**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
LABORATÓRIO DE NEUROANATOMIA E NEUROPSICOBIOLOGIA
ÁREA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA**

MARCELO MENDONÇA DOS SANTOS

Envolvimento de aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário e de vias noradrenérgicas do *locus coeruleus* no controle de convulsões e da antinocicepção pós-ictal em um modelo experimental de crises convulsivas tônico-clônicas

RIBEIRÃO PRETO – SP

2017

MARCELO MENDONÇA DOS SANTOS

Envolvimento de aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário e de vias noradrenérgicas do *locus coeruleus* no controle de convulsões e da antinocicepção pós-ictal em um modelo experimental de crises convulsivas tônico-clônicas

Dissertação apresentada à Área de Pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:
Neurologia/Neurociências.**

**Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne
Coimbra**

RIBEIRÃO PRETO – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dos Santos, Marcelo Mendonça.

Envolvimento de aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário e de vias noradrenérgicas do *locus coeruleus* no controle de convulsões e da antinocicepção pós-ictal em um modelo experimental de crises convulsivas tônico-clônicas. p. número de páginas 81. 2017.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra

1. Epilepsia. 2. Crises convulsivas. 3. Analgesia pós-ictal. 4. NMDA. 5. Núcleo do Trato Solitário. 6. Locus coeruleus. 7. Sistema noradrenérgico

Nome: Dos Santos, Marcelo Mendonça.

Título: Envolvimento de aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário e de vias noradrenérgicas do *locus coeruleus* no controle de convulsões e da antinocicepção pós-ictal em um modelo experimental de crises convulsivas tônico-clônicas.

Dissertação apresentada à Área de Pós-graduação em Neurologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:
Neurologia/Neurociências.**

Aprovado em: _____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____
Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____
Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____
Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr. _____ **Instituição:** _____
Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

“A força de um guerreiro depende exclusivamente do tamanho de seu coração.”

Willian Wallace

DEDICATÓRIA

A todos que diretamente trabalharam para que este sonho meu se tornasse realidade, incentivando-me com amor, carinho e paciência, e que, independentemente dos obstáculos, estiveram sempre ao meu lado, lutando comigo.

Obrigado!!!

A meus avós, Armando e Ivonete (*in memoriam*). Agradeço-lhes por me ensinarem a cultivar minha essência em todas as situações que a vida me vem apresentando

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por Ele estar direcionando sempre meus passos.

Aos meus pais, Antônio e Wilma, pelo amor, preocupação, por ensinarem-me a superar os obstáculos, e por estarem sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra, por não somente me orientar no presente trabalho, mas também por ter me ensinado a superar as adversidades impostas pela vida com paciência, sabedoria, dedicação e amor. Meus sinceros agradecimentos e admiração pelo grande mestre que é. Todos os meus colegas de laboratório, os funcionários do departamento de farmacologia Marcos, Tadeu e Yeda que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho meu muito obrigado pelo carinho e companheirismo.... Enfim a todos.

RESUMO

Dos Santos, Marcelo Mendonça. Envolvimento de aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário e de vias noradrenérgicas do *locus coeruleus* no controle de convulsões e da antinocicepção pós-ictal em um modelo experimental de crises convulsivas tônico-clônicas.

Tem sido estabelecido que microinjeções intraperitoneais (i.p) de Pentilenotetrazol, um antagonista não competitivo dos receptores GABA_A, induzem crises convulsivas do tipo tônico-clônicas em animais de laboratório. Esse efeito convulsivante do PTZ ocorre devido ao bloqueio do fluxo de íons cloreto mediado pelo GABA. Adicionalmente, as crises convulsivas evocadas por PTZ em roedores são seguidas por antinocicepção. Tem sido sugerido que a estimulação elétrica do nervo vago pode reduzir as crises convulsivas e muitas das aferências do nervo vago ao núcleo do trato solitário (NTS) usam o glutamato como neurotransmissor. Há trabalhos mostrando que o NTS conecta-se ao núcleo reticular paragigantocelular (PGi), uma estrutura também responsável pela elaboração de pelo menos parte da antinocicepção pós-ictal, que o PGi projeta-se ao locus coeruleus, cuja estimulação também produz efeito anticonvulsivante e antinociceptivo.. Com intuito de investigar a participação do NTS nas crises convulsivas e na antinocicepção pós-ictal mediado por receptores glutamatérgicos locais do tipo NMDA e neurônios noradrenérgicos (NE) do LC, microinjeções de agonistas e antagonistas NMDA foram feitas no NTS, seguida da administração de PTZ por via i.p. Em adição foi investigado os efeitos da lesão neurotóxica do LC com administrações por via intratecal de DSP-4, seguidas por microinjeções de NMDA no NTS sobre as crises convulsivas e antinocicepção pós-ictal induzidas por injeções de PTZ por via i.p. O bloqueio ionóforo de canais de cloreto ligado ao GABA causou crises convulsivas

tônico-clônicas seguidas antinocicepção pós-ictal em todos os animais submetidos ao presente trabalho. Tanto as convulsões como a antinocicepção pós-ictal mostraram-se parcialmente dependentes da atividade de vias mediadas por aminoácidos excitatórios no núcleo do trato solitário, como da integridade do sistema noradrenérgico, pois o bloqueio de receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA no NTS e a administração intratecal de uma neurotoxina seletiva para neurônios noradrenérgicos alteraram a gravidade das crises tônico-clônicas e a intensidade da analgesia pós-ictal. Esses dados sugerem que o sistema glutamatérgico aferente ao NTS e tanto as vias noradrenérgicas ascendentes como descendentes do locus coeruleus são relevantes para o controle das atividades convulsivas e da antinocicepção pós-ictal

ABSTRACT

Dos Santos, Marcelo Mendonça. *Involvement of glutamatergic inputs to the nucleus of the tractus solitarius and noradrenergic pathways of the locus coeruleus in the control of seizures and post-ictal antinociception in an experimental model of tonic-clonic seizures .*

Intraperitoneal injections of the non-competitive GABA_A receptor antagonist pentylenetetrazole (PTZ) induce tonic-clonic seizures in laboratory animals. The convulsive effect of PTZ is due to GABA-mediated Cl⁻ influx blockade. In addition, seizures caused by PTZ in rodents are followed by significant antinociception. The electrical stimulation of the vagus nerve is known to reduce seizures and several inputs from nervus vagus to the nucleus of the tractus solitarius (NTS) use glutamate as neurotransmitter. There are reports showing that the NTS is connected to the nucleus reticularis paragigantocellularis (PGi), a ventromedial medulla oblongata structure also related to the elaboration of at least part of the post-ictal antinociception, and the PGi sends outputs to the locus coeruleus, whose stimulation also causes both anticonvulsant and antinociceptive effects. The goal of the present work was to investigate the involvement of the NTS in both seizures and post-ictal antinociception control mediated by NMDA receptors as well as the role played by noradrenergic neurons from locus coeruleus (LC). Either NMDA agonists or antagonists were microinjected in the NTS, followed by i.p. PTZ injections. In addition, it was investigated the effects of LC neurotoxic lesions with intrathecal injections of DSP-4, followed by NMDA receptor agonists microinjections in the NTS, on both tonic-clonic seizures and post-ictal antinociception elicited by peripheral administrations of PTZ. The ionophore blockade of GABA-mediated Cl⁻ influx caused tonic-clonic seizures followed by significant post-

ictal antinociception in all animals submitted to the present work. Both tonic-clonic seizures and the post-ictal antinociception were partially dependent of the neural activity of excitatory aminoacid-mediated neurotransmission in the NTS of seizing Wistar rats in addition to the integrity of noradrenergic system, since the NMDA receptors blockade in the NTS and the intra-theccal administration of DSP-4. The neurotoxin selective to LC noradrenergic neurons modified the severity of tonic-clonic seizures and the intensity of post-ictal antinociception. These findings suggest that the glutamatergic inputs to the NTS, in addition to ascending and descending noradrenergic pathways from LC are critical to the control of both seizures and post-ictal antinociception.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 OBJETIVOS.....	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4 RESULTADOS.....	51
5 DISCUSSÃO.....	64
6 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS.....	71

Introdução

1 INTRODUÇÃO

EPILEPSIA

As epilepsias são desordens crônicas do cérebro, caracterizadas pela ocorrência de crises convulsivas, as quais são eventos de hiperativação e sincronização de grupos de neurônios, levando a alterações motoras, sensoriais, autonômicas e comportamentais (Stafstrom, 2006; Cunha *et al.*, 2009). De acordo com a Liga Internacional de Combate à Epilepsia (ILAE), existem diferentes tipos desta síndrome, cujos diagnósticos devem ser elaborados considerando-se aspectos morfológicos, eletroclínicos, genéticos e metabólicos (Berg *et al.*, 2010 - ILAE, 2009).

Com o avanço da compreensão dos sistemas de neurotransmissores, a partir da década de 70, surgiu a hipótese de que disfunções no sistema GABAérgico seriam responsáveis pelo desencadeamento e manutenção da atividade elétrica exacerbada e hiperassíncrona do cérebro, o que levaria a geração de crises convulsivas (Meldrum, 1975). Juntamente com a hipótese GABAérgica, surgiram inúmeras drogas GABA-miméticas, sobretudo aquelas com ação no receptor ionotrópico GABA_A associado a um canal de Cl⁻. A ativação desses receptores culmina no influxo de íons de cloreto, hiperpolarização do neurônio pós-sináptico e concomitante inibição da propagação de potencial de ação.

