber-Weiss ou Fenton (NICHOLLS, 2008).

Essa via de produção do OH^\bullet tem sido bastante estudada, embora o seu papel patológico não esteja bem definido, a existência de proteínas de transporte para o ferro e o cobre, utilizadas pelas células para minimizar a presença de íons metálicos livres indicam que tais reações podem ser prejudiciais para os sistemas biológicos (MOSLEY *et al.*, 2006).

O óxido nítrico (NO) funciona como um mensageiro intracelular de produção endógena que desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (EISERICH *et al.*, 1998), embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, em excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o $\text{O}_2^{\cdot-}$ podem interagir, resultando em um produto muito tóxico, o peroxinitrito (ONOO^-):

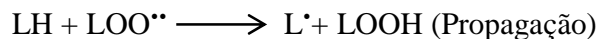
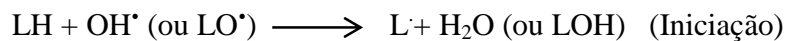


O peroxinitrito (ONOO^-) é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, OH^\bullet , dióxido de nitrogênio e outros, possuem semelhante potencial deletério, conseqüentemente, a toxicidade do NO pode ser explicada, pelo menos em parte, por sua reação com o $\text{O}_2^{\cdot-}$. O aumento da produção de ONOO^- tem sido associado a diversos processos patológicos (WANG *et al.*, 2002).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos, em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular. A peroxidação lipídica também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson. Assim como na formação das

ROS, nem sempre os processos de peroxidação lipídica são prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido aracdônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória. Todavia, o excesso de tais produtos pode ser lesivo (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Um dos processos oxidativos mais amplamente estudados é aquele onde ocorre a quebra dos lipídios das membranas celulares e a formação do radical peroxil (LOO^\bullet). Este processo, chamado de peroxidação lipídica, é extremamente complexo e lesivo. Uma vez iniciado, pode ser propagado, já que o radical peroxil formado pode reiniciar o processo, e este pode ocorrer indefinidamente. A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, representada pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Estas etapas estão apresentadas nas reações seguintes, onde L representa o lipídio:



A reação inicia-se com o sequestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal sequestro pode ser realizado pelo OH^\bullet ou pelo LO^\bullet (radical alcoxila), com conseqüente formação do L^\bullet (radical lipídico). Na primeira equação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 , resultando em LOO^\bullet (radical peroxila), que, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L^\bullet na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais (L^\bullet e LOO^\bullet) produzidos nas etapas anteriores propagam-se até formarem complexos mais estáveis (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Vários estudos já comprovaram que os ROS podem ser causa ou conseqüência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais e sintéticos têm sido

recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e até mesmo, para bloquear sua evolução (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Os antioxidantes podem atuar em diferentes aspectos na proteção dos organismos contra os radicais livres. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua geração, principalmente através da inibição das reações em cadeia com os íons metálicos (ferro e cobre). Os antioxidantes devem ser substâncias capazes de inativar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o dano aos lipídeos, as proteínas, aos ácidos graxos e ao DNA, evitando assim as lesões aos constituintes celulares e a consequente morte celular.

Os compostos antioxidantes podem ter origem endógena, como as enzimas catalase, superóxido dismutase e a glutatona, ou serem exógenos, provenientes, por exemplo, da dieta. Muitos estudos destacam os tocoferóis (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), o selênio, os carotenóides e principalmente os polifenóis, que têm sido amplamente estudados nos últimos anos, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase (EL-AGAMEY *et al.*, 2004; OMONI; ALUKO, 2005). De acordo com Xie *et al.* (2007), o café é um das principais fontes de compostos fenólicos na dieta humana.

5.2 Estresse oxidativo e epilepsia

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

O cérebro é mais vulnerável que outros tecidos porque contém uma grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, além de possuir, em relação aos outros tecidos, menos mecanismos

antioxidantes (WALZ *et al.*, 2000). O estresse oxidativo pode alterar dramaticamente a função celular e modificar a liberação e/ou síntese de outros compostos que podem estar relacionados com a morte neuronal induzida pela convulsão. Por isso, tem sido implicado em uma variedade de condições neurológicas agudas e crônicas, incluindo a epilepsia (FRANTSEVA *et al.*, 2000; WALZ *et al.*, 2000).

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

6 Relevância e Justificativa

Substâncias com propriedades anticonvulsivantes têm sido exaustivamente estudadas na tentativa de se conhecer drogas com eficácia para tipos específicos de convulsão, bem como os mecanismos controladores do aparecimento dessas convulsões (FISHER, 1989; TURSKI *et al.*, 1987). Na fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina podem ser identificados compostos com eficácia no tratamento da epilepsia refratária e/ou neuroproteção contra danos induzidos por convulsões sustentadas (JOPE *et al.*, 1986; CAVALHEIRO *et al.*, 1987; TURSKI *et al.*, 1987; HIRSCH *et al.*, 1992; QUEIROZ *et al.*, 2002).

O principal objetivo das pesquisas sobre novas drogas antiepiléticas é o desenvolvimento de fármacos mais eficazes, específicos para cada tipo de epilepsia e com menos efeitos colaterais. No passado, nove fármacos foram licenciados para o uso como terapia adjunta em epilepsias de difícil controle, dentre eles, a lamotrigina e o levetiracetam (DICHTER; BRODIE, 1996). No entanto, estes novos agentes geralmente só são indicados quando o tratamento com drogas convencionais não funciona (epilepsias refratárias). Isto porque seus mecanismos de ação ainda

não são bem conhecidos, embora o desenvolvimento dessas drogas tenha sido baseado no conhecimento mais racional da fisiologia das crises epiléticas (KWAN *et al.*, 2001).

Nesse contexto, o estudo dos mecanismos de ação de novos fármacos antiepiléticos, bem como de perfis de atividade farmacológica distintos, atribuídos a agentes anticonvulsivantes convencionais, são necessários para melhorar o entendimento a respeito dos efeitos destas drogas. Tais achados podem contribuir para o tratamento adequado das convulsões e para a qualidade de vida de muitas pessoas acometidas pela epilepsia em todo o mundo.

II OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar um estudo comparativo entre levetiracetam (LEV), clonazepam (CNZP) e melatonina (MEL), com o objetivo de identificar a influência destas drogas sobre o estresse oxidativo neuronal *in vivo* e *in vitro* e sobre os sistemas colinérgico e dopaminérgico, no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina (400mg/Kg) em camundongos.

Objetivos específicos

- Identificar os efeitos do pré-tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre as convulsões, *status epilepticus* e morte induzidos por pilocarpina, através de estudos comportamentais (elaboração de curvas dose-resposta);
- Investigar a modulação exercida por LEV, CNZP ou MEL sobre o sistema colinérgico muscarínico, através de:
 - Avaliação dos efeitos de LEV, CNZP e MEL sobre os tremores induzidos por oxotremorina;
 - Investigação da atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de animais pré-tratados ou não com LEV, CNZP ou MEL e/ou P400;
 - Determinação da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de animais pré-tratados ou não com LEV, CNZP ou MEL e/ou P400;
 - Determinação dos efeitos de LEV, CNZP ou MEL sobre a densidade de receptores colinérgicos muscarínicos (*in vitro*) em hipocampo.
- Determinar a influência do pré-tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre o sistema dopaminérgico no modelo de convulsões com pilocarpina, através da determinação da densidade de receptores D1-símile e D2-símile em hipocampo.

- Avaliar do efeito do pré-tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre o estresse oxidativo neuronal induzido pelas convulsões com P400, através de:
 - Determinação da taxa de peroxidação lipídica e produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado de animais pré-tratados ou não com LEV, CNZP ou MEL e/ou P400;
 - Verificação da atividade da enzima antioxidante catalase e dos níveis de glutathione reduzida (GSH) em hipocampo e corpo estriado de animais pré-tratados ou não com LEV, CNZP ou MEL e/ou P400;
 - Identificação da potenciação do efeito protetor do antioxidante acetato de tocoferol (Vit. E) pela associação com LEV, CNZP e MEL nas convulsões induzidas por pilocarpina.

- Analisar a capacidade antioxidante de LEV, CNZP e MEL através de modelo de estresse oxidativo *in vitro*, em homogenatos de cérebro de camundongos, com estresse induzido por choque térmico.

III MATERIAL E MÉTODOS

1 Equipamentos e Materiais utilizados nos experimentos

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

2 Animais

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

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

O projeto com as metodologias utilizadas na elaboração da presente tese foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará. Protocolo de aprovação n-59/07.

3 Preparação das drogas

3.1 Levetiracetam

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

3.2 Clonazepam

Clonazepam (Rivotril[®]) foi dissolvido em solução salina 0,9%, obtendo-se uma concentração final de 0,05mg/mL.

3.3 Melatonina

Melatonina, ICN (CA, USA), foi dissolvida em TWEEN 80, 10% em solução salina 0,9% obtendo-se uma concentração final de 2,5mg/mL.

3.4 Pilocarpina

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

3.5 Oxotremorina

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

3.6 Atropina

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

3.7 Vitamina E

Acetato de tocoferol (Ephynal[®]) foi administrado em concentração de 400UI por animal.

4 Tratamento dos grupos experimentais

4.1 Curva dose-resposta para as drogas em estudo

Os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 10:00 horas. Os animais receberam injeções intraperitoneais de levetiracetam, nas doses de 30, 50, 100 ou 200mg/kg (LEV); clonazepam, nas doses de 0,25, 0,5 ou 1,0mg/Kg (CNZP); melatonina, nas doses de 5, 10, 25 ou 50mg/Kg (MEL) ou, ainda, dos veículos de dissolução dessas drogas (solução salina - NaCl 0,9% ou TWEEN 80 a 10% em solução salina). Após 30 minutos da última injeção das drogas ou

veículo, foi administrada pilocarpina na dose 400 mg/Kg, s.c. (P400). Outros quatro grupos receberam apenas LEV, CNZP, MEL ou salina 0,9% (controle).

Após a injeção de pilocarpina, os animais tratados e controles foram colocados em ambiente reservado para observação dos grupos pelo período de 1 hora (estudo comportamental) (**Figura 8**). Os animais que não sobreviveram até o final do período de observação foram decapitados logo após a morte, e os sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados logo após estudo comportamental. Hipocampo e corpo estriado foram imediatamente isolados, removidos sobre gelo e armazenados à -70°C para a realização dos estudos neuroquímicos.

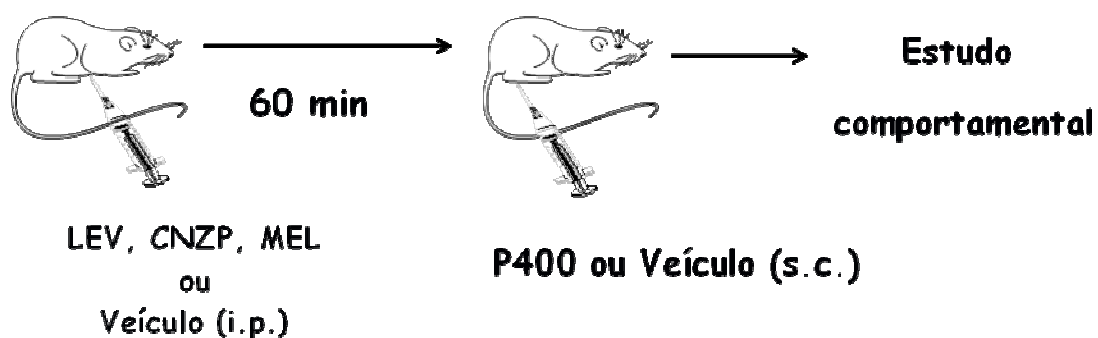


Figura 8. Protocolo experimental de tratamento dos animais

4.1.1 Estudo comportamental- Avaliação das alterações comportamentais após indução de convulsões e estado epiléptico pela administração de pilocarpina.

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo 5 a 10 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados durante 1 hora após a última injeção da droga, de acordo com o tratamento previsto. Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, convulsões motoras, instalação de estado epiléptico, número de mortes, latência de convulsão e latência de morte em cada grupo. O **Quadro 8** apresenta estes parâmetros juntamente

com suas características. Depois desse período de observação, os animais foram utilizados para estudos neuroquímicos.

Quadro 8 - Parâmetros comportamentais observados

Parâmetros	Características
1. Sinais colinérgicos periféricos (SCP)	Miose, cromodacriorréia, piloereção, diarreia
2. Convulsão	Tônico / clônica
3. <i>Status epilepticus</i>	Convulsões intermitentes
4. Nº de mortes	Determinado durante o período de 1 hora depois da última administração realizada
5. Latência de convulsão	Intervalo de tempo em minutos entre a última injeção e o aparecimento da primeira convulsão

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

4.2 Estudo da potencialização da atividade antioxidante do acetato de tocoferol (Vit E)

Os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 10:00 horas. Os animais receberam injeções intraperitoneais de levetiracetam, na dose de 50mg/kg (LEV50); clonazepam, na dose de 0,25mg/Kg (CNZP 0,25); melatonina, na dose de 5mg/Kg (MEL5), ou, ainda, dos veículos de dissolução dessas droga (solução salina - NaCl 0,9% ou TWEEN 80 a 10% em solução salina), em associação ou não com acetato de tocoferol (Vit.E), 400U.I. por animal. Após 60 minutos da última injeção das drogas ou veículo, foi administrada pilocarpina na dose 400 mg/Kg, s.c.

(P400). Os estudos comportamentais foram realizados como descrito anteriormente, para avaliação das latências de convulsão.

Quadro 9 – Grupos experimentais- Potenciação da atividade protetora da Vitamina E

Grupo	Tratamento
I	Veículo + P400
II	Vit.E + P400
III	LEV (50) + P400
IV	CNZP (0,25) + P400
V	MEL (5) + P400
VI	Vit.E + LEV (50) + P400
VII	Vit.E + CNZP (0,25) + P400
VIII	Vit.E + MEL (5) + P400

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

O experimento foi realizado segundo a técnica descrita por Fukuzaki *et al.* (2000): levetiracetam, 200mg/kg (LEV); clonazepam, 0,5mg/Kg (CNZP); melatonina, 25mg/Kg (MEL), salina 0,9% ou atropina (10 mg/Kg) foram administrados, intraperitonealmente, a camundongos, 30 min antes da injeção de oxotremorina (OXO). Os tremores foram visualmente avaliados (durante um minuto) em cada animal 10, 20 e 30 minutos após a administração de OXO (0,5 mg/kg, i.p.), usando uma escala proporcional de 0 a 3, como descrito por Coward (1977): 0 (sem tremores); 1 (tremores isolados e ocasionais); 2 (tremores moderados e intermitentes); 3 (tremores pronunciados e contínuos).

5 Dissecção das áreas cerebrais em estudo

Após o sacrifício por deslocamento cervical, os animais foram decapitados e tiveram os encéfalos rapidamente removidos e colocados sobre papel alumínio numa placa de petri com gelo

para posterior preparo dos homogenatos cerebrais (técnica de estresse oxidativo *in vitro*) ou dissecação das áreas cerebrais a serem estudadas (**Figura 9**).

Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicadamente e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo (**Figura 10**) que, com divulsionamento, foi descolado e retirado.

O corpo estriado foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (**Figura 11**).



Figura 9. Retirada do encéfalo.



Figura 10. Retirada do hipocampo.

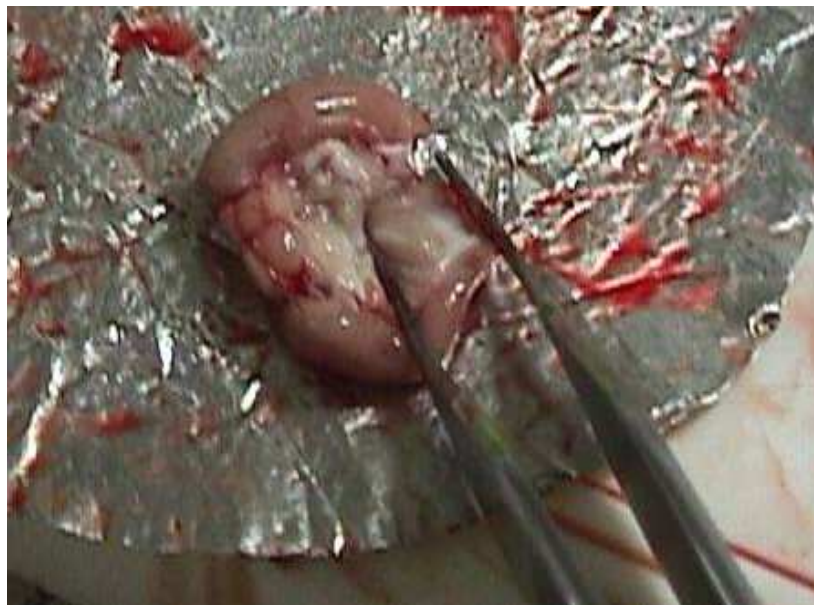


Figura 11. Retirada do corpo estriado.

Após o término da dissecação, hipocampo e corpo estriado foram colocados em papel de alumínio devidamente identificados, pesados e conservados a -70°C para uso posterior. Quando

as áreas foram estocadas durante um certo período de tempo (no máximo 2 meses), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação daqueles que foram ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (BURKE; GREENBAUN, 1987; FIELDER *et al.*, 1987).

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

6.1 Método

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

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

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

6.2 Procedimento experimental

Nos ensaios de *binding in vivo* (animais tratados com a droga ou veículo), terminada a dissecação das áreas cerebrais em gelo (descrita anteriormente), foram feitos homogenatos a 10 % de hipocampo em tampão fosfato de sódio, 150 mM, pH 7,4, para animais de todos os grupos de tratamento.

Nos ensaios de *binding in vitro*, os homogenatos cerebrais de hipocampo de animais não tratados (a 10 % em tampão fosfato de sódio, 150 mM, pH 7,4) foram previamente incubados com levetiracetam (LEV), clonazepam (CNZP) ou melatonina (MEL), nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL, por 30 minutos, antes do início do protocolo experimental descrito a seguir.

Rapidamente, os homogenatos contendo 130 - 160 µg de proteína foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo 2,38 nM de [³H]-NMS, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5 µM em um volume final de 0,2 mL, para experimentos de pontos únicos. Para experimentos de saturação o ligante foi utilizado em concentrações que variavam entre 0,119 a 5,95 nM. Como [³H]-NMS é um ligante não-específico dos receptores muscarínicos, pode ligar-se a todos os subtipos destes receptores (M₁- + M₂-símile). Assim, os ensaios de ligação para os subtipos específicos M₁-símile e M₂-símile foram realizados na presença de 100 µM de carbacol, para bloquear os sítios M₂, e 40 µM de pirenzepina, para bloquear os sítios M₁, respectivamente.

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

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5 mM. Os resultados foram expressos em fentomoles por miligrama de

proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de LOWRY *et al* (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

6.3 Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

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

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

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

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

7 Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos

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

➤ **Receptores D₁-símile**

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

➤ **Receptores D₂-símile**

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

7.1 Método

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

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

7.2 Procedimento experimental

Logo após a dissecação da área cerebral em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % de hipocampo em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Os homogenatos,

contendo 50-100 μg de proteína, foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores D_1 -símile, o tampão continha 2,82 nM de [^3H]-SCH 23390 para experimentos de ponto único e 0,14 a 5,63 nM para experimentos de saturação. No caso dos receptores D_2 -símile, o tampão continha 10 μM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos, e 4,72 nM de [^3H]-espiroperidol para experimentos de ponto único e 0,09 a 6,60 nM para experimentos de saturação.

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

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

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

7.3 Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- [^3H]-espiroperidol (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 μ L de [3 H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

➤ **[3 H]- SCH 23390** (87 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 μ L de [3 H]-SCH 23390 foram diluídos em tampão tris HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM

➤ **Tampão Tris-HCl**

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

➤ **Tris HCl modificado**

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

➤ **Mianserina**

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

➤ **Dopamina**

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

➤ **Butaclamol (Cloridrato de butaclamol)**

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

➤ **Coquetel de cintilação**

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

8 Dosagem de proteína

8.1 Método

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

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

8.2 Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- **Reagente A**
Na₂CO₃ (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2% em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N.
- **Reagente B**
CuSO₄.5H₂O a 0,5% em NaKC₄H₄O₆.4H₂O (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1%.
- **Reagente C**
Solução de cobre alcalino (24 mL do reagente A com 1mL do reagente B, misturados no momento de usar).
- **Reagente de Folin**
Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil) 1:1 em água bidestilada.
- **Solução de albumina sérica bovina** (Sigma, St Louis, MO, USA)
1 mg/mL em água bidestilada.

9 Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE)

9.1 Método

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

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

9.2 Soluções Reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

↳ Tampão fosfato de sódio

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

↳ Solução de iodeto de acetiltiocolina

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

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

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

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

10.1 Método

O grau de lipoperoxidação foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990), seguindo o protocolo a seguir.

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado foi misturado a 1 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% e acrescido de 1 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Após a

agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 min., adicionado o n-butanol (2:1 v/v), a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente centrifugada (800xg, 5 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

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

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

10. 2 Soluções reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

➤ **Solução de Cloreto de potássio**

2,3g de Cloreto de potássio (Reagen, RJ, Brasil) foram diluídos para um volume final de 200mL de água destilada destilada

➤ **Tampão Fosfato**

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

➤ **Solução de ácido tricloroacético**

TCA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 10 mL mais 90mL de água bidestilada.

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

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

11 Determinação da produção de nitrito

11.1 Método da Preparação da Curva-Padrão

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

11.2 Procedimento Experimental

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% (p/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (800xg, 10 min) os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μl do sobrenadante foi incubada com 100 μl do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H_3PO_4 1 %/*N*-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/ H_3PO_4 1 % / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550nm. A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

11.3 Solução reagente

A seguinte solução reagente foi empregada nessa técnica:

➤ **Solução de NaNO_2 (10mM)**

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

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

12 Determinação da atividade enzimática da Catalase (CAT)

12.1 Método

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

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

12.2 Procedimento Experimental

Foi preparado o meio da reação com H_2O_2 (18 mL) mais Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H_2O Milli Q (0,8 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980 μL do meio de reação mais 20 μL do homogenato a 10%. E feita à leitura durante 6 min a temperatura de $37^\circ C$ em espectrofotômetro a 230nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al* (1951).

12.3 Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- **Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8,0**
12,11 g de Trisma Base (1 M) e 0,19 g de EDTA (5 mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e diluídos em 100 mL de água Mill-Q. O pH foi acertado com HCl 1 M.
- **H_2O_2 para meio de reação**

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

13 Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)

13.1 Método

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

13.2 Procedimento Experimental

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

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

➤ Curva-padrão de Glutation (GSH)

A partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), foi preparado 4 mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4 M (pH 8,9). Adicionou-

se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB, e determinada a equação da curva padrão de GSH.

13.3 Soluções reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

➤ **Solução de ácido etilenodiaminotetracético**

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

➤ **Tampão Tris-HCl**

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

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

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

➤ **Solução de ácido tricloroacético**

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

➤ **Solução de Glutation**

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

14 Avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* em modelo de estresse oxidativo por choque térmico.

A atividade antioxidante foi avaliada pela medição da produção de ácido tiobarbitúrico (TBARS), um indicador de peroxidação lipídica (AGAR *et al.*, 1999), pela atividade da catalase (CHANCE; MAEHLY, 1995) e pelos níveis de nitrito-nitrato e glutathiona reduzida (GSH) (metodologias descritas anteriormente).

Camundongos Swiss, 25-30g, foram decapitados e tiveram os cérebros removidos a 4°C. As áreas cerebrais estudadas foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7.4 (1g de peso cerebral para 60mL de tampão). Foram obtidos 1000µL de homogenato na ausência (controle) ou presença das drogas testadas (levetiracetam, clonazepam ou melatonina, nas concentrações de 200, 100 ou 50µg/mL) para realização dos testes de avaliação da capacidade antioxidante.

Os homogenatos foram congelados por 24h a 20 °C (nas amostras pré-incubadas com levetiracetam, melatonina ou clonazepam, estas drogas foram adicionadas aos homogenatos antes do congelamento, em incubação, a temperatura ambiente, por 15min). O estresse oxidativo foi induzido por choque térmico, em incubação por 1 hora, a 37°C, dos homogenatos cerebrais, logo após o término do período de 24h de congelamento (exceto para as amostras sem estresse oxidativo (controle). A capacidade antioxidante foi calculada para cada concentração das drogas testadas (MATTEI *et al.*, 1998, 2001; AUDDY *et al.*, 2003).

15 Análise estatística

Os resultados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido de teste de Student Newman Keuls (*post hoc*) pelo programa GraphPad Prism® versão 3.00, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad Software. O mesmo programa (GraphPad Prism©) foi utilizado para confecção dos gráficos apresentados neste trabalho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p < 0,05$.

IV RESULTADOS

Os resultados de estudos comportamentais para identificação da curva dose-resposta do levetiracetam (LEV), bem como de sua atividade sobre os tremores induzidos por oxotremorina; assim como os ensaios de quantificação de receptores muscarínicos e dopaminérgicos sob influência do LEV *in vivo* e uma parte dos ensaios de avaliação da atividade antioxidante *in vivo* do LEV foram previamente apresentados em nossa dissertação de mestrado. Esses resultados foram reapresentados nesta tese (uma parte foi refeita, teve “n” aumentado), juntamente aos dados provenientes de novas metodologias para investigação dos efeitos do LEV e de todos os experimentos de investigação dos efeitos do clonazepam (CNZP) e da melatonina (MEL), com o intuito de permitir a realização de um estudo comparativo entre estas drogas.

1 ESTUDO COMPORTAMENTAL

1.1 Alterações comportamentais induzidas por pilocarpina em camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam (LEV), clonazepam (CNZP) ou melatonina (MEL).

Poucos minutos após a administração de pilocarpina, 400mg/Kg, i.p. (P400) os animais mostraram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia, tremores), e movimentos estereotipados, seguidos por convulsões motoras límbicas em 100% (40/40) dos animais tratados. O processo convulsivo persistiu e progrediu para *status epilepticus* (estado epiléptico) em 90% (36/40) desses camundongos, levando à morte de todos os animais (**Tabela 1**).

A administração de LEV, i.p., 60 min antes de P400, aumentou a latência de convulsão em todas as doses testadas, de forma dose-dependente, todavia, a dose de 200 mg/kg, selecionada para as análises seguintes, mostrou um aumento mais expressivo nas latências de convulsão quando comparada às demais doses ($p < 0,001$). Aumentou a latência de convulsão em 202% comparado ao controle, levou à ausência de convulsões em 53% (20/38) dos animais; reduziu a ocorrência de estado epiléptico em 58% (22/38) e protegeu 61% (23/38) dos animais da morte (**Tabela 1**).

A administração de CNZP, i.p., 60 min antes de P400, aumentou a latência de convulsão em todas as doses testadas. O efeito protetor demonstrado pelo clonazepam não ocorreu de forma dose-dependente, e a dose de 0,5mg/kg, selecionada para as análises seguintes, mostrou um aumento mais expressivo nas latências de convulsão quando comparada às demais doses ($p < 0,001$). Aumentou a latência de convulsão em 105% comparado ao controle, levou à ausência de convulsões em 70% (21/30) dos animais; reduziu a ocorrência de estado epilético em 70% (21/30) e protegeu 75% (22/30) dos animais da morte (**Tabela 2**).

A administração de MEL, i.p., 60 min antes de P400, aumentou a latência de convulsão, nas três maiores doses testadas. O efeito máximo protetor foi obtido na dose de 25mg/kg, selecionada para as análises seguintes. Esta dose promoveu um aumento expressivo na latência de convulsão (105%) quando comparada ao controle ($p < 0,01$), levou à ausência de convulsões em 20% (7/35) dos animais; reduziu a ocorrência de *status epilepticus* em 35% (12/35) e protegeu 40% (14/35) dos animais da morte (**Tabela 3**).

Sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados permaneceram inalterados em todos os grupos pré-tratados com as drogas testadas. Nenhum animal, dos grupos que receberam apenas salina isotônica, apenas LEV, CNZP ou MEL apresentou atividade convulsiva.

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

LEV (mg/Kg)	n	Convulsão (%)	Latência de Convulsão (min)	Morte (%)	Status epilepticus (%)
-	40	100	8,45 ± 0,23 (n=40)	100	90
30	14	100	12,52 ± 0,69 ^{a*} (n=14)	100	100
50	15	100	14,58 ± 1,20 ^a (n=15)	100	100
100	20	90	16,31 ± 0,90 ^a (n=18)	55	55
200	38	47	25,58 ± 1,30* (n=18)	39	42

Camundongos Swiss, machos, receberam salina 0,9% ou diferentes doses de levetiracetam (LEV), i.p., 60 minutos antes de P400. Os animais foram observados durante 1 hora após a injeção de P400. ^a p < 0,01 comparado ao grupo controle; ^{a*} p < 0,05 comparado ao grupo controle; * p < 0,001 comparado aos demais grupos (análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

Tabela 2 – Efeitos do CNZP nas alterações comportamentais e convulsões induzidas por P400 em camundongos

CNZP (mg/Kg)	n	Convulsão (%)	Latência de Convulsão (min)	Morte (%)	Status <i>epilepticus</i> (%)
-	40	100	8,45 ± 0,23 (n=40)	100	90
0,25	10	60	13,58 ± 1,20 * (n=6)	70	50
0,5	30	30	24,02 ± 2,30 ** (n=9)	25	30
1	10	40	17,33 ± 1,74* (n=4)	30	40

Camundongos Swiss, machos, receberam salina 0,9% ou diferentes doses de clonazepam (CNZP), i.p., 60 minutos antes de P400. Os animais foram observados durante 1 hora após a injeção de P400. * $p < 0,01$ comparado ao grupo controle; ** $p < 0,001$ comparado aos demais grupos (análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

Tabela 3 – Efeitos da MEL nas alterações comportamentais e convulsões induzidas por P400 em camundongos

MEL (mg/Kg)	n	Convulsão (%)	Latência de Convulsão (min)	Morte (%)	Estado epiléptico (%)
-	40	100	8,45 ± 0,23 (n=40)	100	90
5	10	100	10,06 ± 0,25 (n=10)	100	100
10	11	100	13,09 ± 0,60 * (n=11)	80	90
25	35	80	15,58 ± 0,88 ** (n=31)	60	75
50	10	100	12,74 ± 0,49* (n=10)	85	85

Camundongos Swiss, machos, receberam salina 0,9% ou diferentes doses de melatonina (MEL), i.p., 60 minutos antes de P400. Os animais foram observados durante 1 hora após a injeção de P400. *p < 0,05 comparado ao grupo controle; ** p < 0,01 comparado ao grupo controle; (análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

1.2 Efeitos do pré-tratamento com levetiracetam, clonazepam ou melatonina nos tremores induzidos por oxotremorina

O pré-tratamento com levetiracetam (200 mg/Kg; LEV); clonazepam (0,5mg/Kg; CNZP) e melatonina (25mg/Kg; MEL), i.p., reduziu a intensidade dos tremores causados por oxotremorina (OXO) em 48%, 41% e 74%, respectivamente ($p < 0,001$, **tabela 4 e Figura 12**). Os tremores foram determinados segundo a escala proporcional de 0 a 3, descrita por Coward, 1977. A administração de LEV, CNZO ou MEL isoladamente não induziu aparecimento de tremores.

