APLICAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DA FOSFOETANOLAMINA SINTÉTICA SOBRE MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIAS

Marcos Vinícius de Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Interunidades em Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Riberão Preto/ Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Orivaldo Chierice

**São Carlos
2007**

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.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

A447a Almeida, Marcos Vinícius de
Aplicação pré-clínica da fosfoetanolamina sintética
sobre modelos experimentais de epilepsias / Marcos
Vinícius de Almeida ; orientador Gilberto Orivaldo
Chierice. -- São Carlos, 2007.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Bioengenharia. Área de Concentração:
Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais)
-- Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto e Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

1. Fármacos. 2. Fosfoetanolamina. 3. Epilepsias.
4. Aplicação pré-clínica. I. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho integralmente ao meu pai Orandi pelo seu exemplo de companheirismo e dedicação. E a minha mãe Palmira por seu exemplo de perseverança.

A Daniela por seu apoio constante nos momentos difíceis de minha vida!! Deixo meu muito obrigado.

Ao professor Dr. Gilberto O. Chierice pela orientação deste trabalho, confiança, os ensinamentos e lições de vida transmitidos.

Ao prof. Dr. Mário Sérgio Galhiane, pela disponibilidade constante, amizade, exemplo de profissional e por sua eterna prontidão aos meus problemas mais banais.

Ao Professor Dr. Hugo Medeiros Garrido de Paula pela co-orientação, por sua ética e imparcialidade científica que foram indispensáveis na condução deste experimento. E acima de tudo sua sincera amizade.

AGRADECIMENTOS

A professora Dr. Sandra Regina Rissato pela sua impecável conduta profissional, ensinamentos e exemplo de dedicação e amor ao trabalho, características que nortearam e incentivaram minhas incessantes buscas de objetivos nestes últimos anos.

A colega de laboratório Sandra Asafour, pela síntese do composto utilizado no presente trabalho e pela confiança em meus “projetos” de pesquisa e idéias.

A colega Letícia pelas duvidas tiradas nas mais diversas áreas do conhecimento.

Aos estagiários Mário e Márcio pelo auxílio nas cirurgias de implante.

Ao Dr. Renato Meneguelo pelas caronas ultra rápidas na cidade de São Paulo, sua alegria e humor contagiante em momentos inesperados. E sua sinceridade

Ao professor Dr. Durvaney Maria do Instituto Butantã por sua rápida capacidade de organização, confiança, dinamismo e por mostrar-nos a real dimensão de nossas pesquisas e capacidades de superação.

RESUMO

ALMEIDA, M.V. **Aplicação pré-clínica da Fosfoetanolamina Sintética Sobre modelos Experimentais de epilepsias**. 2007. 60 f. dissertação (mestrado)- Programa de Pós-graduação de Interunidades em bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos.

A fosfoetanolamina é um dos principais constituintes de membranas neuronais de mamíferos e sua deficiência orgânica está intensamente relacionada com epilepsias e distúrbios do Sistema Nervoso Central. Devido a estas evidências, é de suma importância o conhecimento da influência das propriedades físico-químicas, na forma sólida e líquida e suas inter-relações com possível efeito anticonvulsivo. Buscando elucidar algumas destas questões o presente trabalho teve por objetivos avaliar biologicamente os possíveis efeitos anticonvulsivantes e antiepiléticos da fosfoetanolamina sintética FS e FSI, frente a convulsões induzidas por PTZ e nos estados epiléticos, detectados em EEG, de ratos *Wistar* epiléticos. Foram utilizadas metodologias específicas para ambas as etapas do estudo, incorporando modelos pré-clínicos de avaliações neurológicas de medicamentos pró-anticonvulsivos. Os resultados apontaram efeito na diminuição da intensidade das crises e de óbitos frente ao modelo de indução de crises por PTZ, e efeito anticonvulsivo da forma líquida e sólida frente ao modelo de ratos geneticamente epiléticos, indicando provável ação neurológica da fosfoetanolamina aos eventos biológicos observados.

Palavras-chave: Fármacos. Fosfoetanolamina. Epilepsias. Aplicação pré-clínica.

ABSTRACT

ALMEIDA, M.V. **Application pre-clinic of Synthetic phosphoethanolamine on epilepsies Experimental models**.2007. 60 f. dissertação (mestrado)- Programa de Pós-graduação de Interunidades em bioengenharia (EESC/FMRP/IQSC), Universidade de São Paulo, São Carlos.

Phosphoethanolamine is one of mains the mammals membranes constituent and your organic deficiency is intensely related with Nervous System Central disturbances and epilepsies. Due to this evidences, it belongs to vanish importance knowledge the influence physicist-chemical properties, in the solid form and liquid form and your interrelations with possible effect anticonvulsive. The present work had for goals to evaluate biologically the possible effects anti convulsive and anti epilepticals of synthetical phosphoethanolamine SF and LF, front the convulsions induced for PTZ and in the epileptic state, detected in EEG, of epileptic *Wistar* mices. They were going used specific methodologies for both the study stages, incorporating models pre-clinical of anticonvulsivements medications neurological evaluations. The results pointed effect in the crises intensity decrease and of deaths front to the crises induction for PTZ, and effect anti convulsive of the liquid and solid form front the model of epileptic genetically mice, indicating Phosphoethanolamine probable has neurological action to the observed biological events.

Keys-word: Farmakis. phosphoethanolamine. Epilepsies. Pré-clinical-administration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plugs torneados fixados à calota craniana com parafusos.....	27
Figura 2 - Aspecto final da cirurgia de implante de plug cortical.....	28
Figura 3 - Exemplo de ondas clássicas de crises epiléticas detectadas no EEG tipo de ondas epiléticas encontradas nos animais antes dos respectivos tratamentos....	29
Figura 4 - Gráfico das medianas e o intervalo interquartis das intensidades das crises convulsivas dos respectivos grupos.....	33
Figura 5 - Representação gráfica das médias das latências das convulsões dos grupos e o respectivo erro padrão da média.....	34
Figura 6 - Tipo de ondas epiléticas encontradas antes dos respectivos tratamentos.....	36
Figura 7 - Eletroencefalografia obtido no animal número 2 antes do tratamento com FS.....	37
Figura 8 - Registro de disparo de crise epilética com detecção simultânea de movimentos clônicos.....	37
Figura 9 - Registro de ocorrência de crise epilética do animal número 2, após tratamento com FS.....	38
Figura 10 – Gráfico das médias das ocorrências antes e após o tratamento com FS e os respectivos erros padrões das médias.....	39
Figura 11 – Gráfico das durações em segundos das crises convulsivas detectadas antes e após o tratamento com a FS, e seus respectivos erros padrões das médias.....	39

Figura 12 - Registro de ondas epiléticas no animal número 5 antes do tratamento com FSI.....	41
Figura 13 – Média de ocorrências para os mesmos indivíduos antes e após o tratamento com FSI, e seus respectivos erros padrões das médias.....	41
Figura 14 - Registro de ondas epiléticas depois do tratamento com FSI.....	42
Figura 15 - Média de duração em segundos das crises convulsivas detectadas antes e após o tratamento com FSI.....	43
Figura 16 - Comparação de ambos os tratamentos FS e FSI, nas durações de crises registradas após respectivos tratamentos, e seus respectivos erros de médias.....	44
Figura 17 - Comparação das médias de ocorrências de crises posteriores aos tratamentos com FS e FSI, e seus respectivos erros das médias.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas das epilepsias no ser humano. Ao lado do modelo, entre parênteses, encontra-se o ano de sua descrição.....	8
Tabela 2 - Escala de níveis de convulsão proposta por RACINE.....	22
Tabela 3 - Demonstra a porcentagem de indivíduos que apresentaram crises convulsivas. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa para o grupo CDZ.....	34
Tabela 4 - Demonstra a porcentagem de ratos que vieram a óbito em cada grupo no período de 24 horas. O asterisco (*) indica redução de mortalidade estatisticamente significativa para o grupo FS.....	35

ABREVIATURAS

CDP.....	Citidina difosfato
CDZ.....	Clordiazepóxido
CMP.....	Citidina monofosfato
CSS.....	Controle solução salina
Exp.....	Experimento
FO.....	Fosfoetanolamina Orgânica
FS.....	Fosfoetanolamina sintética sólida complexada
FSI.....	Fosfoetanolamina Sintética líquida neutralizada
GABA.....	Ácido γ-amino butírico
g.v.....	gavagem
i.v.....	intravenosa
i.p.....	intraperitoneal
i.m.....	intramuscular
NMDA	N-metil-D-aspartato
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
Pi.....	Fósforo inorgânico
PTZ.....	Pentilenotetrazol
SNP.....	Sistema nervoso periférico
SNC.....	Sistema nervoso central
s.c.....	subcutânea

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 FOSFOETANOLAMINA

A fosfoetanolamina é um monoéster, onde a estrutura corresponde a (NH₂-CH₂-CH₂-P), constituinte de tecidos orgânicos e isolada de tumores malignos bovinos em 1936 por OUTHOUSE, forneceu a primeira comprovação da existência deste composto no estado livre na natureza. Posteriormente, outros pesquisadores encontraram a fosfoetanolamina em intestinos de ratos e tecidos cerebrais de bovinos (AWAPARA et. al, 1950; OSTERBERG, 1959).

Com o objetivo de elucidar o papel bioquímico destas substâncias, despertou-se especial interesse científico nos compostos fosforilados. Vários trabalhos enfocaram os diferentes comportamentos químicos dos fosfolipídios, fosfoproteínas e outras classes de organofosforados (OSTERBERG, 1959).

CHRISTENSEN e HASTINGS estudaram os aspectos químicos da interação entre ésteres fosfóricos, como a lecitina, cefalina e a serina, com íons metálicos como sódio e potássio. Sugeriram na época, um papel bioquímico destas substâncias, no controle do equilíbrio entre os eletrólitos nos organismos vivos (MARTELL and SCHWARZENBACH, 1956). Desde então, o interesse na interação fosfolipídeos-metais tem aumentado e outros trabalhos abrangendo complexações com outros cátions metálicos foram publicados (CHRISTENSEN, 1940). Como exemplo de estudo nesta área, MARTELL e SCHWARZENBACH (1956) mediram as constantes de estabilidade dos complexos formados entre adenosina mono, di e trifosfato (AMP, ADP e ATP) com cálcio. Tais complexações são de grande importância na formação das lipoproteínas, transporte de cátions e outros processos bioquímicos.

HAUSER e SHIPLEY (1981) verificaram existir uma interação específica e atípica entre a fosfatidilserina e o cátion Li^+ , resultando na cristalização de um complexo cristalino. Como o lítio costuma ser usado na terapia de doenças maníaco-depressivas, esses autores sugeriram que esta interação representaria provavelmente um papel na ação farmacológica do lítio.

A construção das membranas celulares de mamíferos e o retículo endoplasmático celular utilizam entre outros fosfolípidios a fosfoetanolamina e a fosfatidiletanolamina como parte integrante da estrutura de membranas (NAGATSUKA et al. 2006).

1.1.1 FOSFOAMINAS

CLARCKE et al. (1954) estudaram o equilíbrio de dissociação da fosfoetanolamina. Preocupados em manter um rigor para cálculo termodinâmico, surpreendentemente ignoraram o desvio ocorrido do pK da forma protonada e a forma livre da protonação. Esse estudo do comportamento da fosfoetanolamina orgânica (FO) gerou interesse científico em verificar se outros aminoácidos apresentariam também tal fenômeno de dimerização, já que possuem a mesma estrutura dipolar.

