

HERALDO MACUCO CAPELLA

**ESTUDO DA EPILEPTOGÊNESE: EFEITOS DA
CARBAMAZEPINA, DO VALPROATO E DO
L-DEPRENIL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

**FLORIANÓPOLIS -SC
2000**

HERALDO MACUCO CAPELLA

**ESTUDO DA EPILEPTOGÊNESE: EFEITOS DA
CARBAMAZEPINA, DO VALPROATO E DO
L-DEPRENIL EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE
EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL**

**Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Ciências Médicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para a obtenção do grau de Mestre.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Tadeu Lemos

**FLORIANÓPOLIS -SC
2000**

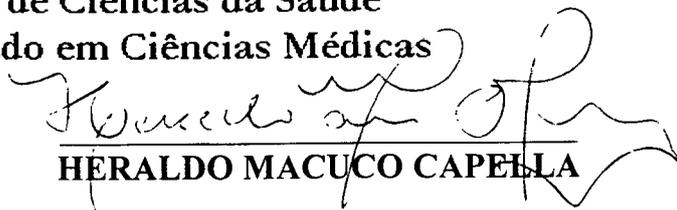
CAPELLA, Heraldo Macuco. *Estudo da epileptogênese: efeitos da carbamazepina, do valproato e do L-deprenil em um modelo de epilepsia do lobo temporal*. Florianópolis, 2000.
XXp.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Epileptogênese 2. Epilepsia mesial temporal 3. Carbamazepina 4. Valproato 5. L-deprenil



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Mestrado em Ciências Médicas


HERALDO MACUCO CAPELLA

ESSA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM CIÊNCIAS MÉDICAS

COM ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM **CLÍNICA MÉDICA** E APROVADA EM SUA
FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

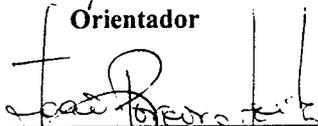


Prof. Mário Sérgio Soares de Azeredo Coutinho
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



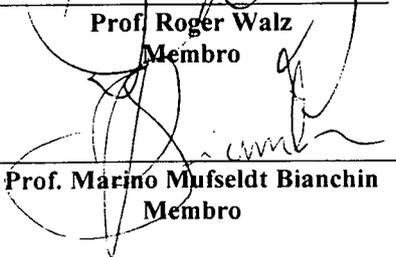
Prof. Tadeu Lemos
Orientador



Prof. João Pereira Leite
Membro



Prof. Roger Walz
Membro



Prof. Marinho Mufseltd Bianchin
Membro

Florianópolis, 01 de setembro de 2000.



Aos meus pais Léa e Ayrton e meus tios Graça e Henrique.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tadeu Lemos, por seu apoio, estímulo e sobretudo pela valorosa e contínua orientação na realização desta dissertação.

À Coordenadoria Especial de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Aos pós-graduandos do Curso de Pós Graduação em Farmacologia, em especial a Elizabeth Waslawik.

Ao academico de Medicina, Andy Luis Ern pelo auxílio na realização da parte experimental.

Ao laboratório de Neurociências da Universidade Federal do Estado de São Paulo, onde foram processados os cérebros dos animais, para o estudo histológico.

À Jane e Mayara, por seu amor e por sua compreensão comigo e com minha profissão.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Tratamento do período silencioso do modelo da PILO	24
3.2 Pré-tratamento com do L-deprenil na indução do modelo	27
3.3 Análise estatística	27
4. RESULTADOS	29
4.1 Efeito do tratamento com CBZ e VPA durante o período silencioso	29
4.2 Efeito do L-deprenil (selegelina) sobre a indução do modelo	39
5. DISCUSSÃO	43
5.1 Efeito do tratamento com CBZ e VPA	43
5.2 Efeito do L-deprenil (selegelina) sobre a indução do modelo da PILO	47
6. CONCLUSÃO	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- FIGURA 1- Fotomicrografia de um corte horizontal da formação hipocampal de um rato adulto, corado por violeta-de-cresil12
- FIGURA 2 - Diagrama das principais conexões intrínsecas da formação hipocampal14
- FIGURA 3 - Latência para a primeira crise (período crônico) do modelo da pilocarpina em animais com salina, carbamazepina ou valproato30
- TABELA 1 - Incidência de crises epiléticas em animais tratados com salina, carbamazepina e valproato durante o período silencioso do modelo da pilocarpina, em ratos31
- FIGURA 4 - Frequência total de crises espontâneas após o estado de mal epilético, induzido pela pilocarpina em ratos tratados com salina, carbamazepina e valproato durante o período silencioso31
- FIGURA 5 - Frequência de crises espontâneas após o estado de mal epilético, induzido pela pilocarpina, em ratos, durante os períodos de tratamento e pós tratamento com salina, carbamazepina ou valproato32
- FIGURA 6 - Frequência de crises espontâneas no modelo da pilocarpina, em ratos, durante os períodos de tratamento com salina, carbamazepina ou valproato33
- FIGURA 7 - Duração das crises espontâneas no modelo da pilocarpina, em ratos, nos períodos de tratamento e pós tratamento com salina, carbamazepina ou valproato34

FIGURA 8 - Duração das crises espontâneas no modelo da pilocarpina, em ratos, nos períodos de tratamento e pós tratamento com salina, carbamazepina ou valproato	35
FIGURA 9 - Fotomicrografia da região hipocampal, em aumento de 25 X, de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina e tratados durante o período silencioso, com salina, carbamazepina ou valproato	37
FIGURA 10 - Fotomicrografia do giro dentado em aumento de 100X, de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina e tratados durante o período silencioso, com salina, carbamazepina ou valproato	38
TABELA 2 - Incidência de crises (número de animais / grupo) no período agudo do modelo da pilocarpina em animais pré-tratados com salina ou L-deprenil 20, 10 ou 5 mg / Kg i.p.,	39
FIGURA 11 - Número de crises induzidas pela pilocarpina 360 mg / Kg i.p. em ratos pré-tratados, 1 hora antes, com salina ou L-deprenil nas doses de 20, 10 ou 5 mg / Kg, i.p.	40
TABELA 3 - Incidência de crises tônicas no período agudo do modelo da pilocarpina, em animais pré-tratados com salina ou L-deprenil	40
FIGURA 12 - Latência para o estabelecimento do estado de mal epiléptico (EME) no modelo da pilocarpina, em ratos pré-tratados com salina ou L-deprenil 10 ou 5 mg / Kg, i.p.	41
TABELA 4 - Número de óbitos induzidos pela pilocarpina 360 mg / Kg i.p. em ratos pré-tratados com salina ou L-deprenil 20, 10 ou 5 mg / Kg, i.p.	42

RESUMO

Objetivos: Estudar o processo de epileptogênese, utilizando o modelo de epilepsia mesial temporal, induzido pela pilocarpina em ratos, avaliando os efeitos da carbamazepina (CBZ) e do valproato (VPA), administrados durante o período silencioso do modelo, e estudar o efeito agudo do L-deprenil sobre a indução de crises pela pilocarpina, no período agudo do modelo.

Material e Método: Ratos Wistar, adultos, machos, foram submetidos ao estado de mal epiléptico (EME) induzido pela pilocarpina (360 mg/Kg, i.p.). No primeiro estudo, aproximadamente 24 horas após o início do EME, 3 grupos de animais foram tratados, respectivamente, com solução salina (SAL), CBZ ou VPA, por um período de 56 dias, sendo monitorizados por mais 56 dias, para a observação de crises espontâneas. Finalizada a observação os animais foram sacrificados e seus cérebros processados para análise histológica da formação hipocampal. No segundo estudo, 4 grupos de animais, foram pré-tratados, 1 hora antes da indução do EME, com SAL ou L-deprenil 5, 10 ou 20 mg/kg, i.p., sendo posteriormente observados por 10h, para a detecção de crises convulsivas.

Resultados: A CBZ e o VPA reduziram a frequência total de crises, o número e a duração das crises durante o tratamento, e minimizaram o padrão de lesão da formação hipocampal. No grupo SAL houve uma redução do número e da duração das crises pós-tratamento. O VPA reduziu a incidência de crise. O L-deprenil, na dose de 5 mg/kg, reduziu a incidência de crise, o número de crises, impediu a expressão de crises tônicas e reduziu a mortalidade. Na dose de 10 mg/kg, houve um aumento da latência para o EME.

Conclusão: A CBZ e o VPA não impediram o desenvolvimento da epileptogênese, mas minimizaram sua expressão. O L-deprenil, na dose de 5 mg/kg apresentou efeito anticonvulsivante.

ABSTRACT

Aim: This study was aimed to address the epileptogenesis by investigating the effects of carbamazepine (CBZ) and valproate (VPA) treatment during the silent period of the pilocarpine model of epilepsy, and the effects of L-deprenil pretreatment in the acute period of this model.

Methods: Adult male Wistar rats were submitted to *status epilepticus* (SE) induced by pilocarpine (360 mg.kg⁻¹, i.p.) 24 h after SE. Three animal groups were treated with saline, CBZ or VPA during 56 days and their behaviour were monitored for up 60 days. At the end of the experiments, histological analysis of the hippocampal formation was performed. In an another experiment, 4 groups were pretreated with saline or L-deprenil 5, 10 or 20 mg.kg⁻¹, i.p., 1 h prior to pilocarpine administration and the animals were observed for spontaneous seizures.

Results: CBZ and VPA reduced the seizures frequency and duration and the hippocampal formation damage. The saline group showed a decrease in the number and duration of the seizures during treatment compared with post-treatment period in the same group. Moreover, VPA reduced seizures incidence. L-deprenil 5 mg.kg⁻¹ reduced incidence and number of seizures, frequency of tonic seizures and mortality. At the dose of 10 mg.kg⁻¹ there was also an increase in the latency for the SE.

Conclusion: CBZ and VPA treatment did not abort the epileptogenesis, but minimised the expression of seizures and hippocampal formation damage. L-deprenil 5 mg.kg⁻¹ showed an anticonvulsant effect against pilocarpine-induced seizures.

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia não é um distúrbio único, compreende diferentes doenças e síndromes que causam descargas excessivas, transitórias e recorrentes das células nervosas, determinando disfunções temporárias de uma pequena parte do cérebro ou de áreas mais extensas, envolvendo os dois hemisférios cerebrais^{1,2}.

Embora a epilepsia seja um dos distúrbio neurológico mais comum, inúmeros obstáculos impedem que se possa conhecer a verdadeira situação epidemiológica deste problema. A taxa de prevalência da epilepsia situa-se entre 3 a 9 por 1000 habitantes². Diversos fatores são responsáveis por esta variação, tais como, os métodos de determinação dos casos, a distribuição da faixa etária estudada e a própria caracterização do distúrbio epiléptico. Um estudo neuroepidemiológico de epilepsia infantil, no município de Okayama, no Japão, estimou a taxa de incidência anual de epilepsia em 145 por 100.000 habitantes abaixo de 10 anos de idade. Quanto à taxa de incidência anual, a maior foi de 378,9 por 100.000 habitantes no primeiro ano de vida e a mais baixa foi de 65,1 por 100.000 habitantes, aos 9 anos de vida. A prevalência nesta população infantil foi de 8,2 por 1000 habitantes². Um outro estudo epidemiológico, realizado em Rochester, Minnesota (USA), no período de 1940 a 1980, determinou a incidência anual média em 85 casos para cada 100.000 habitantes, na faixa etária entre 0 a 9 anos, contrastando com as taxas de 45 por 100.000 habitantes para a população em geral. A prevalência na população foi de 6,8 casos por 1000 habitantes, enquanto que para a população entre 0 a 9 anos foi de 2,7 casos para 1000 habitantes³. Estes dados indicam que a epilepsia é um problema maior na primeira infância e que o diagnóstico precoce, o tratamento adequado e, sobretudo, as medidas preventivas poderão reduzir a incidência desta condição.

Em 1981, a Comissão para Classificação e Terminologia da Liga Internacional contra Epilepsia (Commission on Classification and Terminology of the

Internacional League Against Epilepsy, ILAE)⁴, propôs uma classificação das crises epiléticas com base na extensão do comprometimento cerebral. Assim, temos as crises generalizadas, que envolvem uma grande parte do cérebro com comprometimento precoce da consciência, (deste grupo também fazem as crises mioclônicas conscientes) e as crises parciais, que se originam em uma parte do córtex e podem estar ou não associadas a um comprometimento da consciência. As crises parciais simples, caracterizadas pela preservação da consciência, podem se manifestar com sinais e/ou com sintomas motores, sensitivos, autonômicos e psíquicos. As crises parciais complexas, cuja característica é a alteração da consciência, podem iniciar como crise parcial simples e evoluir com alteração da consciência ou manifestar-se por alterações da consciência desde o início.

Três categorias maiores de epilepsia são reconhecidas: (1) as epilepsias idiopáticas que são definidas pelas características clínicas, eletrencefalográficas e de tendência genética; (2) as epilepsias criptogenéticas, onde se suspeita ser sintomática, mas, no entanto, a etiologia não é claramente determinada; (3) as sintomáticas, que são consequência de uma patologia cerebral conhecida. A epilepsia sintomática pode começar em qualquer fase da vida, pode também estar relacionada à doença focal ou difusa do sistema nervoso e está frequentemente associada ao retardo mental. O eletrencefalograma interictal aparece geralmente alterado. A resolução espontânea das crises não é usual, podendo evoluir com um aumento do número e da duração das mesmas e com alterações anatomopatológicas adicionais, como consequência das crises recorrentes¹.