Tabela 4 – Efeitos de LEV, CNZP e MEL na intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina

Grupos	n	Média de intensidade dos tremores (escala Coward)
OXO	15	2,64 ± 0,18
Atropina	05	0,00 ± 0,0
Atropina + OXO	10	0,00 ± 0,0**
LEV + OXO	15	1,37 ± 0,07*
CNZP + OXO	10	1,55 ± 0,13*
MEL + OXO	10	0,66 ± 0,09**

Foram obtidas as médias das 3 observações (10, 20 e 30 min) para cada animal dos diferentes grupos e estes resultados foram utilizadas p/ cálculo das médias finais de cada grupo. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ comparado ao grupo OXO (ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

1.3 Efeitos da associação levetiracetam, clonazepam ou melatonina com acetato de tocoferol (Vit.E) sobre as convulsões induzidas por pilocarpina.

De acordo com os resultados das curvas dose-resposta para levetiracetam (LEV), clonazepam (CNZP) ou melatonina (MEL), foram escolhidas as doses que apresentaram menor resposta protetora contra as convulsões induzidas por P400 (Pilocarpina, 400mg/Kg, s.c.) para associação com acetato de tocoferol, 400 U.I. por animal (Vit. E), a fim de investigar a possível potenciação do efeito protetor oferecido por essas drogas em associação com um agente antioxidante. A Vit. E, quando administrada isoladamente, demonstrou apenas uma tendência protetora contra as convulsões induzidas por P400. No entanto, as associações de Vit. E com LEV (30mg/Kg) (**Figura 12A**), CNZP (0,25mg/Kg) (**Figura 12B**) ou MEL (5mg/Kg) (**Figura 12C**) demonstraram uma elevação significativa nas latências de convulsão quando comparados aos grupos tratados com VitE, LEV, CNZP ou MEL, isoladamente ($p < 0.001$) (P400: $9,05 \pm 0,34$; Vit.E+P400: $12,35 \pm 0,24$; LEV30+P400: $16,32 \pm 1,13$; Vit.E+LEV30+P400: $27,00 \pm 1,92$; CNZP(0,25)+P400: $13,03 \pm 0,85$; Vit.E+CNZP(0,25)+P400: $24,43 \pm 1,52$; MEL5+P400: $10,58 \pm 0,56$; Vit.E+ MEL5+P400: $21,70 \pm 1,72$, $n=10$, latências de convulsão em minutos), representando uma potenciação da atividade protetora dessas drogas, em associação com um agente antioxidante, contra as convulsões induzidas por P400.

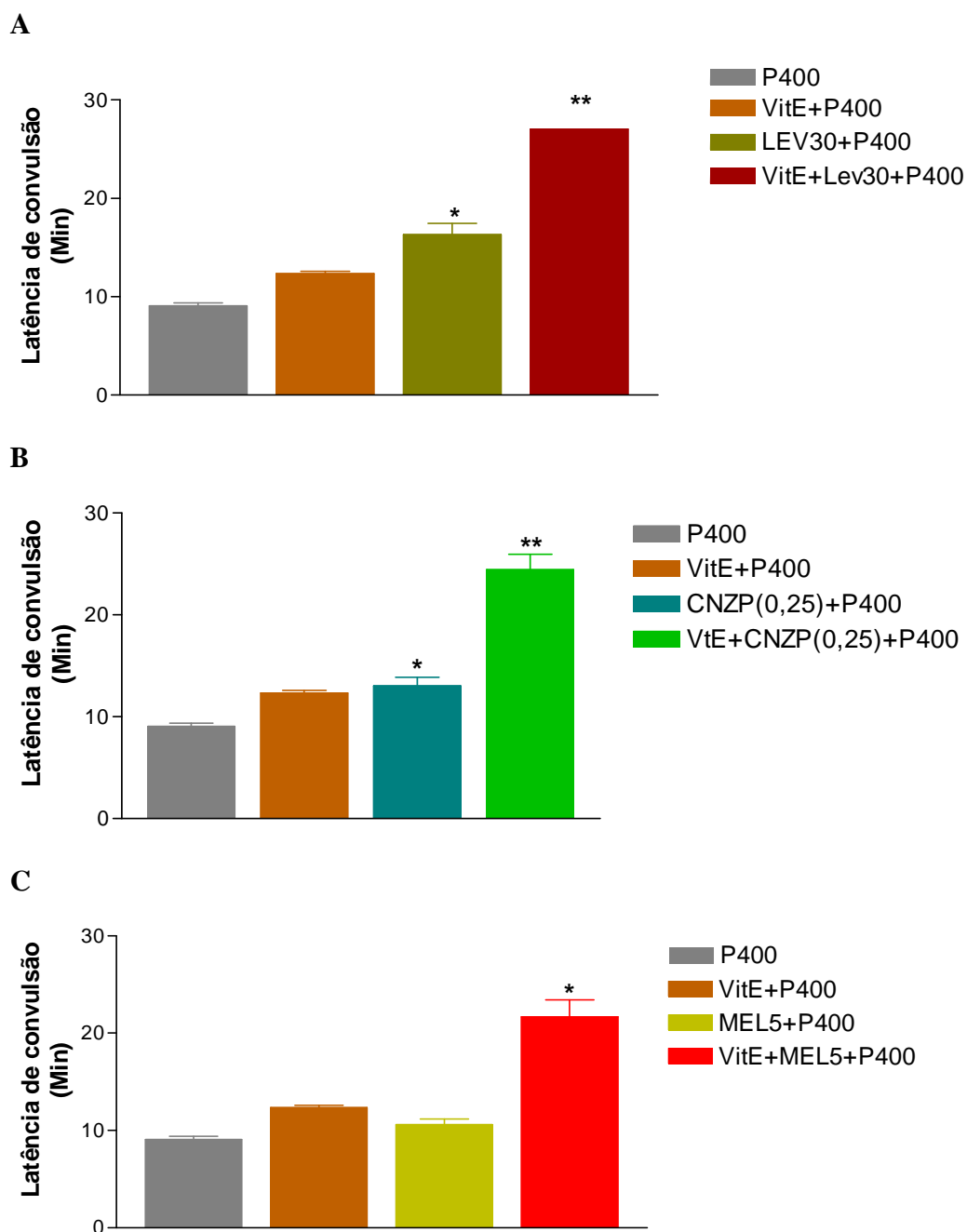


Figura 12. Potencialização da atividade anticonvulsivante de: A. Levetiracetam (LEV 30mg/Kg); B. Clonazepam (CNZP 0,25mg/Kg) e C. Melatonina (MEL 5mg/Kg) pela associação com acetato de tocoferol (Vit.E, 400 U.I.). Média \pm EPM, n=10. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ** $p < 0,01$ comparado aos demais grupos (ANOVA e Student-Newman-Keuls).

2 EFEITOS DE LEVETIRACETAM, CLONAZEPAM E MELATONINA SOBRE O SISTEMA COLINÉRGICO MUSCARÍNICO

O número de sítios de ligação para [^3H]-NMS foi determinado em membranas de hipocampo de camundongos dos seguintes grupos de tratamento: Controle (salina 0,9%); Levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV); Clonazepam, 0,5mg/Kg, i.p. (CNZP); Melatonina, 25mg/Kg, i.p. (MEL); Pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400); LEV + P400; CNZP+ P400 e MEL + P400. Foram realizados experimentos de ponto único com base em curvas de saturação e Scatchards representativos para cada grupo, com concentrações crescentes do ligante radioativo (Controle- $B_{\text{max}}= 248,30$, $K_d= 0,77$; LEV- $B_{\text{max}}= 166,30$, $K_d= 0,68$; CNZP- $B_{\text{max}}= 201,02$, $K_d= 0,72$; MEL- $B_{\text{max}}= 215,09$, $K_d= 0,67$; P400- $B_{\text{max}}= 165,40$, $K_d= 0,34$; LEV+P400- $B_{\text{max}}= 285,50$, $K_d= 1,04$; CNZP+P400- $B_{\text{max}}= 270,50$, $K_d= 0,50$; MEL+P400- $B_{\text{max}}= 175,01$, $K_d= 0,43$). Os resultados foram expressos em femtomoles/mg de proteína.

2.1 Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -, M_1 -, M_2 - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV e administrados ou não com P400.

A administração de LEV antes de P400 acarretou em diferenças no *binding* dos receptores muscarínicos (M_1+M_2) comparado ao grupo P400. O pré-tratamento com LEV reverteu a *downregulation* induzida por P400, trazendo a densidade desses receptores de volta a valores similares aos do grupo controle. De forma interessante, tanto LEV quanto P400, quando administrados isoladamente, induziram reduções de 38% e 34% ($p<0,01$), respectivamente, no *binding* de M_1+M_2 , comparados ao controle. Em relação aos receptores M_1 , apenas no grupo P400 ocorreu *downregulation* (aproximadamente 60%, $p<0,001$), comparado aos demais grupos. Os receptores M_2 , no entanto, sofreram *downregulation* apenas nos grupos tratados com LEV isoladamente ou LEV+P400. Dessa forma, a administração de P400 ou LEV, isoladamente, causou uma *downregulation* nos subtipos M_1 e M_2 , respectivamente (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Efeitos do LEV, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos

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

Médias ± EPM, n=8-10. ^{a, d} p < 0,01 comparado aos grupos Controle e LEV + P400 , respectivamente; * p < 0,001 comparado aos demais grupos (ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

2.2 Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -, M_1 -, M_2 - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com CNZP e administrados ou não com P400.

O pré-tratamento com CNZP reverteu a *downregulation* induzida por P400, (em M_1+M_2 e M_1). CNZP não apenas modificou o *binding* desses receptores a valores similares aos do grupo controle, mas induziu uma elevação significativa (25%, $p < 0,001$) na densidade de ligação aos mesmos (*upregulation*). Os receptores do subtipo M_2 não sofreram alteração em sua densidade pela administração de CNZP. (Tabela 6).

Tabela 6 – Efeitos do CNZP, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos

Grupo	M_1+M_2	M_1	M_2
Controle	213,00 ± 13,42	105,90 ± 06,49	27,019 ± 01,48
CNZP	197,40 ± 17,54	97,02 ± 06,29	30,24 ± 01,51
P400	172,10 ± 11,30 ^{a*}	59,19 ± 07,14 ^a	34,28 ± 04,17
CNZP + P400	265,90 ± 17,19 ^a	127,90 ± 11,87 ^a	26,65 ± 01,79

Os ensaios subtipo-específico para receptores M_1 e M_2 foram realizados na presença de carbacol, para bloquear M_2 e pirenzepina, para bloquear M_1 , respectivamente. Médias ± EPM, n=6-8. ^{a*} $p < 0,01$ comparado ao controle; ^a $p < 0,001$ comparado ao controle (ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

2.3 Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com MEL e administrados ou não com P400.

O tratamento com MEL isoladamente não modificou o *binding* de receptores muscarínicos em hipocampo em relação ao controle. O pré-tratamento com MEL também não alterou a *downregulation* induzida por P400 nos receptores muscarínicos hipocampais. (Tabela 7).

Tabela 7 – Efeitos da MEL, administrada antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos

Grupo	M_1+M_2
Controle	200,70 ±14,00
MEL	213,90 ±15,92
P400	146,30 ±12,02*
MEL + P400	162,30 ±11,58*

Médias ± EPM, n=5-6. *p < 0,01 comparado ao controle (ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

2.4 Ensaios de binding *in vitro*. Densidade de receptores muscarínicos (M₁ + M₂- símile) em homogenatos de hipocampo de camundongos pré-incubados com LEV, CNZP ou MEL.

O número de sítios de ligação para [³H]-NMS foi determinado em homogenatos de hipocampo de camundongos não tratados, pré-incubados por 30min com LEV, CNZP ou MEL, nas concentrações de 50, 100 ou 200 μM, respectivamente. LEV, CNZP e MEL produziram efeito no *binding* muscarínico em todas as concentrações testadas, onde foram observadas inibições do *binding* de [³H]-NMS em até 31,5%, 68,4% e 70% na pré-incubação com LEV, CNZP e MEL, respectivamente, quando comparados ao controle (**Figuras 13, 14 e 15**). (Controle 168,1 ± 12,97; LEV 50μM = 130,10 ± 5,79; LEV 100μM = 115,90 ± 3,84; LEV 200μM = 132,70 ± 2,7; CNZP 50μM = 73,81 ± 2,82; CNZP 100μM = 64,05 ± 2,68; CNZP 200μM = 53,04 ± 1,61; MEL 50μM = 50,29 ± 1,36; MEL 100μM = 83,65 ± 2,78; MEL 200μM = 80,41 ± 1,57. Os resultados foram expressos em fentomoles/mg de proteína.

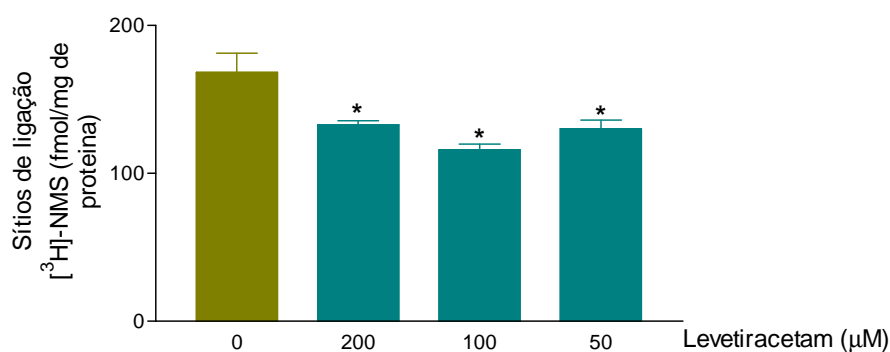


Figura 13- Efeitos do LEV (*in vitro*) sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo. Os resultados representam média ± E.P.M, n=6. *p < 0,01 comparado ao controle (ANOVA Student-Newman-Keuls).

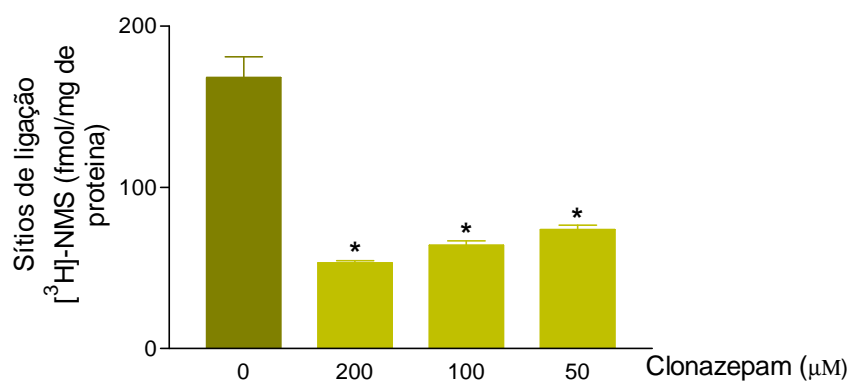


Figura 14- Efeitos do CNZP (*in vitro*) sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo. Os resultados representam média ± E.P.M, n=6. *p < 0,01 comparado ao controle (ANOVA Student-Newman-Keuls)

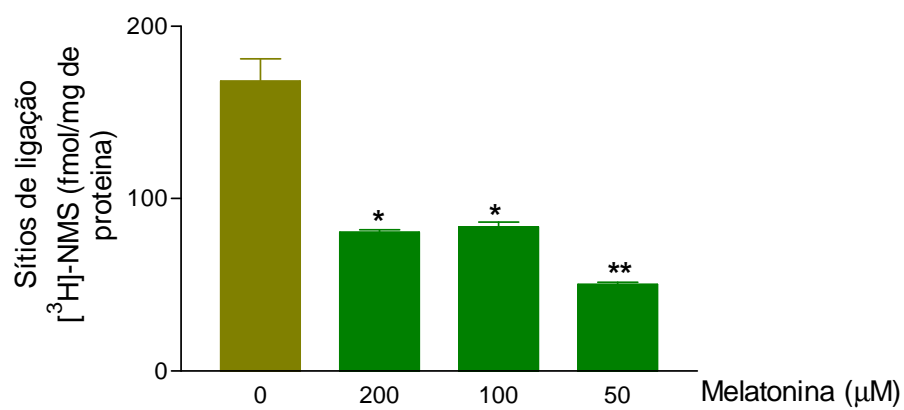


Figura 15- Efeitos da MEL (*in vitro*) sobre a densidade de receptores muscarínicos em hipocampo. Os resultados representam média \pm E.P.M, n=6. *p < 0,01, **p < 0,001 comparados ao controle (ANOVA Student-Newman-Keuls).

2.5 Efeitos de LEV, CNZP E MEL sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

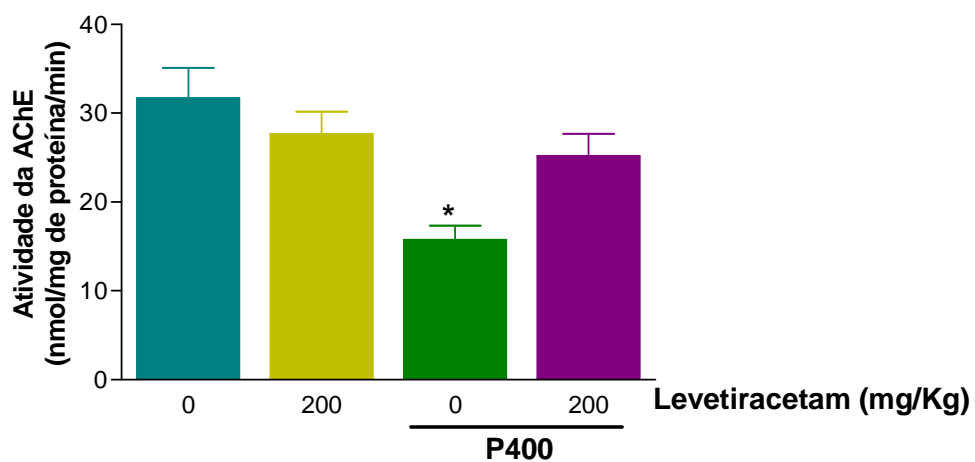
A investigação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada em hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos, pertencentes aos seguintes grupos de tratamento: Controle (salina 0,9%); Levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV); Clonazepam, 0,5mg/Kg, i.p. (CNZP); Melatonina, 25mg/Kg, i.p. (MEL); Pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400); LEV + P400; CNZP+ P400 e MEL + P400. Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína/minuto.

A administração de P400 foi capaz de reduzir em mais de 50% ($p < 0,001$) a atividade da AChE no hipocampo em relação ao controle. No entanto, o pré-tratamento com LEV reverteu esse efeito, tornando o nível de atividade da enzima AChE semelhante ao controle. Nenhuma alteração significativa foi evidenciada no corpo estriado dos animais pertencentes aos diferentes grupos de tratamento (**Figura 16**). Hipocampo: (Controle = $31,73 \pm 3,79$; LEV = $27,67 \pm 2,49$; P400 = $15,76 \pm 1,61$; LEV+P400 = $25,20 \pm 2,48$). (Figura 7); Corpo estriado: (Controle = $104,20 \pm 11,00$; LEV = $110,10 \pm 11,09$; P400 = $107,62 \pm 8,98$; LEV+P400 = $95,50 \pm 6,33$).

A administração de CNZP, isoladamente, induziu aumento de 54% na atividade da AChE. Quando CNZP foi administrado antes de P400, não somente reverteu a inibição da atividade da enzima, como induziu aumento de 140,8% na sua atividade em comparação ao controle ($p < 0,001$) no hipocampo. Nenhuma alteração significativa foi evidenciada no corpo estriado dos animais pertencentes aos diferentes grupos de tratamento (**Figura 17**). Hipocampo: (CNZP= $49,11 \pm 3,84$; CNZP+P400 = $76,42 \pm 6,42$). Corpo estriado: (CNZP= $104,10 \pm 10,66$; CNZP+P400 = $90,01 \pm 8,48$)

No hipocampo, MEL induziu aumento de 45,5% na atividade da AChE, tanto quando administrada isoladamente como quando administrada antes de P400 ($p < 0,001$). No corpo estriado, MEL induziu aumento de 113% na atividade da AChE quando administrada sozinha. ($p < 0,001$) (**Figura 18**). Hipocampo: (MEL= $46,17 \pm 4,83$; MEL+P400 = $46,95 \pm 4,64$); Corpo estriado: (MEL= $222,40 \pm 22,01$; MEL +P400 = $133,60 \pm 13,87$).

A



B

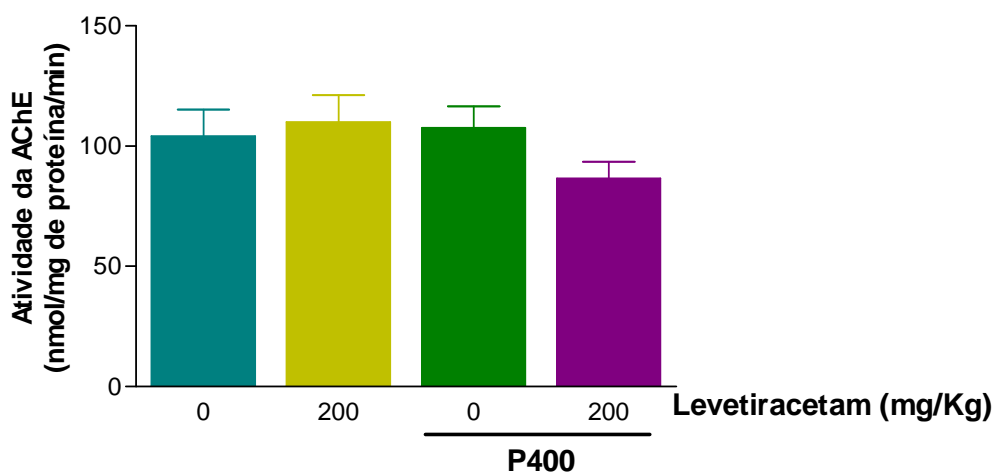
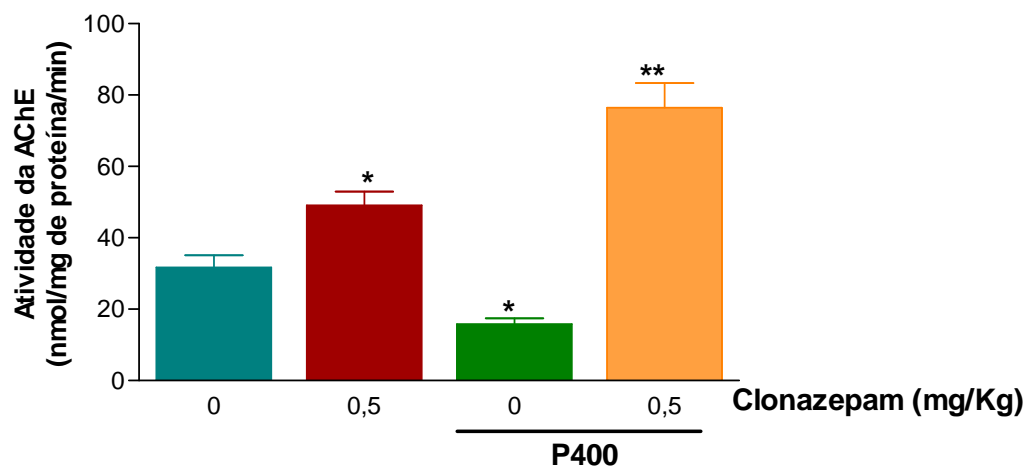


Figura 16. Efeitos do LEV sobre a atividade da AChE em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. Os resultados representam média \pm EPM, n= 20. * $p < 0,01$ em relação ao controle (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

A



B

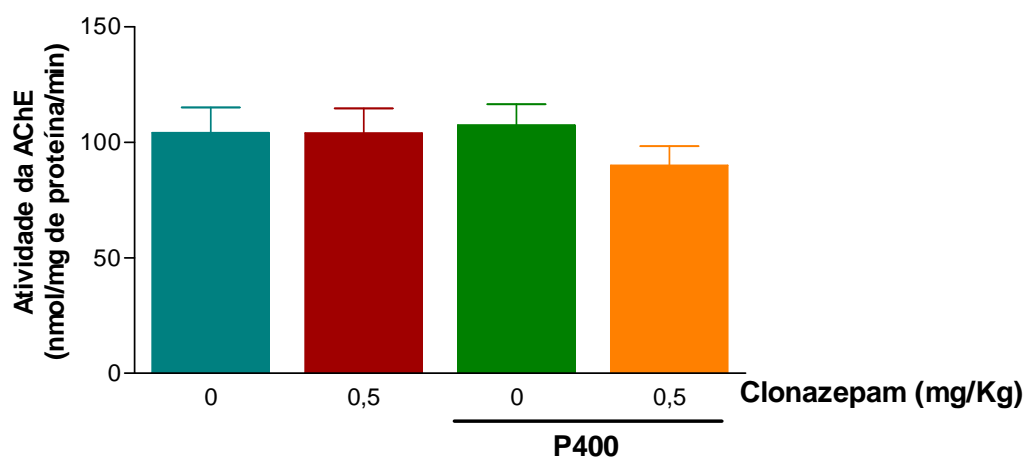
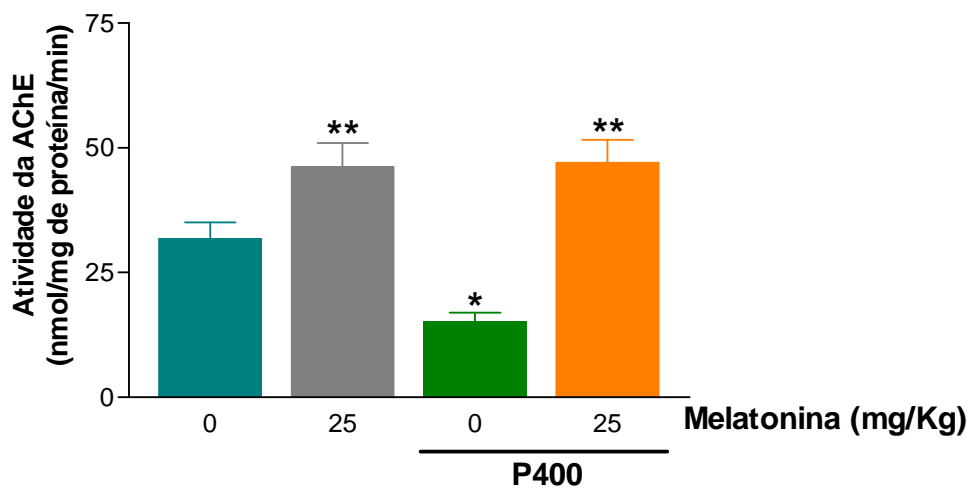


Figura 17. Efeitos do CNZP sobre a atividade da AChE em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. Os resultados representam média \pm EPM, $n = 15$ (A), $n = 10$ (B). * $p < 0,01$ em relação ao controle, ** $p < 0,001$ em relação aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

A



B

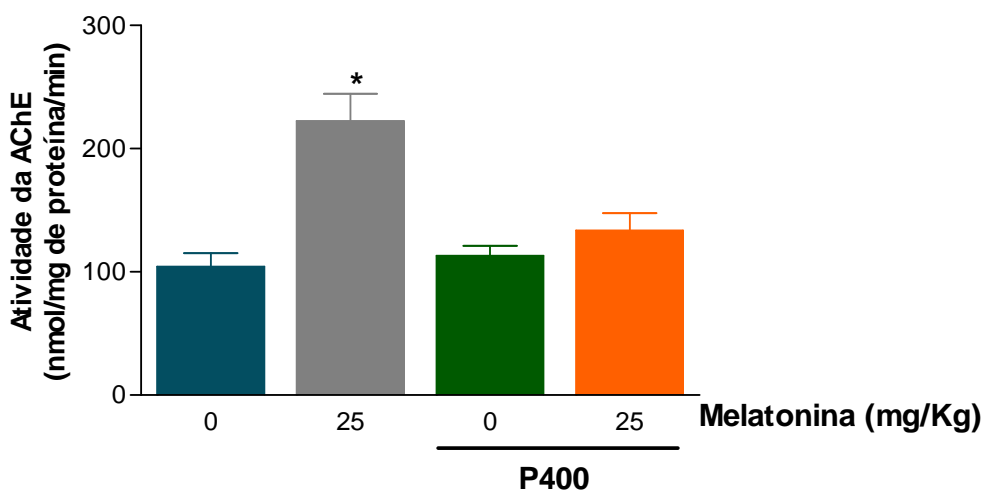


Figura 18. Efeitos da MEL sobre a atividade da AChE em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. Os resultados representam média \pm EPM, $n= 15$. (A) * $p<0,01$ em relação ao controle, ** $p< 0,001$ em relação aos demais grupos (B) * $p<0,001$ em relação aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

3 EFEITOS DE LEVETIRACETAM, CLONAZEPAM E MELATONINA SOBRE O SISTEMA DOPAMINÉRGICO

O número de sítios de ligação para [³H]-SCH 23390 e [³H]-espiroperidol foi determinado em membranas de hipocampo de camundongos dos seguintes grupos de tratamento: Controle (salina 0,9%); Levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV); Clonazepam, 0,5mg/Kg, i.p. (CNZP); Melatonina, 25mg/Kg, i.p. (MEL); Pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400); LEV + P400; CNZP+ P400 e MEL + P400. Foram realizados experimentos de ponto único com base nas curvas de saturação e Scatchards representativos, com concentrações crescentes dos ligantes radioativos (D1: Controle- Bmax= 130,30 Kd= 0,30; LEV- Bmax= 116,20, Kd= 0,45; P400- Bmax= 142,50, Kd= 0,15; LEV + P400- Bmax= 111,30, Kd= 0,12; D2: Controle- Bmax= 254,00, Kd= 0,77; LEV- Bmax= 218,90, Kd= 0,93; P400- Bmax= 304,70, Kd= 1,76; LEV + P400- Bmax= 284,00, Kd= 1,81). Os resultados foram expressos em femtomoles/mg de proteína.

3.1 Densidade de receptores dopaminérgicos (D₁- e D₂- símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV e administrados ou não com P400.

Os resultados demonstraram uma modificação no binding dos receptores dopaminérgicos, evidenciada pela *downregulation* dos receptores D₂-símile no grupo tratado apenas com LEV em comparação ao controle. Observa-se, ainda, que a densidade de receptores dopaminérgicos (D₁ ou D₂) não sofreu alteração significativa na fase aguda do processo convulsivo induzido por P400, como também no grupo pré-tratado com LEV antes de P400 (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Efeitos do LEV sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos

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

Os camundongos receberam injeção de levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV) seguida ou não de pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400). O grupo controle recebeu salina 0,9%. Médias ± E.P.M. N= 6-8. * p < 0,05 comparado aos demais grupos (ANOVA Student–Newman-Keuls test).

3.2 Densidade de receptores dopaminérgicos (D₁- e D₂- símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com CNZP e administrados ou não com P400.