A (FO) e a etanolamina (EA) estão presentes no cérebro normal em grandes quantidades (PERRY, 1971). Essas aminas estão envolvidas no metabolismo dos fosfolípidios e são precursoras da fosfatidiletanolamina e da fosfatidilcolina, dois dos quatro fosfolípidos que compõem a membrana celular (PORCELLATI, 1971; CORAZZI, 1986). Foi demonstrado por vários pesquisadores que a FO e a EA são liberadas por despolarização em algumas circunstâncias. Embora desconheçam o verdadeiro significado fisiológico desta constatação, discute-se quais as reais

interações eletroquímicas envolvidas na dimerização do composto fosfoetanolamina no organismo (WOLFSENSBERGER, 1982; MAIRE, 1984; CORAZZI, 1986; PERSHAK, 1986).

As funções precisas da FO e da EA no tecido nervoso ainda são desconhecidas. No coelho a FO é liberada do hipocampo após despolarização com potássio, glutamato ou metil-aspartato. A liberação de FO está sempre associada com o aumento da concentração de taurina. A interação entre taurina e FO foi confirmada quando se mostrou que a taurina exógena e os bloqueadores da recaptção de taurina aumentam os níveis de FO. O metil-aspartato induz a liberação de taurina e FO dos locais dendrossomáticos, mas não dos sinaptossomáticos (LEHMANN, 1985a).

A EA se converte em FO no sistema nervoso sob a ação da etanolamina-quinase. Em etapa subsequente, através da via de Kennedy, forma-se a fosfatidiletanolamina, um dos quatro fosfolípidos componentes da membrana celular, e mais especificamente da constituição de esfingomielina que representa 8% da constituição da mielina dos axons neuronais (PU, 1984). Uma segunda via envolve o cálcio estimulando a incorporação de serina, etanolamina e colina nos fosfolípidos endógenos já existentes, em reações que não precisam de ATP (PORCELLATI, 1971). A colina é uma trimetil-etanolamina e se transforma por acetilação em acetilcolina (PU, 1984).

Estudos indicam que muitas patologias de SNC, incluindo epilepsias e convulsões esporádicas têm causa provável na deficiência de fosfoetanolamina (ELLISON, 1987). Em pacientes com doença de Alzheimer confirmadas neuropatologicamente, foi dosado a fosfoetanolamina nas regiões de predileção da doença, os dados foram então comparados com cérebros normais da mesma idade.

Constataram que com diferenças estatisticamente significantes, os níveis de fosfoetanolamina se encontravam 64% reduzidos no córtex temporal (área 21 de Brodmann), 48% no córtex frontal (área 9 de Brodmann) e 40% no hipocampo (ELLISON, 1987).

A evidência do efeito da indução de crises sobre decréscimo da liberação de fosfolipídios no tecido cerebral esta relatada na literatura, esta alteração abrange muitas regiões cerebrais, em especial a área cortical (YEGIN et al., 2002).

1.2 EPILEPSIA E SUAS POSSÍVEIS CAUSAS

O conceito adotado pelos cientistas que pesquisam o fenômeno da epilepsia difere integralmente de muitas idéias ainda hoje correntes, idéias que, não raro impregnadas de “superstições”, as quais provêm do século XIV e XV, quando a moléstia era considerada hereditária, degenerativa e, o termo epilepsia, sinônimo de estigma familiar. Era usual dizer que um indivíduo apresentava epilepsia quando este apresentava desmaios súbitos e imprevistos. Hipócrates já suspeitara que a alteração fosse decorrente de afecção cerebral. Neurologistas e psiquiatras do século XIX também estavam convencidos deste conceito. Apenas do início no século XX, com a organização dos hospitais para doentes mentais e abertura para observações mais minuciosas dos epiléticos, foi possível a elaboração de novas idéias acerca do problema. Contudo, foi o advento da eletroencefalografia aplicada à clínica que trouxe a maior contribuição em favor do processo orgânico cerebral (MONTI, 1989).

1.2.1 NATUREZA E MECANISMOS DAS CRISES

A natureza e mecanismos das crises epiléticas foram propostas no século XIX por John Hughlings Jackson, que propôs que as convulsões eram causadas por

“descargas ocasionais repentinas, excessivas, rápidas em locais da substância cinzenta” e que resultava uma convulsão generalizada, quando o tecido cerebral normal era invadido pela atividade da crise, iniciada em um foco anormal. Nos anos subseqüentes, além da demonstração elétrica da sua exatidão, pouco foi acrescentado aos conceitos de Jackson. O eletroencefalograma (EEG) demonstra amplamente que as crises associavam-se a descargas elétricas anormais e, às vezes, maciças no cérebro e serve como método básico para o diagnóstico diferencial das epilepsias (CHIU, 1994).

O termo epilepsias é uma designação genérica para um grupo de distúrbios do sistema nervoso central (SNC), que apresentam em comum o aparecimento de episódios repentinos e transitórios denominados convulsões, geralmente de fenômenos anormais de origem motora, sensorial, autônoma ou psíquica. As crises são, quase sempre, relacionadas a descargas anormais e excessivas dos neurônios do SNC (HAUSER, 1978).

Muitos estudos atribuem como causa de fenômenos epiléticos uma série de cascatas biológicas, incluindo: aumento da liberação de aminoácido excitatório, ativação do receptor do N-methyl-D-aspartato (NMDA) pelo glutamato, influxo de cálcio nos neurônios, adiantamento da síntese de proteínas que determinam uma nova expressão gênica. E estas conduzem a processos fisiopatológicos responsáveis para mudanças ao longo do tempo no comportamento neuronal é uma das hipóteses pouco estudadas até o presente momento é a ativação de enzimas cálcio-dependentes incluindo a fosfolipase A2 e a lisofosfatidilcolina (LPC) que é resultado da interação de uma molécula de fosfatidilcolina e uma molécula de fosfoetanolamina (LIPTON and ROSENBERG, 1994).

1.2.2 DIAGNÓSTICO, INCIDÊNCIA E MORTALIDADE NA POPULAÇÃO

A Organização Mundial de Saúde supõe que até 5% da população do mundo poderá ter alguma ocorrência de crises epiléticas de natureza diversa em algum momento de suas vidas, mas o diagnóstico de epilepsia é mais reservado para aqueles que apresentam crises recorrentes ou no mínimo duas vezes. A proporção da população que apresenta crises dentro de parâmetros considerados médios, ou seja, crises repetidas que evidenciam a necessidade de tratamento, são de 8,2 por 1.000 indivíduos da população geral. Entretanto, este valor pode estar subestimado para países como Colômbia, Equador, Índia, Libéria, Nigéria, Panamá, República Dominicana, Tanzânia e Venezuela onde estudos recentes indicaram valores de mais de 10 indivíduos por 1.000 da população geral. Dados que estimam números de pessoas no mundo que tiveram e que presentemente possuem epilepsia, é em torno de 100 milhões de pessoas. A incidência anual de novos casos é de 50 por 1.000 da população geral. Em países sub-desenvolvidos estima-se o dobro deste valor, devido a alta presença de patologias que conduzem a quadros epiléticos como: neurocisticercose, meningite, malária e complicações de má nutrição perinatal (OMS, 2006).

Países com problemas sanitários tais como Cuba e alguns países da América Central, apresentam como principais causas relatadas da epilepsia a presença de neurocisticercose ocasionada por *Tênia solium* (COSSIO et al., 2002). A taxa de mortes em epiléticos adultos é baixa, e geralmente pode ser aumentada quando associada a fatores de risco como: tumor ou infecção; ou circunstâncias perigosas como: afogamento, queimaduras ou ferimento ocasionados durante as crises repentinas. Outras causas relacionadas podem ser: falência respiratória, cardíaca e

até mesmo suicídio (OMS, 2006). Pessoas com epilepsia têm uma mortalidade acrescida sobre a população como um todo (Morgan & Kerr, 2002).

1.3 MODELOS DE INVESTIGAÇÃO EM EPILEPSIAS

Na década de 1930 houve uma normatização técnica da investigação das crises epilética, isto se deu graças ao desenvolvimento do registro eletroencefálico (EEG) realizado por Hans Berger (DELGADO-ESCUETA and COLS., 1986). A natureza das crises foi confirmada como atividade paroxística e anormal dos neurônios, exatamente como havia descrito John Hughlings Jackson a mais de meio século antes.

Os grandes avanços do estudo das epilepsias foram conseguidos nos últimos 30 anos após a instituição de normas nos modelos de investigação com animais. E em adição a isto, a importância de um modelo experimental é gerada pelo nível em que o modelo serve como reprodução do fenômeno natural. A grande ocorrência de aparecimento de diferentes modelos experimentais é normal, bem como, raro a validação destes no decorrer dos anos. Este fato se deve aos modelos apenas tentarem reproduzir algumas das características de algumas formas de epilepsias uma vez que são poucos os que resistem a uma análise rigorosa (MELLO et al., 2006).

Na tentativa de se isolar as variáveis da etiologia das epilepsias alguns modelos experimentais têm utilizado animais que são geneticamente suscetíveis às crises convulsivas (WHITE, 1997) estas desencadeadas por estímulos sensoriais adequados. Estes estímulos incluem as crises audiogênicas em determinadas raças de roedores e crises provocadas pela estimulação luminosa intermitente, prevalentes em um grupo específico de babuínos. Mais recentemente, foram

desenvolvidas a partir de duas raças consangüíneas de camundongos, uma cepa, caracterizada por convulsão tônico-clônicas espontâneas e outra por evidências comportamentais e eletrocorticográficas de crises de ausência espontâneas (HELLER et al., 1983). Estes modelos além de fornecerem oportunidades para avaliação de medicamentos, chamam a atenção para fatores hereditários suspeitos de desempenhar um papel na gênese da epilepsia humana (MAXSON et al., 1983).

1.3.1 SUBSTÂNCIAS USUAIS EM MODELOS DE INVESTIGAÇÃO

Drogas estimuladoras do sistema nervoso central, particularmente convulsivantes são substâncias quimicamente diversas cujo mecanismo de ação, geralmente, não são bem compreendidos. Muitas substâncias como a estriçnina, picrotoxina, leptazol e pentilenotetrazol são largamente utilizadas como instrumentos experimentais e não possuem usos clínicos (CORAZZI et al., 1985; LOEB, 1985; DALE & RANG, 1993).

A tabela 1 - resume alguns modelos experimentais e seus respectivos enquadramentos dentro da classificação das epilepsias no homem (MELLO et al., 2006).

TABELA 1 - Modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas das epilepsias no ser humano. Ao lado do modelo, entre parênteses, encontra-se o ano de sua descrição (modificado a partir de MELLO & COLS, 1986; *in apud*, MELLO et al., 2006).

MODELO	TIPO DE EPILEPSIA	SITUAÇÃO
EXPERIMENTAL		
<i>Injeção ou aplicação</i>		
<i>tópica de metais</i>		
Cobalto (1960)	Epilepsia focal (1)	Semicrônico
Ácido túngstico (1960)	Epilepsia focal (1), grande mal	Agudo
Creime de alumínio (1937)	Epilepsia focal recorrente, pequeno mal e crises de ausência	Semicrônico
<i>Estimulação química</i>		
Penicilina (1945)	Pequeno mal mioclônico, epilepsia corticoreticular generalizada	Agudo
Estricnina (1900)	Crises com foco cortical	Agudo
Ouabaína (1966)	Epilepsia límbica	Agudo
Pentilenotetrazol (1960)	Pequeno mal e crises generalizadas	Agudo
Picrotoxina (1960)	Epilepsias do lobo temporal (2)	Agudo e crônico (2)
Bicuculina (1970)	Epilepsia de longa duração (2)	Agudo e crônico (2)
Substâncias colinomiméticas (1949)	Epilepsias focais e do lobo temporal	Agudo e crônico
Hidrazinas e piridoxais (1949)	Crises generalizadas	Agudo
Insulina (1940)	Crises metabólicas	Agudo
Oxigênio hiperbárico (1943)	Crises de grande mal	Agudo
Congelamento (1883)	Crises focais	Agudo

<i>Modelos com</i>		
<i>predisposição genética</i>		
Crise audiogênica em camundongo (1924)	Crises tônico-clônicas	Agudo
Fotossensibilidade genética (1966)	Crises centro-encefálicas	Agudo
<i>Estimulação elétrica</i>		
Eletrochoque (1870)	Epilepsia focal	Agudo
Abrasamento (1969)	Crises parciais e generalizadas, pequeno mal e auras	Agudo e crônico
<i>Neurotoxinas</i>		
Ácido caínico (1970)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico
Ácido ibotênico (1979)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico
Ácido domóico (1987)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico

Legenda: (1) apesar de não produzir lesões crônicas; (2) quando aplicada na amígdala.