A partir da década de 90, com os avanços da biologia molecular e clonagem de vários receptores, o neurotransmissor excitatório glutamato e seus receptores, sobretudo os ionotrópicos do tipo NMDA, AMPA e kainato, passaram a ser considerados alvos na pesquisa de novos fármacos anticonvulsivantes (Czapinski *et al.*, 2005; Stefan e Feuerstein, 2007). Na epilepsia, a ativação dos receptores do ácido glutâmico (L-Glu) parece estar bastante envolvida com a iniciação e manutenção da atividade epilética.

Nos últimos anos, tem sido aceito que a quebra do equilíbrio entre sistemas de neurotransmissores excitatórios e inibitórios pode estar subjacente ao desencadeamento das desordens epiléticas. Portanto, os alvos sinápticos das novas drogas antiepiléticas envolvem receptores, transportadores, canais iônicos e enzimas do metabolismo neural, cuja inibição ou exacerbação das atividades pode resultar no controle das crises convulsivas (Ängehagen *et al.*, 2004).

Além do GABA e do glutamato, alterações em outros neurotransmissores podem estar associadas ao desencadeamento de crises convulsivas, constituindo, portanto, alvos para atuação de anticonvulsivantes. Entre estes outros sistemas, encontram-se aqueles mediados por monoaminas.

Neste sentido, Lazarova e Samanin (1983) demonstraram que a depleção seletiva de noradrenalina no prosencéfalo, potencia crises convulsivas geradas por muitos convulsivantes químicos. Além disso, a lesão seletiva de neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos de ratos reduz a eficiência da estimulação vagal no bloqueio das crises convulsivas induzidas por PTZ e por eletrochoque (Browning *et al.*, 1997). A injeção de noradrenalina sistemicamente, por sua vez, suprime crises convulsivas induzidas por PTZ (Krahl *et al.*, 2000).

O envolvimento de alterações na liberação de serotonina na geração de crises convulsivas tem sido cada vez mais demonstrado em diversos modelos experimentais e em análises com tomografia de emissão de pósitrons (PET) utilizando [¹⁸F]FCWAY, um antagonista silencioso dos receptores 5-HT_{1A} (Theodore, 2006).

Alguns estudos mostram que a ativação de receptores do tipo 5-HT_{1A} promove hiperpolarização da membrana através do aumento da condutância do potássio, levando a efeitos anticonvulsivantes *in vivo* (Wada *et al.*, 1992), assim como diminuição da atividade elétrica epileptiforme em fatias de cérebro de ratos (Salgado e Alkadhi, 1995).

1.1.2 MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA O TRATAMENTO DA EPILEPSIA REFRATÁRIA À FARMACOLOGIA (HEMISFERECTOMIA/HEMISFEROTOMIA, & TÉCNICAS DE ESTIMULAÇÃO DO NERVO VAGO)

Em 1983, Rasmussen publicou trabalho em que descrevia sua elegante técnica de desconexão hemisférica associada a pequenas ressecções. Desde então, várias técnicas foram desenvolvidas, como a hemidescorticação parassagital (Delalande), trans-silviana (Schramm), e peri-insular (Villemure). A técnica cirúrgica a ser escolhida dependerá da conformação do cérebro patológico, e também da familiaridade e experiência da equipe cirúrgica com o procedimento neurocirúrgico de escolha. A não ser em casos selecionados, em nosso campus tem sido empregada a hemisferotomia funcional peri-insular descrita por Villemure, que envolve a ressecção do opérculo frontoparietal, acesso ao ventrículo lateral para calosotomia completa, desconexão frontal e fornixectomia, ressecção temporal mesial e corticectomia da ínsula. A hemisferectomia é o procedimento cirúrgico de escolha para os casos de encefalite de Rasmussen, hemimegalencefalias, atrofias e prosencefalias hemisféricas, sequelas de isquemia de troncos arteriais, dentre outras patologias.

A ideia de estimular o nervo vago para bloqueio de crises epiléticas foi inicialmente concebida há cerca de 100 anos pelo neurologista americano Leonard Corning (1855-1923). Corning baseou-se na hipótese de que o fluxo de sangue anormal para o cérebro seria responsável pelo desencadeamento das crises convulsivas. A técnica de Corning foi, no entanto, abandonada pelos neurologistas da época, permanecendo esquecida até os trabalhos de Jacob Zabara, realizados com cachorros, na década de 80. Em um desses trabalhos, Zabara e colaboradores (1985) demonstraram

que crises convulsivas induzidas pela aplicação de estriquinina eram abolidas pela estimulação repetida do nervo vago de cães.

Além deste, vários estudos demonstraram que a estimulação vagal reduz a frequência e severidades das crises, reduz os disparos interictais em diversos modelos experimentais de epilepsia, além de interferir na progressão do abrasamento elétrico do complexo amigdalóide (Lockard *et al.*, 1990; Woodbury e Woodbury, 1990; McLachlan, 1993 e Fernandez-Guardiola *et al.*, 1999).

Desde então, a estimulação vagal tem gradativamente se tornado uma opção terapêutica a ser considerada no tratamento de um amplo espectro de síndromes epiléticas, para controle de crises convulsivas refratárias ou resistentes a medicamentos (Lulicet *al.*, 2009; Terra *et al.*, 2012). O sucesso do procedimento tem sido atribuído à eficiência no controle de crises convulsivas onde a terapia com medicamentos antiepiléticos tem falhado, com um índice mínimo de efeitos colaterais e uma melhora considerável na qualidade de vida dos pacientes (Ben-Menachem, 2002).

www.tdtonline.org (hemisferectomia)

Figura 1 Procedimento neurocirúrgico que remove ou desconecta o Córtex Cerebral epileptogênico de um hemisfério, geralmente realizado em pacientes com epilepsia unilateral sem tratamento devido a malformações do desenvolvimento cortical ou lesões encefálicas.

Figura 2. Eletrodo de estimulação vagal implantado no nervo vago esquerdo de um paciente.

Em detalhe, pode-se observar que os eletrodos envolvem o nervo vago (pontas de flecha) e são conectados a fios subcutâneos que trazem os estímulos de um gerador (Modificado de Ben-Menachem, 2002).

Após o pós-operatório do implante dos eletrodos e gerador, a estimulação é iniciada. Esta consiste em pulsos elétricos de intensidade, duração e frequência estabelecidos pelo médico, os quais são administrados em intervalos pré-estabelecidos de modo semelhante a um marca-passo cardíaco. Além disso, através de uma pulseira magnética no braço, o paciente pode ser orientado a ativar estímulos elétricos adicionais quando da presença de auras, interrompendo o desencadeamento da crise (Lulic *et al.*, 2009).

Devido ao perfil de segurança, o uso da terapia de estimulação vagal tem sido incentivado em crianças epiléticas, uma vez que as drogas antiepiléticas existentes induzem uma série de alterações cognitivas que afetam diretamente o desenvolvimento da criança. Atualmente, existem no mundo cerca de 10,5 milhões de crianças abaixo de 15 anos com algum tipo de epilepsia, o que representa 40% de todas as pessoas epiléticas (Guerrini *et al.*, 2006). Algumas evidências têm mostrado que a estimulação vagal pode ser eficiente como coadjuvante no tratamento de epilepsias generalizadas, epilepsias generalizadas idiopáticas refratárias, síndrome de Lennox-Gastaut e outras desordens resistentes a anticonvulsivantes que atingem a população pediátrica (Buoni *et al.*, 2004; Lulic *et al.*, 2009).

SUMÁRIO DAS PRINCIPAIS SÍNDROMES EPILÉPTICAS DA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA

Com efeito, a epilepsia na faixa etária pediátrica apresenta-se mais complexa, podendo coexistir, em um só paciente, crises tônicas ou clônicas, crises de ausência, crises generalizadas ou parciais complexas. Crises generalizadas podem ter início focal e serem assim passíveis de tratamento cirúrgico curativo. A maioria dos pacientes encaixa-se em uma das diversas síndromes epiléticas descritas . A partir disso, é possível, conseguintemente, avaliar a indicação de tratamento cirúrgico.

1.1.3 Considerações anatômicas e mecanismo da supressão de crises pela estimulação do nervo vago

Desde a aprovação para uso em seres humanos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 1997, a estimulação vagal tem sido utilizada como terapia adjuvante para o tratamento de epilepsias refratárias a medicamentos em pacientes não candidatos à cirurgia. Apesar do amplo uso e dos resultados obtidos com a terapia, os trabalhos realizados até o momento, não conseguiram estabelecer o mecanismo exato através do qual a estimulação do nervo vago produz efeito anticonvulsivante.

O nervo vago ou pneumogástrico, é um nervo misto que transmite informação sensorial aos centros encefálicos superiores e informação motora a diversos órgãos. As aferências vagais conduzem informação ao encéfalo através de três tipos de fibras (Atkinson e Labiner, 2007):

- (a)Fibras A – grande diâmetro, mielinizadas;
- (b)Fibras B – diâmetro intermediário, mielinizadas;
- (c)Fibras C – diâmetro pequeno, não mielinizadas.