Modificações no *binding* dos receptores dopaminérgicos também foram evidenciadas pela *downregulation* dos receptores D₂-símile nos grupos tratados apenas com CNZP e com CNZP antes de P400 em relação ao controle. A administração de CNZP não alterou *binding* dos receptores D₁-símile. (Tabela 9).

Tabela 9 – Efeitos do CNZP sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos

Grupo	D1	D2
Controle	227,00 ± 6,62	419,30 ± 16,60
CNZP	206,90 ± 15,32	268,50 ± 24,10*
P400	226,90 ± 13,15	386,40 ± 20,18
CNZP + P400	197,70 ± 12,48	295,20 ± 28,69*

Os camundongos receberam injeção de clonazepam, 0,5mg/Kg, i.p. (CNZP) seguida ou não de pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400). O grupo controle recebeu salina 0,9%. Médias ± E.P.M. N= 6-8. * p < 0,01 comparado aos demais grupos (ANOVA Student–Newman-Keuls test).

3.3 Densidade de receptores dopaminérgicos (D₁- e D₂- símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com MEL e administrados ou não com P400.

Apenas no grupo pré-tratado com MEL antes de P400 foi evidenciada modificação no *binding* dos receptores dopaminérgicos, pela *downregulation* dos receptores D₂-símile em relação ao controle. A administração de MEL não alterou *binding* dos receptores D₁-símile. (Tabela 10).

Tabela 10 – Efeitos da MEL sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos

Grupo	D1	D2
Controle	247,50 ± 21,16	419,30 ± 16,60
MEL	265,80 ± 11,61	362,90 ± 13,45
P400	230,60 ± 18,19	392,70 ± 18,15
MEL + P400	266,70 ± 05,71	341,70 ± 11,25*

Os camundongos receberam injeção de melatonina, 25mg/Kg, i.p. (MEL) seguida ou não de pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400). O grupo controle recebeu salina 0,9%. Médias ± E.P.M, n= 5. * p < 0,05 comparado ao controle (ANOVA Student–Newman-Keuls test).

4 EFEITOS ANTIOXIDANTES DO PRÉ-TRATAMENTO COM LEVETIRACETAM, CLONAZEPAM OU MELATONINA NO MODELO DE CONVULSÕES INDUZIDAS POR PILOCARPINA.

As análises para investigação da atividade antioxidante das drogas em estudo foram realizadas em homogenatos hipocámpais e estriatais dos seguintes grupos de tratamento: Controle (salina 0,9%); Levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV); Clonazepam, 0,5mg/Kg, i.p. (CNZP); Melatonina, 25mg/Kg, i.p. (MEL); Pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400); LEV + P400; CNZP + P400 e MEL + P400.

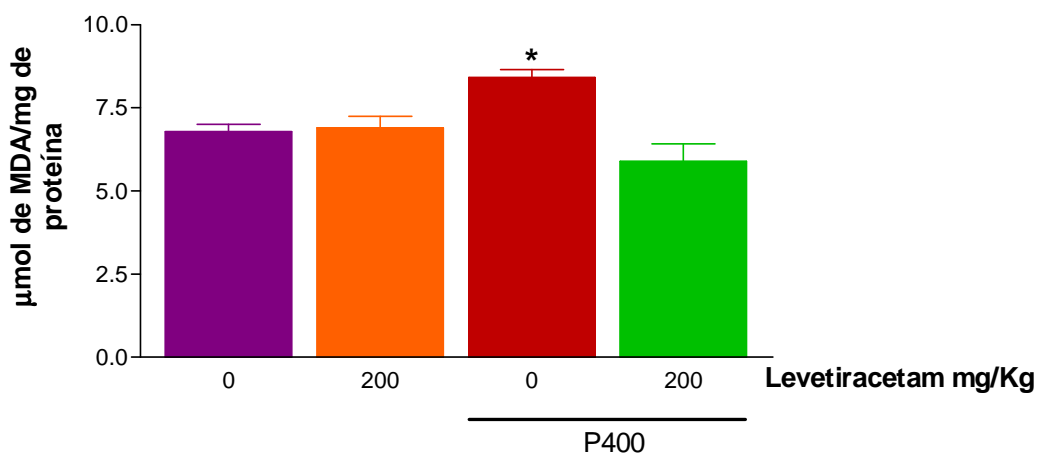
4.1 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) no modelo de P400.

Os resultados da análise da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo e corpo estriado dos diferentes grupos de tratamento foram expressos em μmol de MDA (malonildialdeído)/ mg de proteína.

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

Um aumento significativo na concentração de MDA em relação aos demais grupos foi evidenciado no hipocampo e no corpo estriado dos animais tratados com P400 ($p < 0,01$) em relação aos controles. Apenas no hipocampo, a elevação nos níveis de MDA induzida por P400 foi revertida pelo pré-tratamento com LEV. Quando administrado isoladamente, LEV não alterou os níveis de MDA nas áreas cerebrais estudadas (**Figura 19**). Hipocampo: Controle = $6,79 \pm 0,22$; LEV = $6,90 \pm 0,34$; P400 = $8,41 \pm 0,24$; LEV+P400 = $5,89 \pm 0,54$; Corpo estriado: Controle = $5,98 \pm 0,45$; LEV = $5,68 \pm 0,41$; P400 = $8,15 \pm 0,62$; LEV+P400 = $8,06 \pm 0,50$.

A



B

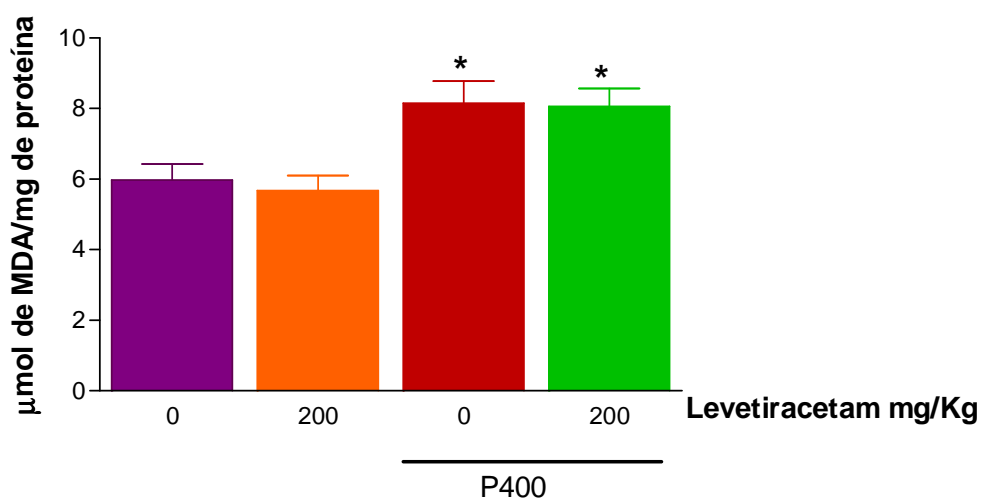


Figura 19. Efeitos do LEV sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Foi determinada a ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM, n=20. * $p < 0,01$ comparado aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

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

O pré-tratamento com CNZP foi capaz de reverter a elevação nos níveis de MDA, induzida por P400, tanto no hipocampo como no corpo estriado, trazendo os níveis de MDA para valores semelhantes ao controle. CNZP sozinho não alterou os níveis de MDA (**Figura 20**). Hipocampo: Controle = $5,87 \pm 0,41$; CNZP = $6,74 \pm 0,59$; P400 = $9,34 \pm 0,87$; CNZP+P400 = $6,39 \pm 0,19$; Corpo estriado: Controle = $4,90 \pm 0,40$; CNZP = $5,08 \pm 0,53$; P400 = $7,70 \pm 0,55$; CNZP+P400 = $4,28 \pm 0,30$.

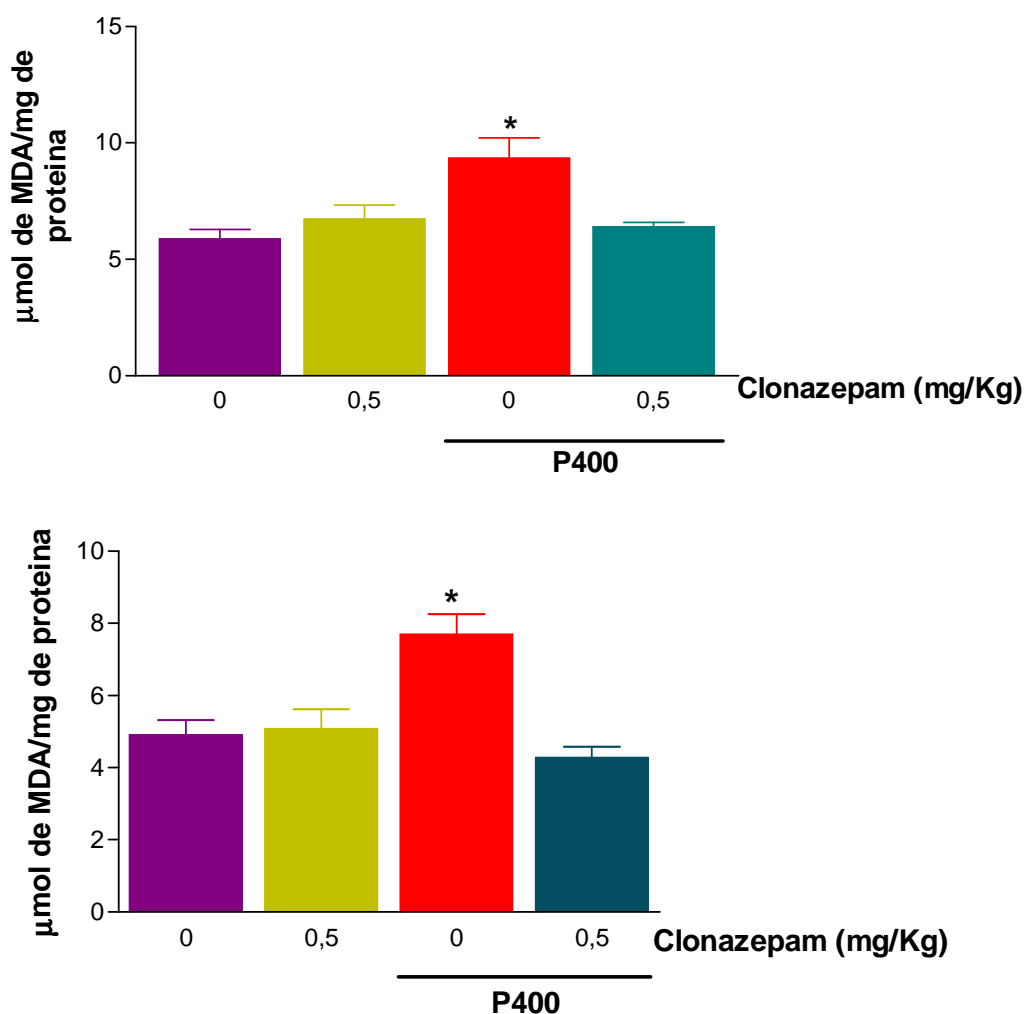


Figura 20. Efeitos do CNZP sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Foi determinada a ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM, $n=9-13$ (A); $n=10-15$ (B). * $p < 0,01$ comparado aos demais grupos (A) * $p < 0,001$ comparado aos demais grupos (B) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

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

Apenas no hipocampo, mas não no corpo estriado, a elevação nos níveis de MDA induzida por P400 foi revertida pelo pré-tratamento com MEL. A administração de MEL isoladamente não alterou a produção de MDA. (**Figura 21**). Hipocampo: Controle = $5,87 \pm 0,41$; LEV = $5,76 \pm 0,40$; P400 = $9,61 \pm 0,90$; LEV+P400 = $5,76 \pm 0,56$; Corpo estriado: Controle = $4,90 \pm 0,40$; LEV = $4,39 \pm 0,52$; P400 = $7,70 \pm 0,55$; LEV+P400 = $8,49 \pm 0,67$.

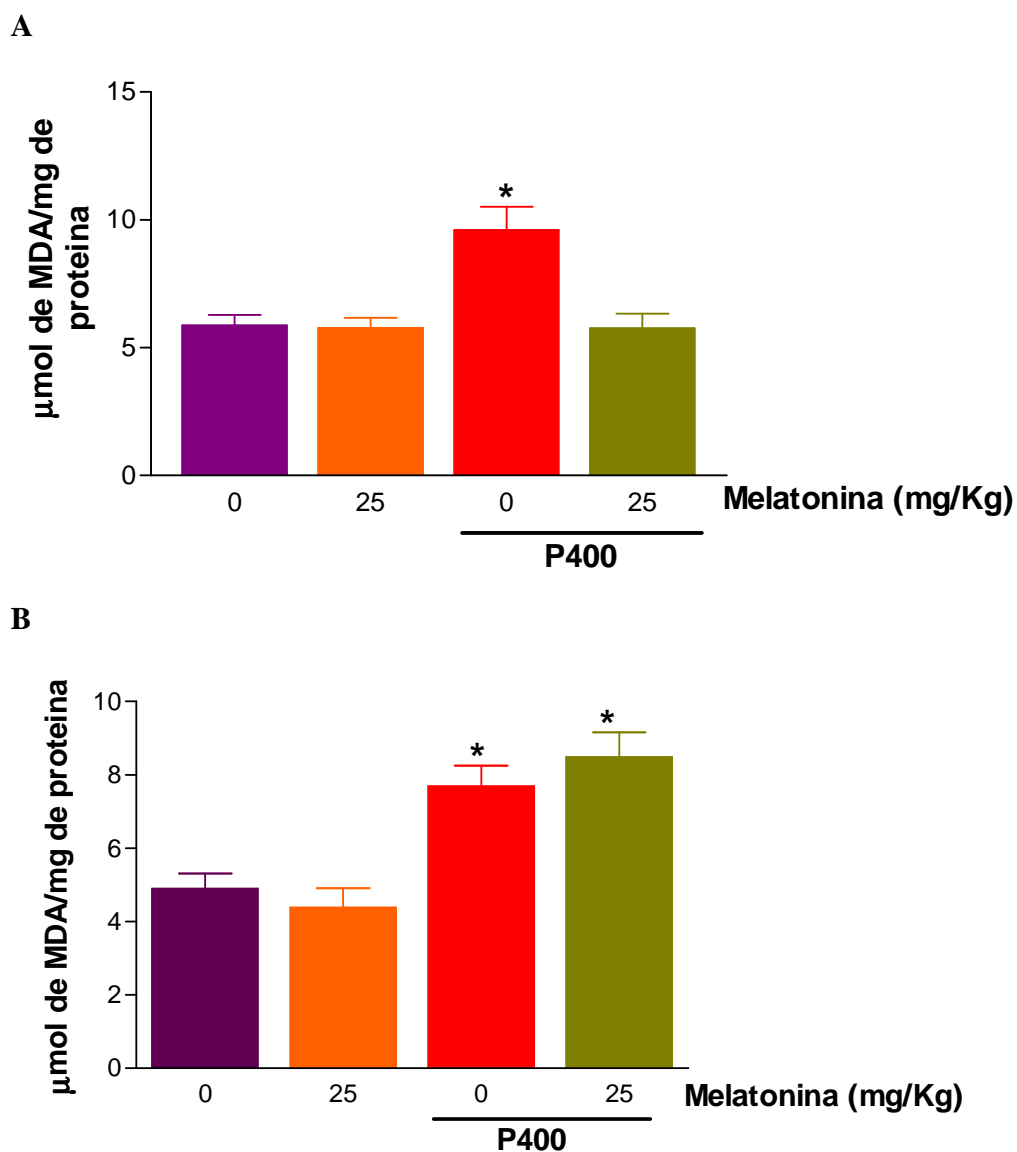


Figura 21. Efeitos da MEL sobre a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Foi determinada a ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA. Os valores representam a média \pm EPM, n=10-15. * $p < 0,01$ comparado aos controles (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

4.2 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a produção de nitrito-nitrato no modelo de P400.

Os resultados da verificação da produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado de camundongos nos diferentes grupos de tratamento foram expressos em nM.

4.2.1 Efeitos do LEV sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

Um aumento significativo na concentração de nitrito-nitrato foi evidenciado no hipocampo dos animais tratados apenas com P400 em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). No entanto, o pré-tratamento com LEV (grupo LEV + P400) reverteu esse aumento, trazendo os níveis de nitrito-nitrato para valores semelhantes aos do grupo controle. (Controle = $49,73 \pm 1,04$; LEV = $48,88 \pm 1,41$; P400 = $59,18 \pm 3,42$; LEV+P400 = $45,53 \pm 4,48$) (**Figura 22A**). Os níveis de nitrito-nitrato não foram alterados no corpo estriado pela administração de P400. No entanto, ocorreu redução na concentração destes compostos nos grupos tratados com LEV, isoladamente, ou antes de P400, em relação ao controle. (Controle = $59,95 \pm 3,23$; LEV = $47,22 \pm 4,55$; P400 = $56,47 \pm 3,10$; LEV+P400 = $43,22 \pm 1,50$) (**Figura 22B**).

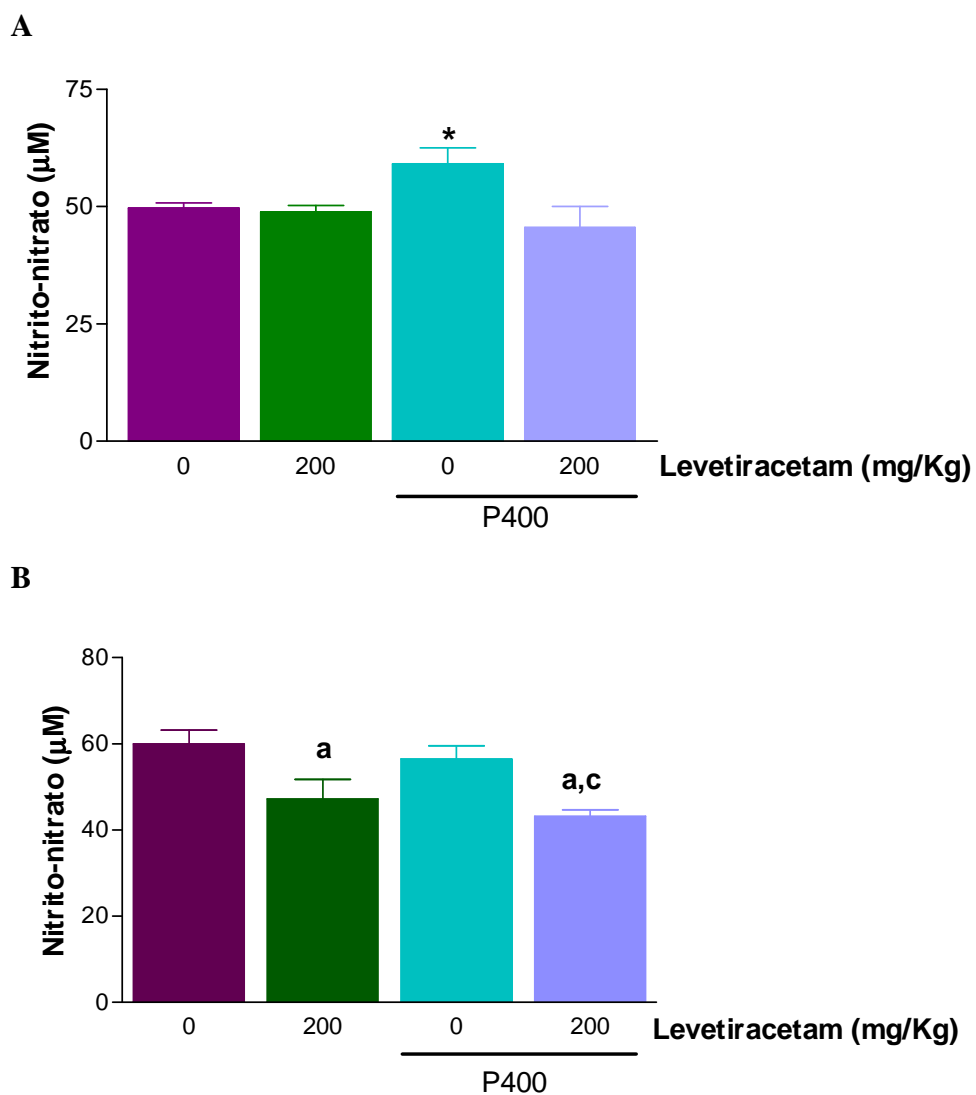


Figura 22. Influência do LEV sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. A produção de nitrito-nitrato foi determinada em 100 µL de homogenato. Os valores representam a média \pm EPM, n=6. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

4.2.2 Efeitos do CNZP sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

O pré-tratamento com clonazepam (CNZP + P400) reverteu o aumento nos níveis de nitrito-nitrato induzido por P400 no hipocampo (Controle = $49,73 \pm 1,04$; CNZP = $49,10 \pm 1,82$; P400 = $59,18 \pm 3,42$; CNZP+P400 = $47,37 \pm 3,28$) (**Figura 23A**). Nenhuma alteração nos níveis de nitrito-nitrato foi evidenciada no corpo estriado sob influência do CNZP. (Controle = $59,95 \pm 3,23$; CNZP = $58,68 \pm 2,41$; P400 = $58,88 \pm 4,40$; CNZP+P400 = $58,18 \pm 2,20$) (**Figura 23B**).

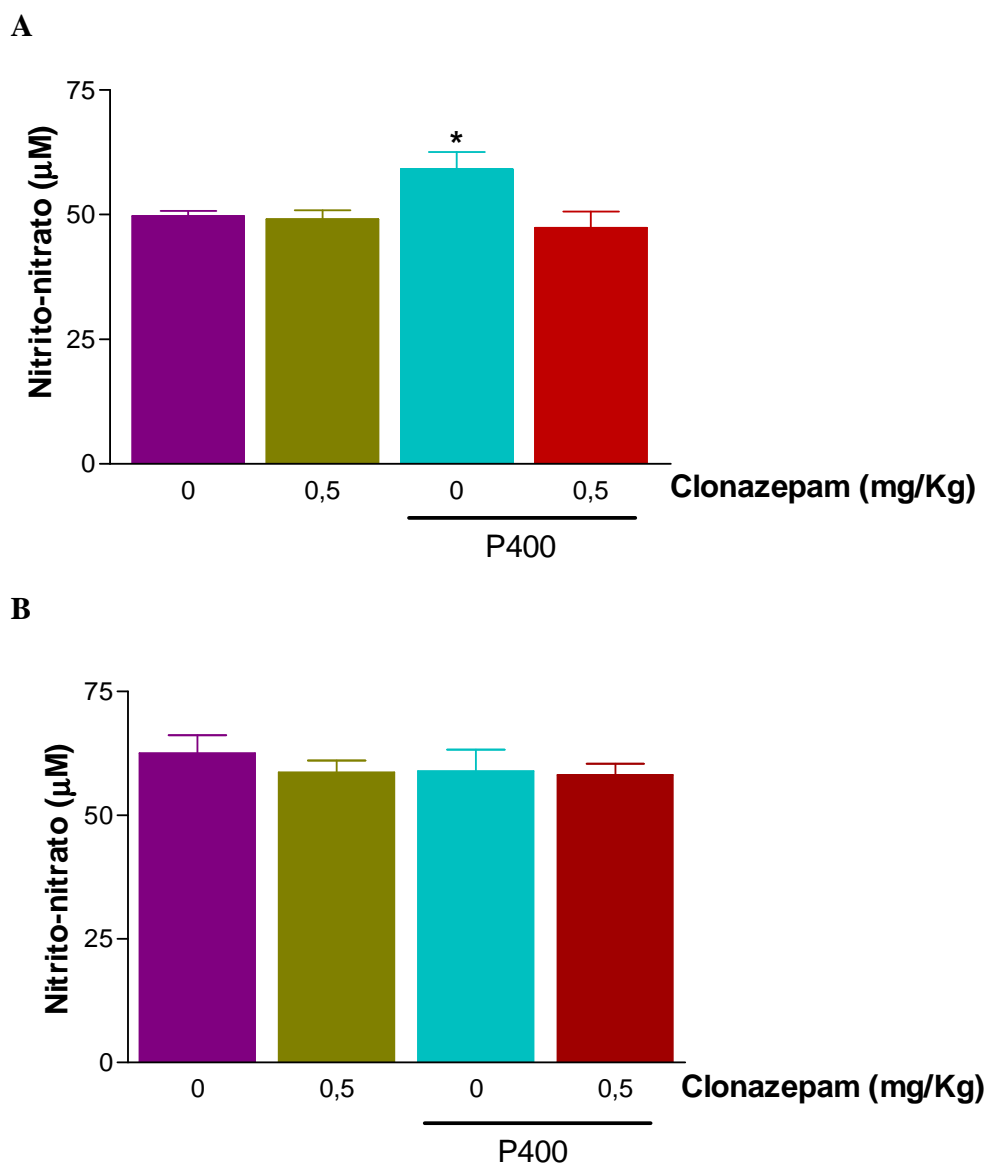


Figura 23. Influência do CNZP sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. A produção de nitrito-nitrato foi determinada em 100 µL de homogenato. Os valores representam a média \pm EPM, n=6. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

4.2.3 Efeitos da MEL sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

O pré-tratamento com MEL (grupo MEL + P400) não reverteu o aumento nos níveis de nitrito-nitrato induzido por P400 em hipocampo. No entanto, no hipocampo dos animais tratados apenas com MEL, houve uma redução significativa nos níveis de nitrito-nitrato em relação aos demais grupos. (Controle = $49,73 \pm 1,04$; MEL = $35,25 \pm 3,27$; P400 = $61,13 \pm 3,11$; MEL+P400 = $53,56 \pm 2,41$) (**Figura 24A**). Nenhuma alteração significativa nos níveis de nitrito foi evidenciada no corpo estriado sob influência da MEL (Controle = $62,50 \pm 3,66$; MEL = $60,56 \pm 2,09$; P400 = $58,88 \pm 4,40$; MEL+P400 = $53,60 \pm 2,98$) (**Figura 24B**).

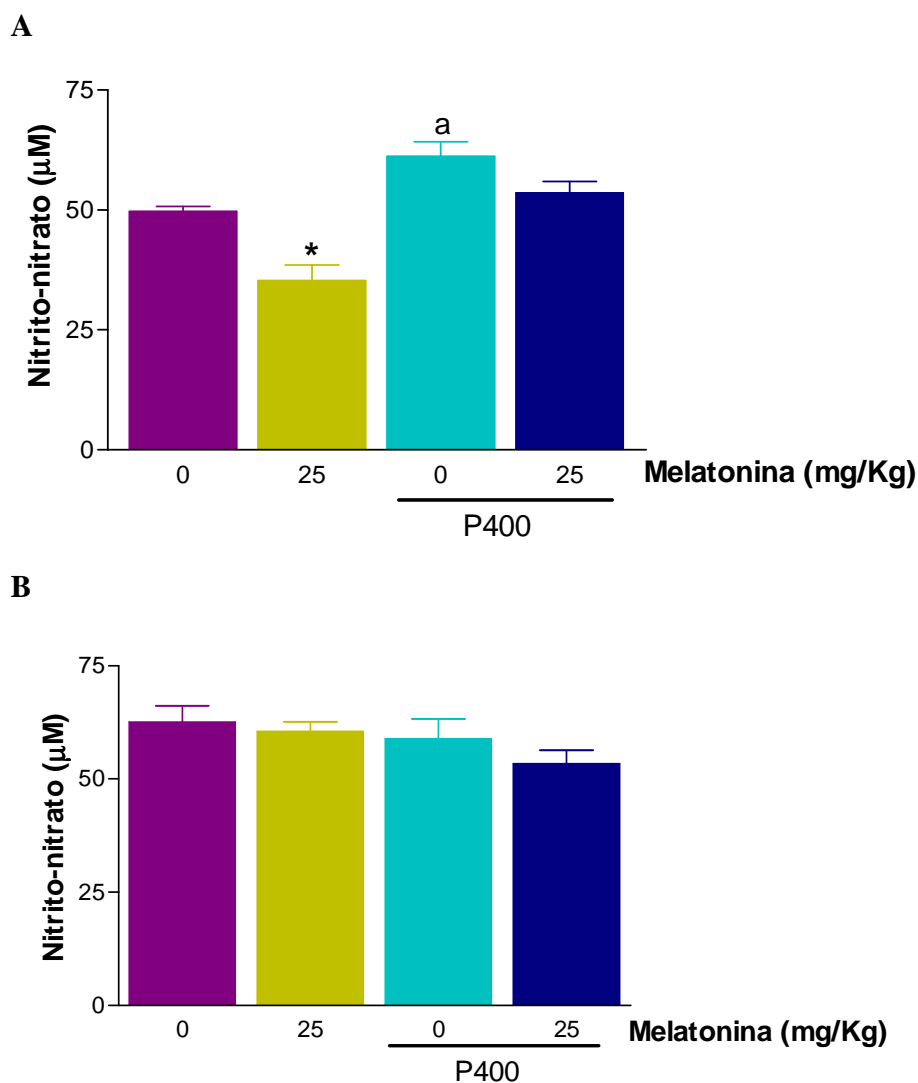


Figura 24. Influência da MEL sobre a produção de nitrito-nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. A produção de nitrito-nitrato foi determinada em 100 µL de homogenato. Os valores representam a média \pm EPM, n=6. ^ap < 0,05 comparado ao controle, *p < 0,01 comparado aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

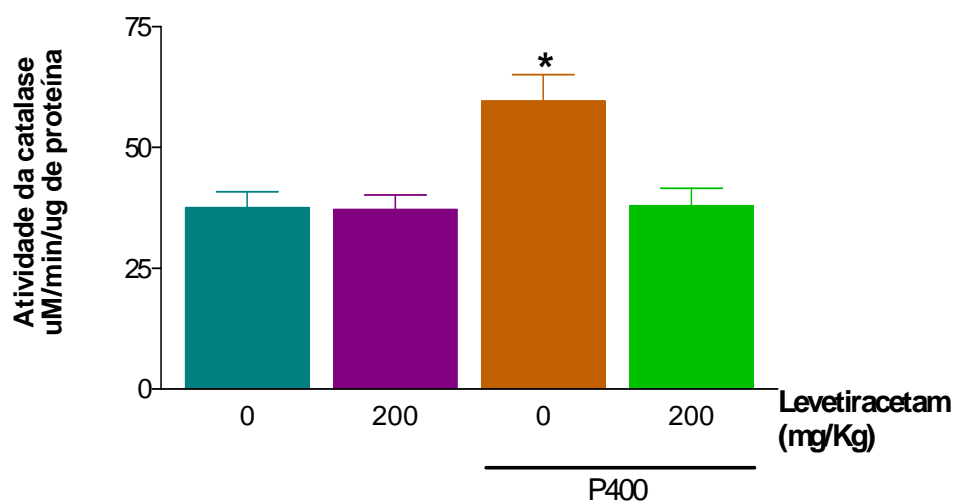
4.3 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a atividade da catalase no modelo de P400.

Os resultados da determinação da atividade enzimática da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos nos diferentes grupos de tratamento foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\mu\text{g}$ de proteína.

