



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA
CURSO DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**



Estudo dos efeitos da administração aguda em doses repetidas da buspirona em camundongos no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina

PAULA BENVINDO FERREIRA

TERESINA

2012

PAULA BENVINDO FERREIRA

Estudo dos efeitos da administração aguda em doses repetidas da bupirona em camundongos no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina

Monografia de trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof^o Dr. Rivelilson Mendes de Freitas

TERESINA

2012

PAULA BENVINDO FERREIRA

Estudo dos efeitos da administração aguda em doses repetidas da buspirona em camundongos no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina

Monografia de trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Data da Aprovação: ____/____/_____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas
Departamento de Bioquímica e Farmacologia
(Orientador)

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida
Departamento de Bioquímica e Farmacologia

Prof.Ms. Jéssica Pereira Costa
Centro de Ensino Tecnológico (CET)

Prof.Ms. Thiago Henrique Costa Marques
Instituto Federal do Piauí (IFPI)

TERESINA

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. Luiz de Sousa Santos Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. Edwar de Alencar Castelo Branco

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE GRADUAÇÃO

Prof. Dr^a. Guiomar de Oliveira Passos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Antônio dos Santos Rocha Filho

VICE-REITOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^o. Dr. José Guilherme Ferre Pompeu

COORDENADOR DO CURSO DE FARMÁCIA

Profa. Dr^a. Maria das Graças Freire de Medeiros

VICE-COORDENADOR DO CURSO DE FARMÁCIA

Profa. Dr^a. Eilika Andréia Feitosa Vasconcelos

Aos meus pais,
pelo exemplo de coragem e humildade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por do meu modo, me fazer acreditar na sua magnitude e no poder ao atender aos meus chamados, por me dar forças para seguir em frente, lutar diante dos obstáculos e sempre fazer tudo dar certo na minha vida

A minha mãe ANA CRISTINA pela guerreira que é, pelo exemplo de mulher, mãe, amiga, professora, diretora, empresária, enfim, por desempenhar tão bem tudo que se propõe a fazer. Esse minha mãe é o exemplo no qual me espelho.

A meu pai ALMIR FERREIRA pelo carinho, esforço, simplicidade, alegria e como do seu jeito me ajudou e me incentivou nessa caminhada.

Dedico essa conquista principalmente a vocês como forma de retribuir tudo o que já fizeram por mim. E PARABÉNS, vocês cumpriram sua missão!

Aos meus irmãos, em especial ao meu irmão e companheiro de profissão SÁVIO BENVINDO, por compartilhar comigo as belezas e dificuldades da profissão e pelas agradáveis conversas e relatos de nossa vivência profissional.

As minhas queridas tias por toda a ajuda nesse trajeto, em especial a TIA NILCE pelo apoio fundamental desde a escolha desse curso. Tia obrigado por ser minha tia, amiga, mãe, prima...

Aos meus companheiros e amigos de sala HANDERSON, MARIA e PAÔLLA, por todo esse tempo juntos, por toda a ajuda em tantos momentos... muito obrigada por tudo... vocês foram fundamentais!

Ao meu inestimável orientador Dr. RIVELILSON MENDES pela contribuição a minha formação profissional e pessoal. Por ter me feito amadurecer, superar meus medos e desafios, acordar pra realidade, ser mais responsável e dedicada... Obrigado pelas brigas, pelos elogios, pela paciência e pela motivação. Agradeço muito pela oportunidade da parceria! O senhor é um exemplo pra todos!

Aos meus amigos e amigas, em especial LARISSA, ISABELLE, ISABELA, MARIANA, ARIELLE, ELI e todos que não foram citados, mas que estão escritos no meu coração, por tantas vezes que me apoiaram nessa caminhada!

Ao EVILÁSIO, pelos sábados, domingos e feriados que me levou ao laboratório e pelas vezes que saiu de sua casa altas horas da noite para levar material para eu estudar... a toda contribuição muito obrigado!

A toda equipe LAPNEX, desde a sua primeira formação, pelas amizades formadas, pelas conversas que ajudavam o tempo passar... por tudo, muito obrigado!

A todos os meus professores pela paciência, dedicação e ensinamentos...

Aos funcionários da UFPI: Cris, seu Orlando, Paulinha, Assis... muito obrigado a todos.

*Enfim, a todos que contribuíram direto ou indiretamente a minha formação o meu **MUITO OBRIGADO!!***

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Epilepsia	18
2.2 Buspirona	18
2.2.1 Descrição	18
2.2.2 Mecanismo de ação	19
2.2.3 Farmacocinética	20
2.2.4 Indicações	21
2.2.5 Interações Medicamentosas	23
2.2.6 Efeitos adversos	24
2.2.7 Contra-indicações	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODO	27
4.1 Procedimento Experimental.....	27
4.2 Método da determinação dos níveis de peroxidação lipídica	28
4.3 Método da determinação do conteúdo nitrito	29
4.4 Método da determinação da atividade da catalase	30
4.5 Método da determinação da atividade da superóxido dismutase	30
4.6 Análises Estatísticas	31
5.RESULTADOS	32
5.1 Comportamento de camundongos adultos observados durante 1 hora após administração de pilocarpina	32
5.2 Efeito do pré-tratamento com buspirona nas latências para instalação da primeira convulsão e do estado de mal epiléptico durante as convulsões induzidas por pilocarpina e taxa de mortalidade em camundongos adultos	34

5.3 Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos pré-tratados de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	34
5.4 Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona de forma aguda com doses repetidas	35
5.5 Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	36
5.6 Atividades da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona de forma aguda em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	37
6. DISCUSSÃO	39
6.1 Estudos comportamentais após convulsões	40
6.2 Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	42
6.3 Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	43
6.4 Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona de forma aguda em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	45
6.5 Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
Referências	51
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LIPC	Latência para Instalação da Primeira Convulsão
LIEME	Latência para a Instalação do Estado de Mal Epiléptico
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
SNC	Sistema Nervoso Central
SCP	Sinais Colinérgicos Periféricos
XO	Xantina Oxidase
ME	Movimentos Estereotipados
EME	Estado de Mal Epiléptico
EROs	Espécies Reativas derivados do Oxigênio

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Ilustração 1: Estrutura química da buspirona	20
Ilustração 2: Camundongo <i>Swiss</i> adulto macho	29
Ilustração 3: Aparelho de espectrofotômetro usados nos experimentos.....	30

Resultados

Ilustração 4: Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma subcrônica no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.....	38
Ilustração 5: Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	39
Ilustração 6: Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma aguda em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	40
Ilustração 7: Atividade da enzima superoxide dismutase no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	41

LISTA DE TABELAS

Resultados

Tabela 1: Efeitos do pré-tratamento com buspirona nas alterações comportamentais durante as convulsões induzidas por pilocarpina 36

Tabela 2: Efeito do pré-tratamento com buspirona nas latências para instalação da primeira convulsão e do estado de mal epiléptico durante as convulsões induzidas por pilocarpina e taxa de mortalidade em camundongos adultos..... 37

RESUMO

FERREIRA, P.B. Estudo dos efeitos da administração aguda em doses repetidas da bupiriona em camundongos no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, 2012, 67 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Farmácia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012

O estresse oxidativo é um dos mecanismos de morte celular induzido pelas crises convulsivas. A bupiriona apresenta efeitos antidepressivos e ansiolíticos devido a sua capacidade de estimular receptores 5-HT_{1A}. Os efeitos agudos da administração oral de bupiriona com doses repetidas sobre o estresse oxidativo foram observados em camundongos *Swiss* adultos machos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina (400 mg/kg, i.p., P400). Quarenta e três animais foram divididos em 4 grupos. O primeiro grupo foi tratado com solução salina 0,9% (v.o., n=10, grupo controle). O segundo grupo foi tratado com pilocarpina 400 mg/kg (n=10, grupo P400). Os animais que faziam parte do terceiro e quarto grupos foram tratados com bupiriona 5 mg/kg (v.o., n=10; grupo BUSP) durante 14 dias consecutivos. Já os animais do quarto grupo receberam P400, 30 min após a última administração de BUSP, (n=13, grupo BUSP + P400). Após o período de tratamento os animais foram eutanasiados e o hipocampo foi retirado para análises neuroquímicas. Os resultados mostram que durante o período do tratamento não se observou sinais de toxicidade ou morte. No grupo tratado com P400 houve um aumento significativo na peroxidação lipídica e nos níveis de nitrito. No hipocampo dos animais, o pré-tratamento com bupiriona e que receberam P400 30 minutos após esse pré-tratamento foi observada uma redução significativa do nível de peroxidação lipídica (65%) e nitrito (85%), bem como aumento da atividade da enzima catalase e superóxido dismutase (58%) quando comparados com o grupo pilocarpina. Tendo como base os resultados, podemos sugerir que o pré-tratamento com BUSP não produz efeitos tóxicos no Sistema Nervoso Central de camundongos, aumenta a latência para primeira convulsão, bem como diminui a taxa de mortalidade e o número de animais que convulsionaram e progridem para o estado de mal epilético e que a bupiriona exerceu efeitos anticonvulsivantes associados com a inibição do desenvolvimento do estresse oxidativo sugerindo o potencial uso terapêutico do seu uso no tratamento da epilepsia.

Termos de indexação: Bupiriona, Convulsões, Estresse Oxidativo, Hipocampo, Pilocarpina.

ABSTRACT

FERREIRA, P.B. **Study of the effects of acute administration of buspirone in mice model of epilepsy, 2012, 67p.** End of Course Work (Bachelor of Pharmacy) - Federal University of Piauí, Teresina, 2012.

Oxidative stress is one mechanism of cell death induced by seizures. Buspirone has antidepressant and anxiolytic effects due to its ability to stimulate 5-HT_{1A} receptors. Acute oral administration in repeated doses of buspirone on the oxidative stress observed in mice in adult male seizure model induced by pilocarpine (400 mg/kg, ip P400). Forty-three animals were divided into four groups. The first group was treated with 0.9% saline (po, n=10, control group). The second group was treated with pilocarpine 400 mg/kg (n=10, P400 group). Animals that were part of the third and fourth groups were treated with buspirone 5 mg/kg (po, n=10; BUSPgroup) for 14 consecutive days. The animals received the fourth group P400, 30 min after the last administration of BUSP (n = 13, group BUSP + P400). After the treatment period the animals were euthanized and the hippocampus was removed for analysis neurochemical. The results show that during the period of treatment there was no evidence of toxicity or death. In the group treated with P400 a significant increase in lipid peroxidation and nitrite levels. In the hippocampus of animals, the pretreatment with buspirone P400 receiving and 30 minutes after this pretreatment was also significantly reduced the level of lipid peroxidation (65%) and sodium nitrite (85%) and increased the activity of enzymes catalase and superoxide dismutase (58%) compared with the group pilocarpine. Based on the results, we suggest that the pretreatment with BUSP does not produce toxic effects on the central nervous system of mice, increased the latency to seizure first and lowers the mortality rate and number of animals which convulsed and proceed to status epilepticus and buspirone exerted anticonvulsant effects associated with inhibiting the development of oxidative stress indicates the potential therapeutic use of its use in treatment of epilepsy.

Keywords: Buspirone, Hippocampus, Oxidative Stress, Pilocarpine, Seizures.

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia do lobo temporal é uma doença crônica que pode interferir em inúmeros aspectos sociais e psicológicos do paciente e ainda está frequentemente associada a um estímulo inicial precipitante, tais como: estado epilético, trauma e convulsões febris prolongadas (DODRILL, 2004). Sendo, um dos distúrbios neurológicos mais comuns, apresenta uma taxa de prevalência de 5% (De LORENZO, 2001). Aproximadamente, 30 a 50% dos pacientes epiléticos são sintomáticos, e esta condição pode ser adquirida através de um stress ambiental (DE LORENZO et al., 2000).

Embora as convulsões em dois terços dos pacientes sejam controladas com sucesso com medicamentos anticonvulsivantes, o outro um terço restante permanece refratária à terapia medicamentosa (MILITÃO et al., 2010). O epilético pode ser mais susceptível a outras doenças psiquiátricas, uma vez que, a modulação neuronal da ansiedade e emoção está relacionada a semelhantes substratos neuronais em diferentes estruturas cerebrais, que podem estar envolvidos na evolução das convulsões parciais complexas, e em particular na do lobo temporal. Essas patologias podem ser associadas às mudanças neuroquímicas primárias e secundárias que são observadas durante as convulsões límbicas (POST, 2004).

Diante desse quadro, existe a necessidade da inserção de novas drogas mais segura e efetivas para o controle dessa a patologia e conseqüentemente pesquisas para o tratamento da epilepsia tem sido uma preocupação constante.

Convulsões induzidas por pilocarpina produzem várias lesões em muitas regiões do cérebro (por exemplo, hipocampo, corpo estriado, córtex frontal entre outros (FREITAS et al., 2005) como consequência da produção de radicais livres. Alterações comportamentais durante as convulsões em camundongos têm sido amplamente relatadas, sendo quantificáveis, replicáveis e revertidas pela administração aguda de antiepiléticos e de compostos antioxidantes (MILITÃO et al., 2009).