Oitenta por cento destas aferências são axônios de neurônios cujos corpos localizam-se nos gânglios superior e inferior do nervo vago, que penetram o sistema nervoso central através do forame jugular e fazem sinapse com neurônios do núcleo do trato solitário (NTS) na região da medula oblonga. As fibras restantes fazem sinapse com neurônios do núcleo dorsal do nervo vago e neurônios do núcleo cuneado na área *postrema*. Os neurônios do NTS, por sua vez, se projetam para estruturas do tronco encefálico e para estruturas cerebrais superiores, dentre as quais se encontram o tálamo, o hipotálamo, o complexo amigdalóide e o córtex insular. As fibras aferentes vagais possuem sinapses excitatórias, as quais liberam glutamato e aspartato; além das fibras inibitórias mediadas por GABA, há fibras colinérgicas e neuropeptidérgicas.

A maioria das sinapses dos neurônios do NTS com núcleos do tronco encefálico são observadas no *locus coeruleus* e núcleo dorsal da rafe, modulando a liberação de noradrenalina e serotonina, respectivamente. Estes neurotransmissores exercem efeitos sobre centros límbicos, reticulares e autonômicos em ambos os hemisférios (figura 2).

(Fornai et.al 2011)

Figura 2. Vias através das quais o nervo vago provavelmente exerce controle sobre o córtex cerebral. Aferências vagais passam pelo núcleo do trato solitário (NTS) para o *locus coeruleus* (LC) via núcleo paragigantocelular (PGi) e núcleo prepósito do hipoglosso (Prep). Neurônios noradrenérgicos (NE) do LC projetam-se para o córtex, tálamo e núcleo dorsal da rafe (DRN). Os neurônios dos núcleos do DRN fazem então sinapses glutamatérgicas e serotoninérgicas (GLU e 5HT) com neurônios corticais (Extraído de Fornai *et al.*, 2011).

1.1 COMORBIDADE EPILEPSIA E DOR

Dor

A Associação para o Estudo da Dor (IASP,1994) definiu a dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou de fato ou ainda, descrita em termos que sugerem tal dano”.

Para animais, ZIMMERMANN (1996) redefiniu a dor como um experiência sensorial aversiva causada por uma lesão potencial ou real que promove vigorosas reações motoras reflexas, respostas neurovegetativas e comportamento de defesa, podendo modificar comportamentos específicos da espécie, assim como comportamento social.

Alguns autores defendem que a dor seria o termo mais adequado a ser utilizado para o Homem, enquanto a nocicepção seria o termo mais adequado para citar em modelos experimentais (NOBACK e COLS., 1996). O termo nocicepção refere-se à percepção do estímulo capaz de produzir lesão tecidual ou reação ao organismo (STOLL & GREENE,1959).

Segundo SNEDDON (2003) a ACHAVAL e cols.(2005) esses estímulos são captados pelas terminações nervosas livres e codificam sinais para fornecer informação ao sistema nervoso central (SNC) da existência de injúria tissular associada a um estímulo nocivo.

Além disso, existem dois componentes da dor: o primeiro é o sensitivo-discriminativo que nos permite distinguir, por exemplo, entre temperaturas nocivas e inócuas à pele, além da localização precisa do estímulo; o segundo é o motivacional-afetivo que está relacionado às reações emocionais (medo e ansiedade), e

neurovegetativas (sudorese, taquicardia, hipotensão), evocadas segundo fatores inatos de cada espécie, aprendizagem e memória (BRANDÃO, 2001).

1.2 Analgesia e as Vias Descendentes Inibitórias da Dor

Um importante componente do organismo em situações de emergência é a redução da capacidade de perceber a dor (COIMBRA e cols.,1992; MENESCAL de Oliveira & HOFFMMANN, 1993; COIMBRA & BRANDÃO, 1997; COIMBRA e COLS.,2006; FREITAS e cols.,2009b).

O indivíduo exposto a situações de perigo iminente, tais como aquelas que envolvem a presença de predadores, ou em que é imprescindível a mobilização de mecanismos de defesa, de dominância ou de adaptação a situações extremas e ameaçadoras detectadas no ambiente, urge o recrutamento de algum sistema que module ou suprima a dor, pois as reações comportamentais recuperativas que seguem à percepção da dor seriam extremamente desvantajosas para sobrevivência do animal.

A dor promove um conjunto de reflexos de retirada, de fuga, retraimento, entre outros comportamentos recuperativos. Portanto, seria mais razoável que essas reações fossem suprimidas automaticamente em favor de respostas mais adaptativas. Se a resposta natural do organismo a situações de emergência inclui a redução na percepção de impulsos nociceptivos, parece plausível que esse sistema endógeno de inibição de dor seja recrutado em situações aversivas (COIMBRA, 1995; COIMBRA e cols., 2006).

Contudo, um animal pode ter algum membro lesado ou, até mesmo, despertar a atenção de predadores após evocação de comportamentos convulsivos. Todavia, a ativação de processos antinociceptivos nessas situações pode ser uma adaptação biológica importante de um animal em estado ictal ou pós-ictal.

As mesmas vias descendentes de inibição da dor que são recrutadas em situações de perigo iminente podem vir a ser ativadas na vigência de quadros convulsivos (COIMBRA e cols., 2001a, b; FELIPPOTTI, 2005; FERREIRA e cols., 2004, 2005, 2010; De OLIVEIRA e cols., 2006, 2009; ZANANDRÉA, 2007; FREITAS e cols., 2004, 2005, 2008, 2009a).

Por outro lado, não podemos afastar a possibilidade desse fenômeno antinociceptivo pós-ictal ser um achado fortuito em decorrência das ativações anômalas que ocorrem durante o processo convulsivo patológico.

A antinocicepção e a analgesia podem ser definidas como redução na resposta dos sistemas sensoriais aos estímulos nociceptivos, e há relatos de que a estimulação de determinadas estruturas cerebrais reduz a resposta dos neurônios sensoriais do corno posterior da medula espinal (CDME) (BASBAUM & FIELDS, 1978).

1.3 *Locus Coeruleus* e Antinociceção

O *locus coeruleus* (LC) apresenta distintos conjuntos de núcleos noradrenérgicos ventrolateralmente localizados em relação ao eixo mediano e tem relação de proximidade ao IV ventrículo no tegmento pontino (FOOTE et al., 1983). O LC projeta-se para muitos núcleos encefálicos, modulando, assim, suas funções (AMARAL & SINNAMON, 1977; JOBE et al., 1994, RYU et al., 1999, TSURUOKA et al., 2003; SAJEDIANFARD et al., 2005; VOISIN et al., 2005). Uma das mais importantes funções do LC é a modulação da dor, pois sua estimulação elétrica e química promove liberação espinal de norepinefrina (HENTALL et al., 2003) e antinociceção (JONES & GEBHART, 1986), que é atenuada pela administração espinal de antagonistas de receptores alfa-2 noradrenérgicos (JONES, 1991; PERTOVAARA, 2006; PROUDFIT, 1988). Porém, essa modulação pode ser realizada não somente por via descendente, mas também por via ascendente (VOISIN et al., 2005; ZHANG et al., 1997). Assim, a lesão bilateral deste núcleo promove aumento das respostas nociceptivas (TSURUOKA et al., 2002). As fibras noradrenérgicas do LC atingem o CDME e as fibras das áreas A5 e A7 alcançam motoneurônios das colunas ventral e ventrolateral da medula espinal (LYONS et al., 1989 & TSURUOKA et al., 2004). Curiosamente, os axônios do LC estão situados primeiramente no funículo ventral ipsilateral e terminam na parte medial das lâminas VII e VIII, fornecendo densa inervação à parte ventral da medula espinal e pouca inervação para o corno dorsal superficial (PROUDFIT & CLARK, 1991; YEOMANS et al., 1992). Os neurônios situados na divisão pontina do tronco encefálico onde se situa o LC atingem o CDME,

modulando estímulos nociceptivos através de receptores $\alpha 2$ -noradrenérgicos (LI & ZHAO, 1993; KING et al., 2005).

1.3.4 Antinociceção pós-ictal

O ácido gama-amino-butírico (AGAB, ou GABA; sigla em inglês) é um transmissor inibitório que está envolvido em diferentes mecanismos fisiológicos e comportamentais, incluindo atividade locomotora, comportamento de defesa induzido pelo medo, comportamento agressivo, comportamento sexual, humor, regulação de respostas cardiovasculares e térmica e da sensibilidade à dor. Em nível celular, o GABA tem sido envolvido no fenômeno de inibição pré-sináptica e na alteração da regulação da excitabilidade encefálica que ocorre na epilepsia (TSUITSUI et al., 1992; COIMBRA et al., 2001 a,b). A diminuição na neurotransmissão GABAérgica tem sido envolvida na etiologia de várias doenças neurológicas, como a epilepsia, pois a atividade desse sistema transmissor está anormalmente baixa nos indivíduos epiléticos (MANYAM et al., 1980). Crises epiléticas podem ser induzidas experimentalmente por inibição de enzimas que sintetizam o GABA ou por bloqueio de receptores GABAérgicos, por qualquer antagonista GABAérgico competitivo ou não competitivo, assim como o pentilenotetrazol (TSUITSUI et al., 1992; COIMBRA et al., 2001 a, b). O PTZ é um antagonista não competitivo GABAérgico que não interage diretamente com o receptor do GABA; mas sim, bloqueia o influxo de Cl^- mediado pelo GABA. A injeção sistêmica de PTZ provoca convulsões tônicas e tônico-clônicas em ratos (SCHOFIELD, 1987; De LIMA & RAE, 1990). O estado pós-ictal é uma consequência imediata das crises convulsivas (FISHER & SCHACHTER, 2000).