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

Foi observada uma elevação significativa, em relação aos demais grupos, na atividade da catalase, tanto em hipocampo como em corpo estriado, nos animais tratados com P400 sozinha. Em ambas as áreas cerebrais, esse aumento foi revertido pelo pré-tratamento com LEV antes de P400. A administração de LEV isoladamente não alterou a atividade da catalase. Hipocampo (Controle = $37,56 \pm 3,26$; LEV = $37,10 \pm 3,05$; P400 = $59,62 \pm 5,46$; LEV+P400 = $37,88 \pm 3,63$); Corpo estriado (Controle = $26,30 \pm 3,92$; LEV = $22,17 \pm 2,45$; P400 = $62,48 \pm 6,18$; LEV+P400 = $36,13 \pm 3,16$) (**Figura 25**).

A



B

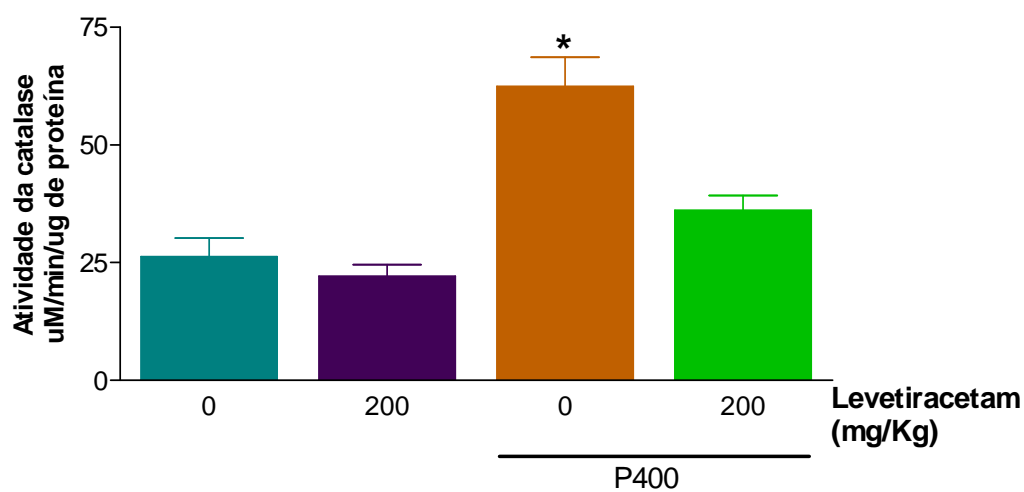


Figura 25. Ação do LEV sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Os valores representam a média \pm EPM, n=20-25. * $p < 0,01$ comparado aos demais grupos (A) * $p < 0,001$ comparado aos demais grupos (B) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

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

Tanto no hipocampo como no corpo estriado, o aumento na atividade da catalase induzido por P400 foi revertido pelo pré-tratamento com CNZP (CNZP+P400). A administração de CNZP isoladamente não alterou a atividade da catalase. Hipocampo (Controle = $26,72 \pm 2,79$; CNZP = $21,56 \pm 2,42$; P400 = $49,52 \pm 5,85$; CNZP+P400 = $35,26 \pm 3,58$); Corpo estriado (Controle = $21,17 \pm 2,99$; CNZP = $14,30 \pm 3,35$; P400 = $37,99 \pm 2,09$; CNZP+P400 = $25,99 \pm 2,86$) (**Figura 26**).

A

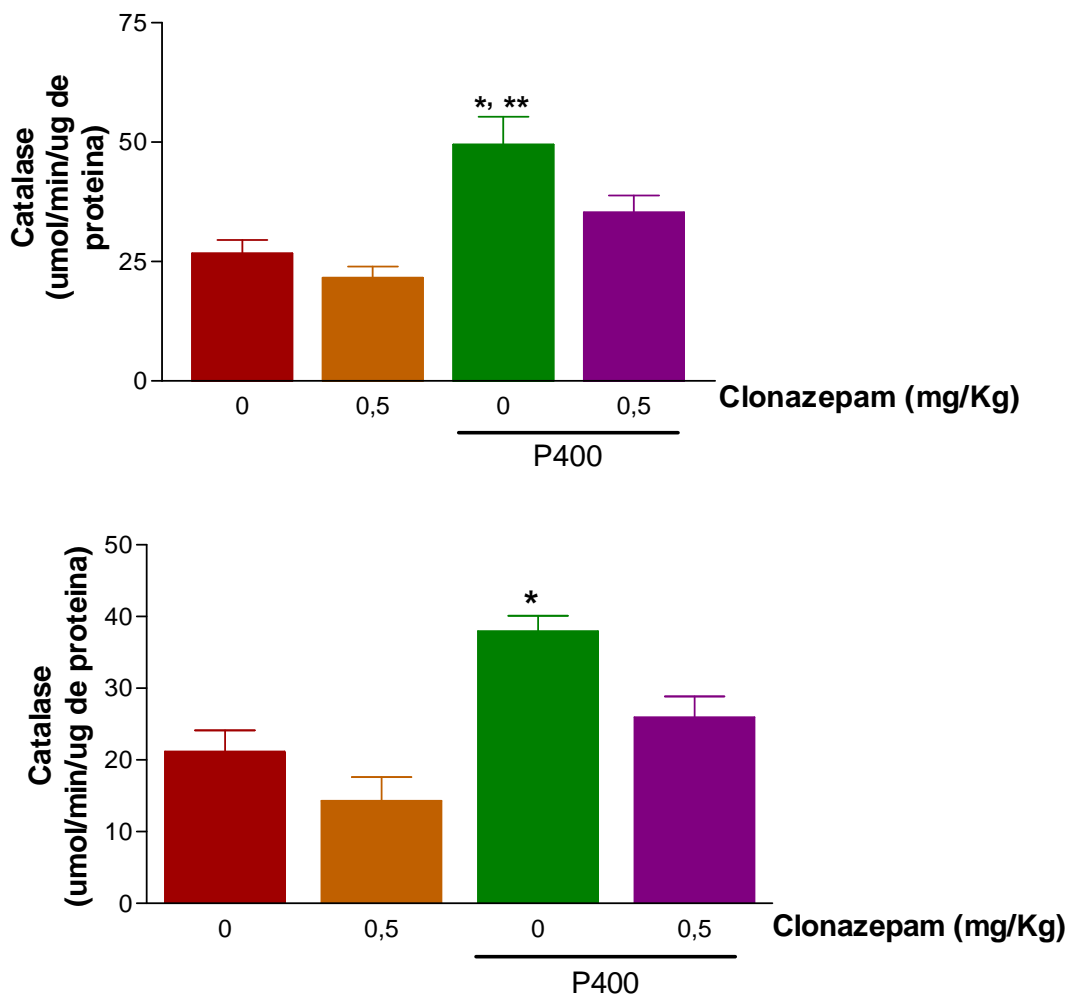


Figura 26. Ação do CNZP sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Os valores representam a média \pm EPM, n=18-25. *p < 0,01 comparado aos grupos salina e CNZP, **p < 0,05 comparado ao CNZP+P400 (A) * p < 0,001 comparado aos demais grupos (B) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

4.3.3 Efeitos da MEL sobre a atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

No hipocampo, mas não no corpo estriado, o aumento na atividade da catalase, induzido por P400, foi significativamente revertido pelo pré-tratamento com MEL (MEL+P400). A administração de MEL isoladamente não alterou significativamente a atividade da catalase. Hipocampo (Controle = $26,72 \pm 2,79$; MEL = $32,03 \pm 3,76$; P400 = $53,91 \pm 5,94$; MEL+P400 = $29,52 \pm 3,02$); Corpo estriado (Controle = $21,17 \pm 2,99$; MEL = $21,29 \pm 2,63$; P400 = $39,28 \pm 2,09$; MEL+P400 = $33,91 \pm 2,98$) (**Figura 27**).

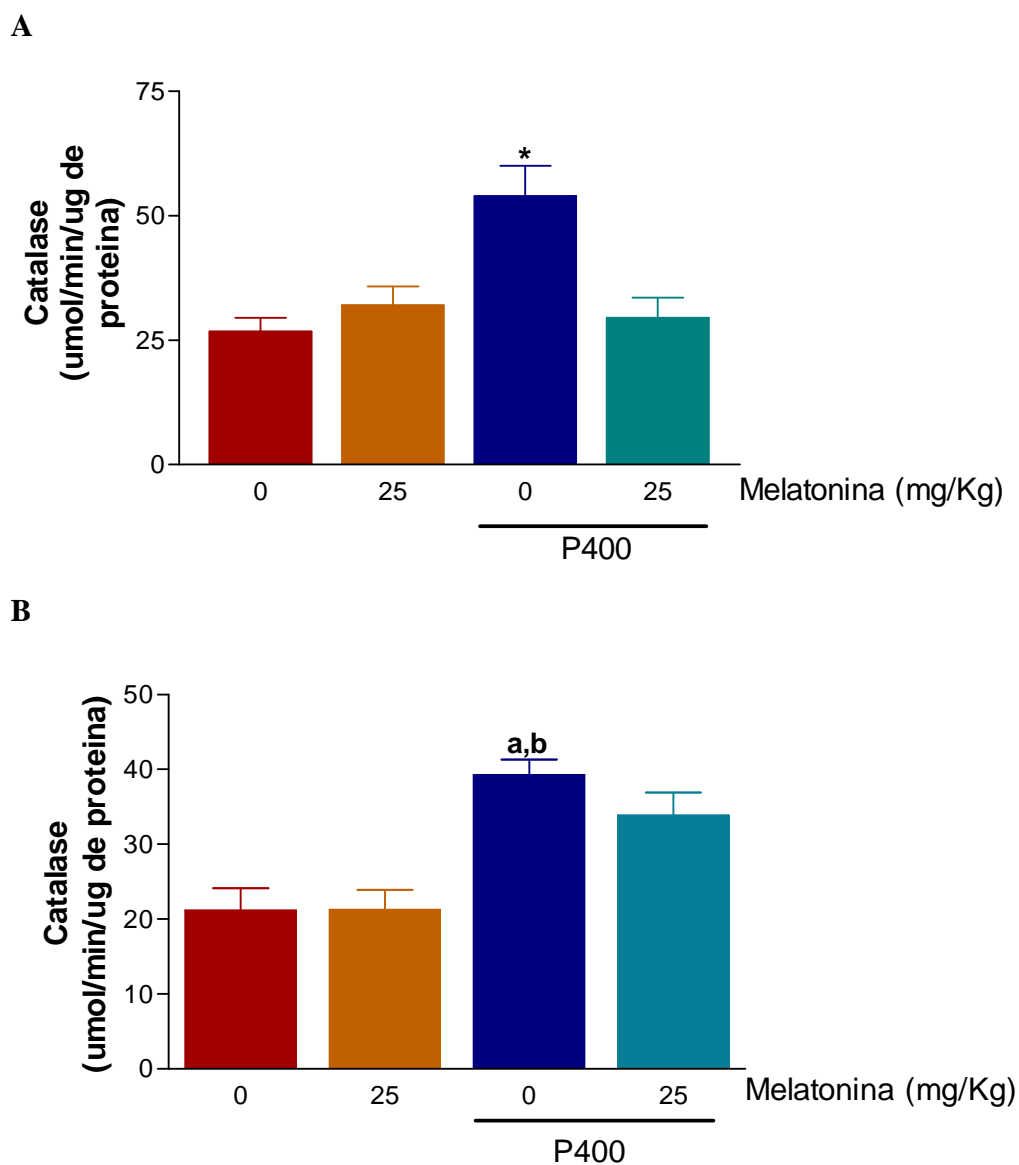


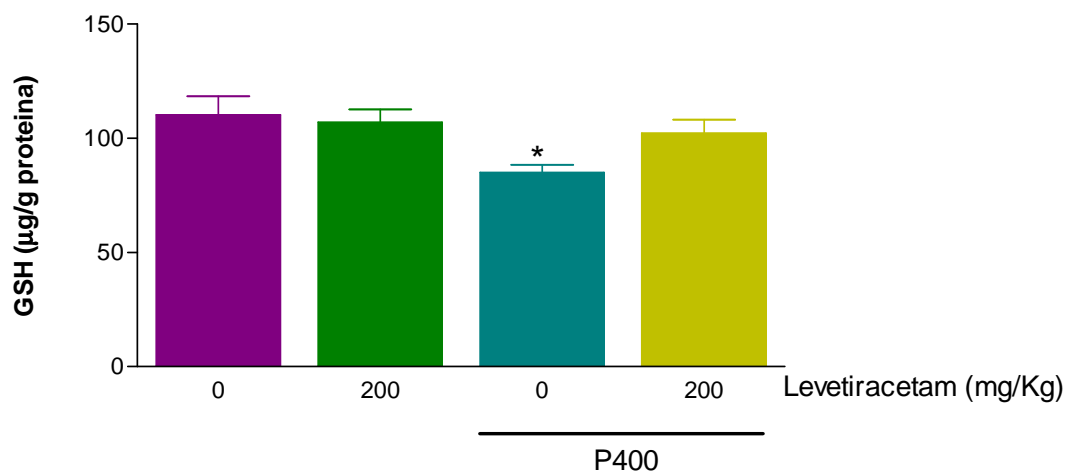
Figura 27. Ação da MEL sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Os valores representam a média \pm EPM, $n=10-15$. * $p < 0,01$ em relação aos demais grupos (A). ^{a,b} $p < 0,01$ em relação aos grupos salina e MEL (B) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

4.4 Efeitos do tratamento com LEV, CNZP ou MEL sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no modelo de P400.

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

Foi constatada uma redução significativa nos níveis de GSH no hipocampo dos animais tratados apenas com P400 em relação aos demais grupos. No entanto, a queda nos níveis hipocampais de GSH foi revertida pelo pré-tratamento com LEV (Controle = $110,30 \pm 8,12$; LEV = $107,10 \pm 56,61$; P400 = $85,07 \pm 3,42$; LEV+P400 = $102,30 \pm 5,90$) (**Figura 28A**). No corpo estriado, houve redução na concentração de GSH em todos os grupos que receberam P400, não sendo esse efeito revertido pela pré-administração de LEV (Controle = $282,00 \pm 20,62$; LEV = $291,10 \pm 17,87$; P400 = $149,20 \pm 24,76$; LEV+P400 = $140,40 \pm 14,03$) (**Figura 28B**).

A



B

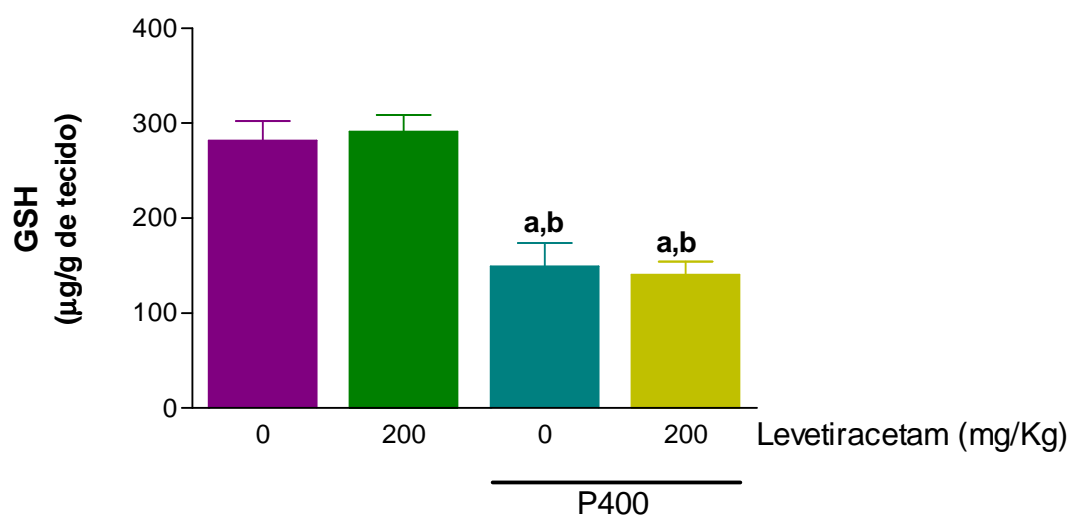


Figura 28. Influência do LEV sobre os níveis de GSH em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Os valores representam a média \pm EPM, n=10. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos (A) ^{a,b} $p < 0,01$ comparado aos grupos salina e LEV (B) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

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

Nenhuma alteração significativa foi observada nos níveis de GSH nos grupos que receberam CNZP isoladamente em relação ao controle. No hipocampo, embora a administração de P400 tenha levado à redução nos níveis de GSH, o pré-tratamento com CNZP elevou os níveis de GSH a valores similares ao controle. (Controle = $148,30 \pm 14,85$; CNZP = $118,70 \pm 6,48$; P400 = $86,12 \pm 7,56$; CNZP+P400 = $114,90 \pm 10,30$) (**Figura 29A**). No corpo estriado, a redução no níveis de GSH induzida por P400 foi revertida pelo pré-tratamento com CNZP (Controle = $250,30 \pm 10,54$; CNZP = $250,80 \pm 3,72$; P400 = $195,50 \pm 12,39$; CNZP +P400 = $249,00 \pm 6,97$) (**Figura 29B**).

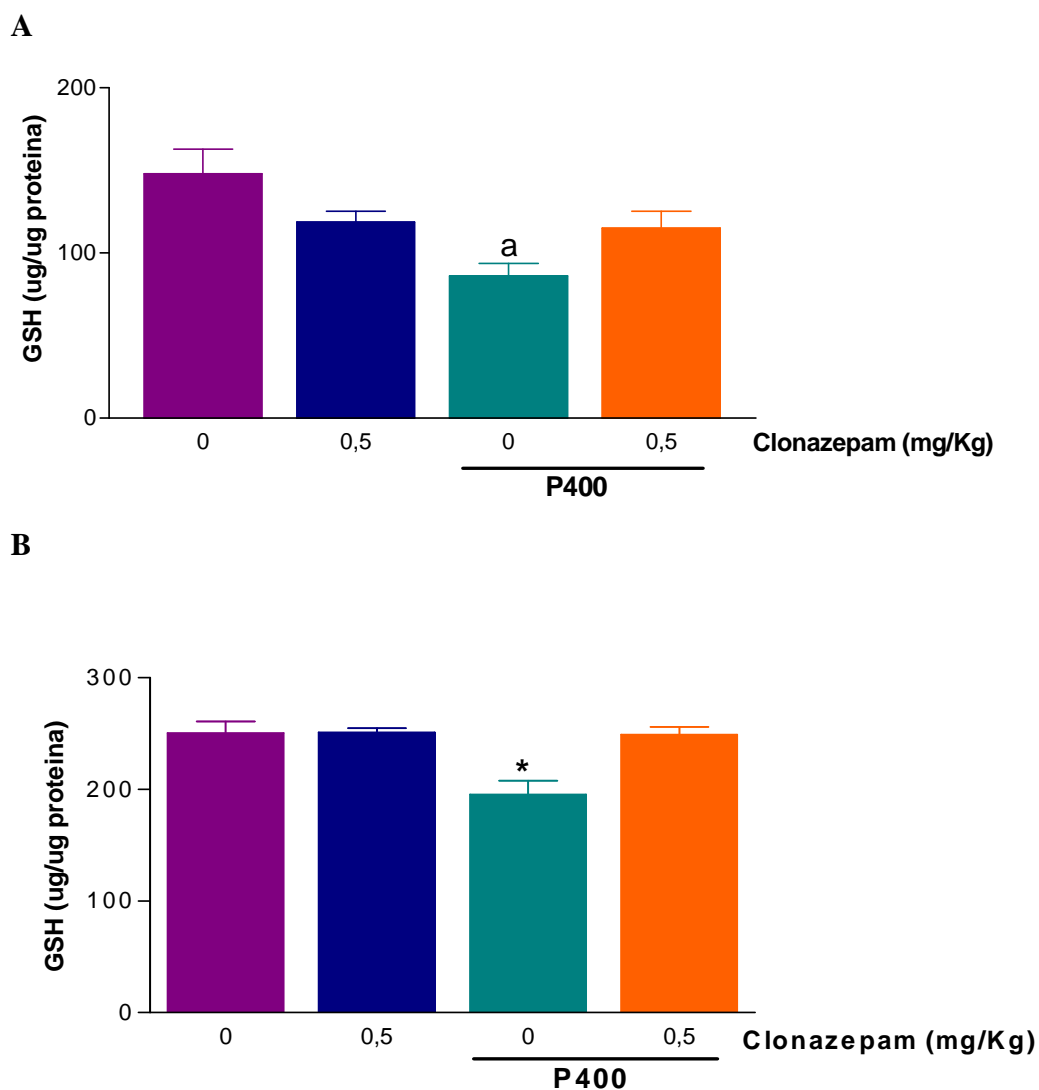


Figura 29. Influência do CNZP sobre os níveis de GSH em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Os valores representam a média \pm EPM, $n=15-20$. ^a $p < 0,001$ comparado ao controle (A) ^{*} $p < 0,01$ comparado aos demais grupos (B) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

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

Foi constatada uma elevação significativa na concentração de GSH no hipocampo dos animais tratados com MEL (isoladamente ou em associação a P400), em relação aos demais grupos. (Controle = $178,10 \pm 11,69$; MEL = $305,10 \pm 19,96$; P400 = $124,70 \pm 12,15$; MEL +P400 = $365,80 \pm 24,77$) (**Figura 30A**). No corpo estriado, a administração de MEL isoladamente elevou GSH em relação aos demais grupos e o pré-tratamento com MEL preservou os níveis de GSH em valores normais, revertendo a redução induzida por P400. (Controle = $268,90 \pm 13,15$; MEL = $544,60 \pm 38,04$; P400 = $204,50 \pm 12,43$; MEL +P400 = $311,60 \pm 43,16$) (**Figura 30B**).

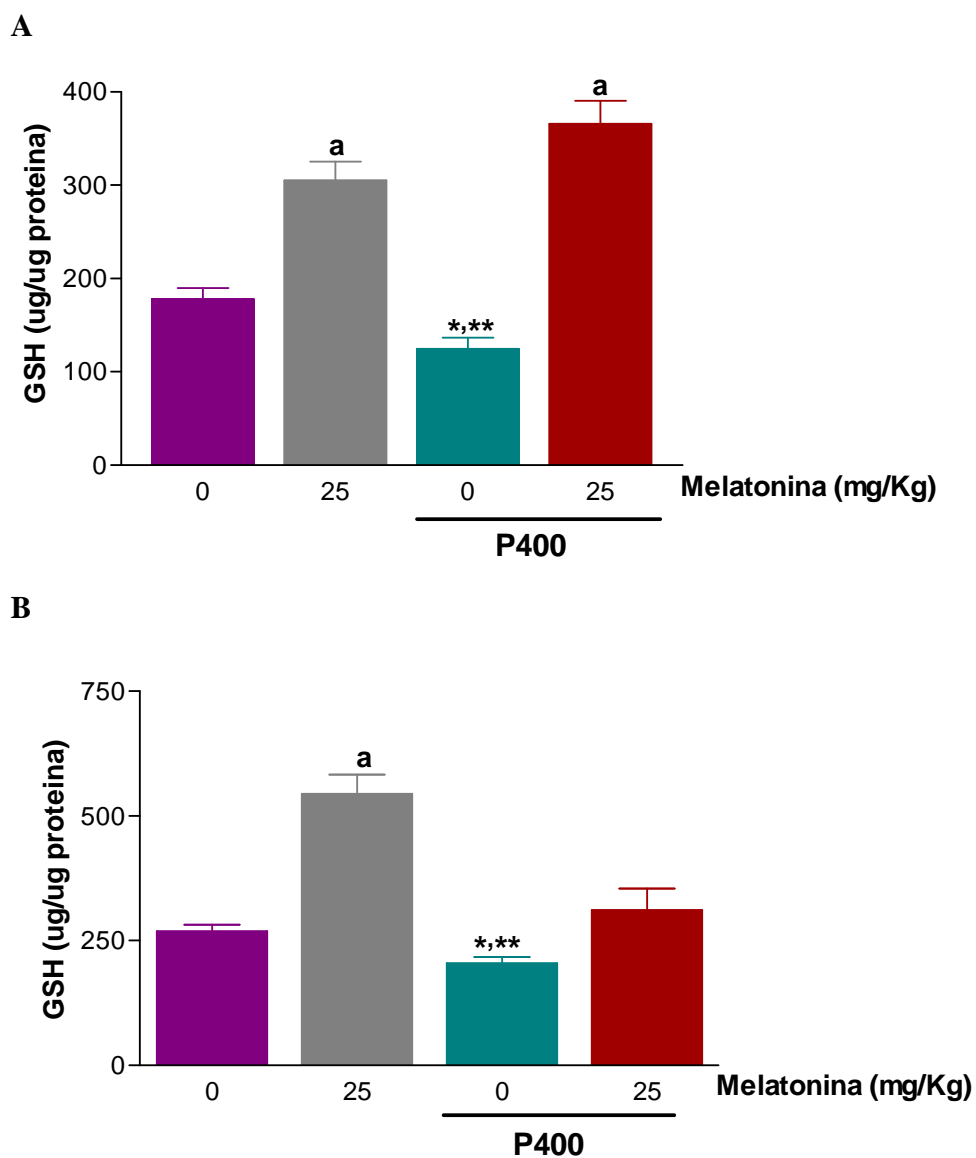


Figura 30. Influência da MEL sobre os níveis de GSH em hipocampo (A) e corpo estriado (B) no modelo de P400. Os valores representam a média \pm EPM, $n=10-16$. ^a $p < 0,01$ em relação ao controle; * $p < 0,05$ em relação ao controle; ** $p < 0,001$ em relação aos grupos MEL e MEL + P400 (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE LEVETIRACETAM, CLONAZEPAM E MELATONINA EM MODELO DE ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR CHOQUE TÉRMICO (*IN VITRO*).

As análises cujos resultados serão apresentados a seguir foram realizadas em alíquotas de homogenatos cerebrais pré-incubados com levetiracetam (LEV), clonazepam (CNZP) ou melatonina (MEL) (nas concentrações de 200, 100 ou 50µg/mL) e submetidas a estresse por choque térmico.

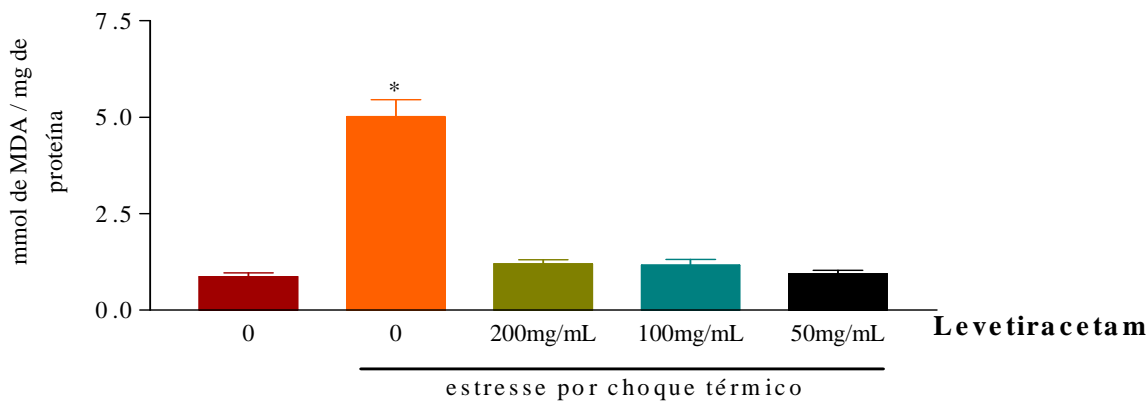
Alíquotas dos homogenatos cerebrais que não foram previamente incubadas com as drogas anticonvulsivantes estudadas, mas receberam choque térmico, foram denominadas Controles (+). As amostras que não foram pré-incubadas com os antiepilépticos estudados e não receberam choque térmico foram denominadas Controles (-).

5.1 Efeitos do LEV, CNZP e MEL sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.

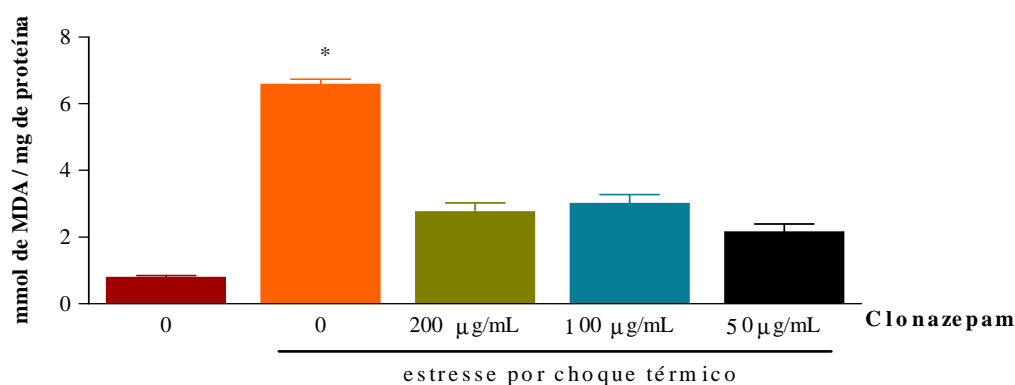
Os homogenatos cerebrais submetidos ao choque térmico (Controle (+)) apresentaram aumento significativo nos níveis de substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) ($p < 0.001$) em comparação aos valores obtidos em homogenatos não submetidos ao choque térmico (Controle (-)), confirmando o estresse oxidativo nos homogenatos submetidos ao modelo de estresse *in vitro*. Nos homogenatos incubados com LEV antes do choque térmico, em todas as concentrações de LEV testadas, os níveis de MDA foram reduzidos a valores semelhantes aos do controle (-) (Controle (-): $0,87 \pm 0,09$; Controle (+): $5,01 \pm 0,44$; LEV200: $1,20 \pm 0,10$; LEV100: $1,17 \pm 0,15$; LEV50: $0,93 \pm 0,09$) (**Figura 31A**).

Nos homogenatos incubados com CNZP ou MEL antes do choque térmico, em todas as concentrações testadas dessas drogas, os níveis de MDA foram significativamente reduzidos em relação ao grupo controle (+). CNZP: (Controle (-): $0,79 \pm 0,05$; Controle (+): $6,58 \pm 0,15$; CNZP200: $2,76 \pm 0,27$; CNZP100: $3,00 \pm 0,27$; CNZP50: $2,15 \pm 0,23$) (**Figura 31B**); MEL (Controle (-): $1,46 \pm 0,37$; Controle (+): $5,01 \pm 0,44$; MEL200: $4,93 \pm 0,09$; MEL100: $4,28 \pm 0,16$; MEL50: $4,51 \pm 0,11$) (**Figura 31C**).