1.3.1.1 PENTILENOTETRAZOL COMO INDUTOR DE CONVULSÕES

Convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em modelos experimentais são freqüentemente utilizadas em experimentos. Há algumas décadas atrás utilizava-se o PTZ por via intravenosa para ativar o EEG, como auxílio diagnóstico na epilepsia. A dose subconvulsivante da droga, isolada ou associada à luz estroboscópica, costuma ativar focos epiléptogênicos latentes (VOURLIOTIS *et al*, 1998). O PTZ é uma poderosa ferramenta em laboratórios para triagem de drogas anticonvulsivantes em animais experimentais, doses convulsivantes limiares da droga são aplicadas e produzem atividade motora caracterizada por espasmo clônico do maxilar e das patas dianteiras (OLSEN, 1982).

Estudos focando a interação de crises convulsivas induzidas por PTZ e níveis dos fosfolipídios orgânicos, detectaram alterações nos níveis de fosfolipídios presentes no cérebro, após crises induzidas, frente a esta constatação, novos estudos visando a suplementação de fosfolipídios em indivíduos expostos a eventos de crises epiléticas podem indicar uma possível rota de eventos envolvidos nesta relação (YEGIN et al., 2002).

Sendo considerado uma ferramenta comum nas práticas de laboratório de triagem de medicamentos anticonvulsivantes o PTZ e outros agentes químicos de mesma atividade biológica, são apenas um de muitos outros testes realizados em conjunto na busca da constatação do efeito anticonvulsivante de várias substâncias (MOESGAARD, et al., 2003).

1.4 POTENCIAIS DE MEMBRANA E POTENCIAIS DE AÇÃO

A existência de potenciais elétricos através das membranas celulares é evidente em todas as células do corpo. Além disso, algumas células como as neurais e as musculares, são “excitáveis” – isto é, capazes de auto geração de impulsos eletroquímicos em suas membranas. Na maioria dos casos, esses impulsos podem ser usados para transmissão de sinais ao longo dessas membranas (KANDEL, et al., 1995).

1.4.1 POTENCIAIS DE MEMBRANA RESULTANTES DA DIFUSÃO

A camada bilipídica da membrana celular é essencial na ocorrência de potenciais elétricos devido à seletividade de íons de cargas distintas, bem como sua impermeabilidade a água. Todo transporte de íons pela membrana celular só é possível devido à existência de poros inseridos nesta estrutura, o que confere a esta

uma característica seletiva de absorção denominada permeabilidade seletiva (KANDEL, et al., 1995).

Para uma célula manter e transmitir uma informação, ela trabalha com uma polarização na membrana celular (que atua como um capacitor) de -70mV. Esta polarização é assegurada pela alta concentração de íons de potássio (K) no interior da célula em contrapartida com a baixa concentração de íons de sódio (Na) no meio intra-celular. A "corrente de íons" divide-se em três componentes principais: Sódio, Potássio e de outros íons (incluindo Cloro). As correntes são geradas como resultado de uma diferença de potencial elétrico e de um coeficiente de permeabilidade celular a um íon específico que assume a forma de condutância (g). A corrente de Sódio, por exemplo, é igual à condutância do Sódio (g_{Na}) multiplicada pela diferença de potencial da membrana e o equilíbrio de potencial de íons de Sódio (E_{Na}) (KANDEL, et al., 1995).

Existe um grande fluxo concentrado de potássio de dentro para fora, pois existe forte tendência para que os íons potássio se difundam para o exterior, e criam, dessa forma, estado de eletropositividade, no exterior da membrana, e de eletronegatividade, em seu interior, devido aos ânions eletronegativos que permanecem dentro da célula, não se difundindo exteriormente junto com o potássio. Essa nova diferença de potencial, positivo externamente e negativo no interior, repele os íons potássio de carga positiva que estão se difundindo para fora. Dentro de pouco mais de 1 ms, a alteração do potencial torna-se suficientemente grande para bloquear qualquer difusão efetiva para o exterior, em consequência do alto gradiente de concentração do íon potássio. Na fibra nervosa mais calibrosa e

normal de mamífero, a diferença de potencial necessária é de cerca de 94 mV, com a negatividade no interior da membrana (KANDEL, et al., 1995).

Quando se admite a alta concentração de sódio no exterior e baixa concentração no interior da membrana, a membrana é altamente permeável aos íons sódio, mas impermeável aos demais íons. A difusão dos íons sódio para interior produz um potencial de membrana com polaridade oposta, negatividade no exterior e positividade no interior da membrana. De novo, o potencial de membrana aumenta, dentro de milisegundos, até valor suficiente para bloquear qualquer difusão efetiva adicional para o interior; todavia, nesta situação, para a fibra nervosa calibrosa de mamíferos, o potencial de ação é de cerca de 61 mV, com a positividade no interior da fibra (GUYTON and HALL, 1997).

Assim destas duas formas distintas da concentração de íons de potássio e sódio no interior e exterior da célula, vê-se que uma diferença de concentração destes íons entre as duas faces da membrana seletivamente permeável, pode, sob condições apropriadas, gerar um potencial de membrana (GUYTON and HALL, 1997).

1.4.2 POTENCIAL DE AÇÃO NEURAL

Os sinais nervosos são transmitidos por potenciais de ação que são variações rápidas do potencial de membrana. Cada potencial de ação começa por alteração abrupta do potencial de repouso, normalmente negativo, para um potencial de membrana positivo, terminando por retorno igualmente rápido ao potencial negativo. Para conduzir um sinal neural, um potencial de ação se desloca, ao longo da fibra nervosa, até atingir sua extremidade. As alterações ocorridas na membrana durante

o potencial de ação são as transferências de cargas positivas para o interior da fibra em seu começo e o retorno das cargas positivas para o exterior a seu término. As etapas sucessivas do potencial de ação são as seguintes:

-*ESTADO DE REPOUSO*: corresponde ao potencial de repouso da membrana antes que comece o potencial de ação. Diz-se que a membrana está “polarizada” durante esta etapa devido à presença de grande potencial negativo da membrana;

-*ETAPA DE DESPOLARIZAÇÃO*: Neste ponto, a membrana fica subitamente permeável aos íons sódio, permitindo o fluxo de grande quantidade de íons sódio com carga positiva para o interior do axônio. O estado polarizado normal, de -90 mV, desaparece, com o potencial variando rapidamente na direção da positividade. Isto é chamado de “despolarização” em casos de fibras mais grossas, o potencial de membrana ultrapassa o potencial zero, atingindo valor positivo, mas, em algumas fibras delgadas, bem como muitos neurônios do SNC, o potencial chega apenas próximo ao potencial zero;

-*ETAPA DE REPOLARIZAÇÃO*: Dentro de poucos décimos de milésimos de segundo, após a membrana ter ficado muito permeável aos íons sódio, os canais de sódio começam a se fechar, enquanto os canais de potássio se abrem mais do que o fazem normalmente. Isto permite a rápida difusão de íons potássio para o exterior da fibra, que restabelece o potencial normal negativo de repouso da membrana. Isto é chamado repolarização da membrana (KANDEL, et al., 1995).

Desta forma o potencial de repouso e principalmente o potencial de ação podem ser alterados por modificações nas estruturas e componentes da camada bilipídica da membrana celular. Estes eventos podem ocorrer através de aumento de oferta de moléculas de fosfolípidos ou outros constituintes de membranas na forma iônica ou molecular (KANDEL, et al., 1995).

1.5 MECANISMO DE AÇÃO DAS DROGAS ANTICONVULSIVANTES

Um mecanismo no controle de convulsões é a utilização de barbitúricos, os quais, antagonizam as ações excitatórias do glutamato. Em vários casos, o mecanismo de ação de drogas anticonvulsivantes é muito mal compreendido. O fenobarbital é um barbitúrico que possui efeito anticonvulsivante consideravelmente maior em relação a sua ação sedativa que a maioria dos outros barbitúricos como pentobarbital. Um de seus efeitos é estimular a ação do GABA como neurotransmissor inibitório pela ligação a um local no complexo GABA-receptor-canal que é distinto dos locais de ligação do GABA ou benzodiazepínicos, esta é uma das possíveis explicações de suas atividades anticonvulsivantes. Entretanto, o fenobarbital não é mais eficaz que pentobarbital na potencialização da ação do GABA, embora seja muito mais eficaz que uma droga anti-epiléptica, e, portanto esta não pode ser uma explicação completa. Além disso, o fenobarbital é tão eficaz contra convulsões eletricamente induzidas quanto contra convulsões induzidas por Leptazol em ratos ou camundongos, enquanto os benzodiazepínicos, que atuam aumentando a ação do GABA, não tem efeito sobre convulsões eletricamente induzidas. O fenobarbital reduz a atividade elétrica dos neurônios em um foco epiléptico artificialmente induzido no córtex, enquanto o diazepam (um benzodiazepínico) não altera muito a atividade focal, mas parece evitar a sua difusão. Portanto, é irreal atribuir a ação do fenobarbital apenas à sua interação com o GABA, e há boas evidências de que também possa atuar através da inibição de respostas sinápticas excitatórias, embora se saiba pouco sobre o mecanismo (DALE & RANG, 1993).

Nos mamíferos, o glutamato age nos receptores os quais são divididos em duas famílias, onde a primeira está associada a canais iônicos (ionotrópicos),

subdivididos e denominados segundo seus respectivos agonistas em receptores NMDA, AMPA e CAINATO (WATIKINS et al., 1990; HOLLMAN and HEINEMENN, 1994).

Alterações do funcionamento de receptores e canais iônicos neuronais ou nas glias, como a ativação excessiva de receptores glutamatérgicos, são responsáveis por várias alterações no SNC, como isquemia cerebral e epilepsias (PRINCE and CONNORS, 1986; WASHBURN et al., 1996).

O CDZ é outro benzodiazepínico que atua de forma geral como depressor do SNC, produzindo todos os níveis de depressão, desde uma leve sedação até hipnose, conforme a dose. Acredita-se que, após interatuar com um receptor neuronal específico de membrana, potencializa ou facilita a ação inibidora do GABA. Calcula-se que o estímulo dos receptores GABA no sistemas reticular ativador ascendente, com aumento da inibição e bloqueio da excitação cortical e límbica após estimular a formação reticular do tronco cerebral. O (CDZ) é bem absorvido no trato gastrointestinal e após a administração intra-muscular, sua absorção é lenta e errática, e sua união às proteínas muito alta. Metaboliza-se no fígado; sua meia-vida é longa, 5 a 30 horas, e seus metabólitos ativos são demoxepam, desmetildiazepam, oxazepam e desmetilclordiazepóxido (PRINCE & CONNORS, 1986).