Em um estudo realizado em seres humanos observou-se que, durante o estado pós-ictal, os pacientes apresentam delírios e tornam-se agitados e agressivos (GERARD et al., 1998), além de apresentarem déficits cognitivos, como dificuldade de atenção e concentração (HELMSTAEDTER et al., 1994). Podem ocorrer, também, paresias pós-ictais, sinalizando a localização das crises no córtex motor contralateral (FISHER & SCHACHTER, 2000).

É correto afirmar que há participação do sistema endógeno de inibição, no período pós-ictal, inibindo ou diminuindo a nocicepção, visto que, após administração periférica de PTZ (64mg/kg, i.p.), houve aumento dos limiares nociceptivos no teste de retirada de cauda (teste de *tail-flick*) (COIMBRA et al., 2001 a, b). Sendo assim, o estudo do substrato neural e dos processos neuroquímicos que permeiam as crises convulsivas e os fenômenos encefálicos que ocorrem no período subsequente pode oferecer dados elucidativos sobre a organização da antinocicepção pós-ictal. Muitos núcleos do sistema endógeno de inibição de dor parecem também desempenhar um importante papel na antinocicepção que segue as crises convulsivas tônico-clônicas, como o núcleo magno da rafe (NMgR) e o complexo gigantocelular/paragigantocelular, pois a lesão desses núcleos ocasionou uma diminuição da analgesia induzida por crises convulsivas tônico-clônicas (De Oliveira et al., 2006), assim como ocorre após a diminuição de atividade do núcleo pré-tectal anterior (ZANANDRÉA, 2007), do LC (FERREIRA, 2005) e do núcleo central do colículo inferior (NCCI) (FELIPPOTTI, 2005).

O sistema opioide foi um dos primeiros sistemas neurais implicados na organização da antinocicepção pós-ictal, pois a administração periférica de naltrexone e de naloxonazine antagonizaram a antinocicepção induzida por crises convulsivas (COIMBRA et al., 2001, a,b). Não obstante, evidências sobre o relevante papel de vias

ou de estruturas noradrenérgicas na elaboração da antinocicepção pós-ictal foi igualmente relatado a posteriori (de Freitas et al., 2005; Felippoti e tal., 2011).

A hipótese deste trabalho é de que o sistema glutamatérgico aferente ao NTS e as vias noradrenérgicas do Lc estão implicadas no controle das crises convulsivas, por meio da conexão entre o nervo vago, o NTS, o PGi , o LC e o neocórtex, e que a antinocicepção pós-ictal depende da integridade de vias noradrenérgicas descendentes que se originam no LC.

Objetivos

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Estudar o papel do sistema glutamatérgico aferente ao NTS e a participação de vias noradrenérgicas que partem do *locus coeruleus* na modulação de crises convulsivas e na elaboração da antinocicepção pós-ictal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- - Estudar o efeito da estimulação química do núcleo do trato solitário com agonista do receptor NMDA, sobre as crises convulsivas e a antinocicepção pós-ictal induzidas por administração de pentilenotetrazol, por via intraperitoneal.
- Estudar o efeito da diminuição de atividade de aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário com microinjeções de um antagonista do receptor NMDA, sobre as crises convulsivas e a antinocicepção pós-ictal induzidas por administração de pentilenotetrazol, por via intraperitoneal.
- -Estudar o envolvimento da neurotransmissão noradrenérgica do *Locus Coruleus* no efeito da estimulação química do núcleo do trato solitário sobre as crises convulsivas e antinocicepção pós-ictal, por meio de administração por via intratecal de DSP-4, uma toxina noradrenérgica seletiva para neurônios do *locus coeruleus*, em animais submetidos ao modelo de crises tônico-clônicas induzidas por administração por via intraperitoneal de pentilenotetrazol.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Ratos Wistar (200 a 240 g), adquiridos no Biotério Central da Universidade de São Paulo, *Campus* de Ribeirão Preto, foram acondicionados dois a dois em gaiolas e mantidos em biotério de manutenção do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto com ciclo claro/escuro de 12/12hs (luzes acesas às 7h), temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas. Água e alimentação *ad libitum* foram oferecidas aos animais. As recomendações éticas da Sociedade Brasileira de Neurociências (SBNec) foram seguidas, evitando o sofrimento desnecessário aos animais durante o experimento e o presente trabalho foi, também, elaborado de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP.

3.2 Estudo Neuropsicobiológico

Procedimentos Cirúrgicos

Após anestesia com xilazina e cetamina, na proporção de 1 ml de cetamina a 10% (92 mg/kg, IP) e 2 mL xilazina a 2% (10 mg/kg, IP) em um volume de 0,1 ml por cada 100 gramas de peso corporal. foi realizada a tricotomia na pele da região da cabeça, e, seguida, os animais foram fixados em aparelho estereotáxico (David Kopf), sendo a calvária exposta cirurgicamente após anestesia local com solução de cloridrato de lidocaína a 2% (xilocaína®) com vasoconstritor. Identificando-se o Bregma, e tomado-a como ponto de referência, estando, ainda, as suturas bregmática e lambdoide em um mesmo plano horizontal, trepanações foram realizadas na calvária.

Uma cânula-guia, constituída de segmento de agulha de injeção hipodérmica (25X6 mm), de aço inoxidável, com 15 mm de comprimento e fixada ao estereotáxico, foi direcionada para a parte medial do núcleo do trato solitário, obedecendo às seguintes coordenadas: ântero-posterior: -14,04 mm; médio-lateral: 0,4 mm e dorso- ventral: 7,7 mm (tomadas segundo atlas estereotáxico de Paxinos e Watson, 1997).

Foram feitas trepanações adicionais no crânio para a introdução de dois parafusos de ancoragem, e a cânula-guia foi fixada à calota craniana por meio de resina acrílica autopolimerisável. Um mandril de aço inoxidável de 0,3 mm de diâmetro foi introduzido no interior da cânula, para protegê-la de impurezas. Para uma melhor fixação da cânula, foi colocado um ponto de solda próximo a uma de suas extremidades, permitindo, desta forma, melhor aderência da prótese de acrílico ao dispositivo de

microinjeções de drogas no tecido encefálico. Após cinco dias da cirurgia, os animais foram submetidos aos diferentes procedimentos experimentais.

Após os procedimentos cirúrgicos, cada rato recebeu uma injeção de anti-inflamatório (banamine meglumine; 2,5 mg/kg, IP) e associação antibiótica de largo espectro (Pentabiótico), por via intramuscular profunda.

3.3 Estudo Neurofisiológico

Este estudo foi realizado em grupos independentes de animais (N=6), que foram anestesiados e submetidos à cirurgia estereotáxica para introdução de uma cânula-guia no núcleo do trato solitário, segundo coordenadas descritas acima. Após o período pós-operatório de cinco dias, os animais foram submetidos a teste de retirada de cauda para registro de medida controle. No dia seguinte a este procedimento, foram feitas injeções centrais de NMDA nas doses de 1 nmol, 3 nmol e 9 nmol e, em seguida, foi determinado o limiar nociceptivo após a evocação de crises convulsivas causadas pela administração periférica de pentilenotetrazol (64mg/kg,IP) em dose única. As latências de retirada de cauda foram determinadas tão logo as convulsões cessaram, nos tempos zero (imediatamente após as crises epiléticas), e nos períodos pós-ictais subsequentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 min após as crises convulsivas).

3.4 Estudo Neurofarmacológico

Este presente estudo foi realizado em grupos independentes de animais (n=6 por grupo), que foram anestesiados e submetidos à cirurgia estereotáxica para a introdução de uma cânula-guia no núcleo do trato solitário segundo as coordenadas descritas anteriormente. A cânula-guia foi direcionada unilateralmente para a estrutura mencionada acima, a qual recebeu administrações de NMDA (1 nmol, 3 nmol, 9 nmol) ou do antagonista NMDA, AP7, nas doses de (0,1 nmol, 1 nmol, 10 nmol) e de salina fisiológica (0,2 µl). Subsequentemente, foram realizadas injeções, por via intratecal, da neurotoxina noradrenérgica DSP-4 na dose de 50 µg. Após o período de 4 horas, os animais receberam uma microinjeção de NMDA na dose de 9 nmol, e, 5 minutos depois, foram feitas injeções periféricas de pentilenotetrazol (64mg/kg, IP) e os limiares nociceptivos foram redeterminados nos tempos zero (imediatamente após as crises convulsivas), e nos períodos pós-ictais subsequentes (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 min após as crises convulsivas).

3.3 TESTE NOCICEPTIVO

Os roedores tiveram seus limiares nociceptivos aferidos, segundo o teste de retirada de cauda. Estes animais foram colocados em uma cela de contenção com paredes de acrílico, e cada um deles teve sua cauda disposta sobre um sensor de uma fonte de calor (teste *Tail-Flick*), cujo o propósito do mesmo era aumentar gradualmente a calorimetria, o que foi automaticamente interrompido tão logo o animal retirava sua cauda do dispositivo. As medidas de Latência de Retirada de Cauda (LRC) foram medidas dentro do intervalo compreendido entre 2,5 e 3,5 segundos. A linha de base foi feita pela média de três LRC, um dia antes do experimento, obedecendo intervalos de 5 minutos. O limiar nociceptivo foi igualmente aferido em sequência às crises convulsivas induzidas pelo PTZ (64mg/kg, IP).