A



B



C

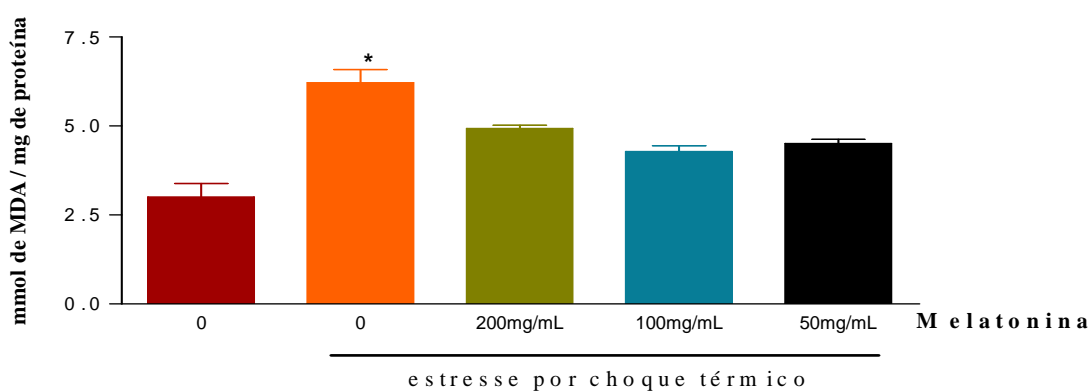


Figura 31. Efeitos do levetiracetam (A), clonazepam (B) e melatonina (C) sobre os níveis de MDA (malonildialdeído) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico. Os valores representam a média \pm EPM, $n = 15-18$. * $p < 0,001$ comparado aos demais grupos. (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

5.2 Influência do LEV, CNZP e MEL sobre os níveis de nitrito em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.

Os homogenatos cerebrais submetidos ao choque térmico (Controle (+)) apresentaram aumento significativo nos níveis de nitrato-nitrito ($p < 0.001$) em relação aos valores obtidos em homogenatos não submetidos ao choque térmico (Controle (-)). Nas amostras incubadas com LEV ou MEL antes do choque térmico, houve uma redução significativa nos níveis de nitrito-nitrato em relação ao controle (+). As concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, de ambas as drogas, levaram a reduções mais significativas de nitrito-nitrato em comparação ao controle (Controle (-): $4,25 \pm 0,42$; Controle (+): $57,73 \pm 5,95$; LEV200: $47,53 \pm 2,59$; LEV100: $27,76 \pm 1,21$; LEV50: $34,61 \pm 1,69$; MEL200: $48,27 \pm 2,37$; MEL100: $25,78 \pm 1,36$; MEL50: $19,14 \pm 2,91$) (**Figura 32**).

Nos homogenatos incubados com CNZP, em todas as concentrações testadas, os níveis de nitrito-nitrato foram igualmente reduzidos em relação ao grupo controle (+). CNZP: (Controle (-): $4,81 \pm 0,39$; Controle (+): $58,56 \pm 6,26$; CNZP200: $33,18 \pm 1,38$; CNZP100: $27,76 \pm 1,21$; CNZP50: $27,57 \pm 1,21$) (**Figura 33**).

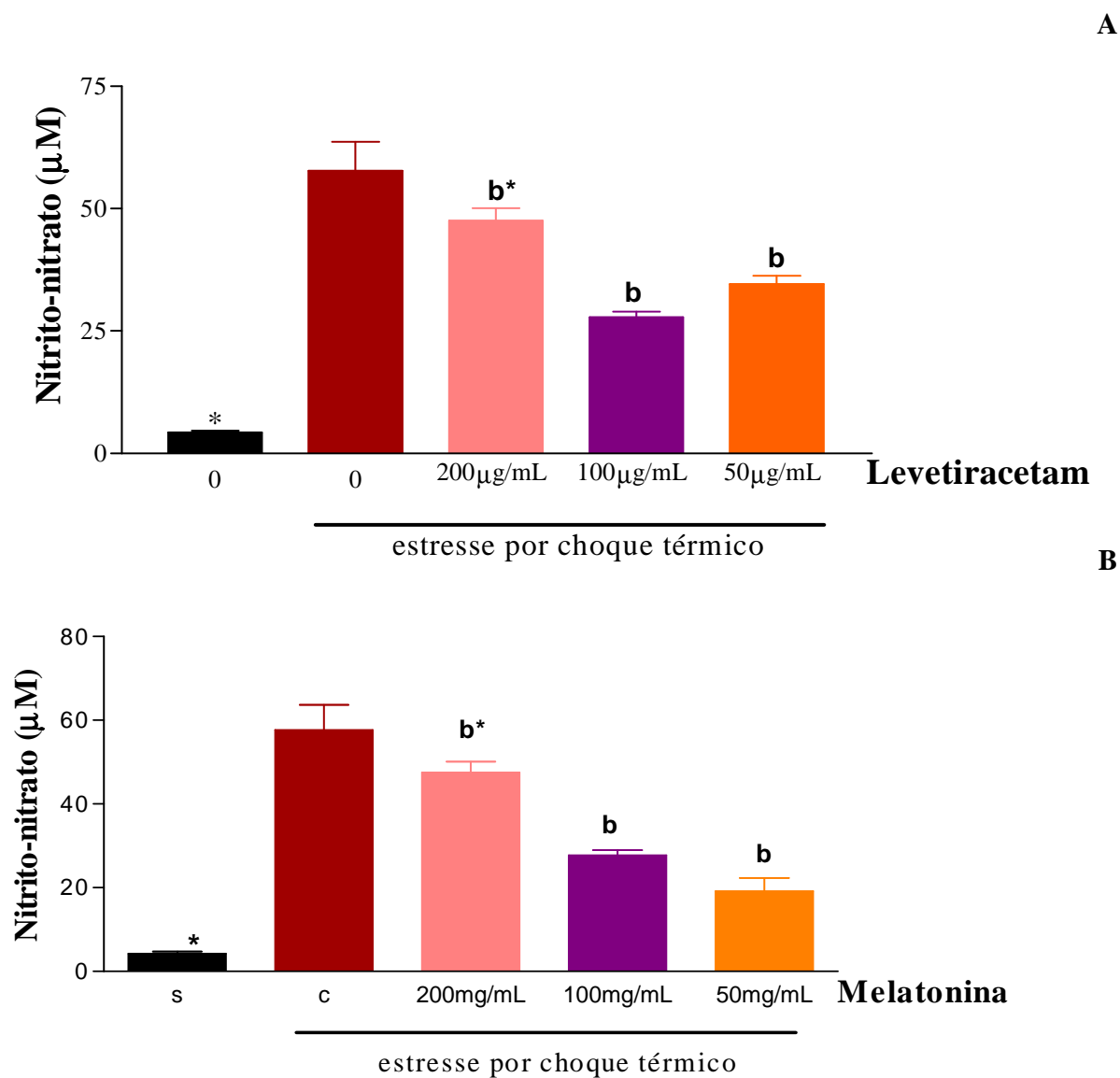


Figura 32. Efeitos do levetiracetam (A) e da melatonina (B) sobre os níveis de nitrito-nitrato em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico. Os valores representam a média \pm EPM, $n = 6$. * $p < 0,001$ em relação aos demais grupos; $^b p < 0,001$ em relação ao controle (+); $^{b*} p < 0,05$ em relação ao grupo submetido a estresse por choque térmico (controle (+)) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

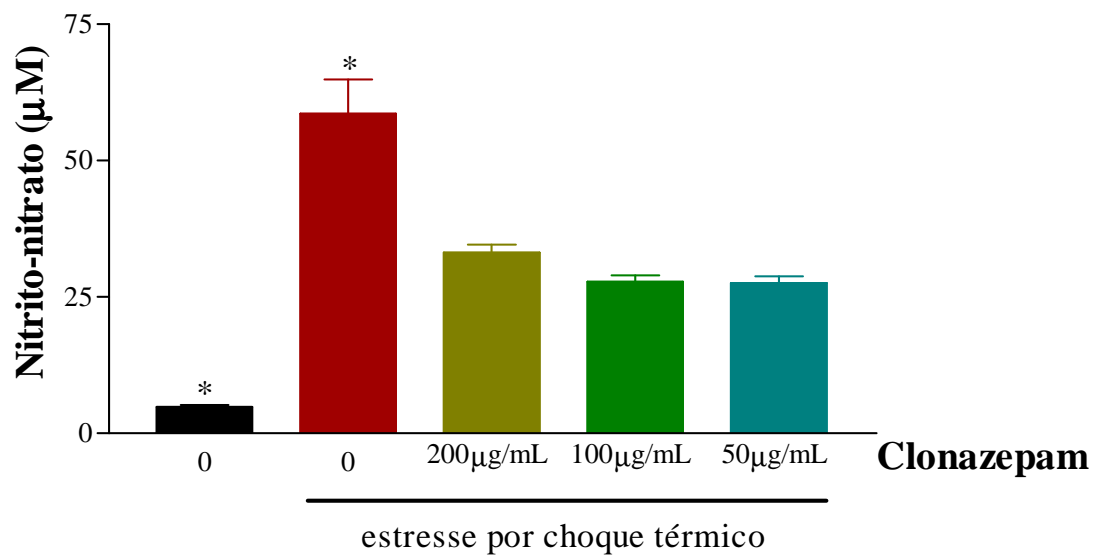


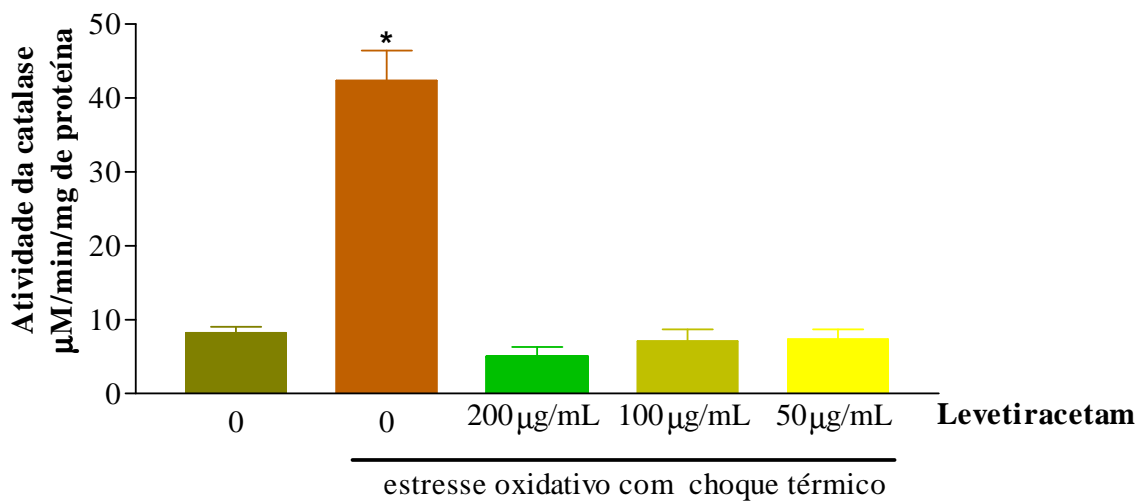
Figura 33. Efeitos do clonazepam sobre os níveis de nitrito-nitrato em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico. Os valores representam a média \pm EPM, $n = 6$. * $p < 0,001$ em relação aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

5.3 Efeitos do LEV, CNZP e MEL sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.

Os homogenatos cerebrais submetidos ao choque térmico (Controle (+)) apresentaram aumento significativo na atividade da catalase ($p < 0.001$) em relação aos valores obtidos em homogenatos não submetidos ao choque térmico (Controle (-)). Nos homogenatos incubados com LEV ou CNZP antes do choque térmico, em todas as concentrações testadas dessas drogas, a atividade da catalase foi significativamente reduzida em relação ao controle (+) e trazida para níveis de atividade semelhantes aos do controle (-). LEV: Controle (-): $8,24 \pm 0,80$; Controle (+): $42,37 \pm 4,05$; LEV200: $4,99 \pm 1,31$; LEV100: $7,09 \pm 1,60$; LEV50: $7,34 \pm 1,35$) (**Figura 34A**); CNZP: (Controle (-): $7,40 \pm 0,60$; Controle (+): $38,15 \pm 4,15$; CNZP200: $10,59 \pm 1,03$; CNZP100: $13,42 \pm 1,93$; CNZP50: $10,06 \pm 0,96$) (**Figura 34B**).

Nas amostras incubadas com MEL antes do choque térmico, as concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ desta droga diminuíram a atividade da catalase de forma significativa em relação ao controle (+) (Controle (-): $11,46 \pm 1,51$; Controle (+): $42,30 \pm 2,93$; MEL200: $25,19 \pm 2,89$; MEL100: $28,93 \pm 1,83$; MEL50: $40,55 \pm 4,29$) (**Figura 35**).

A



B

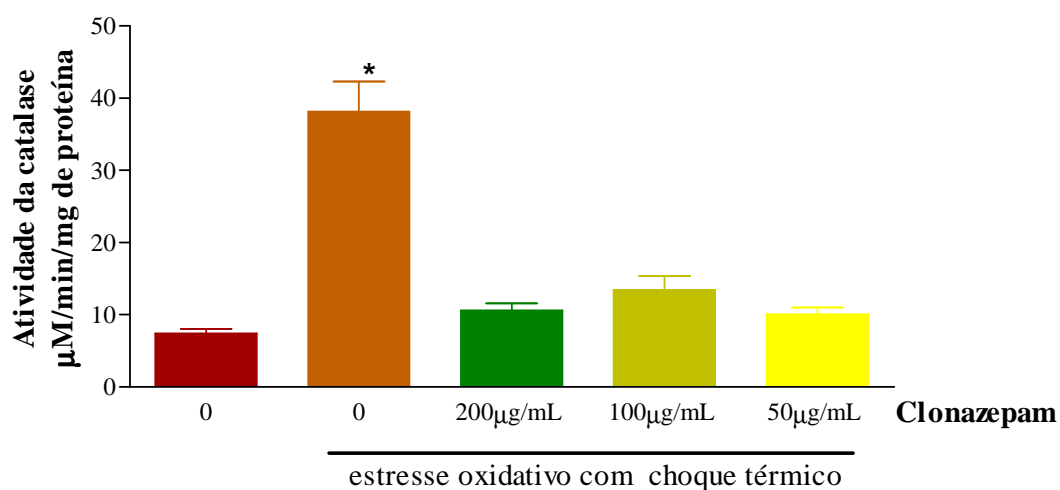


Figura 34. Efeitos do levetiracetam (A) e do clonazepam (B) sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico. Os valores representam a média \pm EPM, $n = 15-20$. * $p < 0,001$ em relação aos demais grupos (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

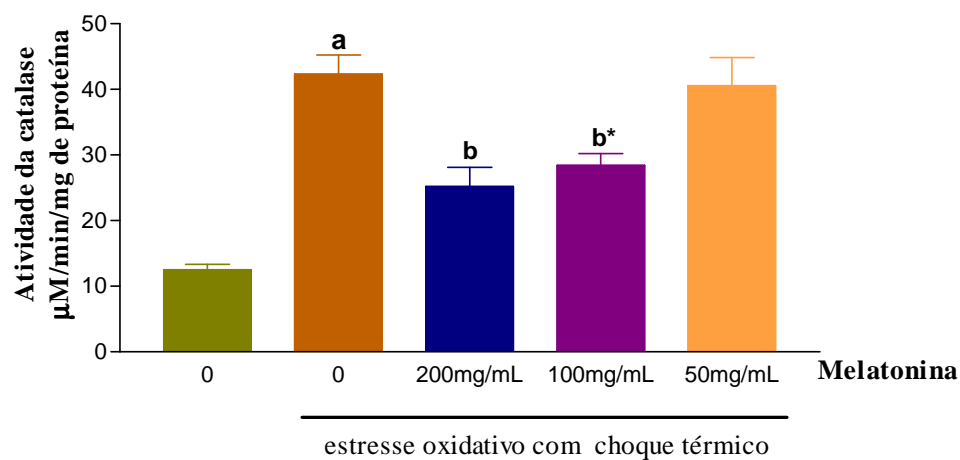


Figura 35. Efeitos da melatonina sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico. Os valores representam a média \pm EPM, $n = 10-15$. ^a $p < 0,001$ em relação ao grupo não submetido a estresse por choque controle (-); ^{b,b*} $p < 0,01$ e $0,05$ em relação ao grupo submetido a estresse por choque controle (+), respectivamente (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

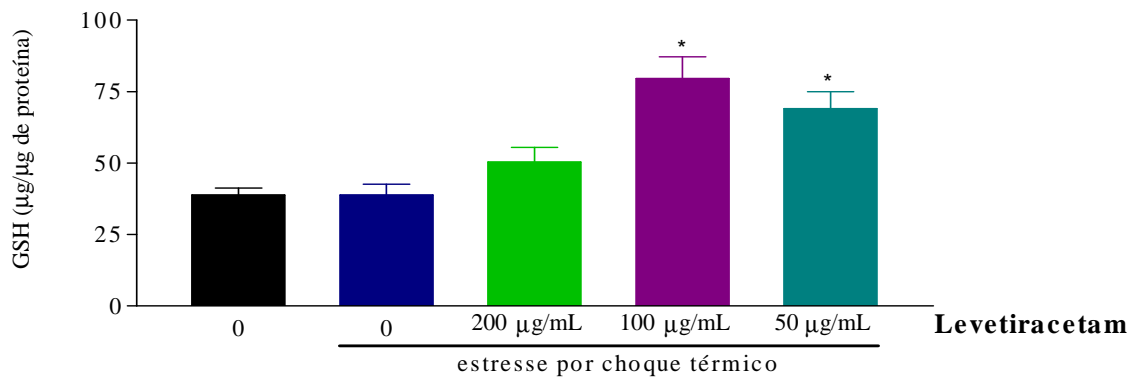
5.4 Efeitos do LEV, CNZP e MEL sobre os níveis de glutathiona reduzida (GSH) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico.

Os níveis de GSH não foram alterados nas amostras submetidas a estresse por choque térmico (Controles (+)) em relação às amostras não submetidas a estresse (Controle (-)). Nas amostras pré-incubadas com LEV, foram observados aumentos significativos nas concentrações de GSH nas concentrações de 50 e 100 μ g/mL em relação aos controles (Controle (-): $38,78 \pm 2,53$; Controle (+): $38,76 \pm 3,89$; LEV200: $50,26 \pm 5,17$; LEV100: $79,59 \pm 7,63$; LEV50: $69,03 \pm 5,89$) (**Figura 36A**).

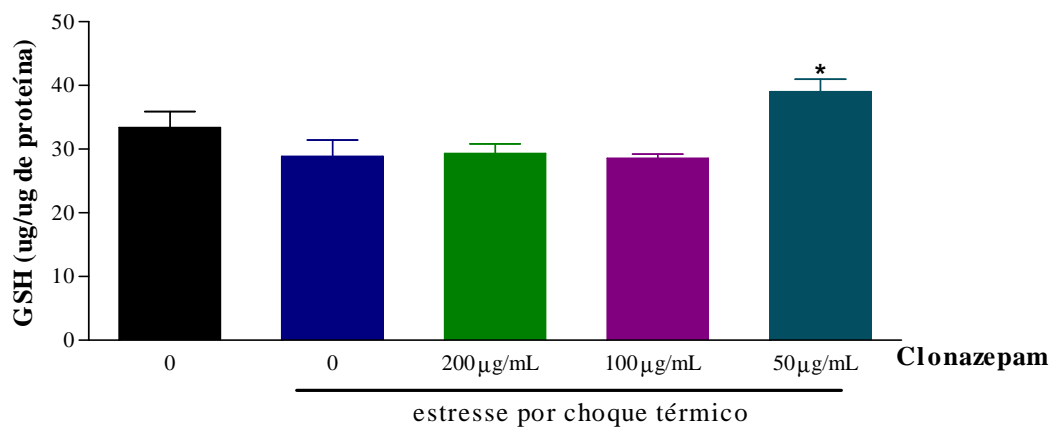
Nos homogenatos pré-incubados com CNZP, houve elevação significativa nos níveis de GSH em relação aos controles apenas na menor concentração testada 50 μ g/mL (Controle (-): $33,41 \pm 2,48$; Controle (+): $28,87 \pm 2,54$; CNZP200: $29,30 \pm 1,50$; CNZP100: $28,55 \pm 0,96$; CNZP50: $39,04 \pm 1,93$) (**Figura 36B**).

Nas amostras pré-incubadas com MEL, de forma similar em todas as concentrações testadas, foi observada substancial elevação nos níveis de GSH neuronais em comparação aos controles (Controle (-): $37,78 \pm 1,97$; Controle (+): $40,86 \pm 2,59$; MEL200: $311,90 \pm 14,08$; MEL100: $307,80 \pm 12,66$; MEL50: $293,80 \pm 21,32$) (**Figura 36C**).

A



B



C

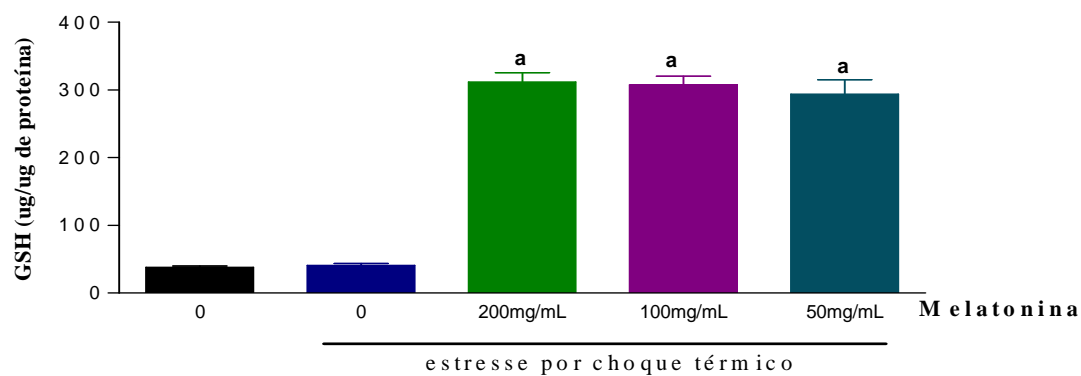


Figura 36. Efeitos do levetiracetam (A), clonazepam (B) e melatonina (C) sobre níveis de GSH (glutaciona) em homogenatos cerebrais submetidos a estresse oxidativo por choque térmico. Os valores representam a média \pm EPM, n = 15-20. *p < 0,01 em relação aos controles (A e B) *p < 0,001 em relação aos controles (C) (ANOVA Student-Neuman-Keuls).

V DISCUSSÃO

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

Análises comportamentais e eletroencefalográficas demonstraram que a administração sistêmica de pilocarpina em roedores induz convulsões com foco de início no sistema límbico, principalmente no hipocampo (TURSKI *et al.*, 1983a). O corpo estriado também consta entre as áreas mais acometidas. Estudos sugerem sua participação nos mecanismos de propagação e manutenção (epileptogênese) da convulsão (MARINHO *et al.*, 1998; BARONE *et al.* 1991).

A atividade convulsiva desenvolvida no modelo com pilocarpina torna-se secundariamente generalizada, sugerindo que este modelo mimetiza diversos aspectos das convulsões parciais complexas com generalização secundária em humanos. Essas convulsões generalizadas mostram-se resistentes a grande parte dos medicamentos anticonvulsivantes.

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

Dessa forma, o presente trabalho objetivou estudar os efeitos de drogas com atividade antiepiléptica (levetiracetam (LEV)- representante do grupo de novos fármacos antiepilépticos, com mecanismo de ação não esclarecido; clonazepam (CNZP)- representante do grupo de fármacos antiepilépticos convencionais, com perfil antiepiléptico distinto de outras drogas de sua classe; melatonina (MEL)- molécula endógena com reconhecida atividade antioxidante e com atividade protetora sobre as convulsões e doenças neurodegenerativas já descrita na literatura) sobre as convulsões induzidas por pilocarpina (P400) em camundongos.

O presente estudo foi realizado através de análises das alterações comportamentais (elaboração de curvas dose-resposta para as drogas estudadas; avaliação da potenciação do efeito protetor destas drogas por associação com antioxidante (vitamina E); influência sobre a ação colinérgica da oxotremorina) e de análises neuroquímicas. Foram investigadas alterações em sistemas de neurotransmissão envolvidos na fisiopatologia das convulsões, com a determinação do *binding* de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 e M_1+M_2 -símile - *in vitro* e *in vivo*) e dopaminérgicos (D_1 e D_2 -símile) no hipocampo. Realizou-se, ainda, avaliação da atividade de sistemas enzimáticos e produção de substâncias derivadas do estresse oxidativo, com a dosagem da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e catalase, dos níveis da glutathiona reduzida (GSH), do conteúdo de nitrito e do índice de lipídio peroxidação em hipocampo e corpo estriado de animais pré-tratados e em modelo de estresse oxidativo *in vitro*.

Uma interpretação comparativa dos resultados deste estudo, para as drogas investigadas, foi realizada, permitindo discutir novos mecanismos associados à proteção contra as convulsões induzidas por P400.

ESTUDOS COMPORTAMENTAIS

Estudos prévios revelaram que o LEV apresenta espectro de ação amplo e diferenciado, tanto em modelos experimentais quanto no tratamento das convulsões em humanos (GOWER *et al*, 1992; LÖSCHER; HÖNAC, 1993). Diversas investigações já foram realizadas, objetivando esclarecer o mecanismo de ação dessa droga. Os resultados obtidos no presente estudo, já publicados (OLIVEIRA *et al*, 2005), confirmam a atividade anticonvulsivante do LEV nas convulsões induzidas por P400, reportada em estudos prévios (KLITGAARD *et al*, 1998, 2003; GLIEN *et al.*, 2002), mostrando um aumento significativo na latência do início das convulsões dos animais pré-tratados, bem como, uma significativa redução no percentual de convulsões, *status epilepticus* e morte, decorrentes da administração de P400.

A análise comportamental e a elaboração de curvas dose-resposta para latências de convulsão e de morte permitiram observar uma proteção mais significativa do levetiracetam na

dose de 200 mg/Kg, que, portanto, foi escolhida para tratamento dos animais utilizados nos estudos neuroquímicos, considerando seu amplo efeito protetor e referências prévias da baixa toxicidade e alta margem de segurança do LEV (KLITGAARD *et al.*, 1998) e poucos efeitos adversos em roedores, mesmo em doses de até 1000 mg/Kg (MAZARATI *et al.*, 2004).

Os experimentos de avaliação dos efeitos do pré-tratamento com CNZP sobre as convulsões induzidas por P400 confirmaram seu efeito protetor, evitando o aparecimento de convulsões, *status epilepticus* e morte na maioria dos animais, além da redução das latências de convulsão nos animais que as apresentaram. Embora os efeitos protetores do CNZP, contra convulsões em modelos colinérgicos, já tenham sido evidenciados nas doses de 0,5 ou 1mg/Kg (KUBOVA *et al.*, 1999; HORT *et al.*, 2000), o presente estudo demonstrou uma maior atividade protetora contra convulsões, *status epilepticus* e morte na dose de 0,5mg/Kg, que, portanto, foi utilizada para tratamento dos animais utilizados nos estudos neuroquímicos. Os efeitos protetores dos benzodiazepínicos contra as convulsões e epilepsia são clinicamente bem conhecidos e o CNZP é, particularmente, utilizado como medicação adicional na prevenção das crises (NAKKEN *et al.*, 2010).

Os efeitos anticonvulsivantes da MEL já foram reportados por vários autores, inclusive em modelos colinérgicos de convulsão (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002, LIMA *et al.*, 2005). O papel da MEL nas convulsões e epilepsia tem sido intensamente estudado. Sua atividade anticonvulsivante já foi demonstrada em diversos modelos animais, como nas convulsões induzidas por eletroestimulação. Além disso, a atividade convulsiva desencadeada pela remoção da glândula pineal pode ser revertida pela administração de MEL (LAPIN *et al.*, 1998; MEVISSSEN *et al.*, 1998). Peled e colaboradores (2001) observaram que a associação de melatonina com drogas antiepilépticas (DAE) reduz a severidade de convulsões tônico-clônicas em crianças. Há relatos de que a administração de MEL a indivíduos com epilepsia pode prevenir as convulsões (FAUTECK *et al.*, 1999; PELED, 2001). Outros autores, todavia, relatam que MEL não possui efeitos claros na frequência de convulsões e, até mesmo, associam seu uso ao aumento na atividade convulsiva em crianças (SHELDON *et al.*, 1998, COPPOLA *et al.*, 2004). Relatam que altas doses de MEL parcialmente reduzem os níveis de GABA, enquanto elevam os níveis de glutamato no SNC. Esse efeito paradoxal poderia explicar os efeitos pró-convulsivantes

da MEL quando altas doses são administradas a crianças epiléticas (MOLINA-CARBALLO *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que a MEL ofereceu uma atividade protetora contra as convulsões induzidas por P400, evidenciada, principalmente, pelo aumento nas latências de convulsão. A dose de 25mg/Kg, utilizada para tratamento dos animais utilizados nos estudos neuroquímicos, apresentou maior efeito protetor.

MODULAÇÃO DO SISTEMA COLINÉRGICO

Sabe-se que a oxotremorina (um agonista colinérgico) é um ligante extremamente seletivo para os receptores colinérgicos muscarínicos no sistema nervoso central e periférico, e é muito utilizada na investigação de funções muscarínicas. Ela é capaz de induzir tremores, que são bloqueados pela atropina (COWARD *et al.*, 1977) e mediados, possivelmente, através da estimulação central do sistema colinérgico (BEBBINGTON *et al.*, 1996).

O efeito protetor contra as convulsões induzidas por P400, observado no pré-tratamento com LEV, CNZP ou MEL, somado à redução na intensidade dos tremores induzidos pela oxotremorina quando LEV, CZP ou MEL foram administrados previamente, sugere uma modulação do sistema colinérgico exercida por estas drogas. Com o intuito de analisar essa modulação, investigou-se, no presente trabalho, a atividade da enzima acetilcolinesterase (em hipocampo e corpo estriado) e a densidade de receptores muscarínicos, através de ensaios de *binding* com [³H]-NMS, em hipocampo de camundongos tratados com LEV, CNZP ou MEL e/ou P400.

A excessiva ativação muscarínica, induzida tanto por aplicação de agonistas diretos que agem nos receptores colinérgicos como por inibidores da acetilcolinesterase, resulta em modificações da expressão gênica e da síntese de proteínas, resultando em alteração do funcionamento do sistema colinérgico (KAUFER *et al.*, 1998; SOREQ; SEIDMAN, 2001).

A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia do lobo temporal, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (MARINHO *et al.*, 1998; DE BRUIN *et al.*, 2000). A pilocarpina exacerba a atividade colinérgica, provavelmente por influência direta, aumentando a ação da ACh circulante, modificando o *binding* dos receptores muscarínicos (HRUSKA *et al.*, 1984) e diminuindo a atividade acetilcolinesterásica (IMPERATO *et al.*, 1998).

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

A AChE é considerada essencial para o funcionamento normal do sistema nervoso, à medida que limita a ação da acetilcolina, tão logo esta seja liberada nas fendas sinápticas. Especula-se que a atividade dessa enzima poderia afetar o desenvolvimento das convulsões induzidas pela pilocarpina, além da sua importância como possível alvo terapêutico (GETOVA-SPASSOVA, 2006). Nesse contexto, drogas com potencial inibição reversível da AChE, que têm sido utilizadas objetivando melhora cognitiva no mal de Alzheimer, poderiam ser úteis também no tratamento de disfunções cognitivas em pacientes com epilepsia e outras desordens neurodegenerativas (FARLOW, 2002; GIACOBINI, 2003).