A buspirona é um agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} (OHLSEN et al., 2005). Esta droga possui um metabólito farmacologicamente ativo, que é um antagonista do receptor α_2 -adrenérgico (CACCIA et al., 1986). A buspirona pode modificar o conteúdo da serotonina (5-HT) que é um neurotransmissor envolvido em diversas funções

fisiológicas. Estudos demonstraram alterações nas funções do sistema serotoninérgico durante a patogênese da epilepsia (WATANABE et al., 2003; ZIAI et al., 2005).

Durante as convulsões induzidas por pilocarpina pode ser observado um aumento no nível de 5-HT no hipocampo dos camundongos. Os níveis elevados de 5-HT e de seu metabólito, o ácido 5-hidroxiindolacético, são fatores patogênicos que podem estar associados com o estresse oxidativo observado em várias patologias do sistema nervoso central, incluindo a epilepsia, por um mecanismo ainda não elucidado totalmente. No entanto, algumas explicações tem sido propostas como a excitotoxicidade através do aumento do conteúdo de 5-HT e consequente aumento na produção de radicais livres.

As convulsões são relacionadas ao estresse oxidativo e a neurotoxicidade. Considerando-se que o agonista do receptor 5-HT_{1A} pode exercer efeitos benéficos sobre as defesas antioxidantes, foi avaliada a influência da bupirona sobre o estresse oxidativo causado pela convulsão induzida por pilocarpina. Neste modelo o metabolismo da dopamina pode gerar um aumento do estresse oxidativo e da degeneração neuronal, causando dano neuronal.

O estresse oxidativo pode ser associado ao aumento do conteúdo de 5-HT hipocampal em camundongos. Esse aumento têm sido implicado no estabelecimento de convulsões e estado epiléptico induzido por pilocarpina (CACCIA et al., 1986). O mecanismo envolvido durante o estresse oxidativo induzido por convulsões no modelo de pilocarpina não é bem entendido, mas várias explicações têm sido propostas. Entre elas incluem excitotoxicidade que está associado com excesso de 5-HT e pelo aumento na formação de radicais livres.

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina é uma importante neuropatologia de interesse para a saúde pública devido à sua alta prevalência. Dessa forma, estudamos o comportamento dos camundongos adultos tratados com pilocarpina e após o tratamento agudo em doses repetidas com bupirona, no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina. Para tanto, foi determinada a latência para instalação da primeira convulsão (LIPC) e a latência para a instalação do estado de mal epiléptico (LIEME) nos animais adultos tratados de forma aguda em doses repetidas com bupirona após convulsões induzidas por pilocarpina. Também foi detectado os níveis

de peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos adultos, bem como foi verificada a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no hipocampo de camundongos adultos tratados de forma aguda com doses repetidas com buspirona após convulsões induzidas por pilocarpina.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

2.1 Epilepsia

A epilepsia do lobo temporal (ELT) pode ser definida como uma afecção crônica de etiologia diversa, caracterizada por crises repetidas, devido à uma descarga excessiva dos neurônios cerebrais em diferentes estruturas e associada eventualmente com diversas manifestações clínicas e paraclínicas, podendo ocorrer também quando há um aumento do nível basal de excitação do sistema nervoso central (SNC), superior ao limiar da convulsão (ENGEL et al., 1997). De Lorenzo et al., (2001) demonstraram, ainda, que a atividade convulsiva pode ocorrer após a perda suficiente e duradoura de neurônios em diferentes regiões cerebrais.

As crises convulsivas podem ser associadas às diversas mudanças bioquímicas em algumas áreas cerebrais afetando vários neurotransmissores (MICHOTTE et al., 2000), além de afetar o metabolismo dos carboidratos, os sistemas de segundos mensageiros (AMPc, DAG e IP³) e a expressão gênica, que poderiam estar envolvidos na fisiopatologia responsável pelas alterações ao longo do tempo nos neurônios (MELDRUM et al., 1990).

Os modelos de epilepsia do lobo temporal semelhante a dos humanos podem ser utilizados para estudar as mudanças neuroquímicas relatadas durante o desenvolvimento e na propagação e/ou manutenção das convulsões, possibilitando o estudo de drogas para o tratamento de pacientes epiléticos (MARINHO et al., 1997), e também pode ser útil para caracterizar prontamente os mecanismos envolvidos no estabelecimento das fases da epilepsia: aguda, silenciosa e crônica.

2.2 Buspirona

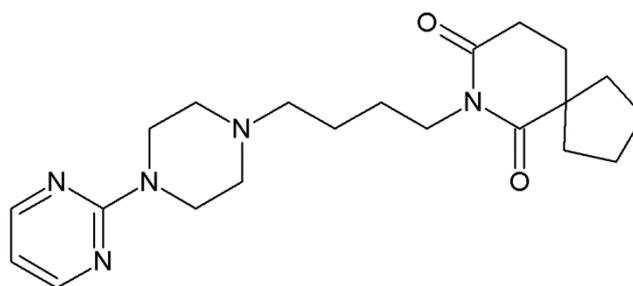
2.2.1 Descrição

A buspirona é o primeiro fármaco da classe das azapironas e a única dessa classe comercializada no Brasil, foi sintetizada na década de 70 e aprovada pela U.S. Food and Drug Administration em 1986 (ANDREATINI et al., 2001; CAIXETA, 1995). É um composto não-benzodiazepínico com propriedades ansiolíticas (SANTOS et al., 2006),

e sem atividade anticonvulsivante, miorelaxante e hipnótico, sendo por isso denominado de ansioseletivo (GOA et al., 1986). Também difere dos benzodiazepínicos por não causar depressão no Sistema Nervoso Central (SNC) (LIMA et al., 2002).

Denominada cientificamente 8-[4-(4-pirimidin-2-il-piperazina-1-il)-butil]-8-azaspiro-[4,5]-decano-7,9-diona, a buspirona (**Ilustração 1**) apresenta uma estrutura química única com dois análogos estruturais: 4,4-dimetil-1-[4-[4-(2-quinolinil)-1-piperazinil]-butil]-2,6-piperidinediona e 8-[4-[4-(2-quinolinil)-1-piperazinil]-butil]-8-azaspiro[4.5]decano-7,9-diona (CHILMONCZYK et al., 1995).

Ilustração 1: Estrutura química da buspirona (8-[4-(4-pirimidin-2-il-piperazina-1-il)-butil]-8-azaspiro-[4,5]-decano-7,9-diona).



2.2.2 Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da buspirona só começou a ser esclarecido na década de 90 devido à necessidade crescente de um fármaco ansiolítico desprovido de efeitos adversos severos (SEO et al., 1999).

É sabido que a buspirona tem alta afinidade pelos receptores serotoninérgicos do subtipo 5-HT_{1A} e que não interage com receptores benzodiazepínicos ou GABAérgicos (ERHORN, 2008). No entanto, produz um aumento na densidade dos receptores D₂ no corpo estriado de ratos adultos, com forte possibilidade de interação entre os sistemas serotoninérgico e dopaminérgico (LIMA et al., 2002). Estudos farmacológicos em nível molecular evidenciam essa interação e indicam que outros sistemas de

neurotransmissores podem estar envolvidos no seu mecanismo de ação (TAYLOR et al., 1985).

Atualmente, têm-se duas hipóteses sobre o mecanismo de ação da buspirona ao agir como agonista parcial dos receptores 5-HT_{1A}, a saber: primeiramente, interagindo com os receptores pré-sinápticos somatodendríticos diminuindo a frequência de excitação dos neurônios serotoninérgicos pré-sinápticos; e/ou atuando como agonista parcial nos receptores pós-sinápticos, competindo com a serotonina por esses receptores, conseqüentemente, diminuindo sua ação (ANDREATINI et al., 2001). Para Dimitrou e colaboradores (1998) a buspirona pode aumentar os efeitos antidepressivos dos inibidores de recaptção da serotonina.

A buspirona também promove alterações sobre o sistema dopaminérgico nigroestriatal e mesolímbico, serotoninérgico na rafe e noradrenérgico no locus coeruleus (RIBLET et al., 1984). Ao interagir com o sistema dopaminérgico pode tanto facilitar quanto dificultar a neurotransmissão dopaminérgica (RIBLET et al., 1982); Essa hibridez dificulta muitas vezes a interpretação de dados obtidos em estudos experimentais.

Um estudo controlado com adultos portadores de retardo mental nos graus leve e moderado e com graves distúrbios comportamentais revelou, que durante o tratamento com uma dose máxima de 50 mg/dia, a buspirona pode agir como agonista 5-HT_{1A} e, reestabelecer a homeostase do sistema serotoninérgico (VERHOEVEN et al., 1997).

2.2.3 Farmacocinética

A buspirona é bem absorvida quando administrada por via oral. Sofre metabolismo de primeira, através de reação enzimática com o citocromo CYP^{3A4}(ANDERSON et al., 1996), e apresenta uma biodisponibilidade de aproximadamente 4%. Quando administrada junto as refeições tem a sua biodisponibilidade aumentada, no entanto essa interação diminui o metabolismo de primeira passagem, uma vez que retarda o esvaziamento gástrico e conseqüentemente a absorção (GAMMANS et al., 1986). É eliminada por metabolismo oxidativo em um metabólito ativo, o 1-pyrimidinyl-piperazine, que apresenta de 1% a 20% da potência da

buspirona e um inativo a 5-hidroxi-buspirona. A dose terapêutica da buspirona deve variar entre um mínimo de 30 mg/dia e um máximo de 60 mg/dia (ANDREATINI et al., 2001), embora tenha demonstrado atividade na ansiedade generalizada com doses entre 15 e 30 mg/dia (BONVALOT et al., 1988). Menos de 1% da dose administrada é excretada na forma inalterada. A depuração plasmática é reduzida em portadores de cirrose hepática e insuficiência renal (BONVALOT et al., 1988; GAMMANS et al., 1986).

Sua meia-vida ($T_{1/2}$) varia de 2 a 8 horas. Liga-se fortemente à albumina e à glicoproteína ácida (GAMMANS et al., 1986). Salazar e colaboradores (2001), analisaram a farmacocinética e a tolerância da buspirona administrada por via oral em três grupos etários: de 13 crianças, 12 adolescentes com distúrbios de ansiedade e 14 adultos saudáveis. Nesse estudo foi observada uma rápida absorção em todos os grupos, com concentração plasmática maior no grupo de crianças e menor no grupo dos adultos. A concentração de 1-pyrimidinyl-piperazine também foi significativamente maior no grupo de crianças. A droga foi bem tolerada por toda a população em estudo: 68% das crianças e adolescentes referiram letargia, 48% cefaléia e 20% dispepsia; e nos adultos predominou como efeito adverso a sonolência (21,4%).

2.2.4 Indicações

Devido a suas propriedades ansiolíticas a buspirona foi introduzida na medicina para o tratamento da ansiedade generalizada. A buspirona possui também efeitos antidepressivos. É indicada na prática clínica para portadores de transtorno de ansiedade, ansiedade crônica, idosos ansiosos e indivíduos que apresentam sintomas mistos de ansiedade e depressão (RICKELS, 1990). Pode ser utilizada também em substituição aos benzodiazepínicos devido à semelhança na eficácia e menor incidência e frequência de reações adversas, como sedação e relaxamento (HONORATO et al., 1990; BONVALOT et al., 1988; GOA et al., 1986), porém esse uso deve ser melhor esclarecido.

McAloon e colaboradores (1995) demonstraram, durante um experimento em ratos que apresentavam infiltração leucocitária, que a buspirona possui ação imunossupressora quando administrada tópica ou sistemicamente. Os achados

revelaram uma atividade não conhecida da bupirona, que necessita ser melhor elucidada.

Inúmeros estudos buscam conhecer o uso terapêutico da bupirona em outras patologias (MALLAT-TOSTES, 1995; BRAHM et al., 2008; ANDREATINI et al., 2001). Há relatos na literatura de portadores da Síndrome de Rett que apresentaram melhora significativa na disfunção respiratória após ser tratado com bupirona (ANDAKU et al., 2005). O uso *off-label* de portadores de deficiência intelectual e transtorno autístico com comportamento auto-destrutivo, como alternativa aos antipsicóticos em pacientes que não os toleram apresentaram redução do comportamento agressivo, o que sugere um uso potencial da bupirona no autismo, porém sem atividade no comprometimento intelectual (BRAHM et al., 2008).

A bupirona também demonstrou atividade na ansiedade infantil. Hanna e colaboradores (1997) observaram a remissão dos sintomas ansiosos em portadores de laringomalácia e disfagia faríngea com dificuldades relacionadas à alimentação. O tratamento com 12,5 mg/dia aliviou a ansiedade relacionada ao ato de comer, a ansiedade social e a capacidade de auto-alimentação que resultaram em ganho de peso e melhora do estado geral. Nessa situação a medicação é bem tolerada e os benefícios persistem com a administração diária do fármaco.

O uso da bupirona é indicado para o tratamento do distúrbio de ansiedade em idosos, com poucos efeitos colaterais (RODRIGUES et al., 1989). É um fármaco eficaz no transtorno de ansiedade da terceira idade em comparação com outros ansiolíticos e benzodiazepínicos (BYRNE, 2002); No entanto, se fazem necessários mais estudos a fim de esclarecer seus efeitos adversos, posologia e interações farmacológicas.