Resultados

A administração sistêmica de PTZ provocou crises convulsivas tônico-clônicas em todos os animais submetidos aos experimentos, mas o pré-tratamento do NTS com NMDA em diferentes doses não foi capaz de alterar as crises convulsivas induzidas por PTZ (i.p.). De acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls, houve um efeito significativo na latência e duração ($F_{(1,74)} = 18.42$; $p < 0.001$), na frequência ($F_{(4,37)} = 4.398$; $P < 0.001$) e na severidade das crises ($F_{(4,37)} = 13.06$; $p < 0.001$), a qual foi analisada segundo o índice de Racine (1972) modificado por Freitas et al. (2013). O tratamento, por via i.p., com PTZ aumentou o índice da severidade e a frequência das crises convulsivas, diminuindo a latência das convulsões quando comparado com os grupos de animais que receberam administração sistêmica de salina ($p < 0.001$ em todos os casos), como mostrado nas figura 4A, B e C, respectivamente. Além disso, essas reações convulsivas induzidas por administração sistêmica de PTZ foram seguidas por uma significativa resposta antinociceptiva. De acordo com a análise de variância de duas vias (RM-ANOVA) seguida pelo teste de *post hoc* de Newlman-Keuls, houve um efeito significativo no período pós-ictal em relação ao tratamento ($F_{(4,25)} = 17.9$; $p < 0.001$), ao tempo ($F_{(15,375)} = 17.64$; $p < 0.001$) e interação entre o tratamento e o tempo ($F_{(60,375)} = 3.478$; $p < 0.001$). As crises convulsivas induzidas por injeções sistêmicas de PTZ provocaram um aumento na latência de retirada de cauda até 90 minutos após o término das crises convulsivas quando comparado com o grupo que recebeu o tratamento com salina por via i.p. ($p < 0.05$). O pré-tratamento do NTS com NMDA nas maiores doses (3 e 9 nmol) diminuiu a antinocicepção pós-ictal nos mesmos tempos, exceto no que se refere à dose intermediária de NMDA que não reduziu a antinocicepção pós-ictal no tempo 90. A dose de 1 nmol de NMDA microinjetado no NTS foi capaz de atenuar a resposta antinociceptiva nos tempos 0, 20, 50 60 e 70 minutos após as crises convulsivas (teste

de *post hoc* de Newlman-Keuls; $p < 0.05$). Assim também, houve diferença estatisticamente significativa entre as doses (teste de *post hoc* de Newlman-Keuls; $p < 0.05$). As doses maiores de NMDA foram diferentes da dose de 1 nmol nos tempos 10, 20, 30 40 e 80 minutos após as crises tônico-clônicas, sendo que a dose maior de NMDA também foi diferente da dose menor nos tempos 50, 70 e 90 minutos (Figura 4D) do período pós-ictal.

Figura 3: A-C: Efeito da microinjeção de um agonista NMDA, sobre o a severidade das convulsões (índice de Racine)(A), frequência de crises (B) e latência e duração das convulsões (C) induzidas pela injeção de PTZ (64mg/kg) por via IP. *P < 0,05; em relação ao grupo controle Sal+Sal; #P < 0,05; em relação ao Sal+PTZ, segundo a *one-way ANOVA*, seguido pelo teste de Neuman- Keuls. Efeito da ativação dos receptores NMDA do NTS com microinjeções locais de NMDA sobre a latência de retirada de cauda. * P<0,05 em relação ao grupo controle (salina no NTS + salina IP); # P < 0,05 em relação ao grupo salina (NTS) + PTZ, IP; + P < 0,05 em relação ao grupo tratado com NMDA 1nmol (NTS)+ PTZ (IP), segundo a *two-way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Neulman-Keuls.

Similarmente ao experimento anterior, quando do estudo do efeito do pré-tratamento do NTS com AP-7 sobre as crises convulsivas induzidas farmacologicamente, a administração sistêmica de PTZ provocou crises convulsivas tônico-clônicas. Essas crises convulsivas evocadas por PTZ administrado por via i.p. foram atenuadas pelo bloqueio dos receptores NMDA no NTS através de microinjeções intra-NTS de AP-7 em diferentes doses. De acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls houve um efeito significativo na latência e duração ($F_{(1,48)} = 167.8$; $p < 0.001$), na frequência ($F_{(4,25)} = 9.48$; $P < 0.001$) e na severidade ($F_{(4,25)} = 21.6$; $p < 0.001$) das crises convulsivas, segundo o índice de Racine (1972) modificado por Freitas et al. (2013). O tratamento por via i.p. com PTZ aumentou o índice de severidade e a frequência das crises, e diminuiu a latência das convulsões quando comparado com o grupo de animais tratados com administração sistêmica de salina fisiológica (teste de *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0.001$ em todos os casos), como mostrado nas figuras 5A, B e C, respectivamente. Além disso, essas reações convulsivas induzidas por administração sistêmica de PTZ foram seguidas por uma significativa resposta antinociceptiva. De acordo com a análise de variância de duas vias (RM-ANOVA) seguida pelo teste de *post hoc* de Newman-Keuls, houve um efeito significativo no período pós-ictal em relação ao tratamento ($F_{(4,25)} = 154.4$; $p < 0.001$), ao tempo ($F_{(15,375)} = 35.07$; $p < 0.001$) e à interação entre o tratamento e o tempo ($F_{(60,375)} = 3.478$; $p < 0.001$). As crises convulsivas induzidas por injeções sistêmicas de PTZ provocaram um aumento na latência de retirada de cauda até 100 minutos após o término das convulsões, quando comparado com o grupo tratado com salina fisiológica, por i.p. (teste de *post hoc* de Newman-Keuls; $p < 0.05$). O pré-tratamento do NTS com AP7 nas maiores doses (0.1, 1 e 10 nmol) diminuiu a antinocicepção pós-ictal nos mesmos tempos do período pós-ictal. A dose de 0.1 nmol de AP7 microinjetada no

NTS foi capaz de atenuar a resposta antinociceptiva nos tempos 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 minutos após as crises convulsivas (teste de *post hoc* de Newlman-Keuls; $p < 0.05$ em todos os casos). Assim também, houve diferença estatisticamente significativa entre as doses (teste de *post hoc* de Newlman-Keuls; $p < 0.05$). A dose de 1nmol de AP7 foi estatisticamente diferente da dose de 0,1 nmol nos tempos 0, a 70 minutos do período pós-ictal, sendo que a dose maior de AP7 também foi diferente da dose menor nos tempos 0 a 80 minutos (Figura 5D).

Figura 4: A-C: Efeito da microinjeção de um antagonista NMDA, o AP7, sobre o a severidade das convulsões (índice de Racine)(A), frequência de crises (B) e latência e duração das convulsões (C) induzidas pela injeção de PTZ (64mg/kg) por via IP. *P < 0,05; ***P < 0,001 em relação ao controle, segundo a *one-way ANOVA*, seguido pelo teste de Newman-Keuls. Efeito do bloqueio de receptores NMDA do NTS com microinjeções locais de AP-7 sobre a latência de retirada de cauda. * P<0,05 em relação ao grupo controle (salina no NTS + salina IP); # P < 0,05 em relação ao grupo salina (NTS) + PTZ, IP; + P < 0,05 em relação ao grupo tratado com AP-7-0,1nmol (NTS)+ PTZ (IP), segundo a *two-way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls.

No que se refere ao estudo da relevância de vias noradrenérgicas no controle de crises convulsivas e da antinocicepção pós-ictal, de acordo com a análise de variância de uma via (ANOVA) seguido pelo teste de *post hoc* Newman-Keuls, houve um efeito significativo na latência e duração ($F_{(1,40)} = 12.54$; $p < 0.001$), na frequência ($F_{(3,20)} = 18.24$; $p < 0.001$) e na severidade das crises ($F_{(3,20)} = 42.22$; $p < 0.001$), a qual foi analisada segundo o índice de Racine (1972) modificado por Freitas et al. (2013). O tratamento por via i.p. com PTZ aumentou o índice da severidade e a frequência das crises convulsivas tônico-clônicas, e diminuiu a latência das convulsões, quando comparado com os grupos de animais tratados com administração sistêmica de salina fisiológica (teste de *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.001$ em todos os casos), como mostrado nas figuras 6A, B e C, respectivamente. Além disso, essas reações convulsivas induzidas por administração sistêmica de PTZ foram seguidas por uma significativa resposta antinociceptiva, corroborando os dados anteriores. De acordo com a análise de variância de duas vias (RM-ANOVA) seguida pelo teste de *post hoc* de Neulman-Keuls houve um efeito significativo no período pós-ictal em relação ao tratamento ($F_{(3,20)} = 155$; $p < 0.001$), ao tempo ($F_{(15,300)} = 15.88$; $p < 0.001$) e à interação entre o tratamento e o tempo ($F_{(45,300)} = 9.304$; $p < 0.001$). A lesão de vias noradrenérgicas realizada pela administração de DSP-4 por via i.t., seguida pela ativação de receptores glutamatérgicos no NTS com NMDA na dose de 9 nmol causou uma diminuição estatisticamente significativa na frequência das crises convulsivas, como mostrado na Figura 6B. As crises convulsivas induzidas por injeções sistêmicas de PTZ provocaram um aumento na latência de retirada de cauda até 110 minutos após o término das crises convulsivas tônico-clônicas, quando comparado com o grupo que tratado com salina fisiológica, por via i.p. (teste de *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.05$). A lesão noradrenérgica seletiva de neurônios do *locus coeruleus per se*, com administração da neurotoxina DSP4 por via

i.t. causou uma diminuição estatisticamente significativa da antinocicepção pós-ictal em todos os tempos do período pós-ictal estudados (teste de *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.05$ em todos os casos), como mostrado na figura 6D. Digno de nota, o tratamento do NTS com NMDA na dose de 9 nmol, precedido pelo pré-tratamento com DSP4 por via intratecal e com PTZ, por via i.p., também diminuiu a antinocicepção pós-ictal em todos os tempos do período pós-ictal presentemente estudados (teste de *post hoc* Newman-Keuls; $p < 0.05$ em todos os casos), como mostrado na Figura 6D.