A inibição da atividade da AChE, induzida pela administração de pilocarpina, em modelo de convulsões, já foi previamente reportada (FREITAS *et al.*, 2006; SALES *et al.*, 2010). No presente estudo, em acordo com os achados da literatura, P400 induziu uma redução na atividade dessa enzima. O pré-tratamento com LEV, no entanto, foi capaz de reverter a inibição na atividade da AChE induzida por P400 no hipocampo. Já administração, tanto de CNZP e quanto

de MEL, não apenas reverteu a inibição da AChE induzida por P400 como foi capaz de elevar significativamente a atividade desta enzima em relação ao controle, mesmo quando CNZP ou MEL foram administrados isoladamente. MEL induziu, ainda, elevação da atividade da AChE em corpo estriado.

Agrawal e colaboradores (2009) demonstraram que a capacidade da MEL em melhorar a função cognitiva não está apenas relacionada à sua ação antioxidante, mas à inibição da AChE neuronal em modelo animal de demência. No entanto, corroborando com nossos achados, outros autores demonstraram que, em modelo de neuroinflamação em ratos, a MEL é capaz de reverter alterações na atividade da AChE induzidas por toxicantes ambientais, trazendo sua atividade de volta à normalidade (TYAGI *et al*, 2010). Venkataraman e colaboradores (2008) demonstraram que, em córtex cerebral, cerebelo e hipocampo de ratos adultos, a MEL é capaz de elevar a atividade da AChE, revertendo a inibição induzida por neurotoxinas.

Benzodiazepínicos (BZD) são as DAE mais utilizadas no tratamento das convulsões induzidas por organofosforados inibidores da AChE. A eficácia dos BZD nessas convulsões é, no entanto, atribuída ao efeito inibitório central via modulação do sistema GABAérgico (BAJGAR *et al*, 2007).

O efeito reativador da colinesterase apresentado pelo LEV, CNZP e MEL no presente estudo poderia contribuir, de forma significativa, para sua atividade anticonvulsivante no modelo em estudo, além de sugerir a influência direta destas drogas sobre o funcionamento do sistema colinérgico como mecanismo alternativo para seu efeito protetor nas convulsões e epilepsia.

Os fenômenos de *up* ou *downregulation* constituem exemplos de adaptações quantitativas cerebrais que ocorrem numa determinada via, em resposta a certo estímulo (HYMAN; NESTLER, 1996). A *downregulation* dos receptores muscarínicos, mediada por agonistas, é um fenômeno já reportado em diversos estudos (KOPPEN; KAISER, 2003). Existem vários relatos da ocorrência de dessensibilização aguda dos receptores muscarínicos em curto prazo (em minutos), induzida pelo tratamento com agonistas, envolvendo a fosforilação do receptor por

proteínas quinases (STOPE *et al.*, 2003). No hipocampo, as alterações na transmissão colinérgica estão associadas ao aumento na resposta associada aos receptores muscarínicos (MESHORER *et al.*, 2002).

Estudos relatam que a pilocarpina é capaz de induzir a *downregulation* dos receptores muscarínicos, evento relacionado à instalação do processo convulsivo. (FREITAS *et al.* 2005, 2006). No presente estudo, a administração de P400, confirmando os achados da literatura, foi capaz de induzir *downregulation* dos receptores muscarínicos no hipocampo (M_1+M_2). No entanto, o pré-tratamento com LEV reverteu a *downregulation* induzida por P400, levando à normalização da densidade desses receptores. Todavia, a administração do LEV sozinho, surpreendentemente, causou uma *downregulation* desses receptores quando comparado ao grupo controle (salina) (dados já publicados, OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Várias evidências indicam que receptores acoplados à proteína G, incluindo receptores muscarínicos, podem adotar múltiplas conformações, que seriam geradas espontaneamente ou induzidas/estabilizadas pela interação do receptor com agonistas ou antagonistas clássicos (ortostéricos), os quais se ligariam ao sítio de ligação do agonista endógeno, bem como compostos alostéricos, os quais se ligariam a outros sítios no receptor (KOPPEN *et al.*, 2003). A ligação de moduladores alostéricos a sítios de ligação alostéricos leva a uma mudança na conformação do sítio de ligação clássico, o que, usualmente, resulta em mudança na afinidade do receptor para agonista e antagonista clássicos. Todos os subtipos de receptores muscarínicos são susceptíveis a modulação alostérica e as características dessa regulação são únicas para cada subtipo de receptor. (KOPPEN *et al.*, 2003).

Em 1989, Wulfert e colaboradores demonstraram que o LEV é capaz de induzir contração do íleo de cobaias (numa preparação *in vitro*), e que esse efeito é inibido pela atropina e potencializado pela fisostigmina, sugerindo uma facilitação da função colinérgica. Nossos resultados podem sugerir um tipo de modulação alostérica exercida pelo LEV sobre os receptores colinérgicos muscarínicos, desde que já se sabe que vários compostos (ex: estriçnina e alcurônio) podem modificar alostericamente a ligação de agonistas dos receptores muscarínicos, como

carbacol, pilocarpina e oxotremorina, e que alguns desses moduladores alostéricos podem atuar como agonistas na ausência do agonista ortostérico desses receptores (JAKUBIK *et al.*, 1997).

No entanto, os ensaios de *binding* seguintes mostraram uma *downregulation* nos sítios de ligação do subtipo M₁ de receptores muscarínicos apenas após o tratamento com a P400 sozinha, confirmando sua ação agonista em M₁ e o papel crucial, previamente estabelecido, dos receptores M₁ na instalação das convulsões no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina (TURSKI *et al.*, 1989; HAMILTON *et al.*, 1998; EGLEN *et al.*, 2001). A administração do LEV sozinho não alterou a densidade dos receptores M₁. Os ensaios realizados nos receptores do subtipo M₂, todavia, demonstraram que a ação agonista-símile do LEV (levando à *downregulation*) parece ser seletiva para o subtipo M₂.

Segundo Eglén *et al* (2001) a ação estimulante da acetilcolina endógena sobre os receptores M₂ na musculatura lisa resulta em reversão do relaxamento induzido por AMPc, favorecendo, indiretamente, a contração. Ainda no mesmo trabalho, observou-se que camundongos *knockout* (com ausência da expressão do receptor, decorrente de modificação genética) para receptor M₂ apresentam uma redução na intensidade dos tremores induzidos pela oxotremorina (sugerindo a participação desse subtipo de receptores no mecanismo desses tremores) e uma pequena redução na potência de agonistas de receptores muscarínicos para induzir contração do músculo liso do íleo. Considerando a ação agonista-símile do LEV sobre os receptores M₂, observada nos ensaios de *binding* do presente trabalho, uma competição (entre LEV e oxotremorina) por esses receptores poderia contribuir para a redução dos tremores induzidos pela oxotremorina nos animais pré-tratados com LEV.

A ativação dos receptores M₂ reverte a abertura dos canais de potássio por agonistas dos receptores beta adrenérgicos, diminuindo o relaxamento da musculatura lisa (*in vitro*) induzido pela ativação do sistema simpático (KUME *et al.*, 1991). Interessantemente, Madeja *et al* (2003) demonstraram que LEV reduz a ativação dos canais de potássio voltagem-dependentes no hipocampo de ratos e cobaias, reduzindo a geração de potenciais de ação repetitivos, o que poderia contribuir para sua ação anticonvulsivante.

Os receptores M_2 podem atuar, normalmente, atenuando a atividade neuronal mediada pelos receptores M_1 . Essa atenuação pode ocorrer tanto pela ação pós-sináptica, reduzindo a responsividade dos receptores M_1 a agonistas, como pela função auto-receptores, inibindo a liberação de ACh dos neurônios pré-sinápticos (MASLANSKI, *et al.*, 1994). Dessa forma, um aumento na atividade dos receptores M_2 , induzido pelo LEV, poderia favorecer sua ação anticonvulsivante no modelo de convulsões em estudo.

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

A interação entre os sistemas GABAérgico e muscarínico já foi previamente relatada por Bähring e colaboradores (1994), que demonstraram que a acetilcolina bloqueia as correntes GABAérgicas inibitórias pós-sinápticas e a resposta ao GABA exógeno, mesmo na presença de tubocurarina (antagonista nicotínico) ou de atropina, em células ganglionares da retina de ratos. Um estudo, objetivando examinar a possibilidade do envolvimento de mecanismos colinérgicos no efeito anticonvulsivante do diazepam, demonstrou que a redução na liberação de ACh nas sinapses, após o tratamento com diazepam associado a atropina, contribui para o aumento na atividade anticonvulsiva do diazepam em modelo colinérgico de convulsão (SHIH *et al.*, 1991). Rektor e colaboradores (1986) relataram o desenvolvimento de mioclonias em babuínos, que foram associadas à depressão do sistema colinérgico por benzodiazepínicos.

Os resultados demonstrados neste trabalho permitiram verificar que a pré-administração de CNZP foi capaz de reverter a *down-regulation* dos receptores muscarínicos em hipocampo. Os ensaios para subtipos de receptores muscarínicos permitiram observar que, especificamente, a *down-regulation* do subtipo M_1 de receptores muscarínicos hipocampais, induzida por P400, é

revertida pelo pré-tratamento com CNZP. A administração de CNZP isoladamente, no entanto, não alterou a densidade dos receptores muscarínicos. Nossos achados a respeito do aumento na atividade da AChE, induzido pelo CNZP, anteriormente descritos, poderiam contribuir para explicar esse efeito, à medida em que a redução nos níveis sinápticos de ACh poderia também levar à diminuição do fenômeno adaptativo de *down-regulation*, dependente de superativação colinérgica (como discutido anteriormente).

A pré-administração de MEL não foi capaz de reverter a *down-regulation* dos receptores muscarínicos induzida por P400. MEL administrada isoladamente também não alterou a densidade hipocampal dos receptores muscarínicos. No entanto, os ensaios de *binding (in vitro)*, também realizados no presente trabalho, demonstraram uma *down-regulation* de receptores muscarínicos após a incubação de homogenatos de hipocampo com LEV, CNZP ou MEL. Desta forma, uma possível interação/modulação direta (alostérica ou ortostérica) desses compostos anticonvulsivantes com os receptores colinérgicos muscarínicos hipocampais não está descartada. Considerando a relevância da ativação colinérgica para a instalação do processo convulsivo no modelo em estudo, as influências observadas, seja na atividade da AChE ou na densidade de receptores muscarínicos hipocampais, pelo tratamento com LEV, CNZ e MEL sugere que a modulação, direta ou indireta, do sistema colinérgico por essas drogas pode contribuir para explicar seus efeitos anticonvulsivantes.

MODULAÇÃO DO SISTEMA DOPAMINÉRGICO

Burke *et al* (1990) demonstraram que, em camundongos tratados com pilocarpina, a estimulação e o bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D₁ agrava ou ameniza, respectivamente, a expressão das convulsões nesse modelo, enquanto a estimulação e o bloqueio de D₂ tem, exatamente, efeitos opostos. Outros estudos já haviam sugerido que ativação dos receptores dopaminérgicos centrais do tipo D₁, pela administração sistêmica de agonistas seletivos, aumentava a frequência e a severidade das convulsões induzidas por pilocarpina e que, por outro lado, ratos eram protegidos das convulsões induzidas por pilocarpina quando pré-tratados com agonistas dos receptores D₂ (MARKSTEIN *et al.*, 1986). Além disso, Barone *et al*

(1991) demonstram que antagonistas dos receptores D₂ facilitam as convulsões induzidas por lítio e pilocarpina.

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

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

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

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

Nossos resultados demonstraram uma ausência de variações significativas na densidade dos receptores D₁ e D₂ pela administração de P400. Todavia, uma *downregulation* dos receptores D₂ hipocâmpais foi observada nos animais tratados apenas com LEV, apenas com CNZP e nos grupos pré-tratados com CNZP ou MEL antes de P400.

A sinalização mediada pelos receptores D₂ interfere nos efeitos neurotóxicos induzidos pelo aumento na neurotransmissão colinérgica. Esse subtipo de receptor dopaminérgico é classificado como modulador geral essencial das convulsões epiléticas, exibindo um controle inibitório da atividade epiléptica cerebral em camundongos (BOZZI; BORRELLI, 2002). Alam e Starr (1993) já haviam demonstrado que injeções focais de agonistas seletivos dos receptores D₂ no hipocampo aumentam significativamente o limiar das convulsões induzidas por pilocarpina.

A modulação do sistema BZD/GABAérgico sobre o sistema dopaminérgico já foi reportada em alguns estudos. O sistema GABA-BZD pode induzir a redução da liberação de DA por inibição pré-sináptica (HOBBS *et al.*, 1996). BZD foram capazes de reverter o aumento nos níveis de HVA (metabólito da DA) induzido por neurolépticos em cérebro de ratos (KELLER *et al.*, 1976). Tenn e Niles (1995) examinaram os efeitos do CNZP e da MEL sobre a função dopaminérgica central e descreveram que estas drogas inibem os efeitos da apomorfina, sugerindo atividade antidopaminérgica, a qual os autores atribuíram à modulação dopaminérgica pelos receptores de BZD no sistema Nervoso Central, via mecanismos GABAérgicos. Nath e colaboradores (2000) sugeriram que o sistema dopaminérgico também está implicado na dependência física a BZD, como o alprazolam, sugerindo que os sintomas da retirada poderiam ser desencadeados pela atividade dopaminérgica em receptores D₂.

Dois subtipos de receptores de MEL, acoplados à proteína G, em mamíferos já foram clonados e caracterizados, o MT1 e o MT2, todavia, argumenta-se que os múltiplos papéis biológicos da MEL são, provavelmente, mediados por sua interação com diversos alvos biológicos, além destes dois subtipos de receptores (BOUTIN *et al.*, 2005). Hamdi (1998) demonstrou que a melatonina pode modular, diretamente, a função de receptores dopaminérgicos D₂ estriatais, aumentando a afinidade destes receptores por agonistas D₂ em estriado de ratos, através de mudanças conformacionais no sítio de ligação do receptor. Além disso, o tratamento com MEL reduziu a atividade elétrica neuronal em neurônios estriatais de ratos, efeito este

revertido por antagonistas dos receptores D₂ (ESCAMES *et al.*, 1996). Há relatos, ainda, do envolvimento dos receptores D₂ na atividade antinociceptiva da MEL na dor induzida pelo glutamato, e que pré-tratamento de animais com o antagonista D₂ (como a sulpirida) impede a atividade antinociceptiva tanto da MEL quanto da apomorfina, uma agonista D₂ (TAYLOR *et al.*, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2006).

Um estudo realizado em roedores mostrou que a liberação de dopamina hipocampal diminui o limiar das convulsões induzidas por pilocarpina, pela ativação dos receptores D₁ (STARR, 1993). O fato de não ter sido observada alteração significativa na densidade dos receptores D₁ no presente estudo, mesmo no grupo tratado apenas com P400, poderia sugerir uma possível alteração na afinidade, e não na densidade desses receptores na fase aguda do processo convulsivo. Ensaios de *binding*, do tipo Scatchard, que permitissem a comparação entre as constantes de dissociação e afinidade dos ligantes, seriam necessários para uma investigação mais aprofundada da influência dessas drogas sobre os receptores dopaminérgicos.

Muitas drogas antiepilépticas (DAE) utilizadas atualmente na clínica têm mecanismos mistos, complexos ou mal compreendidos. Sabe-se que o LEV se liga a uma proteína pré-sináptica (SV2A), diminuindo o influxo de cálcio na terminação pré-sináptica (LYNCH *et al.*, 2004). Acredita-se que esse efeito leve a uma redução na liberação de neurotransmissores excitatórios. Foi demonstrado, ainda, que LEV bloqueia canais de cálcio HVA e altera a função GABAérgica (VAN VLIET *et al.*, 2009). No entanto, não está clara a forma como LEV suprime as crises convulsivas, e seu mecanismo de ação, bem como efeitos adjacentes que contribuam para sua atividade antiepileptogênica, permanecem por ser esclarecidos. Múltiplos mecanismos de ação têm, ainda, sido relatados para drogas convencionais. O valproato, por exemplo, além de alterar as vias de recaptção e liberação de GABA, interfere na ação de canais de potássio e de cálcio e modula canais rápidos de sódio (ROGAWSKI; LOSCHER, 2004). O amplo espectro clínico antiepiléptico do valproato atesta os múltiplos mecanismos subjacentes à sua função. Da mesma forma, o topiramato possui vários mecanismos de ação, incluindo a redução de descarga elétrica repetitiva, via bloqueio de canais de sódio, e aumento da atividade GABAérgica (WHITE *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a *downregulation*, exercida pelo LEV, CNZP ou MEL, observada no presente trabalho, sobre os receptores D₂, poderia ser considerada um mecanismo compensatório, decorrente da modulação desses receptores, podendo constituir outra via de atuação de LEV, MEL e, principalmente, do CNZP (cuja indução da *downregulation* de D₂ foi evidenciada tanto no tratamento isolado como na sua administração antes de P400) na proteção contra as convulsões no modelo em estudo.

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE LEV, CNZP E MEL

Segundo Devi e colaboradores (2008), o balanço pró-oxidante/antioxidante não é apenas modulado pelas convulsões, mas também pelas drogas antiepilépticas. A habilidade dos antioxidantes em reduzir as manifestações convulsivas e as alterações bioquímicas subsequentes (marcadores do estresse oxidativo) fornece subsídios para confirmar o importante papel dos radicais livres no desenvolvimento das convulsões e destaca a possível contribuição dos antioxidantes como adjuvantes às drogas antiepilépticas para um melhor controle das convulsões. Dentre as moléculas que inativam diretamente radicais livres estão os tocoferóis (Vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), beta-caroteno, e GSH (RUSSEL, 1998). A vitamina E é constituída, principalmente, por quatro tocoferóis, e, secundariamente, por quatro tocotrienóis, sendo o α -tocoferol o mais ativo. Estudos comprovam que a vitamina E é um eficiente inibidor da peroxidação de lipídios *in vivo*. Estas substâncias agem como doadores de H para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia (THERIAULT *et al.*, 1999).

A fim de investigar se o efeito anticonvulsivante de LEV, CNZP ou MEL poderia ser potencializado pela associação ao acetato de tocoferol (Vit.E), as doses dessas drogas que se mostraram menos efetivas, ou não efetivas (no caso da MEL), em proteger os animais contra as convulsões, morte e *status epilepticus* (induzidos por P400) durante a elaboração das curvas dose-resposta, foram associadas a Vit.E e administradas antes de P400. Uma significativa potencialização dos efeitos anticonvulsivantes de todas as drogas testadas, pela associação com Vit.E, foi observada, com elevação significativa das latências de convulsão em todos os grupos. Os resultados sugerem que as ações protetoras do LEV, CNZP e MEL contra as convulsões

induzidas por P400, por apresentarem sinergismo com Vit.E, poderiam envolver efeitos antioxidantes.

No conceito farmacológico clássico, sinergismo se refere à interação entre duas drogas que, individualmente possuem efeitos similares e demonstram uma resposta potencializada pela sua administração em conjunto. O sinergismo ou efeito de superadição está presente quando o resultado da combinação das drogas é superior ao efeito individual (TALLARIDA, 2007).

Dessa forma, ensaios para avaliação de parâmetros relacionados ao controle do estresse oxidativo neuronal foram realizados, a fim de confirmar a possível ação antioxidante do LEV e do CNZP, e de confirmar a participação do mecanismo antioxidante da MEL na proteção contra os danos desencadeados pelas convulsões induzidas por P400.

INFLUÊNCIA SOBRE O ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Danos na membrana celular e mitocondrial, incluindo a peroxidação lipídica, podem contribuir de forma significativa para alterações paroxísticas nessas membranas e seu mau funcionamento durante a epileptogênese. Dados na literatura demonstram que o aumento na produção de radicais livres e dano lipídico por peroxidação ocorrem durante as convulsões e na injúria neuronal mediada pelo processo convulsivo (FRANTSEVA *et al.*, 2000b; PATEL *et al.*, 2001). Outras alterações moleculares, como a inibição da enzima ATPase e modificação dos mecanismos de receptores GABAérgicos também podem ser importantes no processo convulsivo (LEES, 1991).

Embora o mecanismo fisiopatológico exato permaneça por ser esclarecido, todo o processo de dano celular pode estar relacionado à elevação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} . Uma série de processos bioquímicos, incluindo a ativação de fosfolipases de membrana, proteases e nucleases, que causam degradação da membrana fosfolipídica e proteólise de proteínas do citoesqueleto e de proteínas de fosforilação, é desencadeada durante as convulsões (DUGAN; CHOI, 1994).

A ativação de fosfolipases, proteases e nucleases induzida pela administração de pilocarpina, com alteração na síntese de fosfoinosítídeos importantes para a transdução do sinal celular, e, conseqüentemente, na cascata de eventos que culminam na formação de segundos mensageiros, pode estar envolvida na atividade epiléptica durante a propagação dos efeitos convulsivantes nas áreas cerebrais envolvidas no processo (BRUCE; BAUDRY, 1995). As alterações no metabolismo dos fosfolipídios de membrana podem resultar também na liberação de diacilglicerol (DAG), eicosanóides, lipídios peróxidos e radicais livres.

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

Modelos experimentais, em roedores, mostraram que o estresse oxidativo parece contribuir para a morte de células neuronais e gliais. Kim *et al.* (1997) demonstraram uma elevação de oxidação protéica e lipídica no hipocampo de animais após quatro e 24 horas da administração de ácido caínico. Freitas e colaboradores (2004b) identificaram níveis aumentados de peroxidação lipídica durante o período agudo das convulsões induzidas por pilocarpina, em várias áreas cerebrais de ratos. Tejada e colaboradores (2006) identificaram o aumento da peroxidação lipídica, induzida por pilocarpina, no hipocampo e córtex de ratos. Níveis elevados de lipoperoxidação também foram relatados em hipocampo de ratos, nas fases aguda e crônica de convulsões induzidas por pilocarpina ou ácido caínico, e na epilepsia induzida por *kindling* (abrasamento) (DAL-PIZZOL *et al.*, 2000; FRANTSEVA *et al.*, 2000a).

Os resultados do presente estudo revelaram níveis elevados de MDA, indicativos de peroxidação lipídica, em hipocampo e corpo estriado de animais tratados com P400, confirmando o envolvimento de radicais livres na injúria cerebral desencadeada pelas convulsões nessas áreas

cerebrais. No entanto, embora LEV não tenha, quando administrado isoladamente, exercido alteração nos níveis normais de peroxidação lipídica em comparação ao controle, o pré-tratamento com LEV inibiu o aumento na peroxidação lipídica induzido pela P400 no hipocampo (dados já publicados- OLIVEIRA *et al.*, 2007), sugerindo uma ação antioxidante dessa droga no modelo em estudo, evidenciada pela estabilização dos níveis hipocampais de MDA. Os níveis elevados de peroxidação lipídica estriatais não foram alterados por LEV.

Atividade neuroprotetora do LEV contra o estresse oxidativo foi relatada quando a injeção intraperitoneal dessa droga levou à redução do produto da peroxidação lipídica, MDA, em córtex de ratos epiléticos, após a toxicidade neuronal induzida por cainato, sugerindo que seus efeitos eram mediados, pelo menos em parte, pela inibição da peroxidação lipídica (MARINI *et al.*, 2004). De acordo com Ueda e colaboradores (2009) LEV suprimiu a excitação glutamatérgica e o aumento da inibição GABAérgica em cérebro de ratos, sugerindo não apenas atividade antiepiléptica mas também potencial atividade neuroprotetora dessa droga.

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

Objetivando identificar se o efeito redutor da peroxidação lipídica seria um mecanismo protetor específico para LEV, ou uma consequência indireta da redução da epileptogênese, e, portanto, comum a outras drogas antiepilépticas, e se os efeitos protetores da MEL contra as convulsões também se deviam a redução do dano oxidativo em áreas cerebrais, procedemos à identificação dos índices de peroxidação lipídica em homogenatos hipocampais e estriatais de animais pré-tratados com CNZP e MEL. De maneira interessante, CNZP foi capaz de reverter a elevação de MDA, induzida por P400, em hipocampo e corpo estriado, enquanto apenas os níveis de peroxidação lipídica hipocampais foram normalizados pelo pré-tratamento com MEL.

A relação entre as propriedades antioxidantes de drogas antiepilépticas (reduzindo a geração de radicais livres e peroxidação lipídica) e seus efeitos neuroprotetores contra o desenvolvimento de convulsões e danos cerebrais em modelos animais de epilepsia implicam na hipótese de que a geração de espécies reativas do oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) é crítica para o início da atividade convulsiva nesses modelos (BONDY; LEE, 1993).

A atividade antioxidante do CNZP foi previamente relatada, através de uma redução significativa no conteúdo de TBARS (indicativo de redução da lipoperoxidação) no plasma e no hipocampo de ratos diabéticos (HAESER *et al.*, 2007). Meissl e colaboradores (1994) descreveram um aumento na liberação de MEL endógena, em glândula pineal de trutas, pela administração de diazepam ou CNZP.

A toxicidade dos radicais livres pode ser atenuada por antioxidantes diretos e indiretos. Nos últimos anos, efeitos antioxidantes diretos, através da “varredura” dos radicais livres, bem como a efeitos indiretos, alterando a função de moléculas antioxidantes endógenas, têm sido atribuídos à MEL. Devido a essas ações, sua capacidade de reduzir o dano oxidativo tem sido testada em uma grande variedade de processos neurológicos experimentais, onde, geralmente, a MEL tem se mostrado altamente efetiva com relação à redução dos danos provocados pelo estresse oxidativo (HARDELAND, 1995; REITER *et al.*, 1997). Akcay e colaboradores (2005) demonstraram que o pré-tratamento com MEL é capaz de reverter a elevação nos níveis de MDA em córtex de ratos, induzida pela administração intraperitoneal de ácido caínico, modelo de epilepsia lobo-temporal, corroborando com os resultados do presente estudo.

Diversas evidências sustentam o papel da MEL na regulação do complexo receptor GABA-benzodiazepínicos, que parece ter sua neurotransmissão inibitória potencializada pela MEL. Além disso, a interação da MEL com peptídeos corticotróficos e receptores benzodiazepínicos mitocondriais pode resultar na participação de neuroesteróides na atividade e função do GABA. Dados recentes de estudos bioquímicos e eletrofisiológicos suportam a possibilidade de que a atividade anticonvulsivante e os efeitos depressores da MEL na atividade neuronal podem depender da sua capacidade antioxidante e do seu papel anti-excitotóxico,

atuando com removedora de radicais livres e regulando receptores glutamatérgicos cerebrais (ACUÑA-CASTROVIEJO, *et al.*, 2007).

Dessa forma, demos continuidade a investigação dos efeitos antioxidantes das drogas em estudo, procedendo a realização de análises de outros parâmetros envolvidos na produção e degradação de radicais livres e EROs.

EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE NITRITO

A excessiva produção de EROs, decorrente de excitotoxicidade, induz morte neuronal e diversas alterações neurológicas, que participam na etiologia de várias patologias, incluindo a epilepsia (LIPTON; ROSENBERG, 1994). As EROs, produzidas durante as convulsões e estado epiléptico, podem ativar os mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* (BONFOCO *et al.*, 1995) e *in vivo* (SHULZ *et al.*, 1995; UEDA *et al.*, 1997).

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

O nitrito (metabólito estável do NO) pode ser associado com a fisiopatologia de várias doenças (VANHATALO; RIIKONEN, 2001) e tem sido implicado em muitos mecanismos moleculares envolvidos nas convulsões, podendo modular uma cascata de efeitos excitotóxicos no SNC e participar do subsequente dano neuronal (DALKARA *et al.*, 1994). Estudos recentes relatam aumento na produção de nitrito-nitrato em diversas áreas cerebrais, incluindo hipocampo

e corpo estriado, em modelos de convulsões induzidas por pilocarpina ou ácido caínico (RADENOVIC *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2004b).

Nossos resultados demonstraram um aumento na produção de nitrito-nitrato no hipocampo dos animais tratados com P400, confirmando a participação desses metabólitos no processo convulsivo. O pré-tratamento com LEV (dado já publicado- OLIVEIRA *et al.*, 2007), CNZP ou MEL, todavia, foi capaz de reverter a elevação dos níveis de nitrito-nitrato no hipocampo, contribuindo, dessa maneira, para redução de EROs no foco epileptogênico. No corpo estriado não foi verificado aumento significativo na produção de nitrito-nitrato pelo tratamento com P400, no entanto, a administração de LEV, isoladamente, ou antes de P400, reduziu significativamente a concentração de nitrito-nitrato nessa área cerebral, em relação ao controle. Dessa forma, os efeitos protetores das três drogas anticonvulsivantes aqui estudadas parecem estar relacionados à diminuição da produção de EROs e compostos deletérios, principalmente no hipocampo, área cerebral extremamente implicada na instalação do processo epiléptico, reforçando a ocorrência de efeito antioxidante.

Ueda e colaboradores (2009) demonstraram que LEV, quando administrado por microinfusão, em técnica de microdiálise, é capaz de inibir a atividade da enzima pró-oxidante NOS (óxido nítrico sintase) induzida em hipocampo de ratos. Um relato recente também sugeriu que a administração crônica de LEV suprime a geração de NO por depleção da enzima NOS induzida, em cérebro de ratos, associando essa supressão aos efeitos neuroprotetores do LEV (TALAREK; FIDECKA, 2003). Dessa forma, o efeito antioxidante do LEV pode estar relacionado à modificação na expressão da NOS e redução nos níveis de peroxidação lipídica.

Singh e Kumar (2007) relataram que o alprazolam, um benzodiazepínico, reduz, significativamente, o estresse oxidativo neuronal induzido pela privação de sono em camundongos. Nesse estudo, os autores descreveram que a elevação nos níveis de nitrito em cérebro de camundongos, induzida por privação do sono, era revertida pelo tratamento com alprazolam, e atribuíram uma atividade antioxidante ao alprazolam nesse modelo. Estudos sugerem, ainda, que o efeito anticonvulsivante dos benzodiazepínicos, incluindo o CNZP, é intensificado por inibidores da formação de NO (BOROWICZ *et al.*, 2000). Corroborando com

esse relato, a supressão seletiva da produção de NO cerebral revelou efeitos anticonvulsivantes. (DE SARRO *et al.*, 1991, MÜLSCH *et al.*, 1994).

De acordo com achados do presente estudo, o pré-tratamento com MEL (40-160 mg/kg) reduziu significativamente os níveis de nitrito no córtex, corpo estriado e tronco encefálico de ratos, induzidos pelas convulsões desencadeadas por pentilenotetrazol, sugerindo que as propriedades anticonvulsivantes da MEL envolvem modulação da produção de NO (BIKJDAOUENE *et al.*, 2003). Existem, ainda, vários relatos na literatura sugerindo que os efeitos da MEL são dependentes da transmissão nitrérgica, onde a MEL exerce influência negativa. Em artéria da cauda de ratos, MEL potencializa a vasoconstricção, em conjunto à estimulação α_1 adrenérgica, por mecanismo que envolve a redução na síntese de NO e pode ser bloqueado pelo inibidor da NOS, L-NAME (EARLY *et al.*, 1998). Em preparação de sistema nervoso entérico de intestino de ratos, a atividade da enzima NOS nos sinaptossomos entéricos foi significativamente reduzida pela administração de MEL (STORR *et al.*, 2002). MEL previniu, ainda, a falência mitocondrial em modelos de sepse através de sua habilidade de inibir a expressão e a atividade de NOS induzidas, tanto mitocondriais quanto citossólicas. Além disso, MEL e seus metabólitos foram capazes de reverter, na substância negra e corpo estriado de ratos, o aumento na atividade da NOS, elevação nos níveis de nitrito-nitrato e estresse oxidativo, em modelo de parkinsonismo, induzidos por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (TAPIAS *et al.*, 2009).