1.6 RELAÇÕES DE DESARRANJOS NEUROLÓGICOS NOS NÍVEIS DE LÍPIDIOS ENDÓGENOS

Nas últimas décadas devido a evidências de estudos os quais relacionaram a freqüente alteração na liberação de muitos lipídeos endógenos, bem como algumas enzimas relacionadas ao metabolismo destes, após a ocorrência de crises epiléticas,

induzidas ou não, estes estudos utilizaram-se de muitos métodos de investigação, detectaram na maioria dos casos alterações nos níveis de fosfoetanolamina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfolipase A2, ácidos graxos, fosfatidilserina, fosfatidilinositol entre outros fosfolipídios e glicerollipídeos (CORAZZI, 1985; YEGIN, 2002; NODA, 1988; FLYNN and WECKER, 1987; LOEB, 1985).

Nos casos onde houve aumentos significativos de fosfoetanolamina, fosfatidiletanolamina e ácidos graxos como palmitol, oléico e araquidônico lançaram uma questão e uma eventual hipótese a ser testada: se a suplementação com substâncias lipídicas e de baixo peso molecular viriam a alterar o comportamento e até mesmo a ocorrência de crises epiléticas detectadas em indivíduos suscetíveis ou expostos a eventos de indução de crises. Outra possibilidade a ser testada concomitante a este tipo de teste pré-clínico neurológico seria a variação dos modelos de investigação adotados a fim de abranger outros tipos de etiológicos de crises epiléticas que não as induzidas quimicamente e fornecer dados seguros sobre a relação dos níveis de fosfolipídios e desarranjos neurológicos (FLYNN and WECKER, 1987).

Visando obter uma interpretação única da influência dos fosfolipídios, em especial da fosfoetanolamina nos eventos epiléticos, este apresenta um estudo da influência da fosfoetanolamina sobre modelos de epilepsias em animais.

2 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar os possíveis efeitos em aplicações pré-clínicas da Fosfoetanolamina sintética na forma sólida complexada (FS) frente a:

- Convulsões induzidas por Pentilenotetrazol em ratos *Wistar* machos normais

Na forma sólida complexada (FS) e na forma líquida neutralizada (FSI) frente a:

- Alterações nas descargas epiléticas em ratos machos *Wistar* geneticamente epiléticos, com auxílio de eletroencefalografia.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS E MÉTODOS EM COMUM AOS DOIS EXPERIMENTOS

3.1.1 SUJEITOS UTILIZADOS EM AMBOS OS EXPERIMENTOS

Os sujeitos da pesquisa foram ratos *Wistar* machos (sadios e geneticamente epiléticos) com 60 dias de idade provenientes do biotério central da UNESP de Botucatu. Estes foram tratados com ração da marca Labina e água potável *ad libitum*. Todos os animais foram mantidos em ambiente controlado de luz (12 horas/dia) e temperatura 20 °C - 24 °C. Todos os animais foram separados aleatoriamente (5 animais por caixa e três caixas por grupo) em caixas de propilpropileno (40 x 32 x 16 Cm) para adaptação. Todos os procedimentos de utilização de animais no presente trabalho foram realizados de acordo com as normas de ética divulgadas pelo COBEA (Colégio Brasileiro Experimental).

3.1.1.2 IDENTIFICAÇÃO DOS GRUPOS E DEFINIÇÃO DA CONDUTA DE TRATAMENTO

Todos os indivíduos foram marcados de 1 a 5 na cauda com tinta, afim de destacar os grupos e indivíduos dentro de cada caixa do grupo. Todos os animais foram pesados diariamente com balança comum e calculado o volume de cada composto a ser administrado por indivíduo. Todas as soluções foram administradas no período da manhã. O tratamento crônico foi estabelecido durante trinta dias consecutivos.

3.2 EXPERIMENTO 1

3.2.1 MATERIAIS

Foram utilizados para este experimento os seguintes materiais:

3.2.1.1 DETECÇÃO E QUALIFICAÇÃO DOS COMPORTAMENTOS

- * Câmera filmadora digital para gravação de todas as ocorrências de comportamentos.
- * Programa de avaliação e quantificação de comportamentos Etholog (OTTONI, 2000), programa específico que quantifica os eventos de comportamentos apresentados pelos animais durante análise neuroetológica.

3.2.1.2 SOLUÇÕES QUÍMICAS DO TRATAMENTO

- * **Fosfoetanolamina sintética na forma sólida (FS)** complexada com Cálcio, Magnésio e Zinco.
- * **Clordiazepóxido** manipulado por farmácia de manipulação e emulsionado em solução salina a 0,9% apenas durante o processo de administração da droga.
- * **Pentilenotretazol** do fabricante laboratório Sigma-Aldrich, este foi pesado em balança analítica METTLER, modelo AE-240 com precisão de décimo de mg, e solubilizado em solução salina a 0,9 % de concentração apenas na hora da administração do composto.
- * **Solução salina** (NaCl) confeccionada com água bidestilada e esterilizada em 0,9 % de concentração.

3.2.2 MÉTODOS

Os animais foram submetidos aos tratamentos com as seguintes doses das soluções químicas:

Grupo testado Fosfoetanolamina (FS), recebeu uma dose de 22g/kg corporal de fosfoetanolamina sintética sólida (FS) complexada com Cálcio, Magnésio e Zinco

como agentes alcalinizantes. Este composto foi emulsificado em solução salina a 0,9% de concentração e foi administrado por gavagem num volume de 10ml/Kg corporal.

Grupo controle com anti-convulsivante conhecido, Clordiazepóxido (CDZ). Este grupo recebeu uma dose de 10mg/Kg corporal de Clordiazepóxido em solução salina a 0,9%, num volume de administração de 10 ml/ Kg corporal administrado por gavagem.

Grupo controle salina (SAL) recebeu solução salina a 0,9% de concentração num volume de 10 ml/Kg corporal administrado por gavagem.

3.2.2.1 INDUÇÃO DE CONVULSÃO COM PENTILENOTETRAZOL

No trigésimo dia de tratamento e após a administração de todas as soluções os animais tiveram sua ração suspensa. Depois de transcorridas duas horas do início da administração das soluções, houve o início da administração do pentilenotetrazol o qual foi administrado por via intraperitoneal (IP) na dose de 60 mg/Kg corporal e num volume de 6 ml/Kg corporal em solução salina a 0,9% (NODA, 1988).

3.2.2.2 AVALIAÇÃO DAS CRISES CONVULSIVAS

Para avaliação das crises convulsivas foi adotada uma escala de valores de acordo com os níveis de convulsão observada nos animais, denominada escala de RACINE (Tabela 1). Esta escala consiste em abrangências de áreas corporais envolvidas em cada estágio de convulsão (RACINE, 1972; BECKER, 1992).

Tabela 2 Escala de níveis de convulsão proposta por (RACINE, 1972)

Estágio	Descrição
0	Sem resposta aparente
1	Movimentos súbitos das orelhas e da face
2	Movimentos mioclônicos sem verticalização corporal
3	Movimentos mioclônicos em posição vertical, com tônus bilateral dos membros anteriores
4	Convulsão tônico-clônica
5	Convulsão tônico-clônica generalizada, com perda do controle postural

Para cada seção de aplicação de PTZ foram selecionados três animais. Após receberem a droga estes ficaram isolados em gaiolas individuais de ferro. Todo processo foi cronometrado com auxílio de cronômetro. Todas as respostas produzidas pelos animais foram anotadas em formulário pré-elaborado. O tempo total de cada seção de observação foi de 40 minutos. Todos os animais tiveram acompanhamento de até 24 horas após a administração do PTZ para verificação de possíveis ocorrências de óbitos.

3.3 EXPERIMENTO 2

3.3.1 MATERIAIS

Para este experimento foram utilizados os seguintes materiais:

3.3.1.1 PARA O IMPLANTE E CIRURGIA

3.3.1.1.1 MATERIAIS ELÉTRICOS

* Plugs de conexões torneadas adaptados ao implante intracraniano, estes plugs foram cortados e soldados aos fios níquel cromo de espessura 0,03 mm, previamente raspados para retirada do esmalte isolante. Durante o procedimento de soldagem não se utilizou ácidos pra remoção de óxidos nas partes a serem soldadas. Utilizou-se deste artifício, a fim de evitar ruídos provocados pela interferência deste processo na posterior leitura do EEG.

* Cabo de cobre 0,06 mm com plugs tipo “bananas” conectados em uma das pontas, e plug torneado tipo macho na outra ponta e este lado foi conectado ao implante existente na cabeça do animal. Na outra extremidade os plugs “bananas” foram conectados à caixa de eletrodos e esta ao eletroencefalograma.

* Retifica de alta rotação (1800 RPM), com broca de ponta de desbaste diamantada, na confecção dos furos da trepanação do crânio do rato, nestes locais foram conectados parafusos de aço inoxidável número 103.

* Resina polimérica moldável foi utilizada no isolamento das conexões de soldas existentes nos plugs e no auxílio de fixação e isolamento elétrico do plug implantado na cabeça do rato.

3.3.1.1.2 MATERIAIS CIRÚRGICOS DIVERSOS

* Cronômetro Citizen foi utilizado para demarcar com segurança o início e o final da sedação de cada animal em processo cirúrgico.

- * Anestésico geral a base de Ketamina da marca Dopalem, como anestésico de ação central.
- * Anestésico local Xylestesin (cloridrato de lidocaína com epinefrina 1:200.000 a 2% da marca Cristália) em solução injetável na sedação e inibição de sangramento excessivo.
- * Relaxante muscular Rumpum com Xilazina 5% da marca Veterinária, administrado intramuscularmente para evitar espasmos musculares súbitos.
- * Água oxigenada 10 vol. no auxílio da remoção de resíduos de tecidos moles e sangue no processo de diafanização das camadas teciduais.
- * Gases e algodão hidrofóbico, esterilizados e próprios para procedimentos cirúrgicos no estancamento do sangue.
- * Instrumentações cirúrgicas:
Pinça dente de rato, pinça de relojoeiro, tesoura cirúrgica, bisturi lamina número 10, seringa carpodérmica, seringas descartáveis de 1 mL e 5 mL.

3.3.1.2 PARA ANÁLISE NO ELETROENCEFALOGRAMO

- * Cabine de tela metálica (Gaiola de Faraday) contra energia estática, no interior desta foi colocada uma caixa de madeira de dimensões 20 x 15 x 15 cm com um furo na tampa, para permitir a passagem dos cabos que interligaram o plug implantado à caixa de eletrodos.
- * Caixa de eletrodos para amplificação e interpolação de sinais provenientes do implante, esta caixa ficou conectada por um cabo próprio ao EEG.
- * Eletroencefalografia, foi realizada em um polígrafo da marca Bergh modelo TW102 nas seguintes condições de calibração: constante de tempo 0,03 filtragem de 35 Hz e 200 μ V e velocidade do papel de 5 cm por segundo.

3.3.2 TRATAMENTOS

Os tratamentos utilizaram as seguintes formas de fosfoetanolamina:

Solução de Fosfoetanolamina na forma sólida (FS) complexada com agentes alcalinizantes cálcio, zinco e magnésio. Composto sintetizado em forma sólida e emulsionado em solução salina a 0,9% apenas para tratamento.

Solução de Fosfoetanolamina Líquida neutralizada (FSI) a 3,3% de concentração. Composto solubilizado durante o processo de síntese. Foi utilizado solução de monoetanolamina $\{(C_2H_7 NO) P.A. - A.C.S.; P.M. 61,08\}$ da marca Nuclear, como agente alcalinizante para substituir a adição de metais neste composto.

Selecionou-se 24 ratos *Wistar* machos e adultos. Estes animais foram triados em cabine acústica com acionamento de sirene a 130 decibéis com frequência de 22.000Hz, onde, apenas os animais que apresentaram crise audiogênica indicativo de quadro epilético (FAINGOLD, 1998; BROWNING, 1994; BROWNING, 1999) foram utilizados.