Figura 5: A-C: Efeito da microinjeção, por via intratecal, de DSP-4 (50 microgramas/200 nanolitros) sobre a severidade das convulsões (índice de Racine) (A), frequência de crises (B), latência e duração das convulsões (C) induzidas pela injeção de PTZ (64mg/kg) por via IP. *P < 0,05 em relação ao controle (salina IT + salina NTS + salina IP); #P < 0,05 em relação ao grupo salina IT + salina NTS + PTZ IP, + P<0,05 em relação ao grupo DSP-4 IT + salina NTS + PTZ IP, segundo a *one-way ANOVA*, seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Efeito da microinjeção, por via intratecal, de DSP-4 sobre a latência de retirada de cauda. * P<0,05 em relação ao grupo controle (salina IT + salina NTS + salina IP); # P < 0,05 em relação ao grupo tratado com salina IT + salina NTS + PTZ IP, segundo a *two-way ANOVA*, seguida pelo teste *post hoc* de Newman Keuls.

Fig: 7 – Fotomicrografias de secções coronais do tronco encefálico de rato Wistar, mostrando (setas) sítios representativos de microinjeção de drogas no núcleo do trato solitário (NTS).

Fig: 8 – Representação esquemática de sítios de administração de salina fisiológica (0,2μL) (Δ), ou de NMDA nas doses 1 μg/0,2μL (●) 3 μg/0,2μL (○) e 9 μg/0,2μL (□) no núcleo do trato solitário de ratos Wistar, dispostos em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005).

Fig: 9 – Representação esquemática de sítios de administração de salina fisiológica (0,2μL) (*), ou de ▲ AP7 nas doses 0,1 μg/0,2μL (●) 1 μg/0,2μL () e 10μg/0,2μL (□) no núcleo do trato solitário de ratos Wistar, dispostos em anagramas do Atlas de Paxinos e Watson (2005).

Díscussão

5 DISCUSSÃO

O bloqueio ionóforo de canais de cloreto ligado ao GABA causou crises convulsivas tônico-clônicas seguidas antinocicepção pós-ictal em todos os animais submetidos ao presente trabalho. Tanto as convulsões como a antinocicepção pós-ictal mostraram-se parcialmente dependentes da atividade de vias mediadas por aminoácidos excitatórios no núcleo do trato solitário, como da integridade do sistema noradrenérgico, pois o bloqueio de receptores de aminoácidos excitatórios do tipo NMDA no NTS e a administração intratecal de uma neurotoxina seletiva para neurônios noradrenérgicos alteraram a gravidade das crises tônico-clônicas e a intensidade da analgesia pós-ictal.

Há evidências de que o sistema noradrenérgico encontra-se envolvido no controle da atividade cortical (Waterhouse et al., 1980; Chandler et al., 2014; Salgado et al., 2016). É sabido que o *locus coeruleus* é uma estrutura eminentemente noradrenérgica que envia conexões ascendentes que se distribuem pelo neocórtex (Salgado et al., 2016), e descendentes (Llorca-Torralba et al., 2016), que atingem o corno dorsal da medula espinal, modulando a atividade da primeira sinapse do sistema ântero-lateral.

O *locus coeruleus* é uma relevante estrutura do tronco encefálico também envolvido na atividade antiepiléptica causada pela estimulação do nervo vago (Fornai et al., 2011).

As fibras aferentes viscerais gerais (aferências parassimpáticas) e as fibras aferentes viscerais especiais (fibras gustativas que inervam a área da epiglote) de neurônios do gânglio nodoso (inferior) do nervo vago projetam-se a divisão caudal e cranial do NTS. As aferências do nervo vago ao NTS usam o glutamato como principal neurotransmissor (Jean, 2001; Andressen et al., 1994; Furness et al., 2012).

O NTS, por sua vez, além de se conectar com o tálamo dorsal, através do lemnisco trigeminal, conecta-se também com o núcleo reticular paragigantecelular, o qual se projeta para o *locus coeruleus* (Aston-Jones et al., 1991; Ruffoli et al., 2011). Dessa forma, uma ativação era de se esperar que a ativação de receptores glutamatérgicos no NTS causassem um efeito anticonvulsivo.

Não obstante, como demonstrado no presente trabalho, a microinjeção de um agonista de receptores NMDA no NTS em diferentes doses não foi capaz de alterar significativamente nem a severidade das crises convulsivas, nem sua frequência, latência ou duração, muito a ativação de receptores NMDA no NTS tenha diminuído significativamente a antinocicepção pós-ictal. Uma possível explicação para esse fenômeno seria a presença de interneurônios inibitórios entre as aferências do neurônio primário do gânglio nodoso e os pericários do NTS. De fatos, há relatos que demonstram que neurônios GABAérgicos podem ser profusamente encontrados ao longo de todo o NTS (Torrealba e Müller, 1999; Bailey et al., 2008). Além disso, neurônios do NTS podem receber tanto glutamatérgicos quanto GABAérgicos sinápticos contatos provenientes de neurônios locais, os quais podem ser ativados por aferências provenientes do nervo vago ou, ainda, modulados por aferências vindas de outros neurônios do tronco encefálico (Smith et al., 1998).

Por outro lado, o bloqueio de receptores NMDA do NTS foi capaz de diminuir significativamente tanto a severidade das crises convulsivas, como a frequência das convulsões, assim como houve também uma significativa redução da antinocicepção pós-ictal. Esses dados corroboram um relato prévio, em que foi demonstrado que a microinjeção de do antagonista não seletivo de receptores de aminoácidos excitatórios no NTS, o ácido cinurênico, causa efeito antoconvulsivo, assim como a microinjeção do

antagonista de receptores GABAérgicos do tipo A, o muscimol, na mesma estrutura do bulbo cranial (Walker et al., 1999).

É interessante notar que, segundo os presentes resultados, a lesão de vias noradrenérgicas do tronco encefálico com DSP-4, uma neurotoxina que compete com o substrato da enzima beta-hidroxilase, com especial tropismo pelo *locus coeruleus*, diminui tanto a frequência das convulsões tônico-clônicas, como a antinocicepção pós-ictal. A noradrenalina do sistema nervoso central provém da metabolização da dopamina pela ação da enzima dopamina beta-hidroxilase. Sua depleção causada pelo DSP-4, causa uma diminuição de atividade de vias eferentes do *locus coeruleus*. Portanto, o efeito causado pela injeção intratecal de DSP-4, associado à ativação de receptores NMDA do NTS, pode ter sido devido a uma possível aos seguintes mecanismos neurais: (a) ativação direta do *locus coeruleus* por neurônios do NTS que ativem eminentemente neurônios não-noradrenérgicos de projeção ascendente que redundem em modulação da atividade cortical; (b) diminuição da atividade da via antinociceptiva descendentes noradrenérgica, devido à depleção de noradrenalina no *locus coeruleus*, causada pelo DSP-4. Efetivamente há evidências na literatura que demonstram heterogeneidade neuroquímica do *locus coeruleus* (referência), assim como a relevância de neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus* na elaboração da antinocicepção pós-ictal (Freitas et al., 2005; Felippotti et al., 2011).

Tomados em conjunto esses dados sugerem que o efeito anticonvulsivo do aumento de atividade de vias glutamatérgicas no NTS pode dever-se ao recrutamento de interneurônios GABAérgicos inibitórios que culminam na redução de atividade de neurônios do NTS, provavelmente liberando a atividade de uma via eferente que estimule o *locus coeruleus*, cujos neurônios modulam atividade cortical.

Uma das estruturas que se interpõem entre os neurônios do NTS e o *locus coeruleus*, sobressai-se o núcleo reticular paragigantocelular (Ruffoli et al., 2011). Os neurônios do núcleo reticular paragigantocelular projetam-se para o *locus coeruleus* por meio de uma via excitatória glutamatérgica, que recruta receptores glutamatérgicos do tipo AMPA/Kainato (Ennis e Aston-Jones, 1988; Aston-Jones et al., 1991). Já foi demonstrado que o complexo reticular gigantocelular/paragigantocelular encontra-se envolvido na elaboração do fenômeno de antinociceção pós-ictal (de Oliveira e tal., 2006).