Em 1989, a Comissão para a Classificação e Terminologia da ILAE⁵ definiu a síndrome epilética como uma desordem epilética caracterizada por um grupo de sinais e sintomas que incluem diferentes tipos de crises, que se diferenciam pela etiologia, características anatômicas, fatores precipitantes, idade de início, severidade das crises, cronicidade, influência do ciclo circadiano e prognóstico. A partir desta definição foi elaborada a Classificação Internacional de Epilepsias e Síndromes Epiléticas, estruturada em dois aspectos básico: o primeiro,

topográfico, separando as epilepsias com crises generalizadas das epilepsias com crises parciais ; o segundo, considerando a etiologia e o prognóstico, distingue as epilepsias sintomáticas das idiopáticas, e estas das criptogênicas⁵.

Aproximadamente 40% das epilepsias do adulto são originárias do lobo temporal, e compreendem três síndromes: a síndrome da epilepsia temporal neocortical, a síndrome da epilepsia temporal familiar e a síndrome da epilepsia temporal mesial⁶. As crises que se originam na amígdala, no hipocampo e no giro para-hipocampal formam um padrão sindrômico específico. Este é baseado na semiologia ictal; nos achados eletrencefalográficos, neurorradiológicos e patológicos; na resposta terapêutica e no prognóstico, configurando a epilepsia temporal mesial^{1,6}. A semiologia ictal, nesta forma de epilepsia, tende a seguir uma seqüência de eventos relativamente fixa em 85 a 93% dos casos. Os pacientes apresentam, no início, crises parciais simples com sintomatologia vegetativa, caracterizadas mais freqüentemente por mal estar epigástrico ascendente, e/ou crises parciais simples com sintomatologia psíquica (dismnésia e/ou medo súbito). Em seguida, evoluem para reação de parada, com automatismo simples de padrão orolabial e alterações motoras contralaterais, tais como: postura distônica ou paresia crítica contralateral e automatismos ipsilaterais ao foco e finalmente, automatismo mais complexo ou generalização secundária⁷. Em mais de 90% dos pacientes, os eletrencefalogramas interictais apresentam espículas e/ou ondas agudas lateralizadas sobre a região temporal anterior. Em aproximadamente 40% dos pacientes há descargas bitemporais em algum momento¹. Tipicamente, a epilepsia temporal mesial ocorre associada à esclerose hipocampal⁸, porém, outros tipos de lesões estruturais como tumores, displasias corticais, hamartomas e malformações vasculares, desde que localizados ou contíguos à região temporal mesial, também podem provocar um quadro semelhante⁶.

A formação hipocampal (Fig.1) inclui quatro regiões citoarquiteticamente distintas: o hipocampo, o giro dentado, o complexo subicular (subículo, pré-

subículo e para-subículo) e o córtex entorrinal. O hipocampo é dividido em 3 áreas: CA1, CA2 e CA3 (CA é a abreviação de *Cornus Ammonis*).^{9,10}

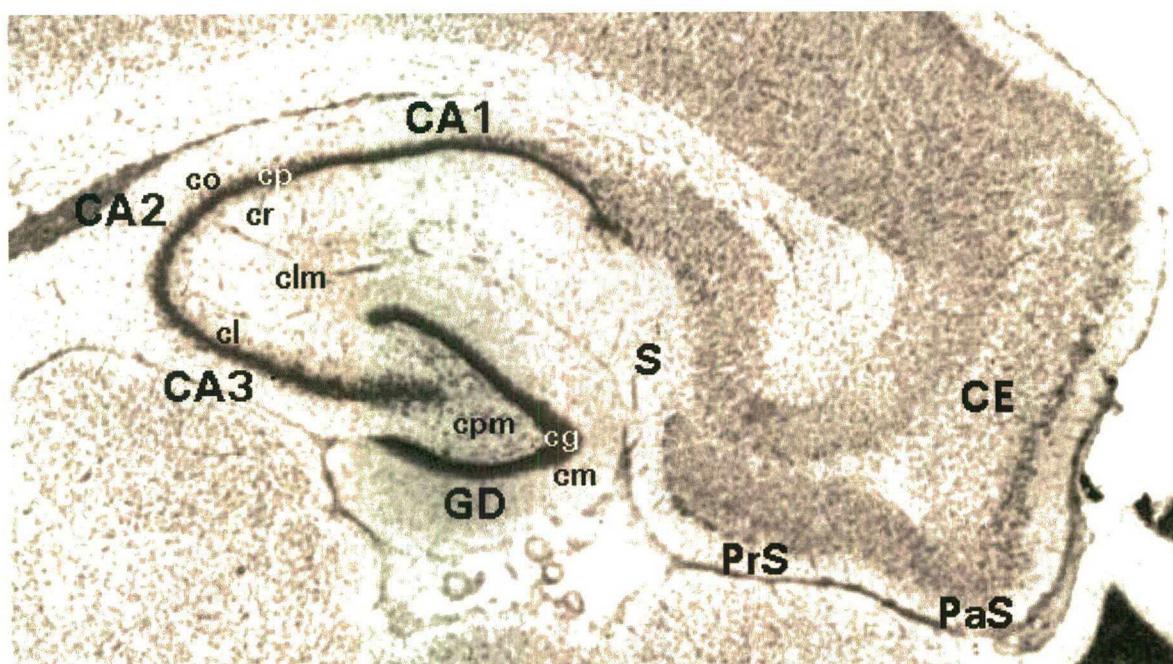


FIGURA 1 - Fotomicrografia de um corte horizontal da formação hipocampal de um rato adulto, corado por violeta-de-cresil, retirada do Atlas Estereotático de Paxinos e Watson (1998)¹¹, representando o hipocampo (CA1, CA2 e CA3), o giro dentado (GD), o complexo subicular [o subículo (S), o pré-subículo (PrS), o para-subículo (PaS)] e o córtex entorrinal (CE). cp = camada piramidal; co = camada *oriens*; cr = camada radial; clm = camada lacunar-molecular; cl = camada lúcida; cg = camada granular; cpm = camada polimórfica; cm = camada molecular. Baseado em Amaral e Witter, 1995.¹⁰

A área CA1, adjacente ao subiculum, é uma das mais extensas e é formada por neurônios piramidais pequenos e dispersos. A área CA2 é uma zona distinta entre CA1 e CA3, constituída por neurônios piramidais ovais em grande quantidade. A área CA3 está localizada na curva do hipocampo, onde penetra no giro dentado, sendo constituída por neurônios piramidais ovais em menor quantidade do que em CA2. Os neurônios piramidais se dispõem de forma compacta numa camada denominada camada piramidal (cp). Os dendritos basais dos neurônios piramidais formam a camada *oriens* (co), os segmentos proximais e distais das arborizações dendríticas apicais formam, respectivamente, a camada radial (cr) e a camada

lacunar-molecular (clm). Apenas em CA3, logo abaixo da camada piramidal, existe uma discreta zona acelular chamada camada lúcida (cl).^{9,10} (Fig.1)

O giro dentado (Fig.1) é dividido em granular (cg), camada molecular (cm) e polimórfica (cpm). A camada granular é a principal, sendo composta por células granulares e estando localizada mais profundamente em relação a camada molecular, a qual é ocupada por dentrítos das células granulares, de várias células polimórficas e das células em cesto. Estas localizam-se entre as células granulares e a camada polimórfica. São assim denominadas porque seus axônios formam plexos pericelulares encestando o soma das células granulares. A camada mais profunda, a polimórfica, composta por uma variedade de tipos neuronais (sendo as células musgosas as mais comuns) constitui o hilo do giro dentado.^{9,10}

A partir do córtex entorrinal (Fig. 2) origina-se a via perfurante, que se projeta para as células granulares do giro dentado, sendo a principal aferência excitatória glutamatérgica para o hipocampo. Destas partem as fibras musgosas que fazem sinápses com as células piramidais de CA3 e ramos colaterais que estabelecem sinápses excitatórias com as células musgosas (interneurônios glutamatérgicos) da camada polimórfica. As células musgosas, por sua vez, excitam as células em cesto (interneurônios inibitórios gabérgicos), que mediam tanto a inibição da via perfurante, quanto das células granulares. Ramos colaterais das células piramidais de CA3 (colaterais de Schaffer) fazem sinápses com as células piramidais de CA1, que enviam projeções axonais de volta ao córtex entorrinal. Assim, forma-se um circuito excitatório constituído por uma via trissináptica (córtex entorrinal → giro dentado → CA3 → CA1) e uma variedade de sistemas modulatórios extrínsecos e intrínsecos. Um destes sistemas, formado pelas células em cesto, protege o hipocampo de uma hiperexcitação da via trissináptica decorrente da estimulação das fibras entorrinais.⁹

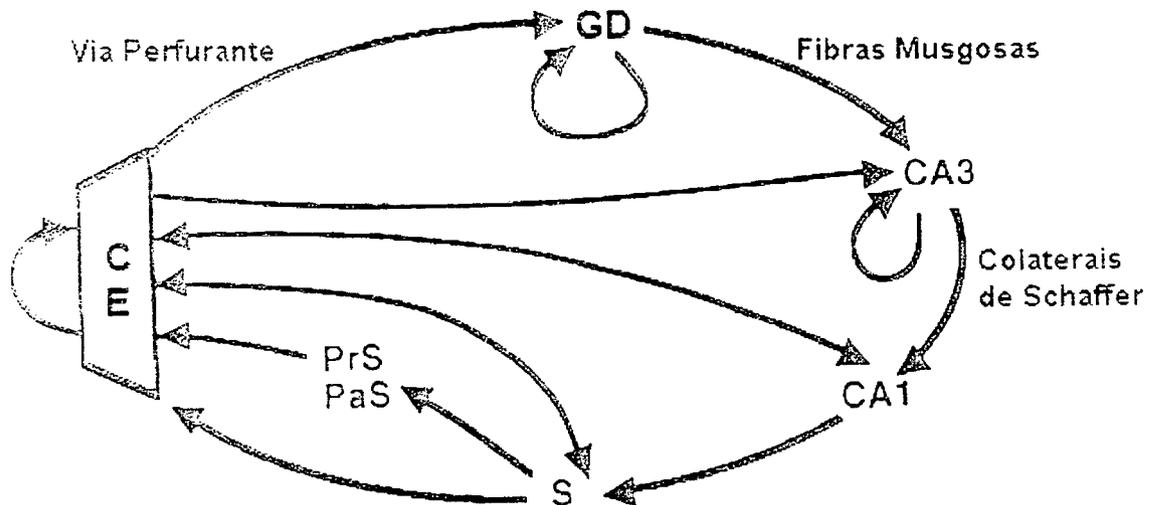


FIGURA 2 - Diagrama das principais conexões intrínsecas da formação hipocampal. CE = córtex entorrinal; GD = giro dentado; CA3 e CA1 = áreas do hipocampo; S = subículo; PrS = pré-subículo; PaS = para-subículo. Adaptado de Amaral e Witter, 1995.⁹

Como mencionado anteriormente, a epilepsia temporal mesial está associada à esclerose hipocampal^{6,8}. A característica da esclerose mesial hipocampal é a marcada perda neuronal no hilo do giro dentado (camada polimórfica) e dos neurônios piramidais em CA1 e CA3, com relativa preservação das células granulares e neurônios piramidais de CA2^{6,8,12}. Sabe-se que esta variação de sensibilidade à lesão no hipocampo, não somente na epilepsia, mas também em outras condições patológicas, está intimamente relacionada à expressão diferencial dos receptores glutamatérgicos excitatórios NMDA (N-metil-D-aspartato), em CA1, e cainato, em CA3 e hilo do giro dentado^{13,14,15}. A ativação desses receptores permite o influxo neuronal de grande quantidade de íons cálcio, podendo alcançar concentrações lesivas, que levam a degeneração celular (exitotoxicidade).^{16,17}

Um estudo anatomopatológico de 300 casos, obtido a partir de um programa de cirurgia para epilepsia, encontrou patologia do lobo temporal em 211 pacientes (70.33%). Destes, 132 pacientes (62,56%) apresentavam esclerose mesial hipocampal, caracterizada por perda neuronal e gliose na região mesial do lobo temporal¹⁸. Estudos clínicos retrospectivos evidenciam que um número significativo

de pacientes com epilepsia do lobo temporal intratável e com esclerose mesial hipocampal têm antecedentes de crises focais, prolongadas e, muitas vezes, associadas com febre na infância^{19,20}. Esta observação sugere que as crises podem lesionar a região mesial do lobo temporal, produzindo a esclerose mesial hipocampal, a qual, após um período de latência, produziria a epilepsia do lobo temporal. Estudos clínicos prospectivos de crianças com crises febris prolongadas, focais e repetitivas (crises febris complexas), utilizando a técnica de ressonância nuclear magnética, demonstraram que uma alteração aguda no hipocampo pode evoluir para atrofia hipocampal²¹. Por outro lado, há referências de que uma parcela dos pacientes com crises febris complexas pode ter disfunção cerebral prévia²² e que a recorrência das crises nos pacientes com epilepsia do lobo temporal determina lesão hipocampal e declínio cognitivo progressivo.^{23,24}

Grande parte dos pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentam alteração hipocampal aguda e, posteriormente, evoluem para o desenvolvimento de crises espontâneas, a epilepsia²¹. A prevalência das epilepsias, sobretudo naqueles pacientes que tiveram um insulto cerebral, reforça a necessidade de se buscar formas precoces de intervenção para evitar ou minimizar os supostos mecanismos envolvidos na epileptogênese. Isto, portanto, constitui-se em assunto de extrema relevância, que requer a utilização de modelos animais que mimetizem o padrão da epilepsia humana.