Nesse contexto, os achados do presente trabalho sugerem a capacidade de LEV, CNZP e MEL em reduzir o nível dos compostos deletérios derivados do NO, nitrito-nitrato, em áreas cerebrais envolvidas na indução ou propagação da atividade epiléptica, o que poderia contribuir, sobremaneira, para seus efeitos protetores neuronais durante as convulsões.

AÇÕES SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE

Os ânions superóxido (O_2^-), produtos da interação entre as moléculas de oxigênio e elétrons provenientes da cadeia transportadora nas mitocôndrias, são convertidos, por ação da

SOD (superóxido desmutase), a peróxido de hidrogênio, que, por sua vez, é detoxificado pelas enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase. Essas enzimas constituem, assim, um sistema antioxidante endógeno, que atua prevenindo o dano neuronal induzidos pelos radicais livres e EROs (REMMEN *et al.*, 2004).

Uma elevação na formação de radicais livres pode ser acompanhada por aumento compensatório imediato na atividade de enzimas inativadores de radicais livres. As convulsões e estado epiléptico podem alterar sistemas antioxidantes e ativar enzimas responsáveis pela remoção de EROs, como a SOD e a catalase, indicando uma resposta celular à elevação na formação de espécies reativas do oxigênio (NAFFAH-MAZZACORATTI *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2004a).

No presente estudo, foi observado um comportamento adaptativo semelhante na atividade da catalase no hipocampo e no corpo estriado em resposta às convulsões induzidas por P400, com aumento significativo na atividade dessa enzima em ambas as áreas cerebrais, durante o processo convulsivo, provavelmente relacionado à maior liberação de radicais livres e EROs. Em acordo com nossos resultados, Wilhelm e colaboradores (2009) e Jesse e colaboradores (2008) identificaram significativo aumento na atividade da catalase, 1 hora após a administração de P400, em cérebro de ratos; Freitas e colaboradores (2004) demonstraram que o *status epilepticus*, induzido por P400, leva ao aumento na atividade da catalase em córtex frontal, corpo estriado e hipocampo de ratos e Nascimento e colaboradores (2005) mostraram elevação na atividade da catalase em corpo estriado de ratos jovens, 1 hora após administração de P400.

O pré-tratamento com LEV (Dado já publicado- OLIVEIRA *et al.*, 2007) ou CNZP, antes de P400, resultou em um efeito estabilizante da atividade da catalase, mantendo-a em níveis normais, tanto no hipocampo como no corpo estriado. Já nos animais pré-tratados com MEL, a atividade da catalase foi significativamente estabilizada no hipocampo.

Singh e Kumar (2007) identificaram a estabilização da atividade da catalase pela administração do benzodiazepínico alprazolam, em modelo de estresse oxidativo neuronal induzido pela privação de sono em camundongos. A literatura relata, ainda, que o pré-tratamento com MEL é capaz de normalizar a atividade das enzimas catalase e superóxido-desmutase no

córtex de ratos, revertendo sua superativação induzida pelas convulsões decorrentes da administração de ácido caínico (AKCAY *et al.*, 2005). Dessa forma, a ação antioxidante da MEL parece estar relacionada não apenas à detoxificação direta de radicais livres, mas a efeitos adicionais, como a elevação da atividade de enzimas antioxidantes, como glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase. Além disso, diversos metabólitos da MEL possuem propriedade de captadores de radicais livres (VELKOV *et al.*, 2009).

Os achados do presente estudo, com relação à indução da estabilização da atividade da catalase por LEV, CNZP e MEL, sugerem uma diminuição da produção de radicais livres, decorrente do pré-tratamento com as drogas anticonvulsivantes em estudo, confirmando sua ação protetora contra as alterações bioquímicas induzidas pelo processo convulsivo.

EFEITOS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA

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

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

O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevivência de 90% de ratos submetidos a hipóxia, podendo ser também útil na proteção contra o estresse oxidativo (DENEKE; FANBURG, 1989). Baixos níveis de GSH também foram detectados em hipocampo

de ratos submetidos às convulsões induzidas por P400 (LIN *et al.*, 2010; DE FREITAS *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstraram uma depleção significativa do antioxidante endógeno GSH no hipocampo e corpo estriado, em consequência da administração de P400, confirmando, assim, a capacidade reduzida de neutralização de radicais livres durante as convulsões.

Em modelo de convulsões com ácido caínico, a pré-administração de LEV preveniu a redução nos níveis de GSH induzida pelas convulsões, no córtex e no diencéfalo de ratos (MARINI *et al.*, 2004). Em modelo de estresse oxidativo induzido por isquemia cerebral de ratos, o benzodiazopínico diazepam foi capaz de reduzir os níveis de MDA e elevar a atividade da SOD e GSH-Px, sugerindo que seu efeito protetor neuronal depende de mecanismos complexos, que envolvem a regulação da síntese e liberação de radicais livres (HU *et al.*, 2001). A redução nos níveis de GSH em hipocampo de ratos, induzida por modelo de demência com estreptozocina, foi revertida pela administração de MEL (AGRAWAL, 2009). MEL também preveniu a perda neuronal de GSH induzida por glicina em córtex cerebral de ratos (LEIPNITZ *et al.*, 2009).

No presente estudo, o pré-tratamento com LEV preveniu a perda de GSH no hipocampo (dado já publicado – OLIVEIRA *et al.*, 2007). A administração de CNZP ou MEL, antes de P400, preveniu a perda de GSH em hipocampo, tendo a MEL, ainda, elevado os níveis de GSH hipocámpais e estriatais, mesmo quando administrada isoladamente. Esses achados sugerem, portanto, uma potencialização do principal mecanismo de defesa antioxidante não-enzimático pelo LEV, no hipocampo, e por CNZP e MEL, em ambas as áreas cerebrais estudadas.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Embora os diversos achados literários, muitos deles citados anteriormente, a respeito de indícios da atividade antioxidante de drogas anticonvulsivantes, juntamente aos resultados encontrados no presente estudo, apontem para o fato que LEV e CNZP, bem como o antioxidante MEL, exerçam seus efeitos protetores contra as convulsões e epilepsia, pelo menos em parte,

através de propriedades antioxidantes, a hipótese de que estas drogas antiepilépticas o fazem por mecanismos antioxidativos diretos ainda é incerta. Nesse contexto, objetivando avaliar se os efeitos protetores dessas drogas contra o estresse oxidativo neuronal seriam apenas indiretos, ou seja, em consequência da inibição ou retardo da instalação das convulsões, através de outros mecanismos que não a ação antioxidante direta dessas drogas, estudos em modelo de estresse oxidativo induzido por choque térmico (*in vitro*) foram realizados em homogenatos cerebrais de camundongos.

A elevação nos níveis de T-BARS, expressa em concentração de MDA, e nas concentrações de nitrito-nitrato, nas amostras submetidas ao choque térmico *in vitro*, indicaram claro processo oxidativo, enquanto a elevação da atividade da catalase sugeriu ativação de mecanismo neuroprotetor compensatório contra o estresse oxidativo. LEV, CNZP e, obviamente, o agente antioxidante MEL exerceram redução do estresse oxidativo nos homogenatos cerebrais, através da diminuição dos níveis de MDA, de nitrito-nitrato e, ainda, pela estabilização da atividade da catalase, potencializando, assim, a atividade enzimática antioxidante endógena e a capacidade de inativação de radicais livres. Juntos, esses resultados demonstram uma redução de substratos tóxicos nas amostras pré-incubadas com ambas as drogas anticonvulsivantes testadas.

Nenhuma alteração nos níveis de GSH foi observada nas amostras submetidas ao choque térmico em relação ao controle (amostras sem choque térmico). Todavia, elevações nos níveis dessa molécula antioxidante endógena foram observadas, em relação ao controle, nos homogenatos pré-incubados com as duas menores concentrações de LEV testadas, com a menor concentração testada de CNZP e com todas as concentrações de MEL. Dessa forma, ainda que LEV e CNZP não possuam capacidade de remover diretamente os radicais livres e espécies oxidativas, poderiam fazê-lo através da indução da atividade de antioxidantes endógenos cerebrais, como GSH. O efeito potencializador da MEL sobre a atividade de GSH foi confirmado também nos estudos *in vivo* (previamente discutido), contribuindo para reafirmar seu papel antioxidante como mecanismo protetor contra danos cerebrais.

Em estudos *in vitro* realizados por Reiter e colaboradores (1995) a MEL se mostrou bastante eficaz na neutralização de radicais hidroxila, além disso, sua atividade de remover

radicais livres se mostrou mais efetiva que a de moléculas antioxidantes endógenas bem estabelecidas, como GSH. MEL demonstrou, ainda, efeito estimulador da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px) em tecido neuronal. Os autores relataram, ainda, que a MEL atua de maneira mais eficiente que a vitamina E na remoção de compostos reativos derivados do oxigênio.

Os presentes resultados não demonstraram efeitos concentração-dependentes para LEV, CNZP e MEL em alguns parâmetros analisados. De fato, em alguns casos, sob ação da menor concentração testada, foi observada a maior capacidade antioxidante, e esta foi reduzida em concentrações mais elevadas. Esses resultados sugerem capacidades pró-oxidantes desses compostos em altas concentrações, indicando que elevadas concentrações desses agentes podem inibir processos de defesa antioxidante endógena.

Relatos prévios apontam efeitos pró-oxidativos na terapia continuada com elevadas doses de DAE. Aumento nos níveis plasmáticos de T-BARS e redução nos níveis de tiol foram detectados em pacientes e terapia prolongada com DAE (TAN *et al.*, 2009). Li e colaboradores (2010) relataram que a exposição prolongada à carbamazepina resulta em formação excessiva de espécies reativas do oxigênio, resultando em dano oxidativo aos lipídios e proteínas e inibindo a capacidade antioxidante em cérebro de peixes. Elevadas doses de CNZP induziram redução da atividade da Glutathiona Peroxidase em nervo ciático e na medula espinhal de ratos, sugerindo dano neuronal (ZHONG *et al.*, 2008).

CONSIDERAÇÕES SOBRE O PAPEL ANTIOXIDANTE E A CAPACIDADE PROTETORA CONTRA AS CONVULSÕES

O desenvolvimento de alterações neurológicas, em geral, é acompanhado pela liberação de glutamato e está relacionado a inúmeros eventos fisiopatológicos, que são mediados pela sobrecarga de cálcio nas células neuronais (DOBLE, 1999; MELDRUM, 2000). Esses eventos também envolvem ativação de lipases e proteases (com conseqüente dano da membrana celular); ativação de óxido nítrico sintases indutíveis (que, juntamente com EROs, destroem lipídios);

danos das proteínas de membrana e do DNA e aumento da liberação de ácido aracdônico, que inicia a formação de EROs (MARINI *et al.*, 2004).

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

A diminuição na produção de nitrito e estabilização da atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado e, ainda, a significativa redução da peroxidação lipídica e o aumento nos níveis de glutathiona no hipocampo, evidenciados no presente trabalho, revelaram que LEV, CNZP e MEL exercem efeitos anti-oxidantes cerebrais, que podem explicar, pelo menos em parte, as ações protetoras e anticonvulsivantes dessas drogas no modelo em estudo.

Nossos resultados permitiram, ainda, estabelecer uma correlação entre a diminuição do estresse oxidativo e conseqüente proteção contra danos nas áreas cerebrais estudadas, envolvidas na instalação e propagação das convulsões, à medida que o pré-tratamento com LEV, CNZP ou MEL aumentou significativamente a latência para a instalação das convulsões, o percentual de desenvolvimento de estado epiléptico e de morte dos animais submetidos a P400. Todavia, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos precisos através dos quais essas drogas exercem seus efeitos protetores contra o estresse oxidativo neuronal e danos desencadeados pelas convulsões e pelo estado epiléptico.

VI CONCLUSÕES

A análise dos resultados apresentados neste trabalho nos permitiu concluir que:

- O pré-tratamento com LEV ou CNZP exerce efeitos protetores contra as convulsões, morte e *status epilepticus* induzidos por P400. A administração prévia de MEL influencia, principalmente, na elevação das latências de convulsão e na proteção contra a morte. Os efeitos colinérgicos periféricos, induzidos por P400, permanecem inalterados na presença de LEV, CNZP ou MEL;
- Este trabalho sugere um efeito modulador, exercido por LEV, CNZP e MEL sobre o funcionamento do sistema colinérgico muscarínico, em nível central, como mecanismo alternativo para a proteção contra as convulsões e epilepsia no modelo de P400, visto que:
 - ✓ LEV, CNZP e MEL reduziram a intensidade de tremores induzidos por oxotremorina, sugerindo uma modulação do sistema colinérgico por estas drogas;
 - ✓ O pré- tratamento com LEV foi capaz de reverter a redução na atividade da enzima AChE em hipocampo, induzida por P400, enquanto CNZP e MEL desencadearam aumentos na atividade da AChE quando administrados isoladamente, além de reverterem a redução na atividade da enzima, induzida por P400, no hipocampo.
 - ✓ O *binding* de receptores muscarínicos no hipocampo foi alterado na administração intraperitoneal de LEV e CNZP antes de P400, onde ambos reverteram a *downregulation* dos receptores muscarínicos hipocampais induzida por P400. LEV, administrado isoladamente, foi capaz, ainda, de induzir *downregulation* dos receptores M2-símile no hipocampo.
 - ✓ Nos ensaios de *binding (in vitro)* foi observada *downregulation* de receptores muscarínicos em homogenatos de hipocampo pré-incubados com LEV, CNZP ou MEL, e isto confirma uma modulação muscarínica sugerida nos estudos “*in vivo*”.

- Na fase aguda das convulsões e *status epilepticus* induzidos por P400 em camundongos não ocorre alteração na densidade dos receptores dopaminérgicos hipocampais. Todavia, a *downregulation* dos receptores D₂ hipocampais, observada nos animais tratados com LEV, CNZP ou pré-tratados com MEL antes de P400, pode ser relevante, já que a sinalização mediada pelos receptores D₂ interfere nos efeitos neurotóxicos induzidos pelo aumento na neurotransmissão colinérgica.
- A ação protetora de LEV, CNZP e MEL contra as convulsões, *status epilepticus* e morte, induzidos por P400, parece estar relacionada às propriedades antioxidantes diretas ou indiretas dessas drogas, através da capacidade de modificar a resposta ao estresse oxidativo neuronal, facilitando mecanismos endógenos de defesa antioxidante, visto que:
 - ✓ As ações anticonvulsivantes de LEV, CNZP e MEL foram potencializadas pela associação com o agente antioxidante (vitamina E);
 - ✓ P400 induziu elevação nos níveis de MDA (indicativo de peroxidação lipídica) em hipocampo e corpo estriado. A administração prévia de LEV ou MEL, antes de P400, reverteu o aumento nos níveis de MDA no hipocampo, enquanto o pré-tratamento com CNZP induziu queda nos níveis de MDA em hipocampo e corpo estriado;
 - ✓ O pré-tratamento com LEV reduziu a elevação na formação de nitrito-nitrato em hipocampo e corpo estriado, induzida por P400, enquanto a administração de CNZP ou MEL reduziu a formação desses produtos do estresse oxidativo no hipocampo.
 - ✓ A atividade da enzima antioxidante catalase, exacerbada na administração de P400 foi normalizada no pré-tratamento com LEV ou CNZP em hipocampo e corpo estriado e com MEL no hipocampo;
 - ✓ Os níveis fisiológicos da enzima antioxidante GSH em hipocampo e corpo estriado, depletados sob a administração de P400, foram normalizados pela pré-administração de LEV (GSH hipocampal) ou CNZP (GSH hipocampal e estriatal), enquanto MEL,

administrada isoladamente, ou antes de P400, elevou os níveis de GSH em ambas as áreas cerebrais;

- ✓ O aumento na formação de MDA, nitrito-nitrato e da atividade da catalase nos homogenatos cerebrais submetidos ao choque térmico (*in vitro*), parâmetros indicativos de estresse oxidativo, foram alterados de forma significativa pela incubação prévia com LEV, CNZP ou MEL, onde estas drogas foram capazes de reduzir os níveis de MDA, de nitrito-nitrato e, ainda, estabilizar da atividade da catalase, potencializando, assim, a atividade enzimática antioxidante endógena e a capacidade de inativação de radicais livres.

- ✓ Ainda no modelo de estresse oxidativo por choque térmico, a incubação com LEV, CNZP e MEL produziu elevações de GSH em relação aos homogenatos não incubados com estas drogas. Dessa forma, ainda que LEV e CNZP não possuam capacidade de remover diretamente os radicais livres e espécies oxidativas, poderiam fazê-lo através da indução da atividade de antioxidantes endógenos cerebrais, como GSH.

VII REFERÊNCIAS

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; COTO-MONTES, A.; GAIA-MONTI, M.; ORTIZ, G. G.; REITER, R. J. Melatonin is protective against MPTP-induced striated and hippocampal lesions. **Life Sci.**, v. 60, p. 23-29, 1997.

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; MACÍAS, M.; MUÑOZ HOYOS, A.; MOLINA CARBALLO, A.; ARAUZO, M.; MONTES, R. Cell protective role of melatonin in the brain. **Journal of Pineal Research**, v. 19, p. 57-63, 2007.

AGAR, E.; BOŞNAK, M.; AMANVERMEZ, R.; DEMİR, S.; AYYILDIZ, M.; CELİK, C. The effect of ethanol on lipid peroxidation and glutathione level in the brain stem of rat. **Neuroreport.**, v. 10, p. 1799-1801, 1999.

AGRAWAL, R.; TYAGI, E.; SHUKLA, R.; NATH, C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 779-787, 2009.

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

AKCAY, Y. D.; YALCIN, A.; SOZMEN, E. Y. The effect of melatonin on lipid peroxidation and nitrite/nitrate levels, and on superoxide dismutase and catalase activities in kainic acid-induced injury. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v. 10, p. 321-329, 2005.

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

ALBERTSON, T. E.; PETERSON, S. L.; STARK, L. G.; LAKIN, M. L.; WINTERS, W. D. The anticonvulsant properties of melatonin on kindled seizures in rats. **Neuropharmacology**, v. 20, p. 61-66, 1981.

ALFAVARO, T. M.; VIGRA, E.; OLIVEIRA, C. R.; CUNHA, R. A. Effect of free radicals on adenosine A (2A) and dopamine D2 receptors in the striatum of young adult and aged rats. **Neurochem. Int.**, v. 45, p. 733-738, 2004.

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

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

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

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

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

ARENDR, J. Aaron Lerner, who discovered melatonin. **J. Pineal Res.**, v. 43, p. 106-107, 2007.

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

AUDDY, B.; FERREIRA, M.; BLASINA, L.; LAFON, L.; ARREDONDO, F.; DAJAS, F.; TRIPATHI, P. C.; SEAL, T.; MUKHERJEE, B. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 131-138, 2003.

AVANZINI, G.; FRANCESCHETTI, S. Cellular biology of epileptogenesis. **The Lancet Neurology**, v. 2, p. 123-145, 2003.

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

BÄHRING, R.; STANDHARDT, H.; MARTELLI, E. A.; GRANTYN, R. GABA-activated chloride currents of postnatal mouse retinal ganglion cells are blocked by acetylcholine and acetylcarnitine: how specific are ion channels in immature neurons? **Eur. J. Neurosci.**, v. 6, p. 1089-1099, 1994.

BAJGAR, J.; KUCA, K.; JUN, D.; BARTOSOVA, L.; FUSEK, J. Cholinesterase reactivators: the fate and effects in the organism poisoned with organophosphates/nerve agents. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, p. 803-809, 2007.

BARLOW-WALDEN, L. R.; REITER, R. J.; ABE, M.; PABLOS, M.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem. Int.**, v. 26, p. 497-502, 1995.

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

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

BARONE, P.; PALMA, V.; PARASHOS, S. A.; CHASE, T. N.; CAMPANELLA, C. L. Role of D1 and D2 dopamine receptors in pilocarpine-induced seizures. In: CARPENTER, M. B.; BERNARDI, G.; DI CHIARA, G.; STANZIONE, P. (Ed). **Basal Ganglia III**. New York: Plenum Press, p. 568, 1990a.

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

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

BEAGLEHOLE, R., BONITA, R., KJELLSTROM, T. **Epidemiologia Básica**. 1. ed., São Paulo: Livraria Editora Santos, 1996.

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

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

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

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

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

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

BIKJDAOUENE, L.; ESCAMES, G.; LEON, J.; FERRER, J. M.; KHALDY, H.; VIVES, F.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Changes in brain amino acids and nitric oxide after melatonin administration in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. **J. Pineal Res.**, v. 35, p. 5460, 2003.

- BONDY, S. C.; LEE, D. K. Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. **Brain Res.**, v. 610, p. 229-233, 1993.
- BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NOCOTERA, P.; LIPTON, A. S. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.
- BONNER, T. I.; BUCKLEY, N. J.; YOUNG, A.; BRANN, M. R. Identification of a family of muscarinic receptor genes. **Science**, v. 237, p. 527-532, 1987.
- BORELLI, E.; BOZZI, Y. Dopamine D₂ receptor signaling controls neuronal cell death induced by muscarinic and glutamatergic drugs. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 19, p. 263-271, 2002.
- BORMANN, J. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. **Trends Neurosci.**, v.11, p. 112-116, 1988.
- BOROWICZ, K. K.; KAMINSKI, R.; GASIOR, M.; KLEINROK, Z.; CZUCZWAR, S. J. Influence of melatonin upon the protective action of conventional anti-epileptic drugs against maximal electroshock in mice. **Eur. Neuropharmacol.**, v. 9, p. 185-190, 1999.
- BOROWICZ, K. K.; LUSZCZKI, J.; KLEINROK, Z.; CZUCZWAR, S. J. 7-Nitroindazole, a nitric oxide synthase inhibitor, enhances the anticonvulsive action of ethosuximide and clonazepam against pentylenetetrazol-induced convulsions. **J. Neural Transm.**, v. 107, p.1117-1126, 2000.
- BOUTIN, J. A.; AUDINOT, V.; FERRY, G.; DELAGRANGE, P. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 26, p. 412-419, 2005.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E.; REITER, R.; CHANCE, B.; JAMIESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 703-719, 1986.
- BOWERY, N. GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 10, p. 401-407, 1989.
- BOZZI, Y.; BORRELLI, E. Dopamine D2 Receptor Signaling Controls Neuronal Cell Death Induced by Muscarinic and Glutamatergic Drugs. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 19, p. 263-271, 2002.
- BRODIE, M. J.; DICHTER, M. A. Antiepileptic Drugs. **Drug Therapy**, v. 344, p. 168-175, 1996.
- BROWNE, T. R.; HOLMES, G. L. Epilepsy. **New England Journal Medicine**, v. 344, p. 1145-1151, 2001.

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

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

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

BURKE, K.; CHANDLER, C. J.; STARR, B. S.; STARR, M. S. Seizure promotion and protection by D1 and D2 dopaminergic drugs in the mouse. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 36, p. 729-733, 1990.

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

BURNEO, J. G.; TELLEZ-ZENTENO, J.; WIEBE, S. Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence. **Epilepsy Research**, v. 66, p. 63-74, 2005.

CANIATO, R.; FILIPPINI, R.; PIOVAN, A.; PURICELLI, L.; BORSARINI, A.; CAPPELLETTI, E. Melatonin in plants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 527, p. 593-597, 2003.

CARNEIRO, R. C. G, CIPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R. P. Diurnal variation of the rat vas deferens contraction induced by stimulation of presynaptic nicotinic receptors and pineal function. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 259, p. 614-619, 1991.

CARNEIRO, R. C. G.; MARKUS, R. P. Presynaptic nicotinic receptors involved in release of noradrenaline and ATP from prostatic portion of rat vas deferens. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 255, p. 95-100, 1990.

CARNEIRO, R. C. G.; TOFFOLETO, O.; CIPOLLA-NETO, J.; MARKUS, R. P. Modulation of sympathetic neurotransmission by melatonin. **European Journal of Pharmacology**, v. 257, p. 73-77, 1994.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

CHAMPNEY, T. H.; HANNEMAN, W. H.; LEGARE, M. E.; APPEL, K. Acute and chronic effects of melatonin as an anticonvulsant in male gerbils. **J. Pineal Res.**, v. 20, p. 79-83, 1996.

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

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

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

CHO, S.; JOH, T. H.; BAIK, H. H.; DIBINIS, C.; VOLPE, B. T. Melatonin administration protects CA1 hippocampal neurons after transient forebrain ischemia in rats. **Brain Res.**, v. 755, p. 335-338, 1997.

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

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

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

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

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. Acetylcholine. In: _____ **The biochemical basis of neuropharmacology**. 6th ed. Oxford: Oxford University Press, 1991, p.190-213.

COPPOLA, G.; IERVOLINO, G.; MASTROSIMONE, M.; LA, T. G.; RUIU, F.; PASCOTTO, A. Melatonin in wake-sleep disorders in children, adolescents and young adults with mental retardation with or without epilepsy: a double-blind, cross-over, placebo-controlled trial. **Brain Dev.**, v. 26, p. 373-376, 2004.

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

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

COVINGTON , E. C. Anticonvulsants for neuropathic pain and detoxification. **Cleve Clin. J. Med.**, v. 65, p. 45-47, 1998.

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

CRAMER, J. A.; GENEVIÈVE, V. H.; STUDY GROUP, T. N132. Maintenance of improvement in health-related quality of life during long-term treatment with levetiracetam. **Epilepsy and Behavior**, v. 4, p. 118-123, 2003.

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

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

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

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

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

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

DE FREITAS, R. M. Lipoic acid alters delta-aminolevulinic dehydratase, glutathione peroxidase and Na⁺,K⁺-ATPase activities and glutathione-reduced levels in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. **Cell. Mol. Neurobiol.**, v. 30, p. 381-387, 2010.

DE SARRO, G. B.; DONATO-DI-PAOLA, E.; DE SARRO, A.; VIDAL, M. J. Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid-induced seizures from the deep prepiriform cortex. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 5, p. 503-511, 1991.

DELORENZO, R. J.; CHURN, S. B.; KOCHAN, L. D. Chronic inhibition of Ca²⁺/Calmodulin Kinase II activity in the pilocarpine model of epilepsy. **Brain Research**, v. 875, p. 66-77, 2000.

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

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

DEVI, P. U.; MANOCHA, A.; VOHORA, D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 9, p. 3169-3177, 2008.

DICHTER, M. A.; BRODIE, M. A. New antiepileptic drugs. **N. Engl. J. Med.**, v. 334, p. 1583-1590, 1996.

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

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

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DUBOCOVICH, M. L. Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. **Nature**, v. 306, p. 782-784, 1983.

DUGAN, L. L.; CHOI, D. W. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. **Ann. Neurol.**, v. 35, p. 17-21, 1994.

EARY, G. G.; DUCKLES, S. P.; KRAUSE, D. N. Effect of melatonin in the rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 123, p. 1533-1540, 1998.

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

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

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

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. G.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 430, p. 37-48, 2004.

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

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

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRÉS, J. V.; FEARTHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EMA. The european agency for the evaluation of medicinal products. **Relatório Europeu de Avaliação Público**. Disponível em <<http://www.eudra.org/emea.html>>. Acesso em: 12 mai. 2010.

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

- ENGEL, J.; PEDLEY, T. A. **Epilepsy: A comprehensive text-book**. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.
- ESCAMES, G.; CASTROVIEJO, D. A.; VIVES, F. Melatonin-dopamine interaction in the striatal projection area of sensorimotor cortex in the rat. **NeuroReport**, v. 7, p. 597-600, 1997.
- FARLOW, M. R. Do cholinesterase inhibitors slow progression of Alzheimer's disease? **Int. J. Clin. Pract.**, v. 127, p. 37-44, 2002.
- FAUTECK, J.; SCHMIDT, H.; LERCHL, A.; KURLEMANN, G.; WITTKOWSKI, W. Melatonin in epilepsy: first results of replacement therapy and first clinical results. **Biol. Signals Recept.**, v. 8, p. 105-110, 1999.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Méd. Brasil**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FIELDER, E. P.; MARKS, M. J.; COLLINS, A. C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **Journal Neurochemical**, v. 49, p. 983-990, 1987.
- FISHER, S. K.; AGRANOFF, B. W. Receptor activation and inositol lipid hydrolyses in neural tissues. **Journal Neurochemical**, v. 48, p. 999-1017, 1987.
- FISHER, S. R. Animal models of epilepsies. **Brain Research Reviews**, v. 14, p. 245-278, 1989.
- FLYNN, C. J.; WECKER, L. Concomitant increases in the levels of choline and free fatty acids in rat brain: Evidence supporting the seizure-induced hydrolysis of phosphatidylcholine. **Journal Neurochemical**, v. 48, p. 1178-1184, 1987.
- FORRAY, M. I.; ANDRES, M. E.; BUSTOS, G.; GYSLING, K. Regulation of endogenous noradrenaline release from the bed nucleus of stria terminalis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 49, p. 687-692, 1995.
- FRANTSEVA, M. V.; PEREZ VELAZQUEZ, J. L.; HWANG, P. A.; CARLEN, P. L. Free radical production correlates with cell death in an *in vitro* model of experimental epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 9, p. 66-71, 2000.
- FRANTSEVA, M. V.; PEREZ VELAZQUEZ, J. L.; TSORAKLIDIS, G.; MENDONCA, A. J.; ADAMCHIK, Y.; MILLS, L. R.; CARLEN, P. L.; BURNHAM, M. W. Oxidative stress is involved in seizure-induced neurodegeneration in the kindling model of epilepsy. **Neuroscience**, v. 97, p. 431-435, 2000a.
- FRANTSEVA, M. V.; VELAZQUEZ, J. L.; HWANG, P. A.; CARLEN, P. L. FREE radical production correlates with cell death in an *in vitro* model of epilepsy. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 1431-1439, 2000b.

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

FREITAS, R. M.; AGUIAR, L. M.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C.; VIANA, G. S.; FONTELES, M. M. Modifications in muscarinic, dopaminergic and serotonergic receptors concentrations in the hippocampus and striatum of epileptic rats. **Life Sci.**, v. 78, p. 253-258, 2005.

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

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

FREITAS, R. M.; OLIVEIRA, A. A.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C.; VIANA, G. S.; FONTELES, M. M. Expression of muscarinic and dopaminergic receptors and monoamine levels frontal cortex of epileptic rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 83, p. 302-306, 2006.