Segundo Aicher et al., (1995), estruturas da divisão caudal do bulbo ventro-lateral conectam-se com a divisão rostral do bulbo ventro-lateral por meio de neurônios distintos da região noradrenérgica A1, sendo ativadas por uma potente via monossináptica excitatória proveniente do NTS. Assim, é possível que essa via tenha sido recrutada pela ativação de receptores do tipo NMDA do NTS, causando uma impressão de que crises convulsivas e antinociceção pós-ictal encontram-se dissociadas. Corroborando esse ponto de vista, o potente efeito anticonvulsivo causado por microinjeções de diferentes doses do antagonista glutamatérgico AP-7 no NTS, observado no presente trabalho, foi seguido por uma forte depressão na antinociceção pós-ictal, o que pode ser considerado uma forte evidência que sugere que esses dois fenômenos são interdependentes.

Essa rede neural aqui abordada parece ser uma forte candidata para os efeitos anticonvulsivos do processo de estimulação do nervo vago, utilizado para o tratamento de epilepsias refratárias ao tratamento farmacológico com anticonvulsivantes.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

- O bloqueio ionóforo de canais iônicos de cloreto, ligados à neurotransmissão GABAérgica causa convulsões tônico-clônicas;
- As convulsões tônico-Clônicas são seguidas de um robusto fenômeno de elevação do limiar nociceptivo, com duração de cerca de 120 min;
- Aferências glutamatérgicas ao núcleo do trato solitário exercem um papel importante na modulação de crises convulsivas tônico-clônicas e da antinocicepção pós-ictal;
- A administração de DSP-4 por via intratecal, diminui sensivelmente as crises convulsivas tônico-clônicas e o fenômeno de antinocicepção pós-ictal. Como a neurotoxina DSP-4 possui um tropismo especial por neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus*, tanto o sistema noradrenérgico ascendente, como as vias noradrenérgicas descendentes, podem respectivamente, modular as respostas convulsivas e elaborar pelo menos parte da analgesia pós-ictal.

Referências

Aicher, S.A.; Kurucz, O.S.; Milner, T.A. Nucleus tractus solitarius efferent terminals synapse on neurons in the caudal ventrolateral medulla that project to the rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.* 693: 51-63, 1995.

Andressen, M.C.; Kunze, D.L. Nucleus tractus solitarius-gateway to neural circulatory control. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 95-116, 1994.

Ängelhagen, M.; Ben-Menachem, E.; Shank, R.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. Topiramate modulation of kainate-induced calcium currents is inversely related to channel phosphorylation level. *J Neurochem.* 88(2): 320-325, 2004.

Aston-Jones, G.; Shipley, M.T.; Chouvet, G.; Ennis, M.; van Bockstaele, E.; Pieribone, V.; Shiekhata, R.; Akaoka, H.; Drolet, G.; Astier, B.; Charléty, P.; Valentino, R.J.; Williams, J.T. Chapter 4 - Afferent regulation of locus coeruleus neurons: anatomy, physiology and pharmacology. *Progr. Brain Res.* 88: 47-75, 1991.

Atkinson, P.B.; Labiner, D.M. Shocking the wandering nerve-vagus nerve stimulation after a decade of widespread use. *Eur Neurol Rev.* 1:14-16, 2007.

Bailey, T.W.; Appleyard, S.M.; Jin, Y.H.; Anderson, M.C. Organisation and properties of GABAergic neurons in solitary tract nucleus (NTS). *J. Neurophysiol.* 99(4): 1712-1722, 2008.

Ben-Menachem, E.; Hamberger, A.; Hedner, T.; Hammond, E.J.; Uthman, B.M.; Slater, J.; Treig, T.; Stefan, H.; Ramsay, R.E.; Wernicke, J.F.; Wilder, B.J. Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures. *Epilepsy Res.* 20(3): 221-227, 1995.

Ben-Menachem, E.; Manon-Espaillat, R.; Ristanovic, R.; *et al.* Vagus nerve stimulation for treatment of partial seizures: 1. A controlled study of effect on seizures. First International Vagus Nerve Stimulation Study Group. *Epilepsia.* 35: 616-626, 1994.

Ben-Menachem, E. Vagus-nerve stimulation for the treatment of epilepsy. *Lancet Neurol.* 1: 477-82, 2002.

Berg, A.T.; Berkovic, S.F.; Brodie, M.J.; Buchhalter, J.; Cross, J.H.; van Emde Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T.A.; Mathern, G.W.; Moshé, S.L.; Nordli, D.; Plouin, P.; Scheffer, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* 51(4):676-85, 2010.

Bialer, M.; White, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nature Reviews Drug Discovery.* 9:68-82, 2010.

Brodie, M.J.; Kwan, P. Newer drugs for focal epilepsy in adults. *BMJ.* 344:e345, 2012.

Browning, R.A.; Clark, K.B.; Naritoko, D.K.; Smith, D.C.; Jensen, R.A. Loss of anticonvulsant effect of vagus nerve stimulation in the pentylenetetrazol seizure model following treatment with 6-hydroxydopamine or 5,7-dihydroxy-tryptamine. *Proc Soc Neurosci.* 2:23-35, 1997.

Buoni, S.; Mariottini, A.; Pieri, S.; Zalfa, A.; Farnetani, M.A.; Strambic, M.; Palmieri, L.; Fois, A. Vagus nerve stimulation for drug-resistant epilepsy in children and young adults. *Brain Dev.* 26(3): 158–163, 2004.

Cunha, A.O.S.; Mortari, M.R.; Carolino, R.O.G.; Coutinho-Netto, J.; Santos, W.F. Glutamate binding is altered in hippocampus and cortex of Wistar rats in pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett.* 424: 51-54, 2007.

Cunha, A.O.S.; Mortari, M.R.; Liberato, J.L.; dos Santos, W.F. Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after pilocarpine-induced status epilepticus. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 104(6):470-7, 2009.

Czapinski, P.; Blaszczyk, B.; Czuczwar, S.J. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem.* 5:3-14, 2005.

Dua, T.; de Boer, H.M.; Prilipko, L.L.; Saxena, S. Epilepsy care in the world: results of an ILAE/IBE/WHO global campaign against epilepsy survey. *Epilepsia.* 47:1225-31, 2006.

Engel, J.Jr. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ilae task force on classification and terminology. *Epilepsia* . 2001;42:796-803.

Ennis, M; Aston-jones, G. Activation of locus coeruleus from nucleus paragigantocellularis: A new excitatory amino acid pathways in brain. *J Neurosci.* 8(10): 3644-3657, 1988.

Felippotti, T.T.; dos Reis Ferreira, C.M.; de Freitas, R.L.; de Oliveira, R.C.; de Oliveira, R.; Paschoalin-Maurin, T.; Coimbra, N.C. Paradoxical effect of noradrenaline-mediated neurotransmission in the antinociceptive phenomenon that accompanies tonic-clonic seizures: role of locus coeruleus neurons and $\alpha(2)$ - and β -noradrenergic receptors. *Epilepsy Behav.* 22(2):165-177, 2011.

Fernandez-Guardiola, A.; Martínez, A.; Valdés-Cruz, A.; Magdaleno-Madrigal, V.M.; Martínez, D.; Fernandez-Mas, R. Vagus nerve chronic stimulation in cats: Effects on epileptogenesis (amygdala electrical kindling): behavioral and electrographic changes. *Epilepsia*, 40: 822-829, 1999.

Follesa, P.; Biggio, F.; Gorini, G.; Caria, S.; Talani, G.; Dazzi, L.; *et al*: Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Res.* 1179:28-34, 2007.

Fornai, F.; Ruffoli, R.; Giorgi, F.G.; Paparelli, A. The role of locus coeruleus in the antiepileptic activity induced by vagus nerve stimulation. *Eur J Neurosci.* 33(12): 2169-2178, 2011.

Freitas, R.L.; Ferreira, C.M.; Ribeiro, S.J.; Carvalho, A.D.; Elias-Filho, D.H.; Garcia-Cairasco, N.; Coimbra, N.C. Intrinsic neural circuits between dorsal midbrain neurons that control fear-induced responses and seizure activity and nuclei of the pain inhibitory system elaborating postictal antinociceptive processes: a functional neuroanatomical and neuropharmacological study. *Exp Neurol.* 191(2):225-42, 2005.

Furness, J.B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 9: 286-294, 2012.

Guerrini, R. Epilepsy in children. *Lancet.* 367:499-524, 2006.

Hammond, E.J.; Uthman, B.M.; Reid, S.A.; Wilder, B.J. Electrophysiological studies of cervical vagus nerve stimulation in humans: I. EEG effects. *Epilepsia.* 33: 1013-1020, 1992

Handforth, A.; DeGiorgio, C.M.; Schachter, S.C.; Uthman, B.M.; Naritoku, D.K.; Tecoma, E.S.; Henry, T.R.; Collins, S.D; *et. al.* Vagus nerve stimulation therapy for partial-onset seizures: a randomized active-control trial. *Neurology.* 51(1):48-55, 1998.

Hartree, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem.* 48:422-7, 1972.

Henry, T.R.; Bakay, R.A.E.; Votaw, J. R.; Pennell, P.B.; Epstein, C.M.; Faber, T.L.; Grafton, S.T.; Hoffnam, J.M. Brain blood flow alterations induced by therapeutic vagus nerve stimulation in partial epilepsy: I. Acute effects at high and low levels of stimulation. *Epilepsia.* 39: 983-990, 1998.