Um modelo ideal de epilepsia deve possuir as seguintes características: (1) o desenvolvimento de crises recorrentes e espontâneas; (2) um tipo de crise com fenomenologia clínica semelhante a crise da epilepsia humana; (3) um início dependente da idade, como é observado nas síndromes epilépticas generalizadas em humanos; (4) as crises clínicas devem estar associadas à atividade epiléptica no eletrencefalograma; (5) perfil farmacocinético das drogas antiepilépticas semelhante ao humano, permitindo a manutenção de nível sérico efetivo durante o tratamento crônico; (6) concentração plasmática terapêutica semelhante a requerida ao controle das crises na epilepsia humana.

Poucos são os modelos experimentais que se aproximam da descrição acima. Dentre eles, destacam-se dois modelos experimentais de epilepsia crônica, usados no estudo da epileptogenicidade do lobo temporal, o modelo do abrasamento (*kindling*)^{26,27} e o modelo da pilocarpina²⁸⁻³¹, sendo o segundo, aquele que, fenomenologicamente, mais se aproxima da epilepsia humana.

Modelo da Pilocarpina

O modelo da pilocarpina, desenvolvido em ratos, foi inicialmente descrito por Turski e colaboradores., em 1983, e melhor caracterizado por Leite e colaboradores, em 1990.^{28,30} Ele consiste na administração sistêmica (intraperitoneal) de dose única de pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, que induz ao estado de mal epiléptico (*status epilepticus* = período agudo), seguido por um período de normalidade do comportamento (período silencioso ou de latência) e, tardiamente, por crises espontâneas e recorrentes (período crônico).

No período agudo, imediatamente após a administração de pilocarpina (PILO), 350 a 380 mg/kg, os animais ficam imóveis, com o olhar fixo, as patas recolhidas e evoluem para episódios de tremores da cabeça e pescoço, com salivação e clonias das patas anteriores (*rearing*). Este quadro pode, ainda, evoluir para crises secundariamente generalizadas. As crises ocorrem a cada 2 a 8 minutos progredindo para estado de mal epiléptico (EME), em 50 a 60 minutos após a administração da PILO. Este período dura de 10 a 24 horas. Uma vez saindo do EME, os animais recuperam-se gradativamente, readquirindo o padrão normal de comportamento (período silencioso). Este período dura, em média, 14 dias. Todos os animais sobreviventes passam, então, a apresentar crises epiléticas espontâneas e recorrentes, que caracterizam o período crônico. Este perdura por toda a vida do animal, que apresenta, em média, 2 a 3 crises por semana. As crises são caracterizadas por automatismo facial, clonias das patas anteriores e perda do equilíbrio com crises generalizadas tônico-clônicas.²⁸⁻³¹

As alterações eletrencefalográficas induzidas pela PILO surgem após cinco minutos, quando a atividade de base é substituída por uma atividade rápida de baixa voltagem, no córtex e na amígdala, enquanto que no hipocampo aparece um ritmo teta regular de 6 a 7 Hz. Após os primeiros 10 minutos, esta atividade é substituída por um ritmo rápido de alta voltagem, com espículas no hipocampo. A atividade espicular se difunde para o córtex e progride para crises eletrográficas, nos primeiros trinta minutos após a administração da PILO. Em aproximadamente uma hora, a atividade eletrográfica evolui para estado de mal epiléptico. Este padrão de alteração do eletrencefalograma dura 10 horas e é seguido por progressiva normalização, sendo que 48 horas após a administração da droga, o traçado eletrencefalográfico pode ser considerado normal. Nas primeiras crises espontâneas, as alterações eletrencefalográficas são caracterizadas por paroxismos localizados somente no hipocampo. As crises subseqüentes mostram difusão progressiva da atividade paroxística do hipocampo para o córtex, com eventos ictais de longa duração. As crises espontâneas são caracterizadas por trens de espículas no hipocampo com propagação para o córtex, com duração máxima de 60 segundos. Segue-se um padrão de atividade de base deprimida com espículas interictais freqüentes.²⁸⁻³¹

Nos animais que desenvolvem EME, a análise histológica revela um padrão seletivo de perda neuronal de forma dramática na região polimórfica do giro dentado e nas áreas CA3 e CA1 do hipocampo²⁸⁻³². Como resultado da morte neuronal e da conseqüente perda de contatos sinápticos, ocorre um desequilíbrio entre inibição e excitação neuronal, estimulando fatores tróficos que determinam o rebrotamento das fibras musgosas. Estes vão fazer sinápses com seus próprios dendritos e os de outras células granulares, na camada molecular interna do giro dentado, formando um *feedback* monossináptico excitatório^{12,32-35}.

Drogas Antiepilépticas

Na ausência de conhecimentos mais específicos, em algumas epilepsias ou síndromes epilépticas, o enfoque da terapia é necessariamente direcionado ao controle dos sintomas, isto é, a supressão das crises. Na verdade todas as drogas atualmente disponíveis são anticonvulsivantes ("anticrises"), já que o termo droga antiepiléptica somente seria usado para aquelas drogas que prevenissem ou tratassem a epilepsia e não somente os seus sintomas, as crises.

As drogas de uso clínico, difenil-hidantoína (fenitoína), carbamazepina, valproato de sódio (ácido valpróico), benzodiazepínicos, etossuximida, fenobarbital e primidona, foram desenvolvidas e introduzidas entre 1910 e 1970. São referidas como drogas anticonvulsivantes antigas (clássicas) ou de primeira geração. Após um hiato de vinte anos, surgiram novas drogas, como a vigabatrina, a gabapentina, o felbamato, a lamotrigina, a oxicarbamazepina, a tiagabina e o topiramato. Estas foram introduzidas na prática clínica como anticonvulsivantes novos ou de segunda geração.³⁶

Os mecanismos de ação das drogas anticonvulsivantes podem ser agrupadas em quatro classes: (1) aquelas que bloqueiam canais de sódio dependentes de voltagem e, conseqüentemente, os disparos repetitivos e sustentados dos potenciais de ação, (fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, valproato, benzodiazepínicos, lamotrigina, oxicarbamazepina, topiramato e felbamato); (2) aquelas que potencializam a atividade gabaérgica (fenobarbital, valproato, benzodiazepínicos, topiramato, felbamato, vigabatrina, tiagabina e gabapentina); (3) aquelas que bloqueiam canais de cálcio do tipo "t" talâmicos (etossuximida); (4) aquelas que têm ação antiglutamatérgica (fenobarbital, topiramato e felbamato).³⁶⁻⁴⁵

Até o momento, nenhuma droga nova apresenta vantagens significativas sobre os anticonvulsivantes de primeira geração. A utilização de bons modelos

experimentais de epilepsia é de fundamental importância para o refinamento do conhecimento sobre as drogas existentes e para o desenvolvimento de novas drogas.

Com relação ao modelo da pilocarpina, as convulsões induzidas pela PILO, no período agudo, são controladas pela administração sistêmica de diazepam, fenobarbital, valproato e trimetadiona, enquanto a fenitoína e a carbamazepina mostram-se ineficazes nesta fase.⁴⁶ As crises espontâneas (período crônico) têm sua frequência reduzida pelo tratamento com fenobarbital, carbamazepina, fenitoína e valproato, sendo refratárias a etossuximida.⁴⁷ O efeito do tratamento farmacológico, com drogas anticonvulsivantes, durante o período de latência, ainda não foi estudado.

Entre as drogas mais utilizadas para controle das crises parciais do lobo temporal e que têm sido estudadas no modelo experimental que mimetiza esta condição clínica, estão a carbamazepina (CBZ) e o valproato (VPA)

A CBZ, desenvolvida na década de 50, foi inicialmente utilizada no tratamento dos distúrbios afetivos bipolares. Vem sendo utilizada como anticonvulsivante a mais de 20 anos para o controle de crises parciais e crises tônico-clônicas generalizadas. Apresenta estrutura química semelhante a dos antidepressivos tricíclicos. É solúvel em lipídeos e liga-se fortemente a proteínas plasmáticas. Sofre metabolização hepática, sendo que um de seus metabólitos, o 10,11-epóxido, é um anticonvulsivante fraco. Esta droga é um poderoso indutor enzimático, reduzindo os níveis plasmáticos de fenitoína, VPA, varfarina, esteróides e anticoncepcionais, além de sofrer auto-indução, estimulando seu próprio metabolismo, após administrações repetitivas. Por isso, após 4 a 6 semanas de tratamento, faz-se necessário o aumento da dose para a manutenção do nível plasmático terapêutico (5-10 microg/ml). Em adulto, a dose de manutenção varia entre 400 a 1800 mg/dia. Pode ser administrada duas ou três vezes por dia. Outros anticonvulsivantes, como a fenitoína, o fenobarbital e a primidona, afetam o metabolismo da CBZ, reduzindo seu nível plasmático. A meia-vida da CBZ, após dose única, é de aproximadamente

50 horas. A auto-indução pode reduzi-la para até 5 horas. Os efeitos colaterais mais frequentes são: sonolência, tonturas, falta de concentração, nistagmo e ataxia. Estes estão, geralmente, relacionados à dose.^{42,48}

O VPA foi introduzido na terapêutica antiepiléptica em 1964, podendo ser utilizado para controle de todos os tipos de crises. É uma droga que liga-se fortemente às proteínas plasmáticas, sofre metabolização hepática. Tem meia-vida curta, de 12 a 14 horas, sendo administrado uma a três vezes ao dia. Seu efeito terapêutico é lento, podendo levar várias semanas para tornar-se 100 % efetivo. Uma vez que não existe uma correlação bem definida entre concentração plasmática, efeitos e toxicidade e que a concentração plasmática sofre ampla variação diária, a monitorização do nível plasmático terapêutico tem pouco valor. O VPA é um inibidor enzimático, elevando os níveis plasmáticos de outras drogas, inclusive anticonvulsivantes. Inversamente, outros anticonvulsivantes indutores enzimáticos, podem reduzir seu nível plasmático. Em adultos, a dose de manutenção de VPA é de 500 a 3000 mg/dia. Os efeitos colaterais mais comuns são dependentes da dose: tremor, ganho de peso, adelgaçamento, perda de cabelos e irregularidades menstruais. Aproximadamente 20 % dos pacientes apresentam hiperamonemia, sem dano hepático, geralmente assintomática.^{42,48}

Catecolaminas e Epilepsia

O papel das catecolaminas, em especial da dopamina e da noradrenalina, nas epilepsias vem sendo discutido desde 1954, quando Chen e colaboradores relataram que o tratamento com reserpina, droga que depleta as reservas de monoaminas, diminui o limiar para crises convulsivas em camundongos (*apud* Trindade Filho, 2000).⁴⁹ Grande parte dos estudos sobre esta relação entre catecolaminas e epilepsia têm demonstrado uma ação inibitória dessas aminas neurotransmissoras sobre a atividade epiléptica.⁴⁹⁻⁵²

Recentemente, foi demonstrado que o L-deprenil (R-(-)-deprenil, selegelina), um potente inibidor irreversível da monoamino oxidase do tipo B (MAO-B), enzima de degradação da dopamina, tem um importante efeito anticonvulsivante em diferentes testes realizados em ratos e camundongos. Löscher e Hönack⁵³ verificaram que o L-deprenil retardou o desenvolvimento do processo de abasamento e aumentou o limiar para crises em ratos totalmente abasados. Em 1996, Löscher e Lehmann⁵⁴ avaliaram o perfil anticonvulsivante do L-deprenil e do fenobarbital em camundongos, utilizando os testes de determinação do limiar para crises induzidas por eletrochoque, eletrochoque supramáximo, limiar para crises induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) endovenoso e subcutâneo. O L-deprenil aumentou o limiar das crises mioclônicas e clônicas induzidas pelo PTZ endovenoso e o limiar das crises tônicas induzidas por eletrochoque, sendo que a potência e o espectro de atividade foi semelhante ao do fenobarbital. Entretanto, o L-deprenil, comparativamente ao fenobarbital, foi ineficaz nos testes do eletrochoque supramáximo e do PTZ subcutâneo, ou seja, não impediu o aparecimento de crises tônicas.

Qual seria, então, o mecanismo pelo qual o L-deprenil exerce sua ação anticonvulsivante?

Um estudo sobre o efeito da do L-deprenil na transmissão glutamatérgica, em neurônios da área CA1 do hipocampo de ratos, mostrou que, na concentração de 1 μMol , ocorreu redução desta neurotransmissão. Este efeito estaria sendo mediado pela inibição da MAO-B e conseqüente aumento da dopamina endógena. Esta atuaria em receptores pré-sinápticos D2, que modulam a liberação de glutamato no hipocampo.⁵⁵ Outros estudos, *in vitro*, realizados por Suppes e colaboradores⁵⁶ e Barreta e colaboradores⁵⁷, demonstraram que a estimulação dopaminérgica do hipocampo determina um aumento na amplitude e duração da fase de hiperpolarização que se segue ao potencial pós-sináptico. Este efeito parece ser mediado pela ativação de receptores dopaminérgicos D1 pós-sinápticos, levando a

um aumento dos níveis de cálcio intracitoplasmático e da condutibilidade dos canais de potássio.