Estes animais foram separados em 2 grupos de tratamento:

Grupo 1 com 12 indivíduos tratado com FS,

Grupo 2 também com 12 indivíduos tratados com FSI.

Todos os grupos foram submetidos à cirurgia de implante de plug intra-cortical com auxílio de aparelho estereotático, segundo a orientação do mapa estereotático de PAXINOS e WATSON, 1986.

3.3.3 CIRURGIA DE IMPLANTE CORTICAL

Os animais foram sedados com anestesia geral, kentamina na dose de 1,2 ml/kg/i.p., e para evitar espasmos nervosos involuntários adversos os animais foram localmente sedados com relaxante muscular de ação central Xilasina, na dose de 1ml/Kg/i.m.. Posteriormente verificada a sedação total do animal através de pinçamento da pálpebra, fixou-se o crânio do mesmo no aparelho estereotático. Efetuou-se uma aplicação de anestésico local e de agente vasoconstritor (Epinefrina Pilocarpina, 2%) em solução salina 0,9%, para evitar sangramento excessivo e prejudicar a visualização do campo cirúrgico.

Retirou-se com auxílio de uma tesoura cirúrgica os pelos do crânio. A porção de tecido muscular e epitelial do mesmo foi diafanizada com auxílio de bisturi e lâmina número 10. Realizou-se uma raspagem do crânio a fim de remover todo tecido mole no campo cirúrgico. Acrescentou-se água oxigenada 10 volumes durante o início do procedimento cirúrgico, a fim de remover todo resíduo de tecido mole ainda aderido ao tecido ósseo.

Para a colocação dos animais no aparelho esterotático segundo Paxinos e Watson, 1986 posicionou-se a barra incisória na medida 3,3 mm abaixo do zero horizontal, os dentes incisivos dos ratos foram presos no aparelho, fixou-se as barras horizontais do aparelho nos meatos auditivos e a linha média cranial foi alinhada centralmente depois deste processo marcou-se nas escalas das barras do aparelho estereotático, os pontos de perfusão craniana a serem realizados. Foram marcados com tinta azul: um ponto de cada lado da sutura sagital do crânio a 1 mm (LE) (látero lateral esquerdo) e 1mm (LD) (látero lateral direito), um outro ponto a 1 mm (PB) da sutura bregma (posterior bregma), e um ponto a 1 mm da sutura lambidóide (posterior anterior).

Nos locais sinalizados, com auxílio de uma broca diamantada e retífica de alta rotação (1800 rpm), foram realizados furos no crânio. Nestes, foram fixados parafusos de aço inoxidável até a confirmação do contato direto do córtex do animal. Nestes parafusos foram conectados fios esmaltados previamente raspados conectados ao plug torneado. Para evitar rompimento, isolou-se e fixou-se o plug à calota craniana com resina acrílica moldável (Figura 1 e 2). Realizaram-se pontos falsos com linha de algodão esterilizada na pele do crânio para finalizar a cirurgia. Durante as horas seguintes o animal ficou sob observação até o seu despertar total e a verificação de possíveis acometimentos anormais no seu comportamento.

Figura 1, plugs torneados fixados à calota craniana com parafusos.

Figura 2, aspecto final da cirurgia de implante de plug cortical.

3.4 AVALIAÇÃO NO ELETROENCEFALOGRAMO

Dois dias após a implantação dos eletrodos, os animais foram avaliados no Polígrafo, sendo então acondicionados dentro de uma caixa de tela metálica a fim de se evitar interferência eletrostática. O plug implantado foi conectado por acoplamento simples na caixa de eletrodos e esta ao EEG. Cada animal foi submetido a uma sessão de 10 minutos e os resultados foram impressos em papel específico para futura análise.

A confirmação de ocorrências de eventos epiléticos nos animais foi obtida através de detecção de espículas longas seguida de espículas lentas no resultado do EEG de cada animal a ser testado (Figura 3).

Figura 3, exemplo de ondas clássicas de crises epilépticas detectadas no EEG.

3.4.1 SUPLEMENTAÇÃO COM FOSFOETANOLAMINA NA FORMA SÓLIDA FS

Os animais epilépticos e normais com implante já instalado, foram suplementados diariamente por período crônico de 30 dias na dose de 22 Mg/Kg corporal, por gavagem (g.v.), com solução de FS.

3.4.2 SUPLEMENTAÇÃO COM FOSFOETANOLAMINA LIQUIDA FSI

Os animais deste grupo também receberam por via oral e pelo mesmo período (30 dias) solução de FSI numa dose 1,0 MI/Kg/g.v., esta calculada como sendo equivalente à dose administrada ao grupo tratado com FS.

3.4.3 AVALIAÇÃO DAS OCORRÊNCIAS E DAS DURAÇÕES DAS CRISES EPILÉPTICAS ENCONTRADAS

Como critério prévio avaliou-se os registros de EEG coletados em papel os quais, foram posteriormente analisados adotando-se a metodologia de quantificação

de descargas epiléticas, tais descargas são caracterizadas pelo aumento súbito de amplitude e de frequência da oscilação eletroencefalográficas, observadas. A quantidade de ocorrências de eventos epiléticos detectados no EEG antes e após o tratamento foram quantificados como número de ocorrências. Avaliou-se também a duração e o tempo de sustentação das crises no córtex em segundos. Este tempo foi determinado através da soma total das medidas registradas em centímetros na folha de impressão do EEG, e posteriormente dividiu-se o valor encontrado na somatória pela taxa de 5 centímetros por segundo que representa a velocidade do papel. Desta forma tem-se o valor dado em segundos de duração de eventos epiléticos obtidos antes e após tratamento e ambos comparados a posteriori. O tempo total de observações em EEG foi de 15 minutos para cada análise individual.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.5.1 EXPERIMENTO 1

Foi utilizado o Teste estatístico Qui-quadrado para avaliação dos resultados expressos em termos de incidência de convulsões e de óbitos (mortalidade). Os dados de intensidade das crises foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com posterior aplicação do teste de Wald-Wolfowitz no caso significância entre os três tratamentos. A latência das convulsões foi analisada pelo teste ANOVA one way, com posterior teste HSD em amostras de tamanho desigual para comparações múltiplas para todos os testes acima mencionados. Foi adotado o nível de significância de 5% e as análises foram feitas utilizando o software específico Statistica/Statsoft da Siegel.

3.5.2 EXPERIMENTO 2

Foi utilizado o teste T de Student para amostras pareadas para comparação de antes e depois das dispersões das médias de ocorrências de crises epiléticas detectadas no EEG antes e após tratamento com as respectivas formas da Fosfoetanolamina. Utilizou-se também o teste T para comparação das dispersões das médias de duração de crises epiléticas, estas dadas em segundos, antes e após os respectivos tratamentos. Foi adotado o nível de 5% de significância nos testes e utilizado o programa SPSS na confecção das análises estatísticas.

4.RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 DESCRIÇÃO GERAL DOS COMPORTAMENTOS DURANTE A INDUÇÃO DE CONVULSÕES PELO PTZ

O **grupo controle salina (SAL)**, após a aplicação do PTZ, apresentou comportamentos típicos de exploração e de autolimpeza.

Exploração: verificação visual, olfativa e auditiva do ambiente, mais intensa nos primeiros momentos após colocação do animal na gaiola individual.

Autolimpeza: lambidas e mordidas na pele, garras, pelos e/ou órgãos genitais, ocorrendo do lado direito e esquerdo do corpo, e frontalmente nas garras e na limpeza de cabeça.

O **grupo clordiazepóxido (CDZ)** apresentou comportamentos similares ao grupo salina nos primeiros momentos de exposição ao novo ambiente da gaiola metálica. Foram relatados comportamentos de exploração e auto limpeza.

O **grupo fosfoetanolamina sólida (FS)** exibiu os mesmos comportamentos exploratórios e de auto limpeza nos momentos seguidos ao da aplicação de PTZ, porém, estes animais se mostraram mais agitados, apresentando maiores frequências destes comportamentos.

4.1.2 DADOS QUANTITATIVOS RELACIONADOS COM AS CONVULSÕES INDUZIDAS PELO PTZ

A intensidade das crises de cada grupo, medida pela escala de Racine, está mostrada na figura 4. Frente aos resultados, encontrou-se diferença estatisticamente significativa na intensidade das convulsões entre os grupos, segundo o teste de Kruskal-Wallis [$H(gf=2, n= 45)=27,22; p<0,05$]. Os animais dos grupos FS e CDZ

tiveram convulsões com intensidades significativamente menores que os animais do grupo SAL (teste de Wald-Wolfowitz ; $p < 0,001$).

Figura 4. Medianas e o intervalos interquartis (50% dos indivíduos) das intensidades das crises convulsivas dos respectivos grupos. O asterisco (*) indica que o resultado do grupo salina foi significativamente maior segundo o teste estatístico de Wald-Wolfowitz.

A incidência das crises convulsivas induzidas por PTZ está sumarizada na tabela 3. O grupo CDZ apresentou redução estatisticamente significativa de incidência de crises com relação ao grupo SAL [Qui-quadrado ($gl = 3$, $p = 5,98$)22,18]. Já o grupo tratado com FS apresentou incidência de crises semelhante ao grupo SAL (Qui-quadrado: $gl = 1$, $p = 0.1432$).

Tabela 3 Porcentagem de indivíduos que apresentaram crises convulsivas. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa para o grupo CDZ em relação a salina.

	Total de animais	Porcentagem de ratos que apresentaram crises
Salina	15	100%
CDZ	15	60% *
FS	15	86,6%

Os dados de latência figuram na figura 5, que mostra a média, mais o erro-padrão da média, para cada grupo. A análise de variância revelou diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos [$F(2,34)=5,47; p<0,0087$]. O grupo tratado com CDZ apresentou maior latência de convulsões quando comparado ao grupo FS e SAL ($p<0,05$). Os grupos tratados com salina e fosfoetanolamina não diferiram entre si.

Figura 5, Média das latências das convulsões dos grupos e o respectivo erro padrão da média. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa, para a média do grupo CDZ comparado entre os outros grupos.

A porcentagem de óbitos para o grupo tratado com FS foi significativamente menor em relação ao SAL (Qui-quadrado $gl = 1$, $p = 0,0143$), sendo que não houve diferença para o grupo tratado com CDZ. A tabela 4, abaixo mostra os valores de mortalidade em cada grupo.

Tabela 4 Porcentagem de ratos que vieram a óbito em cada grupo no período de 24 horas. O asterisco (*) indica redução de mortalidade estatisticamente significante para o grupo FS.

	Total de animais	Porcentagem de ratos que vieram a óbito
Salina	15	33%
CDZ	15	13,3%
FS	15	0% *

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 DESCRIÇÃO GERAL DOS RESULTADOS

Através da avaliação dos registros do encefalograma, foi possível detectar que o padrão de ondas cerebrais encontradas em todos os animais antes do tratamento correspondia aos de animais epiléticos, pois todos possuíam ondas cerebrais com eventos de disparos assíncronos com ondas de espícula longa seguida de ondas lentas (figura 6), características de eventos epiléticos (RACINE,

1971). Este teste confirmou e validou o modelo de corrida selvagem adotado na seleção prévia dos animais.

Figura 6, tipo de ondas epiléticas encontradas nos animais antes dos respectivos tratamentos.