Jean, A. Brainstem control of swallowing neuronal network and cellular mechanism. *Physiol. Rev.* 81: 929-969, 2001.

Krahl, S.E.; Senanayake, S.S.; Handforth, A. Seizure suppression by systemic epinephrine is mediated by the vagus nerve. *Epilepsy Res.* 38(2-3):171-5, 2000.

Kovács, Z.; Czurkó, A.; Kékesi, A.K.; Juhász, G. Clomipramine increases the incidence and duration of spike-wave discharges in freely moving WAG/Rij rats. *Epilepsy Res.* 90:167-170, 2010.

Kuba, R.; Nesvadba, D.; Brázdil, M.; Oslejsková, H.; Ryzí, M.; Rektor, I. Effect of chronic vagal nerve stimulation on interictal epileptiform discharges. *Seizure.* 19(6):352-5, 2010.

Kudo, T.; Kushikata, T.; Kudo, M.; Kudo, T.; Hirota, K.; Antinociceptive effects of neurotrophin in a rat model of central neuropathic pain: DSP-4 induced noradrenergic lesion. *Neurosci Lett.* 2011 Sep 26; 503(1):20-2.

Lanska, D. J.J.L. Corning and vagal nerve stimulation for seizures in the 1880s. *Neurology.* 12;58(3):452-9, 2002.

Lazarova, M.; Samanin, R. Potentiation by yohimbine of pentylenetetrazol induced seizures in rats: role of alpha 2 adrenergic receptors. *Pharmacol Res Commun* 15:419-425, 1983.

LaRoche, S.M.; Helmers, S.L. The new antiepileptic drugs: clinical applications. *JAMA.* 4;291(5):615-20, 2004.

Lockard, J.S.; Congdon, W.C.; DuCharme, L.L.; Feasibility and safety of vagal stimulation in monkey model. *Epilepsia.* 31(2 Suppl):S20-S26, 1990.

Loscher, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 50:105-123, 2002.

Loscher, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 20(5):359-68, 2011.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193:265-75, 1951.

Lulic, D.; Ahmadian, A.; Baaj, A.A.; Benbadis, S.R.; Vale, F.L. Vagus nerve stimulation. *Neurosurg Focus.* 27(3): E5, 2009.

McLachlan, R.S.; Suppression of interictal spikes and seizures by stimulation of the vagus nerve. *Epilepsia.* 34(5):918-23, 1993.

Meldrum, B.S. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int Rev Neurobiol.* 17:1-36, 1975.

Morris, G.L.; Mueller, W.M. Long-term treatment with vagus nerve stimulation in patients with refractory epilepsy. The Vagus Nerve Stimulation Study Group E01-E05. *Neurology.* 10;53(8):1731-5, 1999.

Naritoku, D.K., Morales, A., Pencek, T.L. and Winkler, D. Chronic vagus nerve stimulation increases the latency of the thalamocortical somatosensory evoked potential. *Pacing and Clinical Electrophysiology.* 15:1572–1578, 1992.

Naritoku, D.K.; Terry, W.J.; Helfert, R.H. Regional induction of fosimmunoreactivity in the brain by anticonvulsant stimulation of the vagus nerve. *Epilepsy Res.* 22(1):53-62, 1995.

Oliveira, R.C.; Oliveira, R.; Zanandréia, P.C.; Maurin, T.P.; Coimbra, N.C. Acetylcholine-mediated neurotransmission within the nucleus raphe magnus exerts a key role in the organization of both interictal and postictal antinociception. *Epilepsy & Behavior (Print)*.2:178-185, 2011.

Racine, R.J.. Modification of seizure acitivity by electrical stimulation: II, motor seizure. *Electroencephal.Clin.Phisyol*. 32: 281-294, 1972.

Raedt, R.;Clinckers, R.;Mollet, L.;Vonck, K.; El Tahry, R.;Wyckhuys, T.; De Herdt, V.;Carrette, E.;Wadman, W.;Michotte, Y.; Smolders, I.; Boon, P.;Meurs, A. Increased hippocampal noradrenaline is a biomarker for efficacy of vagus nerve stimulation in a limbic seizure model.*J Neurochem*. 117(3):461-9, 2011.

Rice, A.C.; DeLorenzo, R.J. NMDA receptor activation during status epilepticus isrequired for the development of epilepsy. *Brain Res*. 782:240-7, 1998.

Ruffioli, R; Giorgi, F.S.; Pizzanelli, C.; Murri, L. The chemical neuroanatomy of vagus nerve stimulation. *J. Chem. Neuroanat*. 42: 288-296, 2011.

Rush, A.J.; Marangell, L.B.;Sackeim, H.A.; George, M.S.; Brannan, S.K.; Davis, S.M., *et al*: Vagus nerve stimulation for treatment resistant depression: a randomized, controlled acute phase trial. *Biol Psychiatry*. 58:347–354, 2005.

Salgado, D.; Alkadhi, K.A. Inhibition of epileptiform activity by serotonin in rat CA1 neurons.*Brain Res*. 16;669(2):176-82, 1995.

Salgado, H. Treviño, M.; Atzori, M. Layer- and area-specific actions of norepinephrine on cortical synaptic transmission. *Brain Res*. 2016; 1641(Pt B):163-76.

Santiago-Rodríguez, E.; Alonso-Vanegas, M.; Cárdenas-Morales, L.; Harmony, T.; Bernardino, M.; Fernández-Bouzas, A. Effects of two different cycles of vagus nerve stimulation on interictal epileptiform discharges. *Seizure*. 15(8):615-20, 2006.

Schmidt, D.; Löscher, W. Drug resistance in epilepsy: putative neurobiologic and clinical mechanisms. *Epilepsia*. 46(6):858-77, 2005.

Smith, B.n.; Dou, P.; Barber, W.D.; Dudek, E. Vagally evoked synaptic currents in the immature rat nucleus tractus solitari in an intact *in vitro* preparation. *J. Physiol*. 512.1: 149-162, 1998.

Statnick, M.A.; Dailey, J.W.; Jobe, P.C.; Browning, R.A. Abnormalities in brain serotonin concentration, high-affinity uptake, and tryptophan hydroxylase activity in severe-seizure genetically epilepsy-prone rats. *Epilepsia*. 37(4):311-21, 1996.

Stafstrom, C.E. Epilepsy: A review of selected advances in clinical practice and basic science. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 26: 83–1004, 2006.

Stefan, H.; Feuerstein, T.J. Novel anticonvulsant drugs. *Pharmacol Ther*. 113(1):165-83, 2007.

Szot, P., Miguelez, C., White, S.S., Franklin, A., Sikkema, C., Wilkinson, C.W., Ugedo, L., Raskind, A comprehensive analysis of the effect of DSP-4 on the locus coeruleus noradrenergic system in the rat. *M.A. Neuroscience* (2010)166: 279-291.

Terra, V.C.; Nisyama, M.A.; Abrão, J.; Sakamoto, A.C.; Machado, H.R.; Arida, R.M.; Cavalheiro, E.A.; Scorza, F.A. Epileptologists probe vagus nerve stimulation in children with refractory epilepsy: a promise against sudden unexpected death in epilepsy. *Arq. Neuropsiquiatr*. 70(12): 953-955, 2012.

Theodore, W.H. Brain stimulation for epilepsy. *Nat ClinPract Neurol.* 1(2):64-5, 2005.

Theodore, W.H; Giovacchini, G.; Bonwetsch, R.; Bagic, A.; Reeves-Tyer, P.; Herscovitch, P.; Carson, R.E. The effect of antiepileptic drugs on 5-HT-receptor binding measured by positron emission tomography. *Epilepsia.* 47(3):499-503, 2006.

Torreálba, F.; müller, C. Ultrastructures of glutamate and GABA immunoreactive axon terminals of the rat nucleus tractus solitaries, with a note on infralimbic cortex afferents. *Brain Res.* 820: 20-30, 1999.

Wada, Y.; Nakamura, M.; Hasegawa, H.; Yamaguchi, N. Role of serotonin receptor subtype in seizures kindled from the feline hippocampus. *NeurosciLett.* 6;141(1):21-4, 1992.

Walker, B.R.; Easton, A.; Gale, K. Regulation of limbic motor seizures by GABA and glutamate transmission in nucleus tractus solitaries. *Epilepsia* 40: 1051-1057, 1999.

Waterhouse, B.D.; Moises, H.C.; Woodward, D.J. Noradrenergic modulation of somatosensory cortical neuronal responses to iontophoretically applied putative neurotransmitters. *Exp. Neurol.* 1980; 69(1):30-49.

Woodbury, D.M.; Woodbury, J.W. Effects of vagal stimulation on experimentally induced seizures in rats. *Epilepsia.* 31 Suppl 2:S7-19, 1990.

Zabara, J. Inhibition of experimental seizures in canines by repetitive vagal stimulation. *Epilepsia.* 33: 1005-1012, 1992.

Zabara, J. Peripheral control of hypersynchronous discharge in epilepsy. *ElectroencephalogrClinNeurophysiol.* 61s:S162, 1985.

Zukin, S.R.; Young, A.B.; Snyder, S.H. Gamma-aminobutyric acid binding to receptor sites in the rat central nervous system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 71:4802-7, 1974.