A bupirona demonstra eficácia em portadores de ansiedade associada aos distúrbios cardiovasculares com melhora dos sintomas a partir da segunda semana de tratamento; os efeitos colaterais observados foram mínimos e/ou desapareceram com a continuidade do tratamento (RAMIRES et al., 1993); Especificamente na neurose cardíaca a bupirona obteve resultados benéficos, com desaparecimento dos sintomas característicos da neurose (CUNHA et al., 1987). O cloridrato de bupirona também reduz a ansiedade na síndrome do climatério (HEGG et al., 1989).

Um grande benefício que o tratamento com buspirona acarreta é o de não afetar o estado de alerta, a memória e a habilidade psicomotora, não interferindo no desempenho das atividades cotidianas dos indivíduos que a utilizam terapêuticamente (RODRIGUES & MASSUD FILHO, 1988; RAMIRES et al., 1993). Tem ainda a vantagem de não potencializar os efeitos depressores do álcool, não ter potencial para abuso e não causar dependência (ERHORN, 2008).

Um estudo recentemente realizado revelou um aumento na neurogênese de mamíferos (gambá) por meio da ativação de receptores 5-HT_{1A} ao ser administrado buspirona, devido sua ação agonista parcial nesses receptores. O aumento da neurogênese resultou em melhora da memória espacial e emocional do componente, sendo, portanto, indicativo de que a buspirona pode ser uma alternativa para tratar problemas relacionados ao envelhecimento (GRABRIEC et al., 2009).

2.2.5 Interações medicamentosas

Estudos demonstram que o uso da associação da buspirona com a carbamazepina apresenta de 60% a 70% de eficácia no tratamento do alcoolismo (MALLAT-TOSTES, 1995). Sena e colaboradores (1997), em estudo com a mesma associação, verificaram 47,3% de remissão parcial ou total da dependência ao álcool, sem interação ou efeitos adversos durante seis meses de tratamento. Há relatos da utilização da associação com a moclobemida para tratar a síndrome de dependência ao álcool, no entanto, essa associação ainda precisa ser melhor investigada.

A buspirona reverte os prejuízos produzidos pelo álcool mais eficientemente que o diazepam (ERWIN et al., 1989); É melhor tolerada e mais segura que o diazepam, sendo preferida pelos usuários (BUENO et al., 1988). A associação de buspirona com neurolépticos como a clorpromazina e a trifluoperazina em alcoólatras reduz os riscos de efeitos adversos produzidos pelos neurolépticos (MALLAT-TOSTES, 1995).

Poucos estudos investigaram a buspirona em associação com antidepressivos, porém sabe-se que alguns antidepressivos inibem a enzima CYP^{3A}³⁴ do citocromo P450; Devido à essa atividade, os estudos devem ser controlados para evitar interações

medicamentosas entre esses fármacos. É necessário cautela nessa experimentação, já que há riscos para síndrome serotoninérgica (SANTOS et al., 2006).

Seo e colaboradores (1999) realizaram um procedimento experimental para avaliar os efeitos da buspirona, da fluoxetina e da associação de ambas na ansiedade e constataram que isoladamente os fármacos não tiveram efeito.

Clay e colaboradores (2003) observaram interação entre ritonavir e buspirona. A interação é caracterizada pelo desenvolvimento de ataxia, letargia, rigidez muscular, tremores e fadiga muscular. Os sintomas desapareceram com a diminuição da dose de buspirona e com a substituição do ritonavir pelo amprenavir. Supõe-se que essa interação ocorre devido ao efeito inibitório do ritonavir sobre o CYP³A⁴, que levou ao aumento dos níveis séricos de buspirona.

2.2.6 Efeitos adversos

Os efeitos adversos decorrentes do uso da buspirona são mínimos em comparação a outros ansiolíticos e a fármacos que, anteriormente à sua descoberta, eram utilizadas para essa finalidade. Apresenta menor comprometimento psicomotor e sedação que o diazepam e o clorazepato (NEWTON et al., 1982) e menos sedação e letargia que o alprazolam e lorazepam (COHN et al., 1989). Os efeitos colaterais sedação e sonolência são menos intensos quando comparados ao bromazepam (SILVA et al., 1987).

Os efeitos adversos mais frequentemente observados são tontura, cefaléia, sonolência, distúrbios gastrointestinais e insônia. Ocasionalmente também foram observados: nervosismo, excitação, zumbido, sialosquiese, mal estar, náusea, inquietação, vertigens e fadiga.

Predominantemente as reações adversas são leves e podem, em alguns casos, desaparecer com o ajuste da dose administrada, com a continuidade do tratamento ou espontaneamente (BASTOS, 1987). Dificilmente é necessário interromper o tratamento por causa das reações apresentados pelo paciente, já que os benefícios que a medicação promove se sobrepõem aos sintomas desagradáveis. Essa segurança somada à eficácia e à boa tolerância são características relatadas pelos usuários durante o tratamento.

2.2.7 Contra-indicações

Não há muitos estudos sobre os estados ou condições patológicas em que a buspirona é contra-indicada. Sabe-se que indivíduos com uso prévio de benzodiazepínicos têm diminuída a resposta terapêutica à buspirona.

O tratamento da fobia social é contra-indicado com a buspirona; Observou-se uma leve melhora na sintomatologia, porém os indivíduos em estudos referiram tontura, que os fizeram abandonar o tratamento (NARDI, 1999).

Um estudo aberto com três crianças autistas concluiu que a buspirona pode ser ineficaz para tratá-las; Alguns sintomas autísticos relativos à motricidade, reações afetivas inadequadas e prosexia foram agravados com o uso de buspirona, revelando uma piora e uma contra-indicação específica nesse quadro (CAIXETA, 1995). Não é recomendado o uso de buspirona como tratamento de rotina do transtorno do pânico (RICKELS, 1990). O uso em crianças menores de 18 anos bem como a dose indicada para essa faixa etária precisa ser melhor analisado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Determinar as alterações comportamentais e neuroquímicas observadas no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina durante a fase aguda das convulsões, bem como investigar os efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores do tratamento agudo em doses repetidas com a bupirone nas mudanças observadas durante essa fase em camundongos adultos.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar um levantamento bibliográfico sobre a bupirone
- Estudar o comportamento dos animais adultos tratados com pilocarpina e após tratamento agudo em doses repetidas com bupirone
- Investigar a ação farmacológica da administração aguda em doses repetidas da bupirone no comportamento dos animais no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina
- Determinar a LIPC e a LIEME nos animais adultos tratados de forma aguda em doses repetidas com bupirone após convulsões induzidas pela pilocarpina
- Detectar os níveis de peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos adultos tratados de forma aguda em doses repetidas com bupirone após convulsões induzidas pela pilocarpina
- Verificar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no hipocampo de camundongos adultos tratados de forma aguda em doses repetidas com bupirone após convulsões induzidas pela pilocarpina

4 MATERIAL E MÉTODOS

Um levantamento bibliográfico foi realizado sobre a buspirona, um fármaco não benzodiazepínico com ação ansiolítica de grande importância terapêutica nos transtornos de ansiedade generalizada.

A revisão contemplou artigos completos, resumos e estudos de caso compreendidos entre os anos de 1982 e 2011, através das bases de dados LILACS e MEDLINE. Para busca dos trabalhos foram utilizadas as palavras-chave: *bupirone, action mechanism, pharmacokinetics, indications, adverse effects, nomenclature e structure.*

Os critérios de inclusão definidos para a seleção dos artigos foram: artigos publicados em português, inglês e espanhol; artigos na íntegra que retratassem a temática referente a revisão de integrativa e artigos publicados e indexados nos referidos bancos de dados nos últimos dez anos.

4.1 Procedimento experimental

Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos machos com 2 meses de idade (**Ilustração 2**), com peso variando de 25-35 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 cm² com no máximo 6 animais, onde foram observados por 1 hora, em condições sala com temperatura ambientais semelhantes, com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água ad libitum. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o Guia para o cuidado e uso de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos, Washington, DC (1985), e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (Número do protocolo: 0021/10) da UFPI.

Ilustração 2: Camundongo *Swiss* adulto macho

Fonte: Arquivo pessoal

As substâncias utilizadas foram: cloridrato de pilocarpina e cloridrato de bupiriona (Sigma, Chemical, E.U.A.). Todas as doses são expressas em miligramas por kg (mg/kg) e o cloridrato de bupiriona foi administrado via oral (v.o.) em um volume de 5 mg/kg. Durante os experimentos, os animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro e o segundo grupo foram tratados com bupiriona (5 mg/kg, v.o., n=23) ou solução fisiológica a 0,9% (v.o., n=10) e 30 min depois receberam cloridrato de pilocarpina (400 mg/kg, i.p., n=13). Os camundongos foram observados neste intervalo de tempo (30 min) para a ocorrência de qualquer mudança de comportamento. Os tratamentos descritos anteriormente representam os grupos BUSP + P400 e o P400, respectivamente. O terceiro e quarto grupo receberam solução salina 0,9% v.o. (n=10, grupo controle) ou apenas bupiriona (5 mg/kg, v.o., n = 10, grupo BUSP).

Após os tratamentos, os animais foram colocados em caixas com 30 x 30 cm de diâmetro para observação e determinação do período de latência para o desenvolvimento da primeira crise convulsiva (comportamentos tipicamente observados após a administração de pilocarpina: presença de sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados (ME), convulsões motoras e estado epilético) (TURSKI et al., 1983) e a taxa de mortalidade de cada grupo experimental após a administração de pilocarpina. Trabalhos anteriores têm mostrado que o número de convulsões e óbitos ocorridos em 1 h após administração sempre seguem o mesmo padrão, por isso, decidiu-se observar os animais durante 1 h, já que as convulsões induzidas por pilocarpina ocorrem dentro de 60 min e as mortes dentro 1 h após a injeção de pilocarpina.

Após o período de observação de 1 h os animais que desenvolverem convulsões, estado epiléptico e sobreviveram aos protocolos dos tratamentos experimentais foram eutanasiados, e seus cérebros removidos para dissecação sobre gelo do hipocampo de ambos os lados do cérebro. O hipocampo foi armazenado em condições apropriadas para a realização dos posteriores estudos neuroquímicos. Os corpos dos camundongos foram armazenados em um saco plástico, hermeticamente fechado em um congelador para esse fim e posteriormente enviados ao CCA para correto descarte.

4.2 Método da determinação dos níveis de peroxidação lipídica

O grau de peroxidação lipídica foi mensurado através da determinação dos níveis de TBARS, conforme o método descrito por Draper e Hadley (1990). Os níveis de peroxidação lipídica foram analisados no grupo BUSP + P400 (n=13), no grupo P400 (n=10), no grupo BUSP (n=10) e animais controle (n=10). Foi preparado o homogenato a 10% em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. Deste foi retirado 250 µL do homogenato de cada área cerebral do animais controles e tratados com pilocarpina, ao qual foram adicionados 1 mL de ácido tricloroacético a 10% e 1ml de solução de ácido tiobarbitúrico 0,67% e em seguida a mistura foi agitada em vortex.

Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente por 15 min, a seguir resfriada em água corrente. Após o resfriamento foi adicionada 2 mL de η-butanol, agitada em vortex por 1 min. Após agitação a mistura foi centrifugada a 1200 rpm por 5 min. Após a centrifugação (800/g, 5 min), as substâncias que reagiram à solução de ácido tiobarbitúrico foram determinadas a partir da leitura na absorbância relativa a 535 nm em espectrofotômetro (**Ilustração 3**). Os resultados foram expressos em nmol de MDA/g de tecido.

Ilustração 3: Aparelho deespectrofotômetro usados nos experimentos.



Fonte: Arquivo pessoal

4.3 Método da determinação do conteúdo de nitrito

Para determinar os teores de nitrito nos grupos experimentais pesou-se 7 mg de NaNO_2 que foram dissolvidos em 10 mL de água bidestilada. Foram feitas diluições em série, ficando 1 mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Em seguida foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações (GREEN et al., 1981). Em um tubo branco foi adicionado 500 μL do reagente mais 500 μL de água destilada, em outro tubo teste foi adicionado 500 μL do reagente mais 500 μL do homogenato de tecido a 10%. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito produzido usando NaNO_2 e os resultados foram expressos em mM.

4.4 Método da determinação da atividade da CAT

A atividade da CAT foi medida nos grupos experimentais utilizando o princípio básico da medida da velocidade de produção de O_2 e H_2O de acordo com Chance e Maehly (1955). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951). A atividade da enzima foi medida em 230nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização de Gilford, USA, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade.

A atividade enzimática foi medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em $\text{U}/\mu\text{g}$ de proteína. Uma unidade (U) da CAT corresponde a decomposição de 1mM de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio por minuto.

Foi preparado o meio da reação com H₂O₂ (18 mL) mais Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H₂O Milli Q (0,8 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980 µL do meio de reação mais 20 µL do homogenato a 10% preparado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4. E feita à leitura durante 6 min a temperatura de 37°C em espectrofotômetro a 230 nm. Como branco cinético foi feito pela a leitura na absorbância relativa a 230 nm com apenas 1 ml do meio reacional.

As absorbâncias foram registradas com intervalo de 1 min, durante 6 min. A reação foi acompanhada em 230 nm. Uma curva padrão foi criada usando CAT purificada (Sigma, St Louis, MO, E.U.A.) com condições idênticas. Os resultados foram expressos em mmol/min/mg de proteína (Chance et al., 1955).