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

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C.; VIANA, G. S.; FONTELES, M. M. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurosci. Lett.**, v. 399, p. 76-79, 2006.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica**, 3. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

FUKS, B.; GILLARD, M.; MICHEL, P.; LYNCH, B.; VERTONGEN, P.; LEPRINCE, P.; KLITGAARD, H.; CHATELAIN, P. Localization and photoaffinity labelling of the levetiracetam binding site in rat brain and certain cell lines. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 478, p. 11-19, 2003.

FUKUZAKI, K.; KAMENOSONO, T.; NAGATA, R. Effects of ropinirole on various parkinsonian models in mice, rats, and cynomolgus monkeys. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 503-508, 2000.

GETOVA-SPASSOVA, D. The role of brain cholinesterases and their inhibition in treatment of Alzheimer's disease: L6, **Autonom. Autacoid Pharmacol.**, v. 26, p. 50-51, 2006.

GIACOBINI, E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. **Neurochem. Res.**, v. 28, p. 515-522, 2003.

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

GOLOMBEK, D. A. ; DUQUE, D. F.; SANCHEZ, M. G. B.; BURIN, L. ; CARDINALI, D. P. Time dependent anticonvulsant activity of melatonin in hamsters. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 210, p. 253-258, 1992b.

GOLOMBEK, D. A.; ESCOLAR, E.; BURIN, L. J. Chronopharmacology of melatonin: inhibition by benzodiazepine antagonism. **Chronobiol. Int.**, v. 9, p. 124-131, 1992a.

GOLOMBEK, D. A.; MARTINI, M.; CARDINALI, D. P. Melatonin as an anxiolytic in rats: time dependence and interaction with central GABAergic system. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 237, p. 231-236, 1993.

GOMEZA, J. Enhancement of D₁ dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M₄ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 1043-1048, 1999.

GOTOH, T.; SHIKAMA, K. Generation of the superoxide radical during the autoxidation of oxymyoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 80, p. 397-399, 1976.

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

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

GREEN, A. R.; NUTT, D. J.; COWEN, P. J. Using Ro 15-1788 to investigate the benzodiazepine receptor in vivo: studies on the anticonvulsant and sedative effect of melatonin and the convulsant effect of the benzodiazepine Ro 05-3663. **Psychopharmacology**, v. 78, p. 293-295, 1982.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GREENBLATT, D. J.; BLASKOVICH, P. D.; NUWAYSER, E. S.; HARMATZ, J. S.; CHEN, G.; ZINNY, M. A. Clonazepam pharmacokinetics: comparison of subcutaneous microsphere injection with multiple-dose oral administration. **J. Clin. Pharmacol.**, v. 45, p. 1288-1293, 2005.

HACHINSKI, V. New antiepileptic drugs: the cost of innovation. **Archives Neurology**, v. 55, p. 1142, 1998.

HAESER, A. S.; SITTA, A.; BARSCHAK, A. G.; DEON, M.; BARDEN, A. T.; SCHMITT, G. O.; LANDGRAFF, S.; GOMEZ, R.; BARROS, H. M.; VARGAS, C. R. Oxidative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test: the clonazepam effect. **Brain Res.**, v. 218, p. 137-143, 2007.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extra cellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 280, p. 1-8, 1990.

HAMDI, A. Melatonin administration increases the affinity of D2 dopamine receptors in the rat striatum. **Life Sci.**, v. 63, p. 2115-2120, 1998.

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

HARDELAND, R.; BALZER, I.; POEGGELER, B.; FUHRBERG, B.; URIA, H.; BEHRMANN, R.; WOLF, R.; MEYER, T. J.; REITER, R. J. On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. **J. Pineal Res.**, v. 18, p. 104-111, 1995.

HARDELAND, R.; REITER, R. J.; POEGGELER, B.; TAN, D.X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuros. and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 347-357, 1993.

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

HOBBS, W. R.; RALL, T. W.; VERDOORN, T. A. Sedatives and hypnotics: Ethanol. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; MOLINOFF, P. B.; RUDDEN, R. W.; GILLMAN, A. G. (Ed). **Goodman and Gillman's the Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed. MacGraw-Hill: New York., 1996, p. 361-398.

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

HORSTMAN, J. A.; WRONA, M. Z.; DRYHURST, G. Further insights into the reaction of melatonin with hydroxyl radical. **Bioorg. Chem.**, v. 30, p. 371-382, 2002.

HORT, J.; BROZEK, G.; KOMÁREK, V.; LANGMEIER, M.; MARES, P. Interstrain differences in cognitive functions in rats in relation to status epilepticus. **Behavioural Brain Research**, v.112, p. 77-83, 2000.

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

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

HU, B.; MEI, Y.; WEI, G.; QIU, X.; SUN, S.; TONG, E. Effect of diazepam on the contents of amino acids and free radical during ischemia/reperfusion injury. **J. Tongji Med. Univ.**, v. 21, p. 102-104, 2001.

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

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

ISHIKAWA, K. T. O.; McCAUGH, J. L. Evidence for dopamine as a transmitter in dorsal hippocampus. **Brain Res.**, v. 232, p. 222-226, 1982.

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

JAKOBY, W. B.; ZIEGLER, D. M. The enzymes of detoxication. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 715-718, 1990.

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

JANUSZ, W.; KLEINROK, Z. The role of the central serotonergic system in pilocarpine-induced seizures: receptor mechanisms. **Neurosci Res.**, v. 7, p. 144-153, 1989.

JESSÉ, C. R.; SAVEGNAGO, L.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Neuroprotective effect caused by MPEP, an antagonist of metabotropic glutamate receptor mGluR5, on seizures induced by pilocarpine in 21-day-old rats. **Brain Res.**, v. 1198, p.197-203, 2008.

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

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

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

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

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

KAUFER, D.; FRIEDMAN, A.; SEIDMAN, S.; SOREQ, H. Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. **Nature**, v. 393, p. 373-377, 1998.

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

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

KELLER, H. H.; SCHAFFNER, R.; HAEFELY, W. Interaction of benzodiazepines with neuroleptics at central dopamine neurons. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v. 294, p. 1-7, 1976.

KERWIN, R.; NAYLOR, R.; TRAVIS, M. J.; SIMONS, O.; MOORE, P. K. As drogas e o sistema nervoso. In: PAGE, C. P., CURTIS, M. J., SUTTER, M. C., WALKER, M. J. A., HOFFMAN, B. B. (Eds). **Farmacologia Integrada**, Editora Manole, 1999, p. 103.

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

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

KIMURA, H.; KANEKO, Y.; WADA, J. A. **Catecholaminergic and cholinergic systems and amygdaloid kindling**. Raven Press: New York., 1981, p. 265-287.

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

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

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

KOOP, C.; VOGEL, E.; RETTORI, M. C.; DELAGRANGE, P.; MISLIN, R. Anxiolytic properties of melatonin receptor agonists in mice: involvement of mt1 and/or MT2 receptors in the regulation of emotional responsiveness. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1865–1871, 2000.

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

KOROLKOVAS, A. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

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

KUBOVA, H.; DRUGA, R.; HAUGVICOVA, R.; SKUTOVA, M.; PAVEL MARES, P. Changes in NADPH-diaphorase positivity induced by status epilepticus in allocortical structures of the immature rat brain. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 39–47, 1999

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

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

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

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

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Early identification of refractory epilepsy. **N. Engl. J. Med.**, v. 342, p. 314-319, 2000.

KWAN, P.; SILLS, G. J.; BRODIE, M. J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology Therapy**, v. 90, p. 21-34, 2001.

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

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

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

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

LAPIN, I. P.; MIRZAEV, S. M.; RYZOV, I. V.; OXENKRUG, G. F. Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA, and pentylenetetrazole in mice. **J. Pineal Res.**, v. 24, p. 215-218, 1998.

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

LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B.; TAYLOR, P. Neurohumoral transmission: the autonomic and somatic motor nervous system. In: GILMAN, A. G.; RUDDON, R. W.; MOLINOFF, P. B.; LIMBIRD, L. E.; HARDMAN, J. G. (Ed.). **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: MacGraw-Hill, 1996, p. 105-140.

LEIPNITZ, G.; SOLANO, A. F.; SEMINOTTI, B.; AMARAL, A. U.; FERNANDES, C. G.; BESKOW, A. P.; DUTRA FILHO, C. S.; WAJNER, M. Glycine provokes lipid oxidative damage and reduces the antioxidant defenses in brain cortex of young rats. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 29, p. 253-261, 2009.

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

LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Research.**, v. 50, p. 93-103, 2002.

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

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

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T. H.; MORI, W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 80, p. 2057-2058, 1958.

LI, Z. H.; ZLABEK, V.; VELISEK, J.; GRABIC, R.; MACHOVA, J.; RANDAK, T. Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, p. 137-141, 2010.

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

LIMA, E.; SOARES, J. M. J.; CARMEN, S. G. Y.; GOMES VALENTE, S.; PRIEL, M. R.; CHADA BARACAT, E.; ABRÃO CAVALHEIRO, E.; GRAÇA, N. M. M.; AMADO, D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. **Brain Research**, v. 1043, p. 24-31, 2005.

LIN, Y.; HAN, Y.; XU, J.; CAO, L.; GAO, J.; XIE, N.; ZHAO, X.; JIANG, H.; CHI, Z. Mitochondrial DNA Damage and the Involvement of Antioxidant Defense and Repair System in Hippocampi of Rats with Chronic Seizures **Cell. Mol. Neurobiol.**, 2010.

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

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

LIU, F.; NG, T. B. Effect of pineal indoles on activities of the antioxidant defense enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase, and levels of reduced and oxidized glutathione in rat tissues. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 78, p. 447-453, 2000.

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

LÖSCHER, W. SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 316, 2002.

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

- LÖSCHER, W.; HÖNACK, D.; RUNDFELDT, C. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant Levetiracetam UCB (L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy, **J. Pharmacol.**, v. 284, p. 474-479, 1998.
- LÖSCHER, W.; REISSMULLER, E.; EBERT, U. Anticonvulsant efficacy of gabapentin and levetiracetam in phenytoinresistant kindled rats. **Epilepsy Res.**, v. 40, p. 63-77, 2000.
- LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.
- LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p. 3-16, 2002.
- LOUP, F.; FRITSCHY, J. M.; KIENER, T.; BOUILLERET, V. GABAergic neurons and GABA_A-receptors in temporal lobe epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 34, p. 435-445, 1999.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with follin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LUDDENS, H.; WISDEN, W. Function and pharmacology of multiple GABA_A receptor subunits. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 12, p. 49-51, 1991.
- LUKYANETZ, E. A.; SHKRYL, V. M.; KOSTYUK, P. G. Selective blocked of N-type calcium channels by Levetiracetam. **Epilepsia**, v. 43, p. 9-18, 2002.
- LUNDY, P. M.; SHAW, R. R. Modification of cholinergically-induced convulsive activity and cyclic GMP levels in the CNS. **Neuropharmacology**, v. 22, p. 55-63, 1983.
- LYNCH, B. A.; LAMBENG, N.; NOCKA, K.; KENSEL-HAMMES, P.; BAJJALIEH, S. M.; MATAGNE, A. The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, p. 9861-9866, 2004.
- MACNAMARA, J. O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A.G. (Eds). **The pharmacological basis of therapeutics**. 10th ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 399- 430.
- MADEJA, M.; MARGINEANU, D. G.; GORJI, A.; SIEP, E.; BOERRIGTER, P.; KLIGAAD, H.; SPECKMANN, E. J. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? **Neuropharmacology**, v. 45, p. 661-671, 2003.
- MAEHLY, A. C.; CHANCE, B. The assay catalases and peroxidases. **Methods Biochem. Anal.**, v. 1, p. 357-359, 1954.
- MANEV, H.; UZ, T.; KHARLAMOV, A.; JOO, J. Y. Increased brain damage after stroke or excitotoxic seizures in melatonin- deficient rats. **FASEB J.**, v. 10, p. 1546-1551, 1996.

MANTOVANI, M.; KASTER, M. P.; PERTILE, R.; CALIXTO, J. B.; RODRIGUES, A. L.; SANTOS, A. R. Mechanisms involved in the antinociception caused by melatonin in mice. **J. Pineal Res.**, v. 41, p. 382-389, 2006.

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

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

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

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

MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A.; CECON, E. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, p. 126-133, 2007.

MARKUS, R. P.; LOPES, C. Glândula Pineal. In:_____ **Fisiologia Humana, Sistema Nervioso y sistema endócrino**, Ed. Terceiro Milênio. 1998, p. 99-103.

MARKUS, R. P.; ZAGO, W. M.; CARNEIRO, R. C. Melatonin modulation of presynaptic nicotinic acetylcholine receptors in the rat vas deferens, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 279, p. 18-22, 1996.

MARTIN, E. D.; ARAQUE, A.; BUNO, W. Synaptic regulation of the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. **J. Neurophysiol.**, v. 86, p. 2878-2886, 2001.

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

MASSIEU, L.; RIVERA, A.; TAPIA, R. Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate-gamma-glutamyl hydrazone in the developing rat. **Neurochem. Res.**, v. 19, p. 183-187, 1994.

MATTEI, R.; BARROS, M. P.; GALVÃO, S. M.; HENRIQUES, E. J.; CARLINI, E. A. Heteropteris aphrodisiaca OR Machado: effects of extract BST0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 604-607, 2001.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPINOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. Guarana (Paullinia cupana): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidants activity in vitro. **J. Ethnopharmacol.**, v. 60, p. 111-116, 1998.

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

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

MEISSL, H.; YÁÑEZ, J.; EKSTRÖM, P.; GROSSMANN, E. Benzodiazepines influence melatonin secretion of the pineal organ of the trout in vitro. **J. Pineal Res.**, v. 17, p. 69-78, 1998.

MELDRUM B. S.; ROGAWSKI, M. A. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. **Neurotherapeutics**, v. 4, p.18-61, 2007.

MELDRUM, B. Action of established and novel anticonvulsant drugs on the basic mechanisms of epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 11, p. 67-77, 1996.

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

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

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

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

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

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

MESSENGE, C.; MARGAILL, I.; VERRECCHIA, C.; ALLIX, M.; BOULU, R. G.; PLOTKINE, M. Protective effect of melatonin in a model of traumatic brain injury in mice. **J. Pineal Res.**, v. 25, p. 41-46, 1998.

MESHORER, E.; ERB, C.; GAZIT, R.; PAVLOVSKY, L.; KAUFER, D.; FRIEDMAN, A.; GLICK, D.; BEN ARIE, N.; SOREQ, H. Alternative splicing and neuritic mRNA translocation under long-term neuronal hypersensitivity. **Science**, v. 295, p. 508–512, 2002.

MEVISSSEN, M.; EBERT, U. Anticonvulsant effects of melatonin in amygdala-kindled rats. **Neurosci. Lett.**, v. 257, p. 13-16, 1998.

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

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 188-192, 1972a.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of anion superoxide in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, p. 3170-3175, 1972b.

MOLINA-CARBALLO, A.; MUÑOZ-HOYOS, A.; REITER, R. J.; SÁNCHEZ-FORTE, M.; MORENO-MADRID, F.; RUFO-CAMPOS, M.; MOLINA-FONT, J. A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Utility of high doses of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in a child with severe myoclonic experience: two years experience. **J. Pineal Res.**, v. 23, p. 97-105, 1997.

MORISHITA, S. Clonazepam as a therapeutic adjunct to improve the management of depression. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**, v. 24, p. 75-78, 2004.

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

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

MOSLEY, R. L.; BENNER, E. J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, M. D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, H. E. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, v. 6, p. 261-281, 2006.

MOTAMEDI, M.; NGUYEN, D. K.; ZAATREH, M.; SINGH, S. P.; WESTERVELD, M.; THOMPSON, J. L.; MATTSON, R.; BLUMENFELD, H.; NOVOTNY, E.; SPENCER, S. S. Levetiracetam efficacy in refractory partial-onset seizures, especially after failed epilepsy surgery. **Epilepsia**, v. 44, p. 211-214, 2003.

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

MÜLSCH, A.; BUSSE, R.; MORDVINTCEV, P. I.; VANIN, A. F.; NIELSEN, E. O.; SCHEEL-KRÜGER, J.; OLSEN, S. P. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. **Neuro Report**, v. 5, p. 2325-28, 1994.

MUSICCO, M.; BEGHI, E.; SOLARI, A.; VIANI, F. Treatment of first tonic-clonic seizure does not improve the prognosis of epilepsy. **Neurology**, v. 49, p. 991-998, 1997.

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

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

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis**, v. 14, p. 455-468, 2009.

NAKKEN, K. O.; RYTTER, E. M.; BROCKMEIER, F.; TIDSSKR, N. L. Benzodiazepines in the treatment of epilepsy. **Tidsskr Nor Laegeforen.**, v. 130, p. 842-844, 2010.

NARDI, A. E.; PERNA, G. Clonazepam in psychiatric disorders: an update. **Int. Clin. Psychopharmacol.**, v. 21, p. 131-142, 2006.

NASCIMENTO, V. S.; D'ALVA, M. S.; OLIVEIRA, A. A.; FREITAS, R. M.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C. F.; FONTELES, M. M. F. Antioxidant effect of nimodipine in young rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacol. Bioch. and Behav.**, v. 82, p. 11-16, 2005.

NASH, E. M.; SANGHA, K.S. Levetiracetam. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 58, p. 1195-1199, 2001.

NATH, C.; SAXENA, R. C.; GUPTA, M. B. Effect of dopamine agonists and antagonists on the lorazepam withdrawal syndrome in rats. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 27, p. 167-171, 2000.

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

NICHOLLS D. G. Oxidative Stress and Energy Crises in Neuronal Dysfunction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1147, p. 53-60, 2008.

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

OBEID, T.; AWADA, A.; SAYES, N.; MOUSALI, Y.; HARRIS, C. A unique effect of clonazepam on frontal lobe seizure control. **Seizure**, v. 8, p. 431-433, 1999.

OLIVEIRA, A. A.; ALMEIDA, J. P. C.; FREITAS, R. M.; NASCIMENTO, V. S.; AGUIAR, L. M. V.; JUNIOR, H. V. N.; FONSECA, F. N.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F.; FONTELES, M. M. F. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite–nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 27, p. 395-406, 2007.

OLIVEIRA, A. A.; NOGUEIRA, C. R. A.; NASCIMENTO, V. S.; AGUIAR, L. M. V.; FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: Cholinergic muscarinic system involvement. **Neuroscience Letters**, v. 385, p. 184-188, 2005.

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

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. Soybean foods and their benefits: potential mechanisms of action. **Nutr. Rev.**, v. 63, p. 272-283, 2005.

OMS. Organização Mundial de Saúde. **Relatório sobre saúde mental no mundo**. Disponível em <www.psiqweb.med.br/acad/oms1.html>. Acesso em: 20 mai. 2010.

PAPPOLLA, M. A.; SOS, M.; OMAR, R. A.; BICK, R. J.; HICKSON-BICK, D. L.; REITER, R. J. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to Alzheimer's amyloid peptide. **J. Neurol. Sci.**, v. 17, p. 1683–90, 1997.

PATEL, M.; LIANG, L. P.; ROBERTS, L. J. I. Enhanced hippocampal F2-isoprostane formation following kainate-induced seizures. **J. Neurochem.**, v. 79, p. 1065–1069, 2001.

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

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

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

PELED, N.; SHORER, Z.; PELED, E.; PILLAR, G. Melatonin effect on seizures in children with severe neurologic deficit disorders. **Epilepsia**, v. 42, p. 1208-1210, 2001.

PELTOLA, J.; PELTOLA, M.; RAITANEN, J.; KERÄNEN, T.; KHARAZMI, E.; AUVINEN, A. Seizure-freedom with combination therapy in localization-related epilepsy. **Seizure**, v. 17, p. 276-280, 2008.

PEPEU, G. Effect of 'tremorine' and some anti-parkinson's disease drugs on acetylcholine in the rat's brain. **Nature**, v. 200, p. 895, 1963.

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

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

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

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

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

POEGGELER, B.; THUERMAN, S.; DOSE, A.; SCHOENKE, M.; BURKHARDT, S.; HARDELAND, R. Melatonin's unique scavenging properties – roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogues. **J. Pineal Res.**, v. 33, p. 20-30, 2002.

QUEIROZ, C.; LEITE, J.; MELLO, L. E. **Modelos experimentais em epilepsias**. Cérebro e Mente. 2002. Disponível em <<http://www.comciencia.br>>. Acesso em: 15 mai. 2010.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BEDOR, C. N. G.; JÚNIOR, R. G. C. S. Animal models evaluation employed anticonvulsant drugs: a review. **Rev. Bras. Farm.**, v. 88, p. 163-166, 2007.

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

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

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

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

REITER, R. J. Antioxidant actions of melatonin. **Advances in Pharmacology**, v. 38, p. 103-117, 1997.

REITER, R. J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of physiological interactions. **Endocr. Rev.**, v. 12, p. 151-180, 1991.

REITER, R. J. The melatonin rhythm: both a clock and calendar. **Experientia**, v. 49, p. 654-664, 1993.

REITER, R. J.; TANG, L.; GARCIA, J. J.; MUNOZ-HOYOS, A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sciences**, v. 60, p. 2255-2271, 1997.

REITER, R. J.; MELCHIORRI, D.; SEWERYNEK, E.; POEGGELER, B.; BARLOW-WALDEN, L.; CHUANG, J. L.; ORTIZ, G. G.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. A review for the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. **J. Pineal Res.**, v. 18, p. 1-11, 1995.

REKTOR, I.; BRYERE, P.; SILVA-BARRAT, C.; MENINI, C. Stimulus-sensitive myoclonus of the baboon *Papio papio*: Pharmacological studies reveal interactions between benzodiazepines and the central cholinergic system. **Experimental Neurology**, v. 91, p. 13-22, 1986.

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

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

ROCHE BRASIL. Produtos Farmacêuticos: Bula do Clonazepam. Disponível em: <<http://www.roche.com.br/fmfiles/re7196006/pdf/Bulas/Rivotril.pdf>>. Acesso em 10 mai. 2010.

ROGAWSKI, M. A.; LOSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 5, p. 553-564, 2004.

RUDEEN, P. K.; PHILO, R. C.; SYMMES, S. K. Antiepileptic effects of melatonin in the pinealectomized Mongolian gerbil. **Epilepsia**, v. 21, p. 149–154, 1980.

RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. GABA-based therapeutic approaches: GABA_A receptor subtype functions. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 6, p. 18-23, 2006.

RUSSEL, R. M. Physiological and clinical significance of carotenoids. **Int. J. Vit. Nutr. Res.**, v. 68, p. 349-353, 1998.

SALES, I. M.; FREITAS, R. L.; SALDANHA, G. B.; SOUZA, G. F.; FREITAS, R. M. Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities are reduced in rat striatum and frontal cortex after pilocarpine-induced seizures. **Neurosci. Lett.**, v. 469, p.81-83, 2010.

SALETU, A.; PARAPATICS, S.; SALETU, B.; ANDERER, P.; PRAUSE, W.; PUTZ, H. On the pharmacotherapy of sleep bruxism: placebo-controlled polysomnographic and psychometric studies with clonazepam. **Neuropsychobiology**, v. 51, p. 214-225, 2005.

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

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

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

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

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S. F. The genetics of human epilepsy. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 24, p. 428-33, 2003.

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

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

SHAJI, A. V.; KULKARNI, S. K. Evidence of GABAergic modulation in melatonin-induced short-term memory deficits and food consumption. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 20, p. 311-319, 1998.

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

SHELDON, S. H. Pro-convulsant effects of oral melatonin in neurologically disabled children. **Lancet**, v. 351, p. 1254, 1998.

SHIH, T. M.; KOVIK, T. A.; CAPACIO, B. R. Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman: pharmacological mechanisms. **Neurosci. Biobehav Rev.**, v. 15, p. 349-362, 1991.

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

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

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

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

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

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

SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. Pharmacotherapy of trigeminal neuralgia. **Clin. J. Pain**.v.18, p. 22-27, 2002.

SINGH, A.; KUMAR, A. Protective effect of alprazolam against sleep deprivation-induced behavior alterations and oxidative damage in mice. **Neurosci. Res.**, v. 60, p. 372-379, 2007.

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

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, p. 12-17, 2007.

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

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase – new roles for an old actor. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 294–302, 2001.

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

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

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

STORR, M.; KOPPITZ, P.; SIBAEV, A.; SAUR, D.; KURJAK, M.; FRANCK, H.; SCHUSDZIARRA, V.; ALLESCHER, H. D. Melatonin reduces non-adrenergic, non-cholinergic relaxant neurotransmission by inhibition of nitric oxide synthase activity in the gastrointestinal tract of rodents in vitro. **J. Pineal Res.**, v. 33, p. 101-108, 2002.

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

STUDY, R. E.; BARKER, J. L. Diazepam and (–)-pentobarbital: fluctuation analysis reveals different mechanisms for potentiation of gamma-aminobutyric acid responses in cultured central neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 78, p. 7180-7184, 1981.

SUDGEN, D. Psychopharmacological effects of melatonin in mouse and rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 227, p. 587–594, 1983.

SUDGEN, D. Sedative potency and 2-w125I_x-iodomelatonin binding affinity of melatonin analogues. **Psychopharmacology**, v. 117, p. 364–370, 1995.

TALAREK, S.; FIDECKA, S. Role of nitric oxide in anticonvulsant effects of benzodiazepines in mice. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, p. 181-191, 2003.

TALLARIDA, R. J. Interactions between drugs and occupied receptors. **Pharmacol. Ther.**, v. 113, p. 197-209, 2007.

TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; PLUMMER, B. F.; HARDIES, L. J.; WEINTRAUB, S. T.; VIJAYALAXMI, A. M. M. A novel melatonin metabolite, cyclic 3 hydroxymelatonin: A biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 253, p. 614–620, 1998.

TAN, T. Y.; LU, C. H.; CHUANG, H. Y.; LIN, T. K.; LIOU, C. W.; CHANG, W. N.; CHUANG, Y. C. Long-term antiepileptic drug therapy contributes to the acceleration of atherosclerosis. **Epilepsia**, v. 50, p. 1579-1586, 2009.

TAPIAS, V.; ESCAMES, G.; LÓPEZ, L. C.; LÓPEZ, A.; CAMACHO, E.; CARRIÓN, M. D.; ENTRENA, A.; GALLO, M. A.; ESPINOSA, A.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Melatonin and Its Brain Metabolite N1-Acetyl-5-Methoxykynuramine Prevent Mitochondrial Nitric Oxide Synthase Induction in Parkinsonian Mice. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, p. 3002–3010, 2009.

TAYLOR, B. K.; JOSHI, C.; UPPAL, H. Stimulation of dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens inhibits inflammatory pain. **Brain Res.**, v. 987, p. 135-143, 2003.

TEJADA, S.; ROCA, C.; SUREDA, A.; RIAL, R. V.; GAMUNDÍ, A.; ESTEBAN, S. Antioxidant response analysis in the brain after pilocarpine treatments. **Brain Res.**, v. 69, p. 587–592, 2006.

TENN, C. C.; NILES, L. P. Central-type benzodiazepine receptors mediate the antidopaminergic effect of clonazepam and melatonin in 6-hydroxydopamine lesioned rats: involvement of a GABAergic mechanism. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 274, p. 84-89, 1995.

THERIAULT, A.; CHAO, J-T.; WANG, Q.; GAPOR, A.; ADELI, K.; Tocopherol effects. **Clin. Biochem.**, v. 32, p. 309, 1999.

TREIMAN, D. M.; MEYERS, P. D.; WALTON, N. Y.; COLLINS, J. F.; COLLING, C.; ROWAN, A. J.; HANDFORTH, A.; FAUGHT, E.; CALABRESE, V. P.; UTHMAN, B. M.; RAMSAY, R. E.; MAMDANI, M. B. A comparison of four treatments for generalized convulsive status epilepticus. Veterans Affairs Status Epilepticus Cooperative Study Group. **N. Engl. J. Med.**, v. 339, p. 792-798, 1998.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 237, p. 408-414, 1985.

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

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

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARTZ, M., CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural,

electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-335, 1983a.

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

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

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

TYAGI, E.; AGRAWAL, R.; NATH, C.; SHUKLA, R.. Effect of melatonin on neuroinflammation and acetylcholinesterase activity induced by LPS in rat brain **European Journal of Pharmacology**, 2010.

UEDA, Y.; DOI, T.; TAKAKI, M.; NAGATOMO, K.; NAKAJIMA, A.; WILLMORE, L. J. Levetiracetam enhances endogenous antioxidant in the hippocampus of rats: In vivo evaluation by brain microdialysis combined with ESR spectroscopy. **Brain Res.**, v. 266, p. 1-7, 2009.

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

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; REDEKER, S.; BOER, K.; GORTER, J. A. Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy. **Epilepsia**, v. 50, p. 422-433, 2009.

VANECEK, J. Cellular mechanisms of melatonin action. **Physiol. Rev.**, v. 78, p. 687-721, 1998.

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

VELKOV, Z. A.; VELKOV, Y. Z. H.; GALUNSKA, B. T.; PASKALEV, D. N.; TADJER, A. V. Melatonin: Quantum-chemical and biochemical investigation of antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2834-2839, 2009.

VENKATARAMAN, P.; KRISHNAMOORTHY, G.; VENGATESH, G.; SRINIVASAN, N.; ARULDHAS, M. M.; ARUNAKARAN, J. Protective role of melatonin on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress and changes in acetylcholine esterase and membrane bound ATPases in cerebellum, cerebral cortex and hippocampus of adult rat brain. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v. 26, p. 585-591, 2008.

VYAS, T. K.; BABBAR, A. K.; SHARMA, R. K.; SINGH, S.; MISHRA, A. Intranasal Mucoadhesive Microemulsions of Clonazepam: Preliminary Studies on Brain Targeting. **J. Pharm. Sci.**, v. 54, p. 570-580, 2006.

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

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, X.; WEN, Z.; CAI, T.; JANCZUK, A. J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 1091- 1134, 2002.

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

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

WHITE, H. S.; SMITH, M. D.; WILCOX, K. S. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 81, p. 85-110, 2007.

WILHELM, E. A.; JESSÉ, C. R.; BORTOLATTO, C. F.; NOGUEIRA, C. W.; SAVEGNAGO, L. Anticonvulsant and antioxidant effects of 3-alkynyl selenophene in 21-day-old rats on pilocarpine model of seizures. **Brain Res. Bull.**, v. 30, p. 281-287, 2009.

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

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

XIE, H.; PAN, S.; LIU, S.; YE, K.; HUO, K. A novel method of protein extraction from perennial *Bupleurum* root for 2-DE. **Electrophoresis**, v. 28, p. 871 – 875, 2007.

YAMAMOTO, H. A.; TANG, H. W. Melatonin attenuates Lcysteine- induced seizures and lipid peroxidation in the brain of mice. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 108–113, 1996.

ZHANG, H.; SQUADRITO, G. L.; UPPU, R.; PRYOR, W. A. Reaction of peroxynitrite with melatonin: A mechanistic study. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 12, p. 526–534, 1999.

ZHONG, M.; CAI, F. C.; ZHANG, X. P.; SONG, Y. Peripheral nerve damage and its pathogenesis induced by antiepileptic drugs in rats. **Zhonghua Er Ke Za Zhi.**, v. 46, p. 574-578, 2008.

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

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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