Assim, a ação anticonvulsivante do L-deprenil deve-se ao aumento do tonus dopaminérgico hipocampal, modulando a excitabilidade glutamatérgica por, pelo menos, duas vias: a ativação de receptores D2 pré-sinápticos, com redução da liberação de neurotransmissores excitatórios, e a ativação de receptores D1 pós-sinápticos, prolongando a hiperpolarização.

2. OBJETIVOS

Com o objetivo de compreender o processo de epileptogênese e considerando a importância de se buscar formas precoces de intervenção neste processo, visando minimizar ou evitar o aparecimento de crises epiléticas, e na relevância do modelo de epilepsia parcial temporal induzido pela pilocarpina em ratos, o presente estudo foi delineado com os seguintes objetivos:

- Estudar os efeitos da carbamazepina e do valproato de sódio, administrados durante o período silencioso do modelo da pilocarpina, sobre as crises espontâneas (período crônico);
- Estudar o efeito agudo da estimulação catecolaminérgica sobre a indução deste modelo, através do pré-tratamento dos animais com L-deprenil (selegelina).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, com 90 dias de idade, pesando entre 250-300 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia. Uma semana antes dos experimentos, os animais foram alojados no biotério do laboratório para ambientação. Tendo livre acesso a água e comida e eram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura ambiente variando entre 19 e 23 °C.

3.1 - Efeito do tratamento do período silencioso do modelo da PILO

3.1.1 - Indução do EME

3.1.1.1 - Drogas

- Cloridrato de pilocarpina (PILO) - Sigma
- Metil-escopolamina (metil-nitrato de escopolamina) - Sigma
- Diazepam (7-cloro-1,3-diidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepina-2-ona)
Roche

Ambas as drogas foram dissolvidas em solução salina 0.9% (Halex Istar), estéril e apirogênica, nas concentrações de 40 mg/ml (PILO) e 0.5 mg/ml (escopolamina).

3.1.1.2 - Procedimento

Trinta minutos antes da administração da PILO, os animais foram pré-tratados com metil-escopolamina, na dose de 1 mg/Kg, por via subcutânea (s.c.), visando minimizar os efeitos periféricos da pilocarpina. A PILO foi, então, administrada na dose de 360 mg / Kg, intraperitonalmente (i.p.)

Com o objetivo de reduzir a alta taxa de mortalidade, os animais receberam 10 mg/Kg de diazepam (Roche), i.p., uma hora após o início do EME. A partir das vinte e quatro hora após a administração da PILO, foram alimentados, através de um conta-gotas, com uma solução contendo soro fisiológico a 9% e farelo de ração. Esse procedimento foi realizado até que se observasse uma procura espontânea do animal pelo alimento.

3.1.2 - Tratamento do Período Silencioso

3.1.2.1 - Drogas

- CBZ (5H-dibenz{b,f}azepina-5-carboxamina) - Sigma. Foi dissolvida em solução de Tween 80, a 3% (em solução salina 0.9%).
- VPA (ácido 2- propilpentanóico sódico) - Sigma. Foi dissolvido em solução salina 0.9%.

3.1.2.2 - Procedimento

Vinte e quatro horas após o início do EME, foi iniciado o tratamento com as drogas anticonvulsivantes ou solução salina. Os animais receberam CBZ 40 mg/Kg, i.p., três vezes ao dia (20 animais), ou VPA 150 mg/Kg, i.p., três vezes ao dia (10 animais) ou salina, i.p., três vezes ao dia (20 animais), durante 56 dias (8 semanas).

3.1.3 - Análise Comportamental

A observação das manifestações comportamentais características das crises convulsivas induzidas pela PILO, foi realizada, no período agudo (EME) durante aproximadamente 10 horas.

Nos dias subseqüentes, os animais sobreviventes ao EME, submetidos aos diferentes tratamentos, foram observados diariamente das 8 às 16 horas, por meio de monitorização direta e auxílio de um sistema de vídeo-câmera, com posterior análise do material gravado. Durante o período silencioso do modelo, foi avaliada a

latência para a primeira crise e durante o período crônica foram avaliados: (1) a incidência de crises, (2) a frequência de crises e (3) a duração geral das crises, para cada grupo tratado, durante, no mínimo, 60 dias após o aparecimento do primeiro episódio de crise.

3.1.4 - Análise Histológica do Cérebro

Terminado o período de observação, os animais foram profundamente anestesiados e perfundidos. Um grupo de animais, não submetido a EME, também foi processado, com o objetivo de servir de controle para a análise histológica.

Para a realização da perfusão, foi aberta a caixa torácica e exposto o coração do animal. Puncionou-se o ventrículo esquerdo para a infusão das soluções. Após a punção do ventrículo, foi feita uma incisão na átrio direito, de forma a permitir a saída dos líquidos, após terem circulado pelo animal. Foram perfundidos com solução salina a 0.9 %, durante 5 minutos, e uma solução de formol a 4 %, por mais 5 minutos. Após a perfusão foram decapitados, os cérebros removidos e armazenados em uma solução de sacarose a 30% em formol 4%, por até 30 dias. Foram então processados e corados pelo método de Nissl.

3.1.4.1 - Método de Nissl

Os cérebros foram lavados em água corrente, desidratados em álcool e benzol e inclusos em parafina a 60 °C. Foram, então, cortados em um micrótomo, em secções coronais seriadas, de 10 µm de espessura e posteriormente, coradas com violeta-de-cresil.

As fatias do cérebro foram submetidas a análise histológica em microscópio óptico para detecção de alterações na sua morfologia.

3.2 - Efeito do L-deprenil (Selegelina) sobre a Indução do Modelo

3.2.1. Drogas

- L-deprenil, (R-(-)- deprenil) - Selectchemie
- PILO - Sigma
- Metil-escopolamina - Sigma

3.2.2 - Procedimento

Os animais foram pré-tratados, i.p, com solução salina 0.9% (N = 27) ou L-deprenil nas doses de 5 (N = 20), 10 (N = 24) ou 20 mg/ Kg (N = 23), em dose única, 1 hora antes da administração da PILO. A pilocarpina foi, então administrada, para indução do EME, como descrito anteriormente.

3.2.3 - Observação Comportamental

Os animais foram observados durante 10 horas, após a administração de L-deprenil, e reavaliados 24 horas da administração da PILO. Foram observados os seguintes parâmetros: (1) incidência de crises, (2) número de crises, (3) incidência de crises tônicas, (4) latência para o EME e (5) mortalidade.

3.3 - Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados, foi utilizado o programa GraphPad InStat versão 3.00 para Windows 95.⁵⁸ As comparações estatísticas foram realizadas por análise não-paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis seguido do Teste de Dunn) para comparações entre 3 ou mais grupos; Teste de Fisher e Chi-quadrado para análise dos dados apresentados em tabelas de contingência; exceto para a análise da latência para as crises, onde foi utilizada a ANOVA seguida do Teste de Tukey,

quando comparados 3 ou mais grupos, e o teste “t” de Student, para comparação entre dois grupos.

4. RESULTADOS

4.1 - Efeito do Tratamento com CBZ e VPA Durante o Período Silencioso

4.1.1 - Avaliação Comportamental do Modelo da Pilo (Animais Controle)

Após a administração da PILO, os animais apresentaram automatismo facial associado à salivação, à acinesia e aos tremores difusos. Em 15 a 20 minutos, este padrão comportamental evoluiu com intensificação da salivação, clonias das patas anteriores (*rearing*) e, finalmente queda, seguida, na maioria das vezes, por crise clônica generalizada. Alguns animais evoluíram para crise tônica, geralmente morrendo no período agudo. As crises recorreram a cada 3 a 5 minutos, culminando com o EME, em 25 a 30 minutos da administração da PILO. A duração do EME variou entre 8 a 12 horas, sendo que os animais ficaram comatosos (não responsivos a estímulos ambientais) por até 24 horas. Progressivamente, após este período os animais começaram a retornar ao seu comportamento normal em até 24 horas.

Os animais sobreviventes ao EME (20) passaram por um período de 17 ± 5 dias sem apresentar alterações comportamentais (período silencioso ou de latência).

Após o período silencioso, todos os sobreviventes (100%) apresentaram crises espontâneas recorrentes, na frequência de 1 a 2 crises por semana. As crises geralmente ocorreram durante o período em que os animais estavam dormindo. No início de cada crise, os animais ficaram imóveis, com discreta movimentação das vibrissas, evoluindo para movimentos mastigatórios e de piscamento dos olhos. Em seguida, apresentaram clonias das patas anteriores. Ao finalizar, perdia a postura, caindo e desenvolvendo crise clônica generalizada com duração variável entre 30 a 60 segundos.

4.1.2 - Efeito da CBZ e do VPA

A administração de CBZ produziu sedação dos animais nos primeiros dias do tratamento, sendo que a mesma desapareceu com as administrações subseqüentes. Dos 20 animais que iniciaram o tratamento, 8 morreram sem completá-lo. O VPA não induziu sedação, porém, nos primeiros dias de tratamento, provocou alteração da atividade motora, com incoordenação e tremores, que desapareceu com a continuidade do tratamento. Dos 10 animais tratados com VPA, três foram a óbito no decorrer do período de tratamento, ou seja, 7 animais completaram este período. Destes, 5 morreram ao longo do período de observação pós-tratamento, e apenas 2 chegaram ao final do estudo.

Apenas o VPA afetou a latência para a primeira crise, prolongando este período em aproximadamente 100%, em relação ao grupo controle. A CBZ não afetou este parâmetro (Fig. 3). Da mesma forma, somente o VPA alterou a incidência de crises, reduzindo o número de animais que apresentaram crises espontâneas recorrentes (Tab. 1), quando comparado ao grupo SAL.

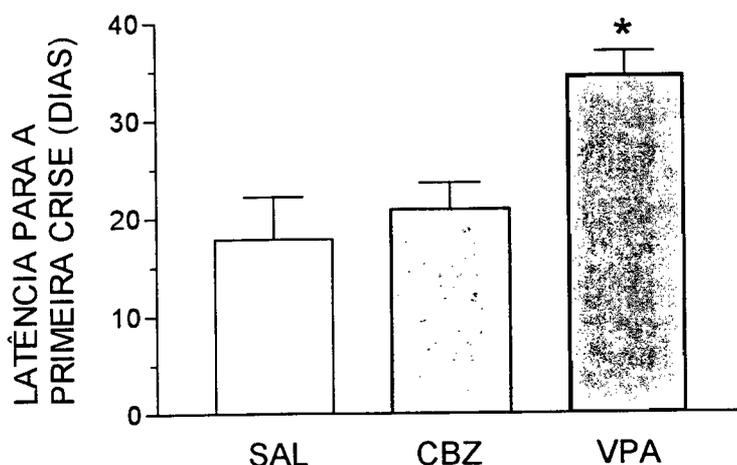


FIGURA 3 - Latência para a primeira crise (período crônico) do modelo da pilocarpina, em animais em tratamento com salina (SAL = 12/12), carbamazepina (CBZ = 9/12) ou valproato (VPA = 2/7). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, teste "t" de Student, em comparação ao grupo SAL.

TABELA 1 - Incidência de crises epilépticas em animais tratados com salina, carbamazepina e valproato, durante o período silencioso do modelo da pilocarpina, em ratos.

TRATAMENTO\CRISES	SIM	NÃO	TOTAL
Salina	12	0	12
Carbamazepina	9	3	12
Valproato	2*	5	7

* $p < 0,0018$ teste de Fisher, comparado ao grupo SAL.

A avaliação da frequência de crises, mostrou que ambas as drogas antiepilépticas, CBZ e VPA, afetaram este parâmetro, reduzindo a frequência total de crises, comparativamente aos animais que foram tratados com SAL (Fig. 4).

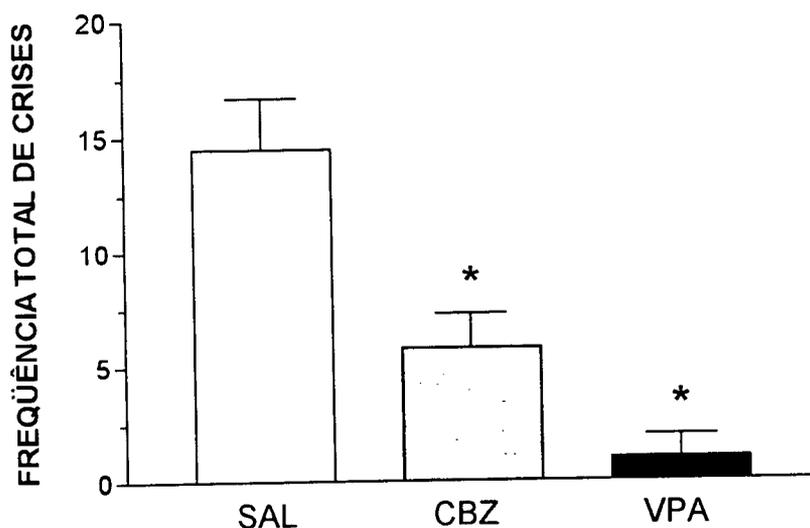


FIGURA 4 - Frequência total de crises espontâneas após o estado de mal epiléptico, induzido pela pilocarpina em ratos, tratados com salina (SAL = 12), carbamazepina (CBZ = 12) ou valproato (VPA = 2) durante o período silencioso. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$, KW = 10,998 (Teste de Kruskal-Wallis).