4.5 Método da determinação da Atividade da SOD

A atividade da SOD foi determinada em nossos experimentos, através da taxa de redução do citocromo C pelos radicais superóxidos, utilizando o sistema xantina - xantina oxidase como fonte geradora de ânion superóxido (O₂⁻) (ARTHUR et al., 1985) através da técnica descrita anteriormente por FLOHÉ et al., 1984.

Foi preparada o meio da reação (volume total 30 mL) contendo tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8 (18 mL), xantina 500 µM (3,0 mL); cianeto de potássio 200µM (3,0 mL); EDTA 1mM, pH 6,8 (3,0 mL). As amostras (homogenato a 10%) foram preparadas com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8. Os homogenatos a 10% foram centrifugados a 15000 rpm durante 15 min a 4°C, em seguida os sobrenadantes foram removidos para posterior determinação da atividade da SOD.

A xantina oxidase (XO) (5 U/mL) usada na reação foi preparada a partir da solução padrão de XO (1 µL para 80µL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8). Em seguida foi realizado o ensaio em uma cubeta de vidro contendo: 975 µL do meio reacional acima descrito, 20 µL do sobrenadante da amostra obtido conforme descrito anteriormente e mais 5 µL da XO, a mistura foi agitada e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm a temperatura ambiente durante 6 minutos. Como branco cinético foi feito pela adição apenas do sistema gerador de ânion superóxido e o citocromo C, e foi realizada a leitura do branco na absorbância relativa à oxidação do citocromo C à 550 nm. A curva da atividade unidade vs percentagem de inibição foi medida com quantidades conhecidas de SOD purificada que está contida em

5 U/mL de solução. A quantidade da atividade da SOD das amostras foram calculadas usando a média das absorções lineares obtidas durante 6 min pela curva.

A diferenciação entre os dois diferentes tipos de SOD (Cu Zn-SOD e Mn-SOD) foi feita pela adição de cianeto de potássio (200 μ M) à mistura de incubação no meio reacional. Onde, o Cu Zn-SOD é inibida pelo cianeto de potássio, enquanto a Mn-SOD não é afetada (TAMATE et al., 1992; TANIGUCHI, 1990).

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade (U) da atividade da SOD corresponde à inibição de 50% da reação do $O_2^{\cdot -}$ com o Citocromo C. A concentração da proteína foi obtida pelo método de Lowry et al. (1951).

4.6 Análises Estatísticas

Os resultados do período de latência para primeira convulsão e alterações neuroquímicas que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com teste T de Student Newman Keuls (como *post hoc* teste) pelo programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad software. Os dados não paramétricos (percentagens) foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste do qui-quadrado. O mesmo programa (GraphPad Prism©) foi utilizado para confecção dos gráficos apresentados neste trabalho. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p < 0,001$.

5 RESULTADOS

Os animais tratados com dose elevada de pilocarpina (grupo P400, 400mg/kg, i.p.) apresentaram convulsões tônico-clônicas generalizadas (100%), que progrediram para o estado de mal epiléptico (EME). Todos os animais morreram após a administração de P400. Durante a primeira hora de observação, apresentaram sinais colinérgicos periféricos, tais como miose, piloereção, cromodaciorréia, salivação, diarreia, diurese, e também movimentos estereotipados, envolvendo o aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e wet-dog shakes (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado). Após a administração de pilocarpina, a instalação da primeira convulsão ocorreu em $7,90 \pm 1,68$ min. Todos os animais pré-tratados com bupirona selecionados para este estudo foram observados por 1 h após a injeção de pilocarpina e manifestaram alterações no comportamento, tais como SCP (100%), tremores (70%), ME (100%), convulsões (54%) e EME (100%).

As tabelas 1 e 2 demonstram que o grupo que foram pré – tratados com BUSP durante 14 dias e receberam P400 no último dia, 30 minutos após a administração de BUSP, tiveram uma redução de 46% no percentual de animais que desenvolvem ataques convulsivos, um aumento de 55% do período de latência para desenvolvimento da primeira convulsão ($17,4 \pm 15,03$ min) e aumento de 46% na porcentagem de sobrevivência em comparação com o grupo P400. Nenhum dos animais dos que receberam injeções de bupirona isoladamente mostrou atividade convulsiva (**Tabela 1 e 2**).

A bupirona age como agonista dos receptores 5-HT₁ e provoca redução da gravidade das convulsões induzidas por pilocarpina. A ação protetora deste agonista pode ser devido à sua ação anticolinérgica fraca. Assim, o estudo sugere que a estimulação aos receptores 5-HT₁ inibe a formação de radical livre formados pelas convulsões induzidas por pilocarpina. Estes achados justificam os efeitos anticonvulsivantes da bupirona observados durante os nossos estudos

comportamentais, uma vez que houve um aumento da latência para a primeira convulsão, uma diminuição da taxa de mortalidade e diminuição do número de animais que convulsionaram e progrediram para o EME (**Tabelas 1 e 2**).

5.1 Comportamento de camundongos adultos observados durante 1 hora após administração de pilocarpina.

Os estudos comportamentais foram realizados como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados como o número de animais que apresentaram alterações dos parâmetros comportamentais em relação ao número total de animais observados durante os experimentos.

Todos os animais adultos tratados com dose elevada de pilocarpina (400 mg/kg, i.p; n=10), durante 1 hora de observação, apresentaram SCP, tais como, miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia, diurese, e também movimentos estereotipados, envolvendo o aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado) (**Tabela 1**).

Os tremores ocorreram em 100% (10) dos animais e as convulsões apareceram em todos os animais (10) nos 17 minutos iniciais, bem como foi instalado o EME logo em seguida, em todos (10) os animais do grupo P400, não havendo nenhuma taxa de sobrevivência nesse grupo (**Tabela 1 e 2**).

Por sua vez, todos os animais adultos pré-tratados com buspirona (5 mg/kg) e que após 30 min da última dose dos 14 dias de tratamento receberam uma dose de pilocarpina (400 mg/kg, i.p; n=13), durante 1 hora de observação, apresentaram SCP, tais como, miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia, diurese, e também movimentos estereotipados, envolvendo o aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* (**Tabela 1**). Por outro lado, os tremores ocorreram em 70% (9) e as convulsões apenas em 54% dos animais (7) que progredem para o EME também em 54% (7) dos animais do grupo BUSP + P400, e foi verificado um aumento de taxa de sobrevivência nesse grupo (**Tabela 1 e 2**).

Tabela 1: Efeitos do pré-tratamento com buspirona nas alterações comportamentais durante as convulsões induzidas por pilocarpina.

<i>Grupos</i>	SCP (%)	ME (%)	Tremores (%)	Convulsões (%)	EME (%)
P400	100	100	100	100	100
BUSP + P400	100	100	70 ^a	54 ^a	54 ^a
BUSP	00	00	00	00	00

Após o tratamento com pilocarpina foram observados por 1 h para a determinação dos SCP, ME, tremores, convulsão e EME. ^ap<0,001, vs pilocarpina (Teste do Qui-quadrado).

5.2 Efeito do pré-tratamento com buspirona nas LIPC e do LIEME durante as convulsões induzidas por pilocarpina e taxa de mortalidade em camundongos adultos

Os resultados apresentados na **Tabela 2** indicam que os efeitos produzidos pela estimulação colinérgica periférica não são bloqueadas pela buspirona. O pré-tratamento com buspirona não interferiu nos sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados e tremores induzidos por pilocarpina.

O pré-tratamento com buspirona na dose (5 mg/kg) reduziu em 46% (p<0,05) a percentagem de animais que convulsionaram, aumentando a LIPC em 120,3% (P400 = 7,90 ± 1,68 min; BUSP + P400 = 17,4 ± 1,53 min) [p<0,0001], e a LIEME em 61,67% (P400 = 14,95 ± 1,57 min; BUSP + P400 = 24,17 ± 3,49 min) [p<0,0001].

Os animais tratados com buspirona (5 mg/kg) não convulsionaram, e não progrediram para o EME, bem como não foi detectada nenhuma morte nesse grupo, quando comparados aos grupos controle e P400. Comparando o grupo pré-tratado com BUSP e que após 30 min recebeu pilocarpina e o grupo P400 pode-se verificar que houve uma diminuição de 46% na taxa de mortalidade no grupo dos animais tratados com a associação BUSP + P400 [p<0,0001].

Tabela 2: Efeito do pré-tratamento com bupirona nas LIPC e do LIEME durante as convulsões induzidas por pilocarpina e taxa de mortalidade em camundongos adultos.

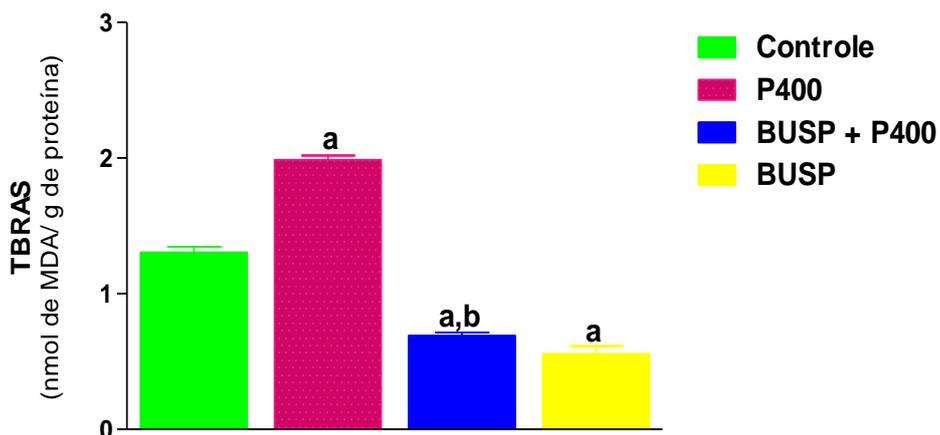
<i>Grupos</i>	LIPC (min)	LIEME (%)	Taxa de Mortalidade (%)
P400	7,90 ± 1,68	14,95 ± 1,57	100
BUSP + P400	17,4 ± 1,53 ^a	24,17 ± 3,49 ^a	54*
BUSP	00	00	00

As latências foram expressas como a Média ± E.P.M. em minutos (min) do número de animais usados nos experimentos, enquanto que, a taxa de mortalidade foi expressa em percentagem.^ap<0,001, quando comparado ao controle (ANOVA e teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste); *p<0,001, quando comparado ao grupo controle (Teste do qui-quadrado).

5.3 Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Os resultados dos efeitos da bupirona na peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina foram apresentados na **Ilustração 4**. No grupo P400 foi verificado um aumento significativo na peroxidação lipídica em relação ao grupo controle (Controle = 1,31 ± 0,04; P400 = 1,99 ± 0,03), [p<0,0001] no hipocampo de camundongos adultos. Por sua vez, o pré-tratamento com bupirona, 30 min antes da administração de pilocarpina produziu uma redução significativa na peroxidação lipídica de 65% quando comparado ao grupo P400 (P400 = 1,99 ± 0,03; BUSP + P400 = 0,69 ± 0,02), [p<0,001] (**Ilustração 4**). Também foi detectada uma redução significativa na peroxidação lipídica no grupo tratado somente com bupirona em comparação aos valores do grupo controle (Controle = 1,31 ± 0,04; BUSP = 0,55 ± 0,05) [p<0,001] no hipocampo dos camundongos adultos (**Ilustração 4**).

Ilustração 4: Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupiriona de forma aguda em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.



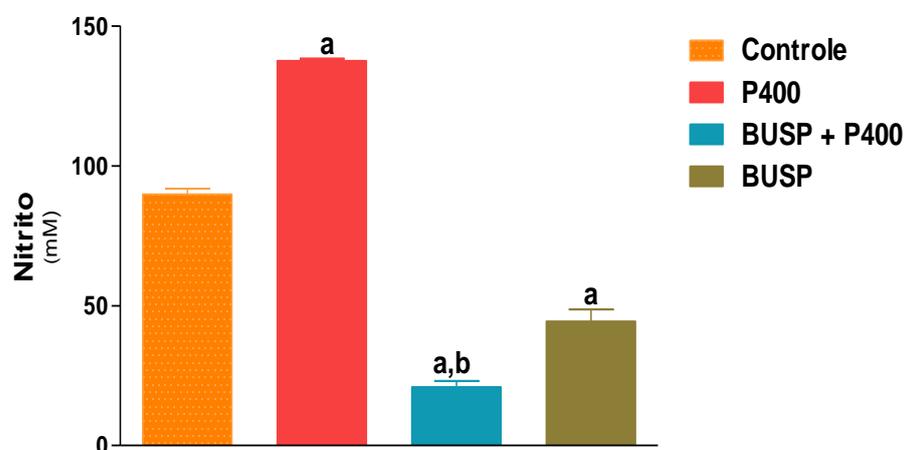
Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico 1 h após o tratamento foram eutanasiados. Os resultados representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. ^a $p < 0,001$, quando comparado ao controle, e ^b $p < 0,001$, quando comparado ao grupo P400.