4.2.2 RESULTADOS DO GRUPO TRATADO COM FS

Em observação realizada por quinze minutos de análise a média foi de 29.2 ocorrências com uma duração média de 118,75 cm. Dividindo pela velocidade do papel a 5 cm/seg., o tempo total de crise foi de 23,75 segundos de duração antes do tratamento. A detecção de padrões de ondas hipersincronizadas antes das crises propriamente ditas, também foi bem caracterizada (figura 7). Outra evidência que sustenta esta confirmação foi a detecção simultânea de mioclônias faciais e de membros superiores com o registro concomitante de crise epiléticas no EEG. Este evento de crise ficou mais evidente pela alta frequência do registro acima da normalmente detectada, nas crises de outros animais (figura 8).

Figura 7, eletroencefalografia obtida no animal número 2 antes do tratamento com FS, nota-se a presença de vários disparos de crises epiléticas tanto no córtex frontal (linha de cima) como nos lóbulos laterais (linha de baixo).

Figura 8, registro de disparo de crise epilética com detecção simultânea de movimentos clônicos.

Após tratamento o número de ocorrências registradas foi de 0,91 segundos de duração, estes dados estão demonstrados na figura 10 para ocorrências e figura 11 para a duração das crises dadas em segundos. Na presença dos resultados, encontrou-se diferença estatisticamente significativa nas comparações de

ocorrências de crises antes e após o tratamento com FS segundo o teste T estatístico $\{T (n=12; df=11)=18,9; p=<0,01\}$, para análise da duração encontrou-se diferença significativa segundo o teste T $\{T (n=12; df= 11)=22,09; p<0,01\}$.

Após o tratamento, ainda foi possível notar uma hipersincronização de ondas cerebrais, características de início de disparos epiléticos (figura 9) (TISSER et al., 2005), porém, sem o desencadeamento de crises epiléticas propriamente ditas como as encontradas anteriormente, figura 7 e 8.

Figura 9, registro de ocorrência de crise epilética do animal número 2, após tratamento com FS. Nota-se ainda a presença de disparos epiléticos no córtex frontal (linha superior) e lóbulos parietais (linha inferior), porém sem a detecção de crise motoras clônicas, como ocorridas antes do tratamento.

Figura 10, média de ocorrências antes e após o tratamento com FS, e os respectivos erros padrões das médias. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa para a média do grupo depois do tratamento com FS.

Figura 11, duração em segundos das crises convulsivas detectadas antes e após tratamento com a FS, e seus respectivos erros padrões das médias. O asterisco (*) indica

diferença estatisticamente significativa na diminuição da duração das crises detectadas após o tratamento quando comparados com o mesmo grupo antes tratamento da FS.

4.2.3 RESULTADOS DO GRUPO TRATADO COM FSI

Durante quinze minutos de análise foi possível quantificar uma média total de 28,08 ocorrências com uma duração média de 24,76 segundos de duração antes do tratamento. Os padrões de ondas antes do tratamento foram descritos como de alta frequência e hipersincrônicas podem ser vistos na figura 12, houve ainda a detecção de movimentos mioclônicos faciais sem elevação de membros superiores.

Após o tratamento houve uma diminuição de ocorrências para uma média de 3,08 ocorrências com uma duração média de 0,71 segundos de duração total, estes resultados estão visualizados na figura 13 e 15 para ocorrência e duração das crises respectivamente. Em presença dos resultados encontrados pode-se verificar diferença altamente significativa $\{T (n=12; df=11)= 17,4; p<0,01\}$ na diminuição de ocorrências registradas depois do tratamento com FSI quando comparadas aos eventos de crises registrados antes do tratamento segundo o teste estatístico do Teste *T*. Para avaliação da duração das crises, dadas em segundos, registradas após o tratamento e comparadas com as encontradas antes o tratamento, encontrou-se uma diminuição significativa no teste *T* estatístico $\{T (n=12; df= 11)=19,16; p<0,01\}$.

Eventos de ondas hipersincronizadas ainda puderam ser notados após tratamento, porém sem a detecção de eventos de crises com frequência alta, figura 14.

Figura 12, Registro de ondas epilépticas no animal número 5 antes do tratamento com FSI, Nota-se ondas hipersincronizadas no lóbulo frontal e lóbulo parietal, e eventos de detecção de mioclônica facial durante o registro.

Figura 13, média de ocorrências para os mesmos indivíduos antes e após o tratamento com FSI, e seus respectivos erros padrões de médias. O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa para diminuição de ocorrências registradas após o tratamento em comparação a média de crises registradas antes do tratamento com FSI.

Figura 14, registro de ondas epilépticas depois do tratamento com FSI. Nota-se a presença de eventos de hipersincronia ainda captados, porém de menor frequência.

Figura 15, média de duração em segundos das crises convulsivas detectadas antes e após tratamento com a FSI e seus respectivos erros padrões de média. O asterisco (*) indica

diferença significativamente estatística na diminuição das durações dos eventos de crises registradas após o tratamento com FSI quando comparadas às detectadas antes do tratamento no mesmo grupo de animais.

4.2.4 COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS DOIS TRATAMENTOS FS E FSI

A comparação dos resultados obtidos frente aos dois tratamentos com formas distintas de fosfoetanolamina sólida complexada e líquida neutralizada, mostrou uma melhor eficiência e uma diferença estatisticamente significativa para o grupo tratado com FSI, quando comparados ao grupo FS, para duração em segundos dos eventos de ocorrências de crises detectadas após os respectivos tratamentos, como mostra a figura 16. O teste estatístico Teste T , revelou os valores $\{T(n=12; df=11)=2,84; p<0,01\}$, demonstrando uma melhor eficácia do grupo FSI para duração dos eventos de crises detectadas após tratamento. Para a avaliação da média de ocorrências observadas após os respectivos tratamentos e comparadas entre si, figura 17, não se obteve diferenças estatisticamente significantes para nenhum dos dois grupos, o teste T revelou os valores $\{T(n=12; df=11)=1,81; p>0,01\}$.

Figura 16, comparação de ambos os tratamentos FS e FSI, nas durações de crises registradas após respectivos tratamentos, e seus respectivos erros de médias. O asterisco (*) demonstra diferença significativamente para o grupo tratado com FSI e revela menores valores de média de durações de crises, quando comparadas às médias do grupo tratado com FS.

Figura 17, comparação das médias de ocorrências de crises posteriores aos tratamentos com FS e FSI, e seus respectivos erros das médias. Não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos dois grupos segundo o teste *T*.

5 – DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO I

No presente estudo, os resultados encontrados sugerem parcial efeito anticonvulsivante da FS em crises induzidas quimicamente. Essa conclusão baseia-se nos dados de redução da intensidade das convulsões. Outro efeito detectado foi a proteção contra óbitos gerados pela administração de PTZ. A seguir discutem-se os fundamentos desta conclusão.

A utilização de Benzodiazepínicos, como o CDZ no controle de convulsões está amplamente descrita em literatura (OSWALD, 1979; AZEVEDO et al., 2004). Frente a estes fatos, as diminuições das intensidades das crises do grupo CDZ já eram esperadas. Estes resultados demonstraram estar de acordo com o modelo de escala de intensidade de convulsão, instituído por Racine (RACINE, 1972) e adotado no presente estudo.

A constatação de que a FS não inibiu significativamente as ocorrências de crises epiléticas induzidas por PTZ pode indicar uma possível interação do composto com o PTZ. Para isto foi adotado no experimento 2, discutido a seguir, um modelo experimental que tem por base, animais geneticamente susceptíveis às crises epiléticas que apresentam corrida selvagem (N`GOUÉMO, 2000), mimetizando desta forma, uma condição natural epilética como a encontrada em humanos, e isolando possíveis interações químicas entre o PTZ e a FS.

A diminuição das intensidades das crises do grupo FS pode indicar um possível efeito inibidor do composto testado, pois mesmo não impedindo a ocorrência de convulsões, estas foram mais brandas quando eventualmente ocorriam. Este agrupamento de convulsões leves no grupo FS indicaria um provável local de atuação do composto no córtex motor, uma vez que, crises motoras mais

intensas foram menos freqüentes neste grupo, porém para confirmação desta hipótese novos estudos devem ser realizados.

O composto FS agiria não como os benzodiazepínicos, ou seja, atuando como calmantes, os quais estimulam o efeito inibitório do GABA através da facilitação da abertura de canais de cloreto (OSWALD, 1979; AZEVEDO et al., 2004 RIZZUTTI, et al., 2004). Conhecendo-se os efeitos de diminuição de liberação de fosfolipídios em cérebros de mamíferos frente à indução de crises com PTZ (NODA et al., 1987) pode-se hipotetizar que uma suplementação com a FS em ratos com crises induzidas proporciona uma regulação nos níveis celulares e plasmáticos, não a ponto de impedir as crises, mas de evitar acometimentos mais severos, como o grau da intensidade das crises. Esta hipótese se baseia nas diferenças de resultados entre os grupos FS e CDZ, discutidas a seguir.

A ação de Benzodiazepínicos apresenta propriedades depressoras do sistema nervoso central, agindo como ansiolíticos, sedativo-hipnóticos e/ou anticonvulsivantes (OSWALD, 1979; AZEVEDO et al., 2004, RIZZUTTI, et al, 2004). Desta forma, como o esperado, o CDZ mostrou-se eficaz na diminuição da incidência e no aumento da latência das convulsões. Buscando um significado único para esses dois parâmetros de medida de convulsão, podemos inferir que eles representam o efeito dos Benzodiazepínicos em inibir o início do fenômeno epilético. Isso se deve ao aumento da inibição neuronal, que reduz a probabilidade de ocorrência de disparos anormais de potencial de ação (DINGLELINE et al.,1990 GODMAN and GILMAN, 2003). O grupo FS não apresentou redução significativa em tais parâmetros de convulsão. Esta diferença nos resultados entre o grupo CDZ e FS sugere que as possíveis vias de ação da FS não sejam idênticas às dos Benzodiazepínicos e que

outras possíveis vias de ação, não identificadas até o momento, podem estar envolvidas.

A ausência total de óbitos nos animais do grupo FS, pode indicar que o abrandamento das intensidades das crises promovidas pela FS resultou numa proteção neuronal. A suplementação com FS pode ter normalizado os níveis deste e de outros subprodutos do metabolismo da fosfoetanolamina mantendo a maioria dos animais nos scores de crises consideradas leves ou límbicas como as descritas por (RACINE, 1972).

Em suma, para confirmação das hipóteses delineadas pelo experimento, novos testes enfocando outras metodologias adotadas em conjunto poderiam ser realizados.

A avaliação de cepas comerciais de ratos epiléticos cientificamente comprovados tratados com FS marcada com fósforo radioativo poderia indicar o local exato de acoplamento molecular do composto, bem como a farmacocinética, e dar suporte a estudos futuros sobre possíveis mecanismos de ação. Modelos de convulsão em nível de membrana, também poderiam ser adotados, uma vez que o composto FO encontra-se inserido nestas estruturas celulares.

5.2 EXPERIMENTO II

Na avaliação das incidências de crises convulsivas no grupo de animais geneticamente susceptíveis às crises epiléticas, estes suplementados com FS, houve diminuição das incidências de eventos interpretados como epiléticos (N`GOUOMO, 2000) após tratamento. Porém, eventos que indicam um quadro de disparos assíncronos prévios as crises propriamente ditas, que podem ou não se

transformar em convulsões mais intensas, conhecidas como hipersincronia (WALZ et al., 2004) ainda foram observados após o tratamento.

Na avaliação dos resultados das durações das crises detectadas antes e após o tratamento, observou-se que as médias das durações das crises diminuiu após o tratamento com FS, mesmo nas eventuais crises observadas, estas não apresentaram longos períodos de sustentação, e a freqüências dos disparos assíncronos diminuiu significativamente após o tratamento com FS.