Já, a avaliação, em separado, dos períodos de tratamento e pós-tratamento, mostrou que esta redução ocorreu apenas no período de tratamento (Fig. 5).

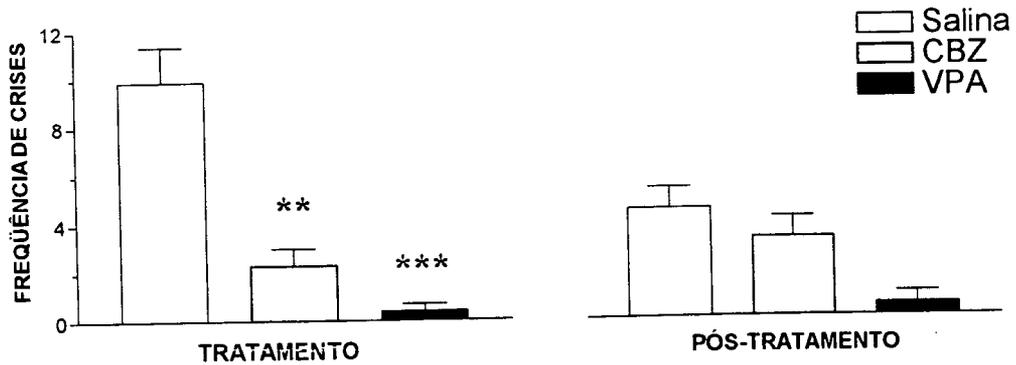


FIGURA 5 - Frequência de crises espontâneas após o estado de mal epilético, induzido pela pilocarpina, em ratos, durante os períodos de tratamento (56 dias) e pós-tratamento (56 dias) com salina (SAL = 12), carbamazepina (CBZ = 9) ou valproato (VPA = 2). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; KW = 20,394 (Teste de Kruskal-Wallis).

Quando à frequência de crises, durante e após o período de tratamento, foi avaliada isoladamente em cada grupo de tratamento, foi encontrada diferença apenas no grupo tratado com SAL (Fig. 6).

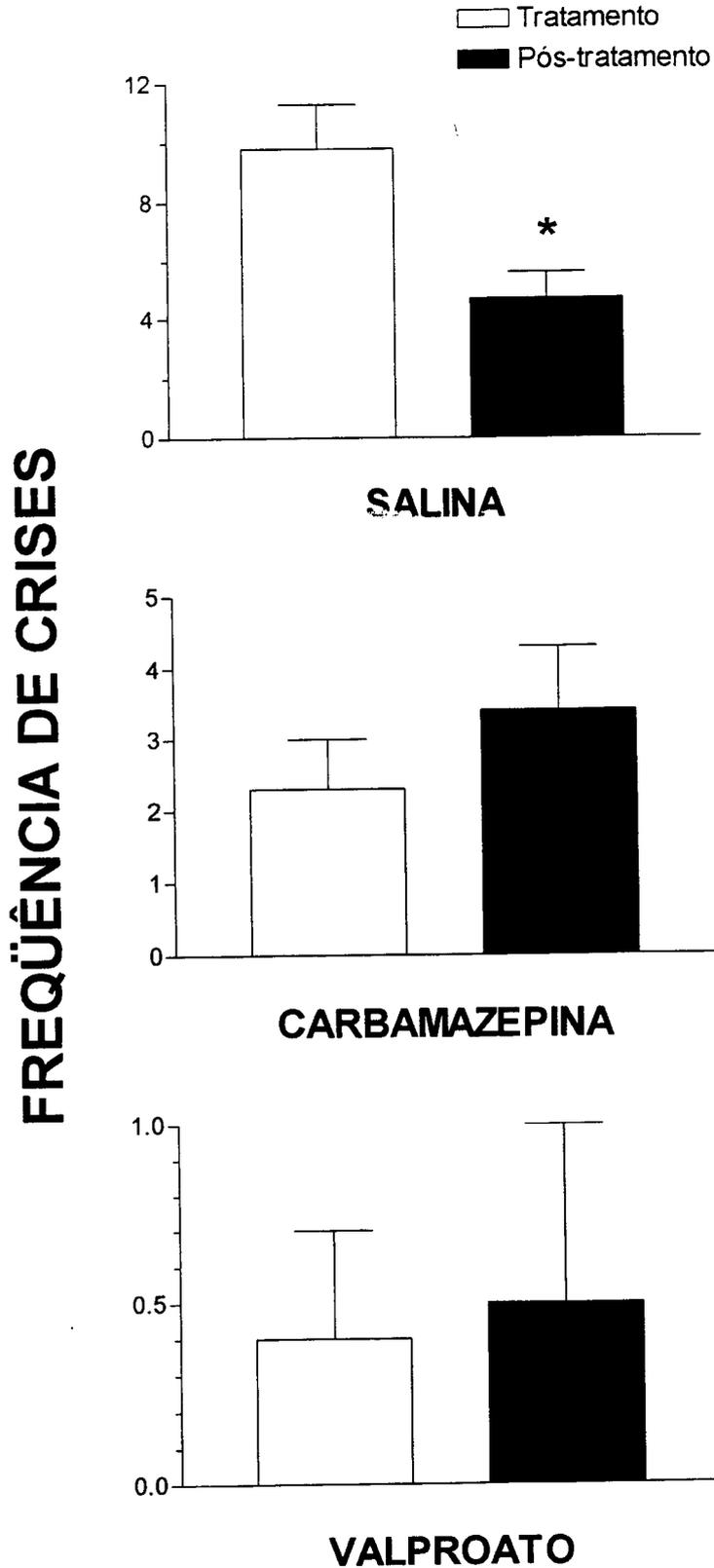


FIGURA 6 - Frequência de crises espontâneas no modelo da pilocarpina, em ratos, durante os períodos de tratamento (56 dias) e pós-tratamento (56 dias) com salina (SAL = 12), carbamazepina (CBZ = 9) ou valproato (VPA = 2). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. * $p < 0,05$; $U = 116,50$ (Teste de Mann-Whitney).

Na avaliação da duração das crises, tanto a CBZ quanto o VPA, em comparação ao grupo SAL, reduziram o tempo de duração das crises, apenas durante o período de tratamento (Fig. 7).

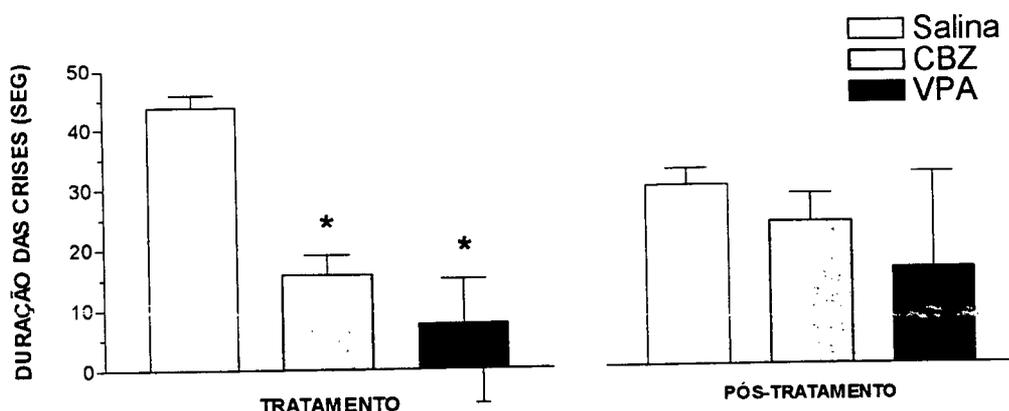


FIGURA 7 - Duração das crises espontâneas no modelo da pilocarpina, em ratos, nos períodos de tratamento (56 dias) e pós-tratamento (56 dias) com salina (SAL = 12), carbamazepina (CBZ = 9) ou valproato (VPA = 2). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. $p < 0,001$; $F_{(2,23)} = 30,067$ (ANOVA + teste de Tukey-Kramer).

Quando a avaliação foi realizada individualmente em cada grupo, comparando-se o período de tratamento com o período pós-tratamento, apenas o grupo tratado com SAL mostrou diferença (Fig. 8).

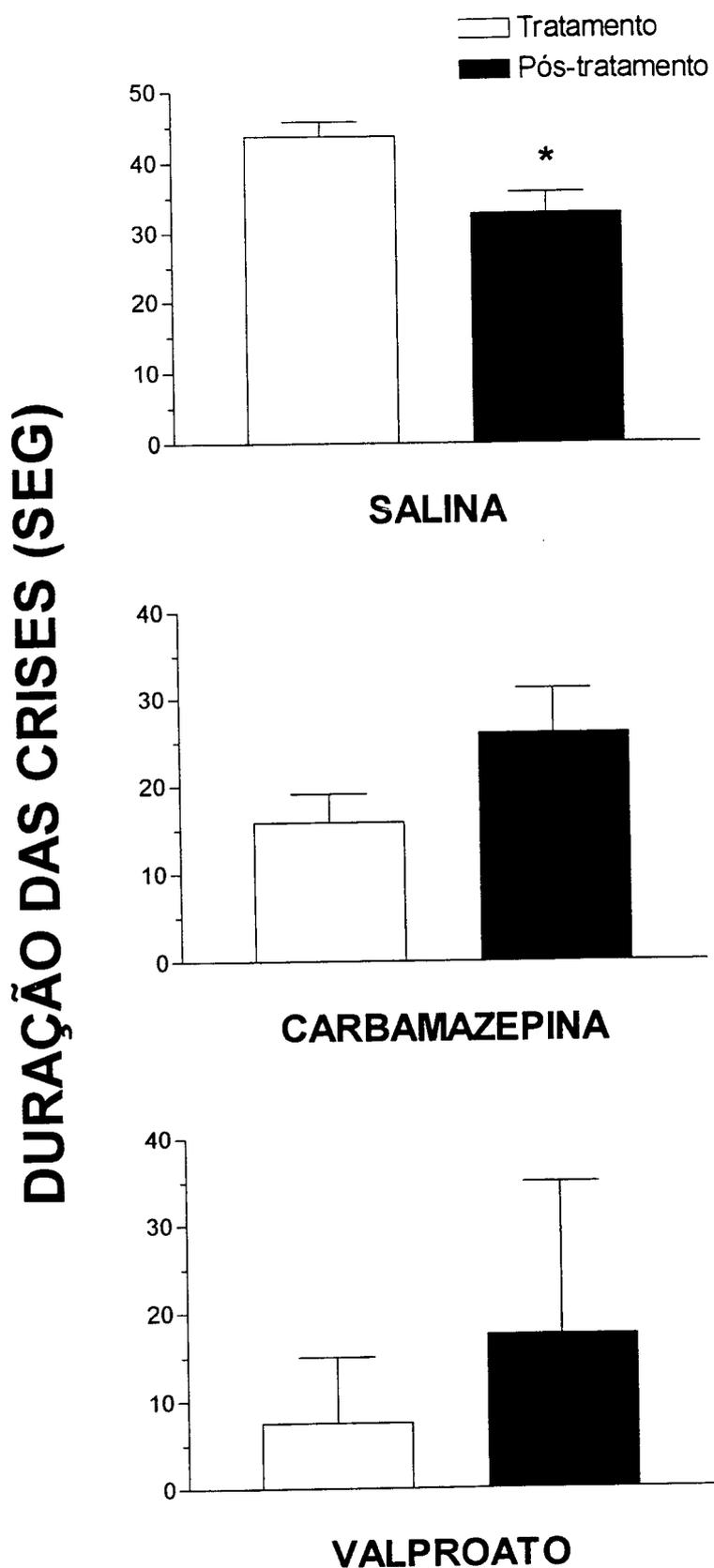


FIGURA 8 - Duração das crises espontâneas no modelo da pilocarpina, em ratos, nos períodos de tratamento (56 dias) e pós-tratamento (56 dias) com salina (SAL = 12), carbamazepina (CBZ = 9) ou valproato (VPA = 2). Os dados representam a média \pm erro padrão da média. ** $p < 0,01$; teste "t" de Student.

4.1.1 - Análise histológica

As figura 9 e 10, descritas em conjunto, mostram o padrão de alterações neuropatológicas do hipocampo e giro dentado, de ratos tratados com SAL, CBZ ou VPA, comparados a um rato controle, não pilocarpinado. No animal controle observa-se o padrão normal da citoarquitetura destas estruturas, com preservação das áreas CA1, CA2 e CA3 do hipocampo e hilo do giro dentado. Na foto do animal tratado com SAL, pode ser claramente notada uma alteração na citoarquitetura hipocampal, com atrofia do hipocampo, retração nas áreas CA1, CA2 e CA3 e no giro dentado (desarranjo, ondulações e espessamento no delineamento das camadas piramidal e granular, respectivamente), dispersão das células do hilo e aparente perda celular. No rato tratado com CBZ observa-se uma aparente preservação do tamanho do hipocampo, com maior integridade da camada piramidal, embora com nítido comprometimento de CA3. No giro dentado, observa-se distorção e espessamento da camada granular e espessamento do hilo. Na foto do animal tratado com VPA, parece haver, também, uma maior preservação da citoarquitetura do hipocampo e giro dentado, com alguma retração e espessamento, mais notadamente no giro dentado.