5.4 Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupiriona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Os resultados dos efeitos da bupiriona no conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina foram apresentados na **Ilustração 5**. No grupo P400 foi verificado um aumento significativo no conteúdo de nitrito em relação ao grupo controle (Controle = $89,84 \pm 1,91$; P400 = $137,6 \pm 0,72$), [$p < 0,001$] no hipocampo de camundongos adultos. Por sua vez, o pré-tratamento com bupiriona, 30 min antes da administração de pilocarpina produziu uma redução significativa no conteúdo de nitrito de 85% quando comparado ao grupo P400 (P400 = $137,6 \pm 0,72$; BUSP + P400 = $20,91 \pm 2,18$), [$p < 0,001$] (**Ilustração 5**). Também foi

detectada uma redução significativa no conteúdo de nitrito no grupo tratado somente com bupiriona em comparação aos valores do grupo controle (Controle = $89,84 \pm 1,91$; BUSP = $44,41 \pm 4,25$) [$p < 0,001$] no hipocampo dos camundongos adultos (**Ilustração 5**).

Ilustração 5: Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupiriona de forma aguda em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.



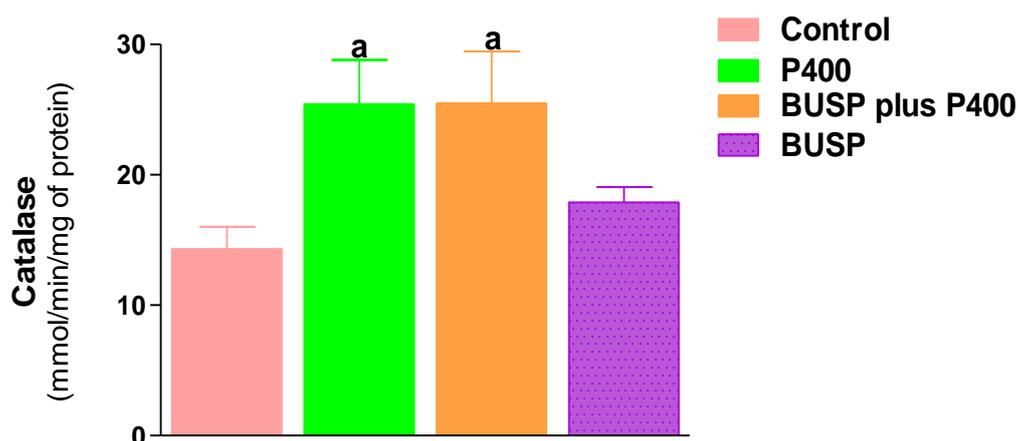
Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico 1 h após o tratamento foram eutanasiados. Os resultados representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. ^a $p < 0,05$, quando comparado ao controle, e ^b $p < 0,001$, quando comparado ao grupo P400.

5.5 Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupiriona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Os resultados dos efeitos da bupiriona na atividade enzimática da CAT no hipocampo de camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina foram demonstrados na Ilustração 6. No grupo P400 foi verificado um aumento significativo na atividade enzimática da CAT em relação ao grupo controle (Controle = $14,32 \pm 0,53$; P400 = $25,43 \pm 1,07$), [$p < 0,05$] no hipocampo de camundongos adultos. Por sua

vez, o pré-tratamento com bupiriona, 30 min antes da administração de pilocarpina produziu aumento significativo na atividade enzimática da CAT de 78% quando comparado somente ao grupo controle (Controle = $14,32 \pm 0,53$; BUSP + P400 = $25,49 \pm 1,4$), [$p < 0,001$] (**Ilustração 6**). Também foi detectado um aumento significativo na atividade enzimática da CAT no grupo tratado somente com bupiriona em comparação aos valores do grupo controle (Controle = $14,32 \pm 0,53$; BUSP = $17,88 \pm 0,43$) [$p < 0,001$] no hipocampo dos camundongos adultos (**Ilustração 6**).

Ilustração 6: Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupiriona de forma aguda em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.



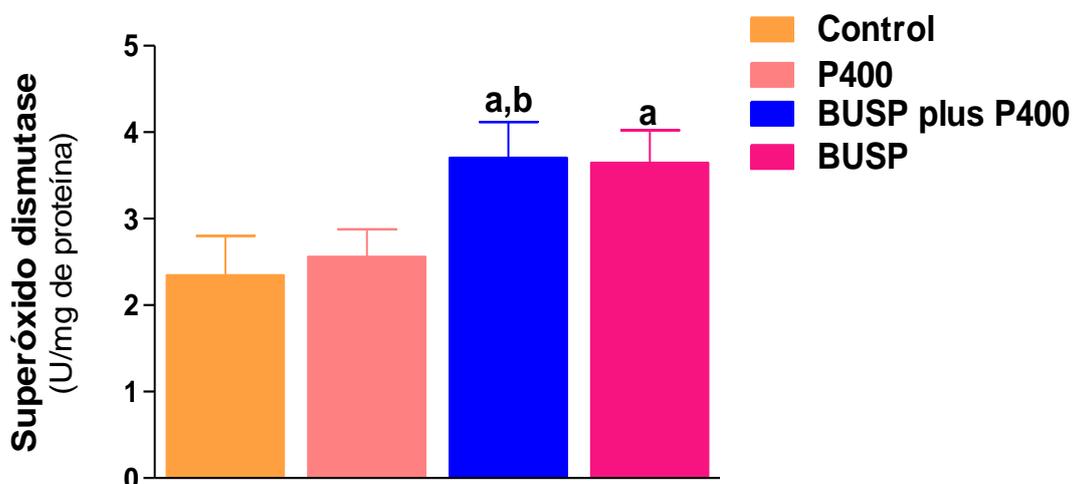
Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico 1 h após o tratamento foram eutanasiados. Os resultados representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. ^a $p < 0,05$, quando comparado ao controle, e ^b $p < 0,001$, quando comparado ao grupo P400.

5.6 Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupiriona de forma aguda com doses no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Os resultados dos efeitos da bupiriona na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo de camundongos adultos após convulsões induzidas

por pilocarpina foram demonstrados na Ilustração 7. No grupo P400 foi verificado um aumento significativo na atividade enzimática da SOD em relação ao grupo controle (Controle = $2,35 \pm 0,14$; P400 = $2,56 \pm 0,11$), [$p < 0,05$] no hipocampo de camundongos adultos. Por sua vez, o pré-tratamento com bupirone, 30 min antes da administração de pilocarpina produziu um aumento significativo na atividade enzimática da SOD de 58% quando comparado somente ao grupo controle (Controle = $2,35 \pm 0,14$; BUSP + P400 = $3,71 \pm 0,15$), [$p < 0,001$] (**Ilustração 7**). Também foi detectado um aumento significativo na atividade enzimática da SOD no grupo tratado somente com bupirone em comparação aos valores do grupo controle (Controle = $2,35 \pm 0,14$; BUSP = $3,65 \pm 0,13$) [$p < 0,001$] no hipocampo dos camundongos adultos (**Ilustração 7**).

Ilustração 7: Atividade da enzima superoxide dismutase no hipocampo de camundongos pré-tratados com bupirone de forma em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.



Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epilético 1 h após o tratamento foram eutanasiados. Os resultados representam a média \pm E.P.M. do número de animais usados nos experimentos. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste *t-Student-Neuman-Keuls* como *post hoc* teste. ^a $p < 0,05$, quando comparado ao controle, e ^b $p < 0,001$, quando comparado ao grupo P400.

6 DISCUSSÃO

Os modelos de epilepsia do lobo temporal semelhante a dos humanos podem ser utilizados para estudar as mudanças neuroquímicas relatadas durante o desenvolvimento e na propagação e/ou manutenção das convulsões (MARINHO et al., 1997), e também pode ser útil para caracterizar prontamente os mecanismos envolvidos na epilepsia. O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina tem sido amplamente utilizado em estudos sobre aspectos comportamentais e neuroquímicos da epilepsia humana. Este é um modelo em que as alterações nas funções cerebrais estão associadas com as mudanças observadas na epilepsia do lobo temporal. Entre as muitas alterações neuroquímicas encontradas durante as convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos pode ser detectado o aumento no conteúdo de 5-HT no tecido cerebral (FREITAS et al., 2004), bem como a alteração de muitos outros parâmetros neuroquímicos, relacionado com estresse oxidativo.

Estudos analisaram o papel do estresse oxidativo durante as convulsões induzidas por pilocarpina, possivelmente através da formação de radicais livres. O estresse oxidativo é um dos possíveis mecanismos responsáveis pelas convulsões induzidas por pilocarpina por muitas razões, entre elas a susceptibilidade do cérebro ao dano oxidativo. O cérebro processa grandes quantidades de O₂ em massa relativamente pequena e tem um alto conteúdo de substratos para oxidação associada às baixas atividades antioxidante, tornando-se extremamente suscetíveis a danos oxidativos (HALLIWELL et al., 1989).

Observando-se os resultados obtidos até o momento percebe-se que a administração oral por 14 dias de buspirona na dose de 5 mg/kg, de forma geral, não produz efeitos tóxicos em camundongos *Swiss* adultos, uma vez que durante o tratamento, nenhum sinal clínico visível de toxicidade foi observado.

No modelo de epilepsia induzido por alta dose de pilocarpina, pode-se observar perda neuronal de algumas áreas cerebrais, a saber: hipocampo, corpo estriado, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, tálamo e substância negra, sugerindo o envolvimento dessas diferentes áreas durante o estabelecimento do processo epiléptico (BORELLI & BOZZI, 2002).

Entre as áreas em que ocorre dano neuronal, o hipocampo, o corpo estriado e o córtex fronto-parietal, além de serem as áreas mais acometidas, podem estar relacionada de forma importante com os mecanismos de instalação, da propagação e/ou manutenção (epileptogênese) das convulsões límbicas. Em geral, as convulsões induzidas por pilocarpina parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas, entre eles os sistemas de defesa antioxidante, do metabolismo dos fosfoinosítídeos (MARINHO et al., 1998). Dentre as inúmeras mudanças neuroquímicas vistas durante a fase aguda do processo convulsivo tem sido verificada expressivas alterações na peroxidação lipídica, no conteúdo do nitrito e nitrato, nas atividades enzimáticas da SOD e CAT.

A relação entre as enzimas e a remoção dos radicais livres foi encontrada na epilepsia e as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) têm sido relacionadas a neurodegeneração induzida pela convulsão. Tem sido sugerido que as convulsões induzidas por pilocarpina são mediadas por um aumento no estresse oxidativo. As pesquisas atuais têm sugerido que os compostos antioxidantes podem dar algum nível de neuroproteção contra a neurotoxicidade das convulsões em nível celular (MILITÃO et al., 2009). Outro estudo sugere que uma elevação na formação de radicais livres pode ser acompanhada de um aumento compensatório das atividades das enzimas antioxidantes.

Além disso, o hipocampo durante as convulsões, pode ser particularmente sensível ao estresse oxidativo por causa de seus altos níveis de 5-HT que induzem a formação de radicais livres (GASPAR et al., 2003) e por causa das defesas antioxidantes reduzida. O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina têm sido extensivamente analisado, uma vez que, exhibe convulsões recorrentes espontâneas e podem esclarecer muitas das alterações vistas na epilepsia do lobo temporal de humanos.

O modelo de convulsão induzido por pilocarpina em alta dose (400mg/kg) foi utilizado como instrumento para investigar a participação dos diferentes sistemas de neurotransmissão do SNC como possíveis moduladores da epileptogênese, como também para observar as alterações comportamentais, e outros aspectos neuroquímicos relacionados com a fase aguda do processo convulsivo (CAVALHEIRO et al., 1994).

6.1 Estudos comportamentais após convulsões

A convulsão induzida por pilocarpina pode ser caracterizada por episódios de alteração no comportamento dos animais (TURSKI et al., 1983a). Essas convulsões apresentam, ainda, uma temporária redução da consciência e contrações involuntárias do músculo esquelético em humanos (JOBÉ, 2003).

Imediatamente após a administração de pilocarpina, os camundongos podem apresentar persistentes mudanças comportamentais, incluindo piloereção, cromodacriorréia, acinesia inicial, ataxia, tremores, automatismos mastigatórios como mioclonia dos músculos faciais, e movimentos de cachorro molhado, que persistem de 10 a 15 minutos (TURSKI et al., 1983a), os quais foram observados de forma semelhante nos camundongos usados em outros estudos comportamentais (FREITAS et al., 2004a).

Nossos resultados indicam que os animais tratados com pilocarpina (400mg/kg, i.p., P400) apresentaram as características descritas por vários pesquisadores na literatura (TURSKI et al., 1983a; MARINHO et al., 1997) confirmando a existência das alterações comportamentais após a administração do estímulo convulsivo.

Todos os animais pré-tratados com buspirona durante 14 dias e que receberam pilocarpina (400 mg/kg) 30 minutos após a última administração de buspirona (5 mg/kg) observados por 1h apresentaram sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados, e 70% apresentaram tremores. Após 17 minutos da administração de pilocarpina 400mg/kg, surgiram às convulsões motoras límbicas nos animais observados por 1h, e em seguida as convulsões recorrentes foram instaladas em 55% dos animais.

Já os que receberam apenas pilocarpina (i.p.; 400 mg/kg), todos os animais observados por 1 hora apresentaram sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados e tremores e após 7 minutos da administração de pilocarpina 400 mg/kg apareceram as convulsões que se instalaram em todos os animais.