Visto que, a FS tem na sua constituição elementos como Magnésio, Cálcio, e Zinco e que estas espécies podem interagir em processos neurofisiológicos diversos (TANG et al., 2003; HEIDARIANPOUR et al., 2006; KANG et al., 2003; XIE & SMART, 1991) interferindo nos resultados de alguma forma, utilizou-se no mesmo modelo de epilepsias adotado, a fosfoetanolamina em forma líquida, a qual não tem em sua constituição estes elementos agregados.

No teste onde os animais foram tratados com a FSI, os resultados indicaram uma diminuição altamente significativa de ocorrências de crises epiléticas após o tratamento em relação à análise realizada antes da suplementação.

Na avaliação das médias das durações das crises observadas antes e após o tratamento, houve uma redução significativa nas médias encontradas após o tratamento. Os padrões de ondas cerebrais antes do tratamento indicavam eventos de hipersincronia antecedendo as crises propriamente ditas, sendo que após o tratamento, mesmo nas eventuais crises detectadas, estas não demonstraram este padrão de ondas. Apresentaram ainda crises mais curtas e de menores freqüências, as quais envolveram menores áreas corporais durante os acometimentos, ou seja, as eventuais crises detectadas após a suplementação com FSI foram de menor intensidade.

Na avaliação das comparações dos efeitos dos dois tratamentos FS e FSI houve uma diminuição no número de ocorrências e crises detectadas no grupo tratado com FSI, e uma diminuição significativa na duração das crises detectadas após os tratamentos no grupo FSI, que obteve menores índices de média de duração das crises. Frente a esta constatação, rejeita-se a hipótese de que o Magnésio, Zinco e Cálcio tenham influenciados de forma positiva os resultados encontrados no grupo FS, uma vez que a eficácia do grupo FSI foi melhor que o FS. Para esta diferença encontrada, a explicação suposta seria que as interações moleculares da FS com Cálcio, Magnésio e Zinco, têm provavelmente as interações energéticas do retículo cristalino diferentes das interações moleculares da FSI encontrada em solução, onde, este fato facilitaria a disponibilização da fosfoetanolamina nos sítios neuronais dos focos epiléticos.

De acordo com SINGH, 1971, ratos epiléticos apresentam menores quantidades de fosfoetanolamina e outros fosfolipídios em seus cérebros que animais normais (BONHAUS et al., 1984). Outros autores descrevem desordens nos níveis de fosfoetanolamina após eventos epiléticos induzidos (MARKU et al., 1987; MOESGAARD et al., 2003). Outras evidências científicas suportam e correlacionam que o aumento de fosfoetanolamina endógena ocasionada por forte intensidade de eletroestimulação do nervo vago levou a um quadro de melhora nas ocorrências de crise epiléticas em pacientes humanos epiléticos tratados por três meses (BEM-MENACHEM et al. 1995)

Estas evidências e relatos em literatura sobre a correlação entre os níveis de fosfoetanolamina e crises convulsivas e epiléticas podem ter forte interação de causa e efeito. Desta forma, supõe-se um possível mecanismo de ação da suplementação de fosfoetanolamina, frente à epilepsias. Este mecanismo poderia

estar envolvido com a incorporação da Fosfoetanolamina às membranas celulares neuronais, uma vez que a fosfoetanolamina orgânica é um dos constituintes majoritários das esfingomielinas, e estas correspondem a cerca de 8% da constituição da mielina dos axions (NAGATSUKA et al., 2006). Este rearranjo entre Fosfoetanolamina sintética e orgânica poderia normalizar a condução de potenciais de ação desordenados e assíncronicos provenientes das más formações das bainhas de mielina e, conter consequentemente o espraio das descargas elétricas anormais a outros neurônios adjacentes desencadeando uma crise epilética propriamente dita, esta hipótese seria reforçada pelos resultados de redução de intensidade das poucas crises detectadas após tratamento pelas duas formas de fosfoetanolamina em ambos os experimentos conduzidos neste presente trabalho.

6 - CONCLUSÃO

O composto Fosfoetanolamina sólido (FS) mostrou-se eficaz na diminuição das intensidades das convulsões induzidas por PTZ, mas não impediu a ocorrência total das crises induzidas. Destaca-se também o efeito significativo como redutor de óbitos pós crises induzidas nos animais tratados.

Obteve-se ainda, efeito significativo como inibidor de ocorrências de eventos epiléticos registrados no EEG e na redução da intensidade das crises detectadas após tratamento dos animais epiléticos geneticamente determinados. Destaca-se que estados de hipersincronia ainda foram notados no registro após o tratamento com FS.

A Fosfoetanolamina líquida (FSI) evidenciou redução no número de ocorrências dos eventos epiléticos detectados no EEG e no tempo de duração destes eventos, após o tratamento, e ainda foi possível notar estados de hipersincronia nos animais epiléticos geneticamente determinados.

A comparação dos tratamentos com formas distintas de fosfoetanolamina (FS e FSI) não demonstrou efeitos significativos frente aos números de ocorrências, mas a FSI apresentou efeito significativamente melhor que a FS na duração de eventos epiléticos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICARDI, J. Epilepsy In Children, New York: Raven Press, 1994.

AWAPARA, J.; LANDRA A.J.; FUERST, R.; J. Biol. Chem. v.1183, p.545 1950.

AZEVEDO, P.; ALÓE, F.; HASAN R.; Hypnotics. Revista de neurociências; v. 12 - n°4 out/dez 2004.

BATEMAN, A.; BODEN, P.; DELL, A.; DUCE, I. R.; QUICKE, D. L. J.; USHERWOOD, P.N.R. Postsynaptic Block of a Glutamatergic Synapse by low Molecular Weight Fractions of Spider venom. Brain Res. v. 339, n. 2, p. 237- 244, 1985.

BECKER, A.; GRECKSCH, G.; RÜTHRICH, H. L.; POHLE, W.; MARX, B.; MATHIES, H. Kindling and its consequences on learning in the rats. Behavioral and Neural Biology, v. 57, p. 37 – 43, 1992.

BEN-MENACHEM, E.; HAMBERGER, A.; HEDNER, T.; HAMMOND EJ.; UTHMAN, BM.; SLATER, J.; TREIG, T.; STEFAN, H.; RAMSAY, RE.; WERNICKE, JF.; WILDER, BJ. Effects of vagus nerve stimulation on amino acids and other metabolites in the CSF of patients with partial seizures. Epilepsy Research. v. 20, p. 221-227, 1995.

BERNIK, M.A. Benzodiazepínicos. EDUSP, 1999.

BONHAUS, D.W.; LIPPINCOTT, S.E.; HUXTABLE, R.J. Subcellular distribution of neuroactive amino acids in brains of genetically epileptic rats. Epilepsia. v. 25(5), p.564-8, 1984.

BONHAUS, D.W.; RUSSEL, R.D.; Mc NAMARA, Activation of substantia nigra pars reticulata neurons: role in the inhibition and behavior expression of kindled seizures, brain res. v.45, p.41-48, 1991.

BRACKLEY, P. T. H. P.; BELL, D. R.; CHOI, S. K. ; NAKANISHI, k.; USERWOOD, P. N. R. Selective antagonism of Native and cloned Kainate and NMDA Receptors By Polyamine-containing toxins. J. Pharm. Exp. Ther. v. 226, p 1573 – 1580, 1993.

BROWING, R.A.; Anatomy of generalized convulsive seizures, in: A. malafosse, E. Hirsch, C. Marescaux, D. Broglin, R. Bernasconi (Eds.), Idiopathic Generalized Epilepsies: clinical, Experimental and Genetic aspect, John Libbey & Co., p. 399 – 411, London, 1994.

BROWING, R.A, WANG, C., NELSON, D.K., JOBE, P.C.; Effect of precolicular transaction on audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats, Exp. Neurol. v. 155, p. 295 – 301, 1999.

CAIRRÃO, M. A. R.; SANTOS, W. F.; COLUSSO, A. J.; GARCIA-CAIRASCO, N. Estudo do Efeito Comportamental da administração intracerebroventricular da peçonha da aranha *Parawixia bistrata* (araneidae, araneae) em ratos Wistar. In REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, Caxambu/MG, Nº 12, 1997. Programa e Resumos. São Paulo Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 1997, p. 307.

CHAUVEL, P. et al.: Frontal Lobe Seizures and Epilepsies, New York: Raven Press, 1992.

CHIU, E.; AMES, D. Functional Psychiatric Disorders of the Elderly, New York: Cambridge University Press, 1994.

CLARK, H. B.; DATTA, S. P.; RABIN, B. R. Biochemistry Journal. v.59, p. 209, 1954.

COOK, P. J.; HUGGETT A.; GRAHAM-POLE R.; SAVAGE I.T.; JAMES I. M.; Hypnotic accumulation and hangover in elderly inpatients: a controlled double-blind study of temazepam and nitrazepam. Br Med J (Clin Res Ed). January 8; 286(6359): p. 100–102, 1983.

CORAZZI, L.; PISTOLESI, R.; ARIENTI, G.; The fusion of liposomes to rat brain microsomal membranes regulates the synthesis of phosphatidylserine and its transport to mitochondria. International Conference on the Biochemistry of Lipids. 1990.

CORAZZI, L.; PISTOLESI, R.; ARIENTI, G.; Fusion of liposomes with rat brain microsomal membranes and modulation of phosphatidylserine synthesis. International Meeting on Membranes and Nutrition, p. 512, 1989.

COSSIO, H.; FUSTES, O. H. O. J.: Neurocisticercosis y epilepsia en Cuba. Rev-Neurol. v. 29 (11), p.6 - 1003, 1999.

CHRISTENSEN, H.N.; HASTINGS, A.B. Journal of Biological Chemistry. n. 136, p. 387, 1940.

DALE, M. M. & RANG, H. P. Farmacologia, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3º ed., p. 360 –369, 1993.

ELLISON, D. W.; BEAL, M. F.; MARTIN, J. B. Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. Brain Res. v.417 p.389–392, 1987.

FAINGOLD C.L.; BOERSMA ANDERSON C.A. loss of intensity- induce inhibition in inferior colliculus neurons leads to audiogenic seizure susceptibility in behaving genetically-prone rats, exp. Neurol, v.113, p.354-363, 1991.

FAINGOLD, C.L. Locomotor behaviors in generalized convulsions are hierarchically driven from specific brain-stem nuclei in the network subserving audiogenic seizures. Ann. N.Y. Acad. Sci. v.860, p. 566 – 569, 1998.

FAINGOLD C.L.; RANDALL M.E. Neurons in the deep layers of superior colliculus play a critical role in the neuronal network for audiogenic seizures: mechanisms for production of wild running behaviour, brain res. v.815, p.250-258, 1999.

FLYNN C. J.; WECKER L., Concomitant increases in the levels of choline and free fatty acids in rat brain: evidence supporting the seizure-induced hydrolysis of phosphatidylcholine. J Neurochem Apr; 48(4), p. 1178-84, 1987.

GARCIA – CAIRASCO, N.; WAKAMATSU, H.; BUENO, S.T.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; OLIVEIRA, J. A. C. Behavioral evaluation of audiogenic kindling and amygdala kindling in *Wistar* audiogenic rats. Soc. Neurosci. Abstr. v. 19, p.1468, 1993.

GUYTON, A. C. & HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9º ed., 1997, p. 687- 691.

GRISHIN, E. V.; VOLKOVA, T. M. ARSENIIEV, A. S.; Isolation and structure analysis of components from venom of the spider *Argiope lobata*. Toxicon. v. 27, n. 5, p. 541-549, 1989.

HAUSER, W. A. Epidemiology of epilepsy. ADV. Neurol., v.19, p.3123- 339, 1978.

HAUSER, H.; SHIPLEY, G. The Journal of Biological Chemistry. v. 256, n. 22, p.11377, 1981.