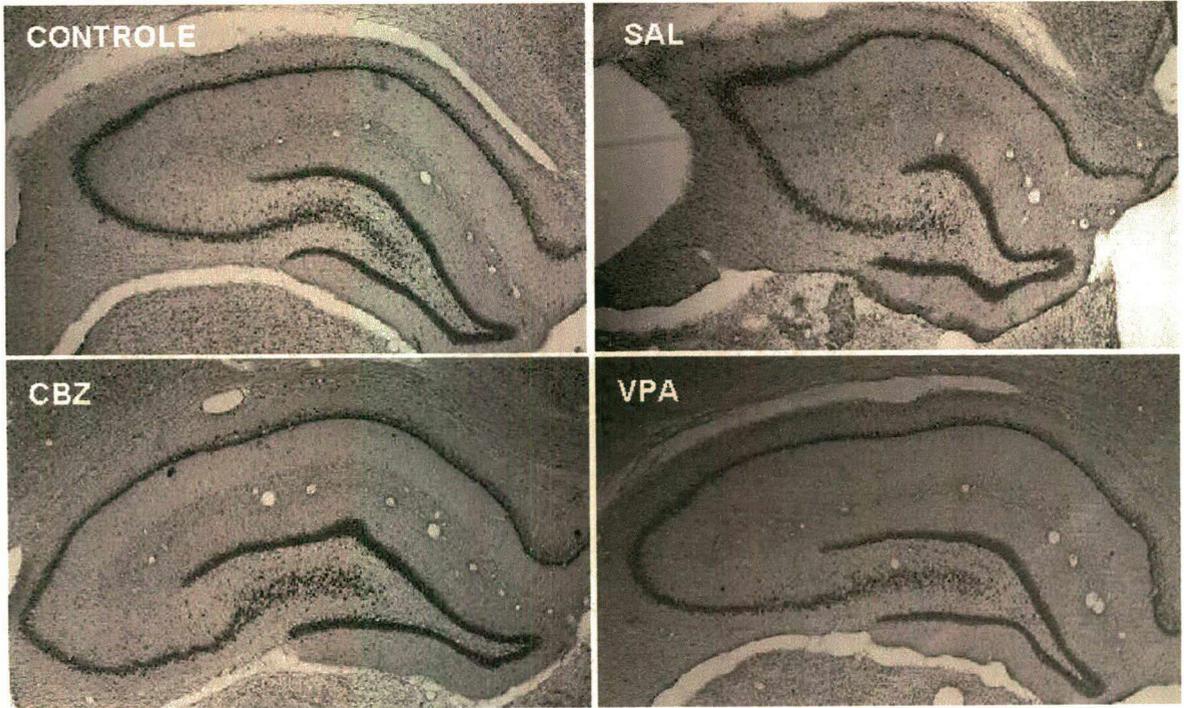


FIGURA 9 - Fotomicrografias da formação hipocampal, em aumento de 25X, de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina e tratados durante o período silencioso, com salina (SAL), carbamazepina (CBZ) ou valproato (VPA). O grupo controle refere-se a um animal, virgem de tratamento, não submetido ao modelo da pilocarpina. Na foto do animal controle observa-se o padrão normal da citoarquitetura da região. Em SAL, observa-se o comprometimento da forma característica do hipocampo e giro dentado, com atrofia das estruturas, retração, espessamento e ondulação das camadas CA1, CA2 e CA3; dispersão das células do hilo (setas). Em CBZ e VPA, observa-se um menor comprometimento da citoarquitetura da região hipocampal.

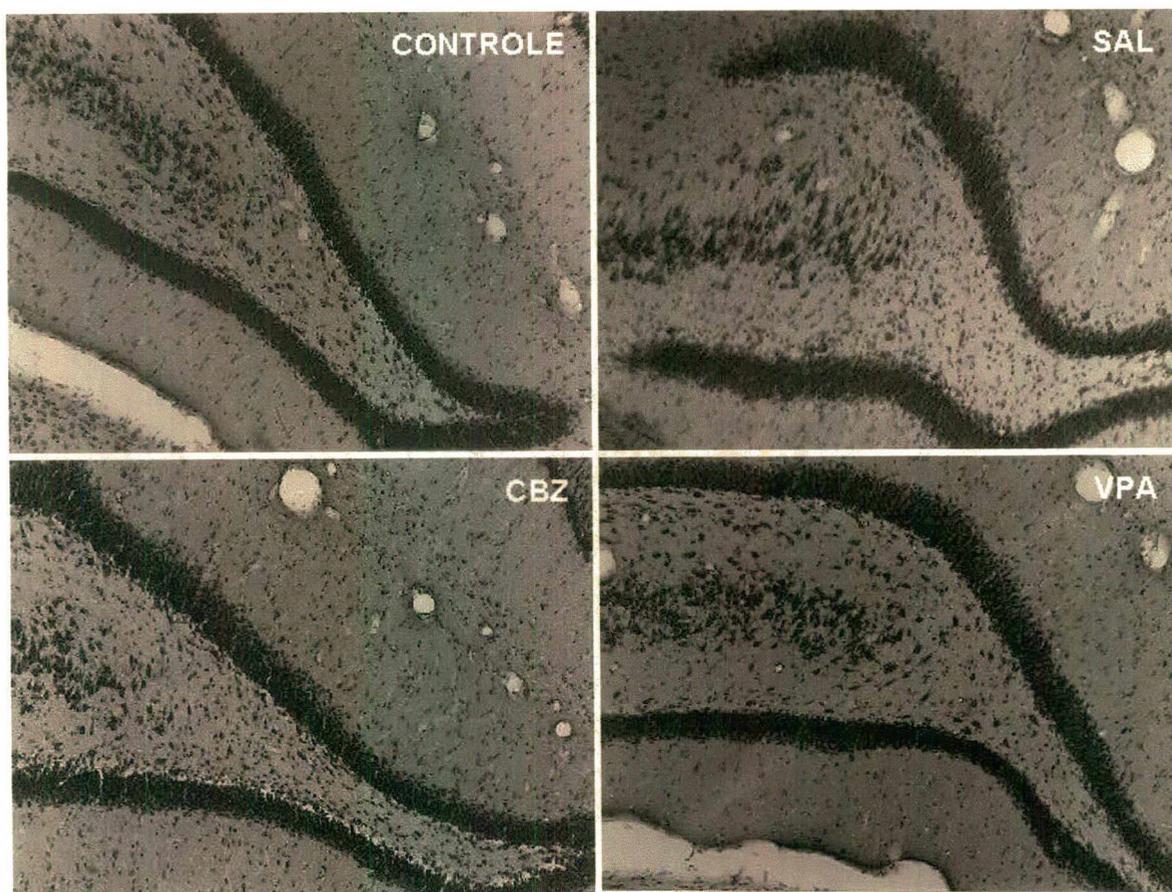


FIGURA 10 - Fotomicrografias do giro dentado, em aumento de 100X, de ratos Wistar adultos submetidos ao modelo da pilocarpina e tratados durante o período silencioso, com salina (SAL), carbamazepina (CBZ) ou valproato (VPA). O grupo controle refere-se a um animal, virgem de tratamento, não submetido ao modelo da pilocarpina. Na foto do animal controle observa-se o padrão normal da citoarquitetura do giro dentado. Em SAL, observa-se o comprometimento da forma característica da estrutura, com retração, espessamento e ondulação da camada granular; dispersão das células da camada polimórfica e perda de células no hilo (setas). Em CBZ e VPA, observa-se um menor comprometimento da citoarquitetura da desta estrutura.

4.2 - Efeito do L-deprenil (Selegelina) sobre a Indução do Modelo

Foi observada uma redução da incidência de crises induzidas pela PILO (360 mg/kg, i.p.) no grupo pré-tratado com L-deprenil na dose de 5 mg/kg, i.p.. As doses de 10 e 20 mg/kg de L-deprenil não alteraram este parâmetro (Tab. 2).

TABELA 2 - Incidência de crise (número de animais/grupo) no período agudo do modelo da pilocarpina, em animais pré-tratados com salina ou L-deprenil 20, 10 ou 5 mg/kg, i.p..

TRATAMENTO\CRISES	SIM	NÃO	TOTAL
SALINA	21	6	27
L-DEPRENIL 20 MG/KG	16	7	23
L-DEPRENIL 10 MG/KG	15	9	24
L-DEPRENIL 5 MG/KG	5***	15	20

*** $p < 0,001$; $\chi^2_1 = 12,95$.

Esta mesma dose de L-deprenil (5 mg/kg) reduziu o número de crises induzidas pela pilocarpina, em aproximadamente 60%, quando comparada ao grupo salina. As demais doses não afetaram o número de crises e da mesma forma não houve diferença entre as três doses de L-deprenil (Fig. 11).

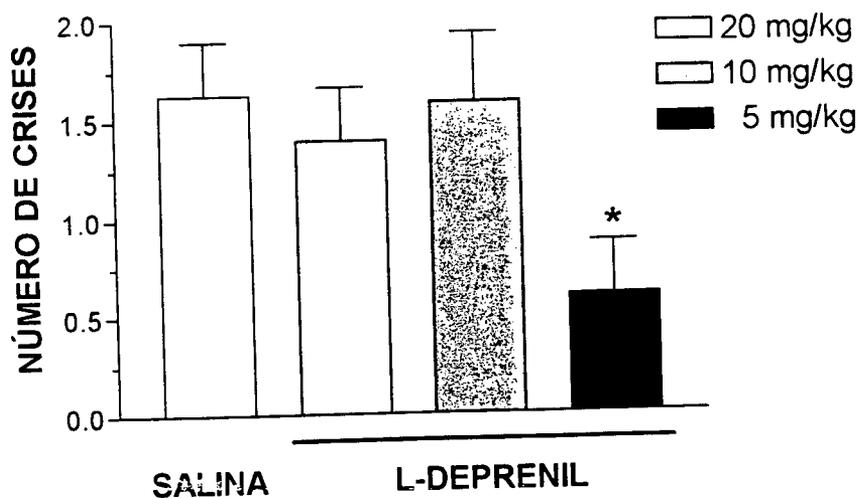


FIGURA 11 - Número de crises induzidas pela pilocarpina 360 mg/kg, i.p., em ratos pré-tratados, 1 hora antes, com salina ou L-deprenil, nas doses de 20, 10 ou 5 mg/kg, i.p.. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. * $p < 0,05$; KW = 10,085 (Teste de Kruskal-Wallis).

Em relação ao tipo de crise apresentada pelos animais, avaliamos a ocorrência de crises tônicas e observamos que nenhum animal tratado com L-deprenil 5 mg/kg, i.p., apresentou este tipo de crise, enquanto que, em todos os outros grupos de estudo, estas foram observadas (Tab. 3).

TABELA 3 - Incidência de crise tônica (número de animais/grupo) no período agudo do modelo da pilocarpina, em animais pré-tratados com salina ou L-deprenil 20, 10 ou 5 mg/kg, i.p..

TRATAMENTO\CRISE TÔNICA	SIM	NÃO	TOTAL
SALINA	7	20	27
L-DEPRENIL 20 MG/KG	10	13	23
L-DEPRENIL 10 MG/KG	3	21	24
L-DEPRENIL 5 MG/KG	0*	20	20

* $p < 0,05$; $\chi^2_1 = 6,09$.

Na avaliação da latência para a ocorrência do EME, foi detectado um aumento deste parâmetro no grupo pré-tratado com selegelina 10 mg/kg. Os demais grupos não afetaram o tempo para o estabelecimento do EME (Fig. 12). No grupo pré-tratado com L-deprenil 20 mg/kg, apenas um animal apresentou EME, constituindo uma amostra muito pequena, não aceito pelo tratamento estatístico utilizado.

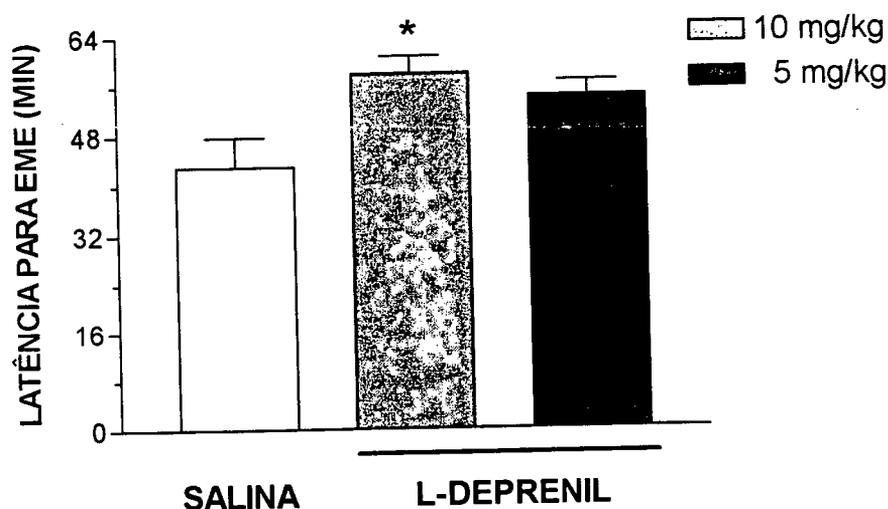


FIGURA 12 - Latência para o estabelecimento do estado de mal epilético (EME) no modelo da pilocarpina, em ratos pré-tratados com salina ou L-deprenil 10 ou 5 mg/kg, i.p.. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. * $p < 0,05$; $F(1,30) = 6,73$.