Em relação ao número de mortes dos animais em cada grupo observado, foi visto que no grupo BUSP + P400 que 54% dos camundongos morreram e que no grupo P400 todos os animais morreram. Nos animais tratados somente com buspirona 5mg/kg não foram observados mudanças comportamentais nem convulsão ou morte.

Observa-se, portanto, que no processo convulsivo há um aumento significativo no número de morte dos animais em função do período de tempo observado da fase aguda, mostrando, assim, uma possível relação entre o tempo e o estabelecimento das mortes dos animais adultos durante o desenvolvimento do processo convulsivo, o que pode sugerir uma maior interação entre os diferentes sistemas de neurotransmissão cerebral em decorrência da propagação e manutenção da atividade epiléptica, levando a uma possível potencialização dos efeitos neurotóxicos sobre o SNC.

O presente estudo demonstrou que o pré-tratamento com buspirona pode produzir um aumento na atividade antioxidante enzimática. Seus mecanismos de compensação contra o estresse oxidativo observado durante as convulsões pode explicar parcialmente a ação antioxidante da buspirona. As convulsões induzidas por pilocarpina são reduzidas pela buspirona, sugerindo um papel dos radicais livres no controle da instalação e propagação das convulsões. Podemos sugerir que o pré-tratamento com a buspirona é capaz de amenizar crises convulsivas induzidas por pilocarpina, aumentar a latência para instalação do mal epiléptico, bem como a diminuição da mortalidade de camundongos adultos (**Tabelas 1 e 2**).

6.2 Níveis de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

A peroxidação lipídica produzida em muitas condições, como convulsão e/ou no modelo de isquemia cerebral de reperfusão, tem sido avaliado e pode ser verificada indiretamente através de homogenato cerebral e de diferentes tecidos (FREITAS et al., 2004a). A peroxidação lipídica é um processo que envolve a oxidação de ácidos gordurosos poliinsaturados, os quais são componentes básicos de membranas biológicas. Compostos reativos eletrofílicos são formados durante este processo, principalmente os do tipo aldeídos α e β -não-saturados. Estes compostos produzem ligações diretamente com a molécula do DNA. Os epóxi-aldeídos são mais reativos para o DNA do que aldeídos saturados. Os compostos resultantes da peroxidação lipídica reagem principalmente com o DNA mostrando ação genotóxica e mutagênica (LUCZAJ et al., 2003).

A produção de radicais lipídicos é uma reação tóxica que pode ser iniciada pela formação de peroxidação lipídica que culminam na destruição parcial ou completa da

membrana celular pela peroxidação lipídica em diferentes tecidos (UEDA et al., 1997). O nível de peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram eutanasiados após a observação durante uma hora foi determinado no presente estudo. Nossos resultados demonstraram que durante a fase aguda da convulsão ocorre um aumento significativo na produção de peroxidação lipídica no hipocampo dos camundongos tratados com pilocarpina (i.p., 400 mg/kg).

A peroxidação lipídica pode ser produzida por danos na membrana celular e mitocondrial de diferentes células, inclusive neuronais (PATEL et al., 2004) e ainda, pode ser capaz de produzir outras alterações moleculares através da inibição da enzima ATPase que está implicada no mecanismo dos receptores Gabaérgicos e que pode ser importante no processo convulsivo (LEES, 1991).

No modelo de epilepsia com pilocarpina em alta dose, uma variedade de processos bioquímicos incluindo a ativação de fosfolipases de membrana, proteases e nucleases podem ocorrer; contudo, como e quando estes processos se iniciam e são propagados ainda precisam ser esclarecidos. Os fosfoinosítídeos de membrana participam na transdução do sinal celular e iniciam uma cascata de eventos que culminam na formação de segundos mensageiros que podem estar envolvidos na atividade epiléptica durante a propagação dos efeitos convulsivantes para as demais áreas envolvidas no processo (BRUCE et al., 1995).

As alterações no metabolismo dos fosfolipídios de membrana podem resultar também na liberação de diacilglicerol, eicosanóides, peroxidação lipídicas e radicais livres. Os radicais livres estão envolvidos em inúmeras condições patológicas, indiretamente, parecem refletir nos mecanismos do estresse oxidativo, tais como: aumento da atividade das enzimas removedoras dos radicais livres (SOD, CAT), oxidação de lipídios e proteínas estruturais (BRUCE et al., 1995).

O presente estudo demonstrou um aumento significativo na peroxidação lipídica no hipocampo de camundongos tratados somente com P400 que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram eutanasiados após 1 h de observação. Nos animais que receberam tratamento prévio com buspirona, percebeu-se uma diminuição significativa da peroxidação lipídica. Já nos animais que foram tratados apenas com buspirona, não se observou alterações nos níveis de tais substâncias. Nossos estudos concordam em parte com os de Ueda et al. (1997) que demonstraram um aumento na

produção de radicais livres, ácidos graxos poliinsaturados e peroxidação lipídica da membrana neuronal após convulsão e estado epiléptico.

Acredita-se que a peroxidação lipídica aumentada pode ser casualmente relacionada com a presença de anormalidades estruturais no cérebro de pacientes epiléticos e de camundongos adultos (FREITAS et al., 2004a) e para se avaliar de forma mais detalhada as alterações em outras estruturas cerebrais em função da produção de peroxidação lipídica, novos estudos são necessários a fim de contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia das convulsões límbicas. Dados in vivo podem confirmar a hipótese de que a peroxidação lipídica da membrana neuronal produzida pelo ataque de radicais livres pode causar dano neuronal induzido por pilocarpina e participa do estabelecimento da atividade epilética em camundongos (FREITAS et al., 2004a).

6.3 Conteúdo de nitrito no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

O nitrito e o nitrato podem ser associados com a fisiopatologia de inúmeras doenças (RIIKONEN et al., 2001). A epilepsia do lobo temporal é uma desordem neurológica crônica freqüentemente associada a um estímulo precipitante inicial (estado epilético, trauma, estresse oxidativo e convulsões febris prologandas) (WATANABE et al., 2004), com o subsequente aparecimento de convulsões recorrentes após o período silencioso. Esse período silencioso que pode ser longo (5 a 10 anos) (ENGEL et al., 1997).

O estresse oxidativo pode ser um dos indutores desse dano neuronal e tem sido implicado em uma variedade de condições neurológicas agudas e crônicas, incluindo a epilepsia (BRUCE et al., 1995; UEDA et al., 1997). As espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) são uma parte normal do metabolismo humano. Quando as EROs são produzidas em excesso, podem causar dano tecidual, incluindo peroxidação lipídica, dano ao DNA, inativação de enzimas e morte neuronal por necrose ou apoptose (HALLIWELL et al., 1999). As EROs produzidas durante as convulsões e estado epilético podem ser consideradas com uma parte dos mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica in vitro (BONFOCO et al., 1995) e in vivo (BRUCE; BAUDRY, 1995; UEDA et al., 1997). Acredita-se que o aumento no influxo

intracelular de cálcio induzido pelos receptores glutamatérgicos pode estimular a formação de radicais livres por meio de vários mecanismos, incluindo a disfunção mitocondrial e ativação da enzima óxido nítrico sintase, o que aumenta a produção do óxido nítrico e de seus metabólitos nitratos (NO_3^-) e nitrito e nitratos (NO_2^-) (YOSHIDA; TARDINI, 2003). Por sua vez, o envolvimento das EROs durante o período agudo das convulsões induzidas por pilocarpina precisam ainda ser melhor esclarecido e compreendido.

Todos os organismos humanos podem sofrer dano oxidativo, e o cérebro é o órgão mais sensível do organismo (HALLIWELL et al., 1999). Uma possível razão desta alta sensibilidade dessa área em humanos pode ser o alto consumo de oxigênio, uma vez que cerca de 20% do oxigênio transportado é consumido pelo cérebro. Outro fator importante é a grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, além do baixo conteúdo de mecanismos antioxidantes cerebrais existentes. Muitos estudos sugerem que o dano neuronal pode ser induzido pela estimulação de receptores excitotóxicos que induzem a produção de radicais livres, entre eles, nitrito e nitrato (BRUCE et al., 1995; UEDA et al., 1997).

O estresse oxidativo cerebral induzido pelas convulsões pode ser bloqueado ou pelos menos reduzido de forma significativa através do bloqueio da inibição da enzima o óxido nítrico sintetase (NOs), portanto uma possibilidade para o tratamento dos efeitos do estresse oxidativo em pacientes epiléticos, poderá ser feito através do uso de medicamentos capazes de modularem a atividade enzimática da NOs (RAJASEKARAN, 2005).

Os resultados do presente estudo mostraram um aumento significativo na produção de nitrito e nitrato no hipocampo de camundongos que apresentaram convulsão, estado epilético e que foram eutanasiados após 1 h de observação. Da mesma forma, já foi observado um aumento na produção de nitrito e nitrato no fluido cérebro espinhal de crianças com a Síndrome de West (VANHATALO et al., 2001). Nossos dados também corroboram com de Hollmann e colaboradores (2002), que demonstraram aumento nos conteúdos dos radicais livres, inclusive nitrito e nitrato no hipocampo após dano cerebral e estado epilético em camundongos.

Já nos animais que receberam pré-tratamento com buspirona foi observado uma diminuição significativa da peroxidação lipídica no hipocampo dos mesmos demonstrando as características neuroprotetora, antioxidante da buspirona e a sua

potencial utilização como anticonvulsivante. O grupo tratado com buspirona não apresentou variações significativas nos conteúdos de nitrito e nitrato.

Durante as convulsões o nitrito e nitrato têm sido implicados em muitos dos mecanismos moleculares do processo, podendo modular uma cascata de efeitos excitotóxico no SNC, e finalmente participar do subsequente dano neuronal em todo o cérebro e ativar outros mecanismos que potencializem os danos e a propagação do foco epiléptico (SOSUNOV et al., 2005).

O uso de drogas antioxidantes durante o estado epiléptico devem ser realizados para melhor esclarecer o envolvimento das EROs na patogênese da epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina. Costello e colaboradores (2004) verificaram que o uso clínico de terapias antioxidantes melhora o quadro clínico de camundongos, comprovando a eficácia dessas drogas, que está implicada em humanos epilépticos.

6.4 Atividade da enzima catalase no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma aguda em doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

A CAT é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SIMONIE et al., 2000). É importante na manutenção do metabolismo normal das EROs, sendo seu papel bastante relevante para o funcionamento celular em diferentes partes do organismo (PONG et al., 2002).

Inúmeras EROs são normalmente produzidas em diferentes áreas do cérebro, tais como superóxido e radical hidroxila, e além disso, ocorre a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante o catabolismo das mesmas. O H_2O_2 por si só não é um radical livre, mas em alta concentração pode reagir com o íon superóxido (Reação de Haber-Weiss) ou com o ferro (Reação de Fenton) produzindo um novo radical livre, o radical hidroxila (OH.) que é altamente reativo e pode induzir diferentes danos teciduais ao reagir com macromoléculas proteicas.

Os resultados do presente estudo não mostraram modificações significantes nas concentrações da enzima CAT no grupo pré-tratado com buspirona em relação ao grupo tratado somente com pilocarpina e no grupo BUSP, as alterações não são significativas.

As convulsões induzidas por pilocarpina produzem uma série de mudanças em parâmetros relacionados com a produção e eliminação de EROs (SIMONIE et al.,

2000). Um aumento na formação dos radicais livres pode ser acompanhado por um mecanismo compensatório de aumento na atividade das enzimas removedoras de radicais livres e esta ação foi observada após convulsão e estado epiléptico no hipocampo de camundongos adultos, e o aumento pode estar relacionado como um mecanismo compensatório em função do tempo, através da modulação da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo dos radicais livres (FREITAS et al., 2004b). Verificam-se também durante o funcionamento fisiológico cerebral mudanças na atividade neuronal que são acompanhadas por alterações no metabolismo cerebral (metabolismo energético e do próprio oxigênio) induzindo modificações no fluxo sanguíneo cerebral (DYMOND et al., 1976) prejudicando o seu funcionamento fisiológico cerebral.

Em contraste, durante distúrbios patológicos, o fluxo sanguíneo pode não ocorrer desta maneira. Evidências clínicas e experimentais demonstraram possíveis alterações no nível basal do oxigênio durante e após as convulsões, verificadas pela redução da concentração do oxigênio (aumento da demanda metabólica durante a atividade epilética); simultaneamente, um elevado fluxo sanguíneo foi observado, provavelmente devido a uma vasodilatação secundária (DYMOND et al., 1976).

Considerando que um aumento da demanda metabólica pode ser observado durante as convulsões límbicas, pode-se sugerir que atividade da CAT poderia ser uma das enzimas que teria sua atividade inalterada, aumenta ou diminuída durante a atividade epilética. O fato de que a atividade da CAT está aumentada pode não resultar em efeitos neurotóxicos durante o estado epiléptico induzido por pilocarpina, indicando que a produção basal de EROS pode danificar células neuronais normais e precisa ser controlada (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001) é de suma importância e precisa ser esclarecido o seu envolvimento em fenômenos patológicos neurodegenerativos, inclusive na convulsão. A relação entre a atividade da CAT e a primeira fase das convulsões tem sido mais proposta do que demonstrada, por que existem certas dificuldades em estabelecê-la (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001). A maior dificuldade está em demonstrar se o aumento funcional na modulação da atividade desta enzima é a causa ou consequência das convulsões.