HEIDARIANPOUR A.; SADEGHIAN E.; MIRNAJAFI-ZADEH J.; FATHOLLAHI Y.; MOHAMMAD-ZADEH M.; Anticonvulsant effects of N(6)-cyclohexyladenosine microinjected into the CA1 region of the hippocampus on entorhinal cortex-kindled seizures in rats. Epileptic Disord. v.8 (4), p. 259-266, 2006.

HELLER, A. H.; DICHTER, M. A.; AND SIDMAN, R.L. Anticonvulsant sensitivity of absence seizures in the *tottering mutant mouse*. Epilepsia, v.33, p. 24 - 25, 1983.

HOLLMANN, M.; HEINEMANN, S. Cloned glutamate receptors. Annu. Rev. Neurosci. v. 17, p. 31- 108, 1994.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Essential Of Neural Science and Behavior. New York: Mc-Graw Hill, p. 455- 478, 1995.

KANG TC.; PARK SK.; HWANG I.K.; AN S.J.; BAHN J.H.; CHOI S.Y.; KIM J.S.; WON MH.; The decreases in calcium binding proteins and neurofilament immunoreactivities in the Purkinje cell of the seizure sensitive gerbils. Neurochem Int. Feb;40(2), p.115- 222, 2002.

KAWAI, N.; NIWA, A.; ABE, T. Spider venoms contains specific receptor blocker of glutaminergic synapses. Brain Res. v. 247, n.1, p. 169 – 171, 1982.

LEHMANN, A., LAZAREWICZ, J.W., ZEISE, M., N-Methylaspartate-evoked liberation of taurine and phosphoethanolamine in vivo : site of release , J. Neurochem., v.45, p. 1172-1177, 1985.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica, Rio de Janeiro: Sarvier, 2^o ed., p. 491 – 505, 1995.

LIPTON SA, ROSENBERG PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. J.N Engl Med, v.330, p. 613-622, 1994.

LOEB C.; BO G. P.; SCOTTO P. A.; BENASSI E. ; BESIO G.; MAINARDI P.; FAVERIO A. GABA and phospholipids in penicillin-induced seizures. Exp Neurol. Oct;90(1), p.278-80, 1985.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. Eur. J. Pharmacol. v. 342, n° 1, p. 1 – 113, 1998.

MAIRE, J.-C.E., WURTMAN, R.J., Choline production from choline-containing phospholipids : a hypothetical role in Alzheimer's disease and aging, Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry. v.8, p. 637-642, 1984.

MARKU, N.; CORAZZI, L.; PICCININ, G.L.; ARIENTI, G. Cerebellar metabolism of phosphatidylethanolamine and its water-soluble precursors during bicuculline-induced convulsive seizures. Neurochemical Research. v. (12) 4, p.341- 344, 1987.

MARTELL, A.E.; SCHWARZENBACH, G. Helvetica Chimica Acta. v. XXXIX, n.76, p. 653, 1956.

MAXSON, S.C.; FINE, M.D.; GINSBURG, B.E.; KONICKI, D.L. A mutant for spontaneous seizures in c57BL/10Bg mice. Epilepsia. v. 24, p. 15-24, 1983.

MCCORMICK, K. D.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. J. Chem. Ecology. v. 19, n.10, p. 2411– 2451, 1993.

MELLO, L.; BORTOLOTO, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. (Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. Neurobiol. v.49 p. 231-268, 1986. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/epilepsia/ep24.htm>>. Acesso em: 20 de maio de 2007.

MOESGAARD, B.; HANSEN, H.H.; HANSEN, S.L.; HANSEN, S.H.; PETERSEN, G.; HANSEN, H.S. Brain levels of N-acylethanolamine phospholipids in mice during pentylenetetrazol-induced seizure. Lipids. 38(4), p. 387-90, 2003.

MOE, S. T. SMITH, D. L.; CHIEN, Y. E.; RASZKIEWICZ, J. L.; ARTMAN, L. D.; MULLER, A. L.; Desing, synthesis and biological evaluations of spider toxin (argiotoxin –636) analogs as nmda receptor antagonists. Pharma. Res. v. 15, n.1, p. 31 – 38, 1998.

MONAGHAM, D. T.; BRIDGES, R. J.; COTMAN, C. W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the functions of the central nervous system. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. v. 29, p. 365– 402, 1989.

MONTI, J.M. Effect of a reversible monoamine oxidase A inhibitor (moclobemide) on sleep of depressed patients. Br J Psychiatry. p.155, 1989.

MORGAN, C. L. I.; KERR, M. P.; Epilepsia e mortalidade: Um estudo de ligação recorde num U.K. população, Epilepsia. v. 43 (10), p. 1251- 1255, 2002.

NAGATSUKA Y.; TOJO H.; HIRABAYASHI Y.; Identification and Analysis of Novel Glycolipids in Vertebrate Brains by HPLC/Mass Spectrometry. Methods Enzymol. v.417, p. 155- 67, 2006.

N'GOUEMO, P.; FAINGOLD, C.L. Phenytoin administration reveals a differential role of pontine reticular formation and periaqueductal gray neurons in generation of the convulsive behaviors of audiogenic seizures. Brain Res. v. 24, n. 859(2), p. 311- 7, 2000.

NODA, K.; TAKAHASHI, K.; HIBINO, H. Influence of phosphatidylcholine on the threshold dose of pentylenetetrazol for inducing seizure Yakubutsu Seishin Kodo. Sep; v.8(3), p.417- 20, 1988.

OLSEN, R. W. Drug interactions at the gaba receptor ionophore complex. ANNU. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 22, p. 245- 277, 1982.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/epilepsy/en/>>. Acessado em: 20 de maio de 2007.

OTTONI, E. B.; EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. Behavior Research Methods, Instruments, & Computers. v. 32(3), p. 446- 449, 2000.

OSTERBERG R. ARKIV FOR KEMI, v.13, p. 409, 1959.

OUTHOUSE, E.L. Biochem. J. v.30, p.143, 1936.

OSWALD, I. The why and how of hypnotic drugs. Br. Med. J., v.1, p.1167- 1168, 1979.

OTAVIANO, M.R.F. Síntese, caracterização, estudo de equilíbrio químico e agregação do 2-aminoetanol dihidrogenofosfato. 1999. Tese (Doutorado em Química

Analítica e Físico Química) - Universidade de São Paulo, Orientador: Gilberto Orivaldo Chierice. 1999.

PAXINOS G., WATSON, The rat Brain in Stereotaxic Coordinate, Academic Press, Sydney, 1986.

PINEL, P. J.; ROVNER, L. I. Experimental epileptogenesis; kindling-induced epilepsy in rats. Exp. Neurol. v. 58, n. 2, p. 190– 202, 1978.

PERRY, T.L., BERRY, K., HANSEN, S., DIAMOND, S., MOK, C., Regional distribution of amino acids in human brain obtained at autopsy, J. Neurochem. v.18, p. 513- 519, 1971.

PERSHAK, H., WOLFENBERGER , M., DO, K.Q., DUNANT, Y. CUENOD , M., Release of ethanolamine , but not-serine or choline, in rat pontine nuclei on stimulation of afferents from the cortex, in vivo , J. Neurochem., v.45, p.1338-1343, 1986.

PORCELLATI, G., ARIENTI, G., PIROTTA, M. , GIORGINI, D., Base-exchange reactions for the synthesis of phospholipids in nervous tissue: the incorporation of serine and ethanolamine into the phospholipids of isolated brain microsomes, J. Neurochem , v. 18, p.1395-1417, 1971.

PRINCE, D.A, CONNORS, B.W.; Mechanisms of Interictal Epileptogenesis. In Delgado-Escueta AV, Ward AA Jr, Woodbury DM, Porter RJ (Eds) *Advances in neurology, Vol. 44. Basic mechanisms of the epilepsies. Molecular and cellular approaches.* Raven Press, p.275–299, 1986.

PORCELLATI, G., ARIENTI, G., PIROTTA, M., GIORGINI, D., Base-exchange reactions for the synthesis of phospholipids in nervous tissue: the incorporation of serine and ethanolamine into the phospholipids of isolated brain microsomes, J. Neurochem , v.18, p.1395-1417, 1971.

PU, G.A.W.; Anderson, R.E., Ethanolamine accumulation by photoreceptor cells of the rabbit retina , J. Neurochem , v. 42, p. 185-191, 1984.

RACINE, R. J. Modifications of seizure activity by electrical stimulation: ii, motor seizure. Electroencephal. Clin. Neurophysiol. v. 32, p. 281– 294, 1972.

REIGEL, C.E.; DAILEY, J.W., JOBE, P.C.; The genetically epilepsy0prone rat: an overview of seizures-prone characteristic and responsiveness to anticonvulsant drugs, life Sci, v.39 p. 763- 774, 1986.

RIZZUTTI, S.; BIZARI, L.; PRADO, F.; PRADO, G.F. Midazolan nasal no tratamento de crises convulsivas. Revista de Neurociências v.12, p. 157- 165, 2004.

SYPOSIOUM. (Vários autores) Epilpsy: diagnosis and management. (Browne, T.R., and Feldman, R.G., eds.) Little, Browne & Co., Boston, 1983.

TAYLOR, C. P.; MELDRUM, B. S. Trends Pharmacol. Sci. v.16, p.309- 316, 1995.

TANG, Y.N.; ZHAO, F.L.; YE, H.M.; [Expression of caspase-3 mRNA in the hippocampus of seven-day-old hypoxic-ischemic rats and the mechanism of neural protection with magnesium sulfate Zhonghua ErKeZaZhi. v. 41(3), p.212-4, 2003.

USERWOOD, P. N.; BLAGBROGH, I. S. Spider Toxins affecting glutamate recptors: polyamines in therapeutic neurochemistry. Pharmacol Ther. v. 52, n.2, p. 245 – 248, 1991.

VOURLIOTIS, M. E.; RIECHERT, U.; MAYER, P.; GRECKSCH, G.; HÖLLT, V. Pentyleneetetrazole (PTZ) – Induce c- fos expression in the hippocampus of kindled rats is suppressed by concomitant treatment whith naloxone. Brain Reserch. v. 792, p. 299– 308, 1998.

WALZ, R.; BIANCHIN, M.M.; LINHARES, M.N.; LEITE, J.P.; SAKAMOTO, A.C. Epilepsias. In: KAPCZINSKI F, QUEVEDO J e IZQUIERDO I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos, 2. ed. Porto Alegre, ARTMED, p. 429- 44, 2004.

WASHBURN, M. S.; DINGLELINE, R. Block of Amino – 3 – hidroxy – 5 – methyl – 4 – isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors by polyamines and polyamines toxins. J. Pharmacol. Exp. Ther. v. 278, n. 2, p. 669– 678, 1996.

WATIKINS, J.C.; KROGSGAARD-LARSEN, P.; HONORE, T. Structure-activity Relationships in the development of excitatory amino acid recptor agonists and competitive antagonists. Trends Pharmacol. Exp. Ther. v. 11, n.1, p. 25– 33, 1990.

WHITE, H.S. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. Epilepsia, v. 38, p. 9-17, 1997.

WOLFSENSBERGER, M., FELIX, D., CUENOD, M. 2-Aminoethanol as a possible neuromodulator in the pigeon optic tectum , Neurosci. Lett., v. 32, p. 53- 58, 1982.

XIE, X.M.; SMART, T.G. A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. Nature. Feb 7; v.349 (6309), p. 521- 4, 1991.

YEGIN A.; AKBAS SH.; OZBEN T.; KORGUN D.K. Secretory phospholipase A2 and phospholipids in neural membranes in an experimental epilepsy model. Acta Neurol Scand. V. 106(5), p. 258- 62, 2002.