Foi detectada uma redução da mortalidade no grupo pré-tratado com L-deprenil 5 mg/kg, quando comparado ao grupo tratado com salina. As doses maiores de L-deprenil não alteraram a taxa de mortalidade, neste estudo (Tab. 4).

TABELA 4 - Número de óbitos induzidos pela pilocarpina 360 mg/kg, i.p., em ratos pré-tratados (1 hora antes) com salina ou L-deprenil 20, 10 ou 5 mg/kg, i.p.

TRATAMENTO\ÓBITO	SIM	NÃO	TOTAL
SALINA	18	9	27
L-DEPRENIL 20 MG/KG	16	7	23
L-DEPRENIL 10 MG/KG	12	12	24
L-DEPRENIL 5 MG/KG	3**	17	20

** $p < 0,001$; $\chi^2_1 = 10,406$.

5. DISCUSSÃO

Reproduziu-se neste estudo, pela análise comportamental, as três fases do modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina, segundo o que havia sido previamente descrito na literatura²⁸⁻³⁰. A administração, de diazepam após uma hora do EME, determinou hipotonia e redução da amplitude da atividade motora, característica deste período do modelo, minimizando a mortalidade imediata. A dose utilizada sabidamente não é eficaz na interrupção do EME, como anteriormente demonstrado por Lemos e Cavalheiro³².

5.1 - Efeito do tratamento com CBZ e VPA

Num primeiro momento, o tratamento com CBZ e VPA parece ter tido um efeito protetor, minimizando a expressão da epileptogênese. Este perfil protetor aparece na redução da frequência total de crises, na duração das crises para os grupos tratados com CBZ e VPA, comparativamente ao grupo tratado com SAL (na vigência do tratamento), assim como no prolongamento do período de latência da primeira crise e na redução da incidência de animais com crises, no grupo tratado com VPA. Porém, quando cada grupo de tratamento foi analisado separadamente, o aumento na frequência e na duração das crises, durante o período de tratamento com SAL, parece estar relacionado ao efeito facilitador da expressão das crises pelo estresse, gerado pela manipulação diária dos ratos durante o tratamento, o que não ocorreu nos grupos tratados com CBZ e VPA. Por outro lado, isto mostra que o tratamento com a CBZ e o VPA protegeram os animais das crises induzidas pela manipulação. Em outras palavras, a proteção contra as crises induzidas pelo estresse da manipulação, durante o tratamento com CBZ e VPA, teria sido

responsável pela diferença observada na avaliação da frequência total de crises entre os grupos. Assim, não fica evidenciado um efeito direto sobre o processo de epileptogênese.

O pequeno número de animais tratados com VPA (2) que chegou ao final do estudo, constitui um fator que limita mas não invalida a interpretação destes dados, na medida em que os ratos morreram no período pós-tratamento, nos permitindo ainda valorizar os dados relativos ao período de tratamento.

A análise histológica mostrou uma maior preservação das estruturas do hipocampo e do giro dentado nos animais tratados com CBZ e VPA, comparados àqueles tratados com SAL. Embora estas drogas não tenham prevenido o aparecimento das crises espontâneas, este dado histológico mostra que, neste modelo, a intervenção terapêutica no período silencioso pode ter um papel protetor. Este efeito protetor pode estar relacionado ao menor número de crises desses animais, além da menor duração das crises. O impacto das crises sobre a anatomia da estrutura hipocampal corrobora dados da literatura, demonstrando que a atividade epiléptica contribui para a lesão cerebral. Estudos experimentais têm demonstrado que a intensidade das lesões do hipocampo, como a perda neuronal do hilo do giro dentado e o rebrotamento axonal das fibras musgosas, está diretamente relacionado à frequência e à duração das crises epiléticas.^{32,59,60}

A CBZ e o VPA já havia sido previamente estudadas no modelo da PILO, porém nas fases aguda e crônica do modelo. Turski e Cavalheiro, em 1987, estudando o efeito de várias drogas anticonvulsivantes nas crises induzidas pela pilocarpina, verificaram que o clonazepam, o fenobarbital e o VPA apresentaram uma boa eficácia contra as crises induzidas pela PILO, o que repercutiu em proteção a lesão cerebral⁴⁶. Já a CBZ não teve efeito contra as crises induzidas pela PILO e, conseqüentemente, não afetou o padrão de lesão cerebral. Mas, em um estudo farmacológico na fase crônica deste mesmo modelo, Leite e colaboradores, em 1992, verificaram que a CBZ teve uma acentuada ação

supressora sobre as crises espontâneas, enquanto que o VPA teve efeito mais discreto⁴⁷. Em outro importante modelo experimental de epilepsia do lobo temporal, o modelo do *kindling* ou abrasamento, em ratos, o VPA inibiu o desenvolvimento do abrasamento enquanto a CBZ não o fez⁶¹.

No tratamento clínico das epilepsias, a CBZ e o VPA são drogas utilizadas para o controle deste tipo de crise^{42,48}. Quanto ao mecanismo de ação dessas drogas, a CBZ atua aumentando a frequência e a amplitude dos potenciais pós-sinápticos inibitórios e bloqueia canais de sódio dependentes de voltagem, na sua forma inativada, determinando a limitação do disparo repetitivo sustentado neuronal. O valproato, além de bloquear os canais de sódio, potencializa a atividade GABAérgica, em especial na substância negra reticular, que está envolvida no controle das crises epiléticas. A ação do VPA sobre a neurotransmissão GABAérgica, embora ainda não totalmente esclarecida, está relacionada à estimulação da descarboxilase do ácido glutâmico, que é a enzima de síntese do neurotransmissor, e à inibição da enzima GABA-transaminase, que faz a degradação do GABA.^{48,62,63}

Neste sentido, os resultados relativos ao período de tratamento com VPA devem ser decorrentes da potencialização da atividade gabérgica, levando a um aumento da inibição sobre a excitabilidade no hipocampo e na substância negra. Com relação ao tratamento com CBZ, uma vez que reduziu a frequência e a duração das crises, mas não afetou a latência para a primeira crise, nem a incidência de crises, poderia estar limitando de alguma forma, porém não impedindo efetivamente os disparos neuronais.

Verificou-se, que o tratamento com CBZ e VPA não impediu o desenvolvimento da epileptogenicidade, mas limitou a expressão das crises. A ausência de um tratamento profilático efetivo contra a epilepsia não invalida a necessidade deste tratamento. Muitos autores têm abordado esta discussão, sem que se tenha chegado a um consenso a

respeito⁶⁴⁻⁶⁶. Em parte, a discussão tem se intensificado a partir de estudos epidemiológicos prospectivos em humanos, que não mostram uma relação entre crises na infância e epilepsia do lobo temporal, e estudos de ressonância nuclear magnética, também em humanos, que sugerem a existência de lesão hipocampal prévia predispondo as crianças às crises febris, esclerose hipocampal e epilepsia do lobo temporal.⁶⁶⁻⁶⁹ Os resultados apresentados nesse estudo, mostram que, no modelo experimental de epilepsia do lobo temporal, induzido pela pilocarpina, em ratos, a intervenção no momento do insulto inicial, mesmo que não impeça a epileptogênese, minimiza a sua expressão (crises), e, assim, a extensão da lesão cerebral.

A prevalência da epilepsia em pacientes que sofreram insultos cerebrais reforça a necessidade de intervenções farmacológicas que previnam a epilepsia. Estas intervenções devem ser baseadas em três linhas teóricas:

A) Interferência nos *drives* excitatórios glutamatérgicos por meio do bloqueio dos receptores ionotrópicos tipo NMDA, antagonistas dos receptores metabotrópicos pós sinápticos (tipo 1 e 5) e agonistas dos receptores metabotrópicos pré-sinápticos (tipo 2 e 3).⁷⁰

B) Interferência nos *drives* inibitórios gabérgicos, seja por meio de drogas que aumentam a disponibilidade de GABA ou das que atuam diretamente nos receptores gabérgicos.^{71,72}

C) Interferência sobre o disparo neuronal sustentado, através do uso de bloqueadores de canais iônicos dependentes de voltagem (sódio, potássio e cálcio).^{72,73}

Uma vez que a efetividade protetora das drogas esteja bem demonstrada em modelos experimentais como os da pilocarpina, um passo importante é dado para que se venha a elaborar estudos clínicos naqueles pacientes com elevado risco de sofrer epilepsia em fases mais tardias da vida.

5.2 - Efeito do L-deprenil (selegelina) sobre a Indução do Modelo da Pilo

Os nossos achados evidenciaram que o L-deprenil, na dose de 5 mg/kg, administrado 1 hora antes da pilocarpina apresentou um efeito protetor sobre a indução de crises convulsivas, uma vez que diminuiu a incidência e o número de crises.

Trabalhos anteriores já mostraram que o L-deprenil tem um efeito protetor sobre as crises induzidas pelo pentilenotetrazol, pelo eletrochoque e no modelo do abrasamento. Löscher e colaboradores demonstraram que a administração aguda de 10 mg/Kg de L-deprenil causou um significativo aumento no limiar das crises em diferentes modelos de epilepsia, em ratos e camundongos, até uma hora após a sua administração. Este efeito desapareceu após duas horas.^{53,54} Entretanto, nestes trabalhos de Löscher e colaboradores, a dose de 5 mg/Kg não afetou o limiar nas crises induzidas por eletrochoque e no modelo do abrasamento, no entanto reduziu a intensidade das mesmas. O efeito protetor do L-deprenil também se manifestou através da inibição das crises tônicas e da mortalidade. Löscher e Lehmann, estudando estes mesmos parâmetros nos modelos do eletrochoque supra-máximo e do pentilenotetrazol (PTZ), não observaram proteção com doses de até 40 mg/kg, i.p., de L-deprenil. Parece, então, que as crises induzidas pela pilocarpina são mais sensíveis ao efeito protetor do L-deprenil, uma vez que neste modelo a proteção apareceu com uma dose relativamente mais baixa da droga.

Contudo, neste estudo, a dose de 10 mg/kg, também apresentou um certo efeito protetor, quando foi avaliado o parâmetro latência para o EME. Esta também foi a dose mais efetiva nos modelos de determinação do limiar frente ao eletrochoque e ao PTZ.^{53,54}

Embora o L-deprenil seja um inibidor irreversível seletivo da MAO-B, ainda não está claro se o seu efeito anticonvulsivante se deve a inibição desta atividade enzimática e conseqüente aumento dos níveis de noradrenalina e dopamina.

Löscher e Lehmann relatam que o L-deprenil, na dose de 10 mg/kg (i.p.) não apresentou efeito anticonvulsivante em camundongos, quando foi administrado durante 4 semanas, uma vez por dia, a tarde. Nas manhãs seguintes era determinado o limiar das crises mioclônicas induzidas pelo PTZ (i.v.).⁷⁴ Este fato vai contra o papel da irreversibilidade da inibição da MAO-B como uma explicação para o efeito anticonvulsivante do L-deprenil, observado nos trabalhos anteriores, já que a administração crônica, que certamente levou a uma completa e prolongada inibição da enzima, falhou em induzir tal proteção. Sabe-se que a meia-vida de recuperação da MAO, após sua inibição pelo L-deprenil, é de 8 a 12 dias⁷⁵.

No mesmo trabalho anteriormente citado, Löscher e Lehmann, relataram que a administração contínua do L-deprenil, através de uma minibomba osmótica subcutânea, determinou um progressivo aumento no limiar das crises. Assim, parece haver um efeito reversível do L-deprenil, não relacionado à inibição da MAO-B, que está envolvido na sua ação anticonvulsivante.⁷⁴

Heinonen e colaboradores e Knoll e colaboradores demonstraram que o L-deprenil estimula a liberação de dopamina e noradrenalina primariamente pela ativação de potenciais de ação dos neurônios catecolaminérgicos.^{76,77} Já em 1988, Turski e colaboradores, relataram que a estimulação dopaminérgica da substância negra e do estriado protegia os animais das crises induzidas pela PILO (período agudo do modelo da pilocarpina). Demonstraram, portanto, que a transmissão dopaminérgica na substância negra e no corpo estriado tem importância no controle inibitório do sistema neuronal envolvido na propagação da atividade motora epiléptica.⁷⁷

Mais recentemente, apareceram evidências de que a inibição seletiva da MAO-A teria, também, um potente efeito anticonvulsivante. Como em ratos e camundongos, doses a partir de 1 mg/kg de L-deprenil passam a apresentar uma ação não seletiva, bloqueando tanto a MAO do tipo A quanto a do tipo B, sugere-se, então, que a MAO-A estaria assim envolvida no efeito anticonvulsivante desta droga.^{53,54,74}

Com base em todas estas informações, o efeito anticonvulsivante do L-deprenil, na dose de 5 mg/kg, i.p., poderia ser explicado por dois mecanismos: (1) por uma ação direta sobre a liberação de catecolaminas; e (2) pelo bloqueio da MAO-A e MAO-B e conseqüente aumentando o tônus catecolaminérgico. Ambos, os mecanismos, estimulando a modulação inibitória dopaminérgica no hipocampo.