Nossos resultados indicam que as convulsões induzidas por pilocarpina podem alterar as defesas antioxidantes e a CAT no período estudado da fase aguda no hipocampo de camundongos adultos. A anatômica distribuição das alterações nas

atividades da CAT observada sugere uma extensa participação do hipocampo, do corpo estriado e do córtex frontal de camundongos adultos no processo convulsivo induzido por pilocarpina e em outras desordens neurológicas.

6.5 Atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo de camundongos pré-tratados com buspirona de forma aguda com doses repetidas no modelo de convulsão induzido por pilocarpina

O cérebro é mais vulnerável ao estresse oxidativo que outros tecidos, por que contém uma grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, e tem comparado a outros tecidos, menos mecanismos antioxidantes (POPOVA, 2005).

Durante o estresse oxidativo são produzidos radicais livres tais como superóxidoradical hidroxila. Estes radicais têm sido implicados em uma variedade de processos degenerativos, doenças e síndromes. Algumas destas doenças incluem aterosclerose, infarto do miocárdio, câncer, isquemia cerebral global e focal, condições inflamatórias agudas e crônicas e desordens do SNC como esclerose, doença de Parkinson, epilepsia e demência (Alzheimer's) e também em uma variedade de outras patologias relacionadas com a idade. Em todos esses eventos patológicos ocorrem inúmeras alterações bioquímicas como, por exemplo, o da produção do íon superóxido e da expressão das isoformas e da atividade da SOD (UEDA et al., 2005).

Os radicais livres são compostos químicos caracterizados por um orbital contendo elétrons não pareados. Estes conferem aos radicais livres uma capacidade peculiar de interagir com um elétron de outras moléculas com um orbital completo, produzindo dano à estrutura que o ele se ligou (CASTAGNE et al. 1999).

O superóxido é um radical que pode ser gerado no cérebro por vários mecanismos. Ele pode ser metabolizado pelas enzimas superóxidos dismutases (SODs) que estão presentes no citoplasma (zinco-isoforma) e na mitocôndria (magnésio-isoforma) (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001). Investigamos a atividade da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo durante a primeira hora da fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina em alta dose.

Verificou-se, assim, um aumento da atividade da SOD na área pesquisada durante a primeira hora da convulsão. As mudanças na atividade enzimática, nos experimentos “in vitro”, revelaram que, no processo convulsivo, pode haver a interferência na atividade da enzima na forma aguda e em curto prazo no hipocampo.

Nos animais do grupo BUSP + P400 e no BUSP, foi observado uma aumento significativo dessa enzima em comparação aos grupos controle e P400, demonstrando o poder antioxidante da buspirona.

Alguns estudos sugerem que o estresse oxidativo pode ter uma importante participação na etiologia da convulsão, induzindo morte neuronal nos animais adultos (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001; FREITAS et al., 2004b) e que facilita a progressão do quadro convulsivo, além de permitir o aparecimento de crises convulsivas recorrentes.

O estresse oxidativo pode ser produzido através da quebra do balanço entre a formação de EROS e da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e glutathione peroxidase). O mediador central do estresse oxidativo pode ser o radical superóxido, que influencia ambos os processos fisiológicos e patológicos no cérebro de humanos e camundongos (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001). O superóxido danifica diretamente apenas uma minoria de componentes celulares, como exemplo proteínas Fe-S, mas é um importante precursor de compostos oxidantes, tais como: radicais hidroxilas e peroxinitrito e nitrato. A SOD catalisa a conversão de superóxido em H_2O_2 e O_2 , mantendo, assim, baixos, os níveis do mesmo que não induzem o aparecimento de patologias em humanos (LIU et al., 2002).

Embora, tenha sido verificado um aumento na atividade da SOD durante a primeira hora da convulsão foi verificado também um aumento no conteúdo de peroxidação lipídica, sugerindo que ativação desta enzima pode não ter sido suficiente para exercer um papel fundamental de proteção contra danos na membrana neuronal nas áreas analisadas. Outros mecanismos antioxidantes, como catalase, podem ser necessários para realizar um papel neuroprotetor auxiliando a remoção de radicais livres durante o estabelecimento e propagação das convulsões.

Entre as enzimas antioxidantes acredita-se que no hipocampo a principal delas pode ser a SOD, já que esta área cerebral contém uma grande quantidade de zinco e cobre (DANSCHER et al., 1976) e que superexpressão da CuZn superóxido dismutase em camundongos transgênicos pode atenuar o dano oxidativo e a neurotoxicidade hipocampal (MURAKAMI et al., 1997) reduzindo os malefícios da atividade epiléptica.

Novos estudos devem ser realizados para se avaliar de forma mais detalhada a atividade enzimática da SOD em outras áreas cerebrais em novos períodos de observação além da aguda, já estudada no presente trabalho, com o propósito de

contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia das convulsões límbicas induzidas por pilocarpina que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com a buspirona aumenta a latência para primeira convulsão, diminui a taxa de mortalidade e o número de animais que convulsionaram e progridem para o estado de mal epiléptico. Sendo assim, podemos sugerir que a buspirona pode apresentar um efeito anticonvulsivante contra as convulsões induzidas por pilocarpina e com base nesses fatos, a buspirona pode ser usada como uma droga anticonvulsivante, provavelmente através da modulação de atividades enzimáticas e antioxidantes cerebrais. Além disso, os dados evidenciam que a formação de radicais livres tem papel relevante na propagação e/ou manutenção da atividade convulsiva. Um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, com uma redução na formação de radicais livres, produz uma diminuição significativa na susceptibilidade às convulsões induzidas por pilocarpina, resultados que sugerem que a buspirona pode apresentar um efeito anticonvulsivante contra as convulsões induzidas por pilocarpina. Estudos futuros devem ser realizados para melhor esclarecer o mecanismo de ação da buspirona.

REFERENCIAS

ANDAKU, D.K.; MERCADANTE, M.T.; SCHWARTZMAN, J.S. Buspirone in Rett syndrome respiratory dysfunction. **Brain.Dev.** v. 27, p. 437-438, 2005.

ANDERSON, I.M.; DEAKIN, J.F.; MILLER, H.E. The effect of chronic fluvoxamine on hormonal and psychological responses to buspirone in normal volunteers. **Psychopharmacology.** v.128, p.74-82, 1996.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr.** v. 23, n. 4, p. 233-242, 2001.

ARTHUR, J.R.; BOYNE, R. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. **Life Sci.**, v. 36, p. 1569-1575, 1985.

BASTOS, O. Estudo não comparativo de avaliação de eficácia e tolerância do cloridrato de buspirona em pacientes com sintomas de ansiedade em clínica psiquiátrica. **J. Bras. Psiquiatr.** v. 36, p. 353-6, 1987.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NOCOTERA, P.; LIPTON, A.S. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.

BONVALOT, T.; BOULENGER, J.P.; ZARIFIAN, E. Buspirone: pharmacological and clinical properties of the first member of a new anxiolytic drug family. **Rev. Med. Interne.** v. 9, p. 97-103, 1988.

BRAHM, N.C.; FAST, G.A.; BROWN, R.C. Buspirone for autistic disorder in a woman with an intellectual disability. **Ann. Pharmacother.** v. 42, p. 131-137, 2008.

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

- BUENO, J.R.; LAKS, J. Atividade ansiolítica da buspirona: estudo comparativo com placebo e diazepam. **J. Bras. Psiquiatr.** v. 37, p. 97-99, 1988.
- BYRNE, G.J.A. What happens to anxiety disorders in later life? **J. Bras. Psiquiatr.** v. 24, p. 74-80, 2002.
- CACCIA, S.; CONTI, I.; VIGANO, G.; GARATTINI, S. 1-(2-Pyrimidinyl)-piperazine as active metabolite of buspirone in man and rat. **Pharmacology**, v. 33, p. 46-51, 1986.
- CAIXETA, M. Buspirona em crianças autistas: estudo aberto. **Rev. Neuropsiq. da Inf. e Adole.** v. 3, n.3, p. 33-37, 1995.
- CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.
- CHANCE, B.; MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol**, v. 2, p. 764-768, 1955.
- CHILMONCZYK, Z.; LES, A.; WOZNIAKOWSKA, A.; CYBULSKI, J.; KOZIO-L, A.E.; GDANIEC, M. Buspirone analogues as ligands of the 5-HT_{1A} receptor: 1. The molecular structure of buspirone and its two analogs. **J. Med. Chem.** v. 38, p. 1701-1710, 1995.
- CLAY, P.G.; ADAMS, M.M. Pseudo-Parkinson disease secondary to ritonavir-buspirona interaction. **Ann. Pharmacother.** v. 37, p. 202-205, 2003.
- COHN, J.B.; WILCOX, C.S. Baixo potencial de sedação da buspirona comparado com alprazolam e lorazepam no tratamento de pacientes com ansiedade: um estudo duplo-cego. **Rev. Bras. Med.** v. 46, p. 51-54, 1986.
- COSTELLO, D.J., DELANTY, D. Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? **Expert review of neurotherapeutics**, v. 4, p. 541-553, 2004.
- CUNHA, G.P.; CAMARGO, M.I. O emprego da buspirona na neurose cardíaca. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 49, p. 61-65, 1987.

DANSCHER, G.; FJERDINGSTAD, F.J.; FJERDINGSTAD, E.; FREDEMS, K. Heavy metal content in subdivisions of the rat hippocampus (zinc, lead and copper). **Brain Res.**, v. 112, p. 442-446, 1976.

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

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

DIMITRIOU, E.C.; DIMITRIOU, C.E. Buspirone augmentation of antidepressant therapy. **J. Clin. Psychopharmacol.** v. 18, p. 465-469, 1998.

DODRILL, C.B. Neuropsychological effects of seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 5, p. S21-S24, 2004.

DYMOND, A.M.; CRANDALL, P.H. Oxygen availability and blood flow in the temporal lobes during spontaneous epileptic seizures in men. **Brain Res.**, v. 102, p. 191-196, 1976.

ENGEL, J., PEDLEY, T.A. Epilepsy: A comprehensive text-book, **Lippincott-Raven**, Philadelphia, 1997.

ERHORN S. BUSPIRONE. **XPharm**: The comprehensive pharmacology reference. p. 1-5, 2008.

ERWIN, C.W.; LINNOILA, M.; HARTWELL, J.; GUTHRIE S. Efeitos da buspirona e diazepam, puros ou em combinação com álcool, no desempenho de habilidades e potencias evocados. **Rev. Bras. Med.** v. 46, p. 25-33, 1989.

FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 93-104, 1984.

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the

hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacol.Biochem.Behav.** v. 78, p. 327-332, 2004.

FREITAS, R.M.; NASCIMENTO, V.S.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neurosci.Lett.**, v. 365, n. 2, p. 102-105, 2004b.

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **FEBS J.** v. 272, p. 1307–1312, 2005.

GRABIEC, M.; TURLEJSKI, K.; DJAVADIAN, R.L. The partial 5-HT_{1A} receptor agonist buspirone enhances neurogenesis in the opossum (*Monodelphis domestica*). **Eur. Neuropsychopharmacol.** v. 19, p. 431-439, 2009.

GAMMANS, R.E.; MAYOL, R.F.; LABUDDE, J.A. Metabolism and disposition of buspirone. **Am. J. Med.** v. 80, p. 41-51, 1986.

GASPAR, O.; CASES, L. Maroteaux, The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics, **Nat. Rev. Neurosci.** v. 4. p. 1002–1012, 2003.

GOA, K.L.; WARD, A. Buspirone: A preliminary review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an anxiolytic. **Drugs.** v. 32, p. 114-129, 1986.

HANNA, G.L.; FEIBUSCH, E.L.; ALBRIGHT, K.J. Buspirone treatment of anxiety associated with pharyngeal dysphagia in a four-year-old. **J. Child. Adolesc.Psychopharmacol.** v. 7, p. 137-43, 1997.

HOLLMANN, M.; HARTLEY, M.; HEINEMANN, S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition, **Science**, v. 252, p. 851-854, 1991.

HONORATO, J; CATALÁN, M; Buspirone: a new non-benzodiazepine anxiolytic drug. **Rev. Clin. Esp.** v. 186 n. 6, p. 286-291, 1990.

JOBE, P.C. Common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective. **Epilepsy & Behavior.**, v. 4, p. S14-S24, 2003.

YOSHIDA, W.B.; TARDINI, D.M.S. Brain injury due to ischemia and reperfusion in carotid endarterectomy surgery. **J Vasc Br.**, v. 2, n. 2, p. 119-128, 2003.

LEES, G.J. Inhibition of sodium-potassium-ATPase: potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology. **Brain Res.**, v. 16, p. 283-300, 1991.

LIMA, V.T.M.; MACÊDO, D.S.; NOGUEIRA, C.R.A.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Buspirona aumenta a densidade de receptores dopaminérgicos D2-símile em corpo estriado de rato. **Arq.Neuropsiquiatr.** v. 60, p. 38-40, 2002.