6. CONCLUSÃO

Este estudo nos permite as seguintes conclusões:

- 1 - A manipulação dos animais durante o período de tratamento, foi um fator desencadeante de crises;
- 2 - Tanto a CBZ como o VPA protegem os animais da expressão das crises desencadeadas pela manipulação;
- 3 - O tratamento com CBZ ou VPA, durante o período de latência do modelo da pilocarpina, não impede o desenvolvimento da epileptogenicidade;
- 4 - O padrão histológico da formação hipocampal em ambos os grupos de tratamento (CBZ e VPA) e a redução da incidência de crises no grupo tratado com VPA, sugerem que ambas as drogas, mas em especial o VPA, embora não impedindo o desenvolvimento da epileptogênese, minimizaram as alterações estruturais e a expressão das crises ;
- 5 - O L-deprenil, na dose de 5mg/kg, apresenta um efeito anticonvulsivante sobre as crises induzidas pela pilocarpina, no período agudo do modelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gerreiro CAM, Guerreiro MM. *Epilepsia*. São Paulo: Lemos Editorial, 1996: 1.
2. Ohtahara S, Oka E, Yamatogi Y. A epidemiologia da epilepsia. *B. J. E. C. N.* 1998; 4: 13-19.
3. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Prevalence of epilepsy in Rochester, Minnesota: 1940-1980. *Epilepsia*. 1991; 32: 429-445.
4. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. *Epilepsia*. 1981; 22: 489-501.
5. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndrome. *Epilepsia*. 1989; 30: 389-399.
6. Yacubian EMT, Garzon E, Sakamoto AM. *Vídeo-eletroencefalografia. fundamentos e aplicações na investigação da epilepsias*. São Paulo: Lemos Editorial, 1999: 73.
7. Palmine ALF. Padrões eletroclínicos e neuro-radiológicos nas epilepsias do lobo temporal e frontal refratárias ao tratamento medicamentoso: critérios de seleção e prognóstico de tratamento cirúrgico. *J. L. B. E.* 1991; 4: 23-35.
8. Meldrum BS, Bruton CJ. Epilepsy. In: *Greenfield's Neuropathology*. New York: L. W. eds, 1992: 12: 46-83.
9. Knowles WD. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *J. Clin. Neurophysiology*. 1992; 9: 252-263.
10. Witter DGAM. Hippocampal formation. *The rat nervous system*. New York: Academic Press, 1995: 443-485.
11. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York: Academic press, 1998.

12. Mello LEAM, Cavalheiro EA, Finch DM. Circuit mechanisms of seizure in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsy*. 1993; 34: 985-995.
13. Rafiki A, BenAri Y, Khrestchatisky M, Represa. Long lasting enhanced expression in the rat hippocampus of NMDA splice variants in a kainate model of epileps. *Eur. J. Neurosci*. 1998; 10: 497-507.
14. Meldrum BS. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology*. 1994; 44: S14-S23.
15. Cotman CW, Monaghan DT, Otterson OP, Storm-Mathisen J. Anatomical organization of excitatory aminoacid receptor and their pathways. *T.I.N.S.* 1987; 10: 273-80.
16. Auer RN, Siego BK. Biological differences between ischemia, hipoglicemia and epilepsy. *Ann. Neurol*. 1988; 24: 699-707.
17. Siego BK. Calcium, excitotoxins and brain damag. *N.I.P.S.* 1990; 5: 120-5.
18. Coutinho LMB, Hilbig A, Calgagnotto EC, Costa JC, Paglioli EB, Palmine . Neuropatologia da epilepsia de dificil controle: estudo de 300 casos consecutivos. *Jornal. Bras. Neurocirug*. 1998; 9: 119-120.
19. Sagar HJ, Oxbury JM. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsion. *Ann. Neurol*. 1987; 22: 334-340.
20. GrattenSmith JD, Harvey AS, Desmond PM, Chow CW. Hippocampal sclerosos in children with intractable temporal lobe epilepsy: Detection with MR imaging. *A . J. R.* 1993; 161: 1045-1048.
21. VanLandingham KE, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febril convulsions. *Ann. Neurol*. 1998; 43: 413-426.
22. Fernández G, Effenberger O, Viniz B, Steinlein O, Elger CE, Döhring W, Heinze HJ. Hippocampal malformation as a cause of familial febril convulsions and subsequent hippocampal sclerosis. *Neurology*. 1998; 50: 909-917.
23. Annegers JF, Hauser WA, Shirts SB, Kurland LT. Factores prognostic of unprovoked seizure after febril convulsions. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316:493-498.

24. Kälviäinen R, Salmenperä T, Partanen K, Vainio P, Riekkinen P, Pitkänen A .
Recurrent seizure may cause hippocampal damage in temporal lobe epilepsy.
Neurology. 1998; 50: 1377-1382.
25. Löscher W, Schmidt D. Which animal should be used in the search for new
antiepileptic drug ? A proposal based on experimental and clinical
considerations. *Epilepsy Res*. 1988; 2: 145-181.
26. Girgis M. Kindling as a model for limbic epilepsy. *Neuroscience*. 1981; 6:
1695-1706.
27. Sato M, Racine RJ, Mcintyn DC. Kindling: basic mechanisms and clinical
validity. *Electroenceph. Cl. Neurophys*. 1990; 76: 459-472.
28. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinroh Z, Turski L.
Limbic seizure produced by pilocarpine in rats: a behavioral
electroencephalographic and neuropathological study. *Behav. Brain. Res*. 1983; 9:
315-335.
29. Cavalheiro EA, Leite JP, Bortolotto ZA, Turski WA, Ikonomidou C, Turski L.
Long term affects of pilocarpine in rats: structural damage of brain triggers
kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia*. 1991; 32: 778-782.
30. Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recorrent seizure in rats:
an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci. Biobehav. Res*. 1990; 14:
511-7.
31. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital. J. Neurol. Sci*. 1995; 16:
33-7.
32. Lemos T, Cavalheiro EA. Suppression of pilocarpine induced status epilepticus
and the late development of epilepsy in rats. *Exp. Brain. Res*. 1995; 102: 423-
428.
33. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic
recurrent excitation of granule cells by mossy fibers in human epileptic
hippocampus. *Neuroscience*. 1991; 42: 351-63.
34. Tauck DL, Nadler JV. Evidence of funcional mossy fiber sprouting in
hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J. Neurosci*. 1985; 5: 1016-22.

35. Sutula T, Cascino G, Cavazo J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann. Neurol.* 1989; 26: 321-30.
36. Löscher W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. *Euro. J. Pharmacol.* 1998; 342: 1-13.
37. McDonald RL, Kelly KM. Antiepileptic drug mechanisms of action. *Epilepsia.* 1995; 36: S2-S12.
38. Macdonald RL, Meldrum BS. Principles of antiepileptic drug action. *Antiepileptic Drugs.* New York: Raven Press, 1995: 61-78.
39. Upton N. Mechanisms of action of new antiepileptic drugs: rational designs and serendipitous findings. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1994; 15: 456-463
40. White HS. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drug. *Epilepsia.* 1997; 38: S9-S17.
41. Michael RP, Suzan N. Mechanism of action of antiepileptic and antimyoclonic drugs. *Negative motor phenomena.* Philadelphia: Lippincott. Raven Publishers, 1995: 329-360.
42. Brodie MJ, Dichter MA. Antiepileptic drug. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 168-175.
43. Dichter MA, Brodie MJ. New antiepileptic drugs. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 1583-1590.
44. Meldrum BS. Update on the mechanism of action of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 1996; 37: S4-S11.
45. Marson AG, Kadir ZA, Hutton JL, Chadwick DW. The new antiepileptic drugs: a systematic review of their efficacy and tolerability. *Epilepsia.* 1997; 38: 358-380.
46. Turski WA, Cavalheiro EA, Coimbra C, Berzaghi MP, Turski CI, Turski L. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. *Brain. Res. Ver.* 1987; 12: 281-305.
47. Leite JP, Cavalheiro EA. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy. Res.* 1995; 20: 93-104.

48. Cockerell OC, Shorvon SD. *Epilepsia. Conceitos Atuais*. São Paulo: Lemos Editora, 1997: 58-60.
49. Trindade Filho, E. *Epilepsia e monoaminas: estudo através do modelo experimental induzido pela pilocarpina*. São Paulo: Universidade Federal do Estado de São Paulo, 2000. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado de São Paulo, 2000.
50. Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Effect of DSP4 on hippocampal kindling in rats, *Pharmacol Biochem Behav.* 1986; 24: 77-79.
51. Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffah M. Spontaneous recurrent seizure in rats: amino acids and monoamine determinations in the hippocampus. *Epilepsia* 1994; 35: 1-11.
52. Dailey JW, Yan Q, Adams-Curtis LE, Mishra PK, Jobe PC. Neurochemical correlates of antiepileptic drugs in the genetically epilepsy-prone rat (GEPR). *Life. Sc.* 1996; 58: 259-266.
53. Löscher W, Dagmar Hönack. Anticonvulsant and antiepileptogenic effect of L deprenyl (selegiline) in kindling model of epilepsy. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1995; 273: 307-314.
54. Löscher W, Lehmann. L deprenyl (selegiline) exerts anticonvulsant effects against different seizure types in mice. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1996; 277: 1410-1417.
55. Hu KS, Huang CC, Su MT, Tsai JJ. Ldeprenyl (selegiline) decreases excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal via dopaminergic mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1996; 279: 740-747.
56. Suppes T, Kriegstein AR, Prince DA. The influence of dopamine on epileptiform bursts activity in hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 1985; 326: 273-280.
57. Baretta N, Berton F, Bianchin R, Capogna M, Francesconi W, Bruneli M. Effects of dopamine D1 and D2 dopaminergic agonists on the excitability of hippocampal CA1 pyramidal cell in guinea pig. *Exp. Brain. Res.* 1990; 83: 124-130.

58. GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical test, 1998, GraphPad Software, Inc., San Diego California USA.
59. Meldrum BS. Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pathol.* 1993; 3: 404-412.
60. Cavazos JE, Das I, Sutula TP. Neuronal loss induced in limbic pathways by kindling: evidence for induction of hippocampal sclerosis by repeated brief seizure. *J. Neurosci.* 1994; 14: 3106-3121.
61. Silver JM, Shin C, McNamara O. Antiepileptic effects of conventional anticonvulsants in the kindling model of epilepsy. *Ann. Neurol.* 1991; 29: 33-38.
62. Shorvon S, Dreifuss F, Fish D, Thomas D. *The treatment of epilepsy.* London: Oxford, 1996:123-130.
63. Moshé SL, Garant DS, Sperber EF, Velísková J, Kubavá H, Brow L. Ontogeny and topography of seizure regulation by the substantia nigra. *Brain Develop.* 1995; 17: 61-72.
64. Pitkänen A, Holonen T. Prevention of epilepsy. *TiPS.* 1998; 19: 253-254.
65. Hernandez TD. Preventing post traumatic epilepsy after brain injury: weighing the cost and benefits of anticonvulsant prophylaxis. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1997; 18: 59-62.
66. Fisher PD, Sperber EF, Moshé SL. Hippocampal sclerosis revisite. *Brain Development.* 1998; 20: 563-573.
67. Gratten Smith JD, Harvey AS, Desmond PM, Chow CW. Hippocampal sclerosis in children with intractable temporal lobe epilepsy: detection with MR imaging. *A. J. R.* 1993; 161: 1045-1048.
68. Nohri V, Lee N, Tien RD, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal sclerosis in progression: a case report. *Epilepsia.* 1994; 35: 1332-1336.
69. Vanlandingham KA, Heinz ER, Cavazos JE, Lewis DV. Magnetic resonance imaging evidence of hippocampal injury after prolonged focal febrile convulsions. *Ann. Neurol.* 1998; 43: 413-426.

70. Thomsen C, Dalby NO. Role of metabotropic glutamate receptor subtypes in modulation of pentylenetetrazole induced seizure activity in mice. *Neuropharmacol.* 1998; 37: 1465-1475.
71. Biggs CS, Pearce BR, Fowler LJ, Whitton PS. The effect of sodium valproate on extracellular gaba and other aminoacids in the rat ventral hippocampus: an in vivo microdialysis study. *Brain Research.* 1992; 594: 138-142.
72. Legido A, Clancy RR, Berman PH. Neurologic outcome after electroencephalographically proven neonatal seizure. *Pediatrics.* 1991; 88: 583-595.
73. Weiss GH, Feeney DM, Caveness WF. Prognostic factors for the occurrence of posttraumatic epilepsy. *Arch. Neurol.* 1993; 40: 7-10.
74. Löscher W, Lehmann H. Anticonvulsant efficacy of L deprenil (selegiline) during chronic treatment in mice: continuous versus discontinuous administration. *Neuropharmacol.* 1998; 37: 1587-1593.
75. Celada P, Artigas F. Plasma 5 - hydroxyindoleacetic acid as an indicator of monoamine oxidase - A inhibition in rat brain and peripheral tissues. *J. Neurochem.* 1993; 61: 2191-2198.
76. Heinonen EH, Anttila MI, Lammintausta RAS. Pharmacokinetic aspects of L-deprenil (selegiline) and its metabolites. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1994; 56: 742-749.
77. Knoll J, Miklya I, Knoll B, Marko R, Kelemen K. (-) deprenyl and (-) 1 - phenyl-2-propylaminopentane act primarily as potent stimulents of action potential transmitter release coupling in the catecholaminergic neurons. *Life Sci.* 1996; 58: 817-827.
78. Turski L, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Ikonomidou- Turski, Kleinrok Z, Turski WA. Dopamine sensitive anticonvulsant site in the rat striatum. *J. Neuroscience.* 1988; 8: 4027-4037.