LUCZAJ, W.; SKRZYDLEWSKA, E. The compounds resulting from lipid peroxidation mostly react with DNA showing both genotoxic and mutagenic action; among them, 4-hydroxynonenal is the most genotoxic, while MDA is the most mutagenic DNA damage caused by lipid peroxidation products. **Cell Mol Biol Lett.**, v. 8, n. 2, p. 391-341, 2003.

MALLAT-TOSTES, L.R. Uso da associação carbamazepina-buspirona no tratamento do alcoolismo: atualização. **J. Bras. Psiquiatr.**v. 44, p. 93-7, 1995.

MALLAT-TOSTES, L.R. Uso da associação de doses baixas de neurolépticos com buspirona no tratamento do alcoolismo. **J. Bras. Psiquiatr.** v. 44 ,p.177-183, 1995.

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIN, V.M.S.; AGUIAR, L.M.V.; PINHO, R.S.N.; VIANA, G.S.B. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. **Neuroscience Letters**, v. 235, p. 13-16, 1997.

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIN, V.M.S.; VALE, M.R.; VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MCALOON, M.H.; CHANDRASEKAR, A.; LIN, Y.; HWANG, G.C.; SHARPE, R.J. Buspirone inhibits contact hypersensitivity in the mouse. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**v. 107, p. 437-438, 1995.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol.Sci.**, v. 11, p. 379-387, 1990.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochem.Int.** v. 56, p. 16-20, 2009.

MICHOTTE, Y.; KHAN, G.M.; SMOLDERS, I.; EBINGER, G. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2418-2432, 2000.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16-20, 2010.

MURAKAMI, K.; KONDO, T.; EPSTEIN, C.J.; CHAN, P.H. Overexpression of CuZn-superoxide dismutase reduces hippocampal injury after global ischemia in transgenic mice. **Stroke**, v. 28, p. 1797-1804, 1997.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALHEIRO, E.A.; FERREIRA, E.C.; ABDALLA, D.S.P.; AMADO, D.; BELLISSIMO, M.I. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v. 46, p. 121-128, 2001.

NARDI, A.E. Antidepressants in social anxiety disorder. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 59, n. 3, p. 637-42, 2001.

NEWTON, R.E.; CASTEN, G.P.; ALMS, D.R.; BENES, C.O.; MAURUNYCZ, J.D. The side effect profile of buspirone in comparison to active controls and placebo. **J. Clin. Psychiatry.** v. 43, n. 2, p. 100-102, 1982.

OHLSSEN, R.I.; PILOWSKY, L.S. The place of partial agonism in psychiatry: recent developments. **J. Psychopharmacol.** v. 19, n. 4, p. 408-413, 2005.

PATEL, M.; LIANG, LI-PING. Mitochondrial oxidative stress and increased seizure susceptibility in SOD2-mice. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 6, p. 542-555, 2004.

PONG, K.; YONGQI, Y.; DOCTROW, S.R.; BAUDRY, M. attenuation zinc-induced intracellular dysfunction and neurotoxicity by a synthetic superoxide dismutase / catalase mimetic, in cultured cortical neurons. **Brain Research**, v. 950, p. 218-230, 2002.

POPOVA, L.D., Assessment of free radical formation process in rats with different audiogenic seizure susceptibility by means of biochemiluminiscent methods. **Ukr. Biokhim Zh.**, v. 77, p. 129-132, 2005.

POST, R.M. Neurobiology of seizures and behavioral abnormalities. **Epilepsia**, v. 45, n. S2, p. 5-10, 2004.

RAJASEKARAN, K. Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 80, p. 263-272, 2005.

RAMIRES, J.A.F.; SOLIMENE, M.C.; SERRANO JÚNIOR, C.V.; MANSUR, A.P.; PILEGGI, F. Eficácia e tolerabilidade do cloridrato de buspirona no tratamento dos sintomas psicossomáticos na clínica cardiológica. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 60, n. 4, p. 269-72, 1993.

RICKLELS, K. Buspirona in clinical practice. **J. Clin. Psychiatry.** v. 51 p. 51-54, 1990.

RODRIGUES, A.L.; MASSUD FILHO, J. Avaliação multicêntrica do cloridrato de buspirona no tratamento da ansiedade em pacientes geriátricos. **Arq. Bras. Med.** v. 46, p. 25-33, 1989.

SALAZAR, D.E.; FRACKIEWICZ, E.J.; DOCKENS, R.; KOLLIA, G.; FULMOR, I.E.; TIGEL, P.D.; UDERMAN, H.D.; SHIOVITZ, T.M.; SRAMEK, J.J.; CUTLER, N.R. Pharmacokinetics and tolerability of buspirona during of oral administration to children and adolescents with anxiety disorder and normal healthy adults. **J. Clin. Pharmacol.** v. 41, p. 1351-1358, 2001.

SANTOS, M.A.; HARA, C.; STUMPF, B.L.P.; ROCHA, F.L. Depressão resistente a tratamento: uma revisão das estratégias farmacológicas de potencialização de antidepressivos. **J. Bras. Psiquiatr.** v. 55, n. 3, p. 232-242, 2006.

SENA, E.P.; JESUS, R.S.; SARMENTO, C.A.; COSTA, L.M.; SCIPPA, A.M.; CASTRO E SILVA, E.; OLIVEIRA, I.R. Uso da associação carbamazepina-buspirona na dependência do álcool. **J. Bras. Psiquiatr.**v. 46, n. 12, p. 645-649, 1997.

SEO, A.L.; VIEIRA, A.; SCHIRIPA, C.; WOLFF, M.J.; RESENDE, M.C.M.; LONGO, S.R.; NASSIS, C.Z. Estudos dos efeitos da buspirona, da fluoxetina e da associação de ambas sobre a extinção do comportamento operante condicionado, em ratos, por privação de alimento. **Arq. Med. ABC.**, v. 22, p. 6-9, 1999.

SILVA, J.A.C.; RUSCHEL, S.I. Estudo comparativo duplo-cego da buspirona versus bromazepan em pacientes ambulatoriais com sintomas de ansiedade. **J. Bras. Psiquiatr.**, v. 36, n. 4, p. 253-258, 1987.

SIMONIÉ, A.; LAGINJA, J.; VARLJEN, J.; ZUPAN, G.; ERAKOVIC, V. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neuroscience Research**, v. 36, p. 157-166, 2000

SOSUNOV, A.A.; KRUGLYAKOV, P.P.; Mc CANN, G.M.; KASPERSER, K.; KHOVRYAKIV, A.V.; IVANOV, N.M.; SHIKHANOV, N.P. Studies of damage to hippocampal neurons in inbred mouse lines in models of epilepsy using kainic acid and pilocarpine. **Neurosci.Behav.Physiol.**, v. 35, p. 623-638, 2005.

TAMATE, K.; ISHIKAWA, M.; SENGOKU, K.; ABE, M.; NAKATA, T.; SHIMIZU, T.; TANIGUCHI, N. Role of oxygen radical and superoxide dismutase in ovulation in the rat. **Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 1992.

TANIGUCHI, N. Superoxide dismutases: significances in aging, diabetes, ischemia and câncer. **Rinsho Byori.**, v. 38, n. 8, p. 876-881, 1990.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARTZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-335, 1983a.

VANHATALO, S.; RIIKONEN, R. Nitric oxide metabolites, nitrates and nitrites in the cerebrospinal fluid in children with west syndrome. **Epilepsy Research**, v. 46, p. 3-13, 2001.

VERHOEVEN, W.M.A.; TUINIER, S. Serotonin-1A agonist buspirone in disruptive behavior. **Biological Psychiatry**. v. 42, n. 1, p. 1-23, 1997.

WATANABE, A.; TOHYAMA, Y.; NGUYEN, K.Q.; HASEGAWA, S.; DEBONNEL, G.; DIKSIC, M. Regional brain serotonin synthesis is increased in the olfactory bulbectomy rat model of depression: an autoradiographic study. **J. Neurochem**. v. 85, p. 469–475, 2003.

ZIAI, W.C.; SHERMAN, D.L.; BHARDWAJ, A.; ZHANG, N.; KEYL, P.M.; MIRSKI A.M. Targetspecific catecholamine elevation induced by anticonvulsant thalamic deep brain stimulation. **Epilepsia**, v. 46, p. 878–888, 2005.

ANEXOS

\

ANEXO A: Carta de aceite da Revista Brasileira de Ciências Básica e Aplicada

Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada

Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

Araraquara, 14 de julho de 2011

Ref. RCFBA – 021/2011

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo:

Título: Aspectos farmacológicos da buspirona.

Autores: Ferreira PB, Santos IMS, Freitas RM.

foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

ANEXO B: Confirmação de submissão a Revista de Psiquiatria Clínica

> Date: Mon, 23 Apr 2012 10:20:34 -0300
> From: revpsiq@usp.br
> To: rivmendes@hotmail.com
> CC: daniel.barros@usp.br
> Subject: ms recebido
>
>
>
>
> Revista de Psiquiatria Clínica
>
> Il.mo Sr.
> Dr.Rivelilson Freitas
>
> Prezado Dr. Freitas,
>
> Obrigado pela submissão do manuscrito:
>
> ESTUDO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTE DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DA BUSPIRONA NO
> MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA
>
> O trabalho será enviado a pareceristas e em breve lhe comunicarei a
> decisão editorial.
>
> Com os cumprimentos cordiais,
>
>
> Prof. Dr. Wagner F. Gattaz
> Editor-Chefe, RPC
>
>
>

ANEXO C: Apresentação oral do trabalho no II Congresso Farmacêutico Piauiense, com menção honrosa.



ANEXO D: Apresentação de banner no 1º Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação.




Efeitos da administração subcrônica da bupiriona em camundongos para delineamento farmacêutico da molécula

Paula B. Ferreira¹, Ciro G. Sá², Paôlla R. Policarpo¹, Rivelilson M. Freitas

Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil. ²Programa Graduação em Ciências Farmacológicas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil




INTRODUÇÃO

A bupiriona é uma agonista parcial do receptor 5-HT_{1A} (Ohlsen e Pilowsky, 2005), que pode inibir a estimulação colinérgica e, portanto, apresentar um mecanismo de compensação para inibir ou cessar as convulsões induzidas pela pilocarpina (Sato et al., 2008), que produzem várias desordens em muitas regiões do cérebro (Freitas et al., 2005) como consequência da interrupção de conexões neuronais.

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina produz alterações comportamentais e neuroquímicas que ainda não estão totalmente esclarecidas (Freitas et al., 2004). Baseado nessas evidências, esse trabalho objetiva determinar se a bupiriona é capaz de exercer efeito anticonvulsivante no modelo de convulsões induzido por pilocarpina para posteriormente realizar experimentos de delineamento farmacêutico da molécula da bupiriona, no intuito de melhorar sua atividade farmacológica e diminuir seus efeitos adversos no SNC.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 40 camundongos *Swiss* adultos machos com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30g, e as seguintes substâncias: cloridrato de pilocarpina 400 mg/kg e cloridrato de bupiriona 5 mg/kg que foram divididos em 4 grupos de 10 animais.

O primeiro grupo foi tratado com solução salina 0,9% (grupo controle). O segundo tratado com pilocarpina 400 mg/kg (n=10, grupo P400). Os animais que faziam parte do terceiro grupo foram tratados com bupiriona 5 mg/kg (v.o., n=10; grupo BUSP) durante 14 dias. Já os do quarto grupo foram tratados com bupiriona 5 mg/kg (v.o.) durante 14 dias consecutivos, e 30 min após a última administração de BUSP, receberam P400 (n=10, grupo BUSP + P400).

Após o tratamento do quarto grupo BUSP+P400 os animais foram observados durante 1 hora para determinação do período de latência para a primeira convulsão e a latência de instalação do estado de mal epilético, presença de sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados, convulsões motoras e estado epilético e a taxa de mortalidade. Em seguida, os animais que sobreviveram foram eutanasiados e as áreas cerebrais córtex frontal, hipocampo e corpo estriado foram retiradas para análises histopatológicas e neuroquímicas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A bupiriona como agonista dos receptores 5-HT_{1A} reduz a severidade das convulsões induzidas por pilocarpina. A ação protetora deste agonista pode ser devido às suas propriedades anticolinérgicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. *FEBS J.* v. 272, p. 1307–1312, 2005.
 FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUZA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* v. 78, p. 327-332, 2004.
 OHLSEN, R.I.; PILOWSKY, L.S. The place of partial agonism in psychiatry: recent developments. *J. Psychopharmacol.* v. 19, n. 4, p. 408–413, 2005.
 SATO, H.; SKELIN, I.; DEBONNEL, GUY.; DIKSIC, M. Chronic bupiriona treatment normalizes open field behavior in olfactory bulbectomized rats: Assessment with a quantitative autoradiographic evaluation of the 5-HT_{1A} binding sites. *Brain Res. Bull.* v. 75, p. 545–555, 2008.

Assim, sugere-se que a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} podem inibir as crises convulsivas induzidas por pilocarpina.

Tabela 1: Efeito do pré-tratamento com bupiriona nas alterações comportamentais durante as convulsões induzidas por pilocarpina.

Grupos	SCP (%)	ME (%)	Tremores (%)	Convulsões (%)
P400	100	100	100	100
BUSP + P400	100	72,72	72,72	54,54
BUSP	00	00	00	00

Tabela 2: Efeito do pré-tratamento com bupiriona nas latências para instalação da primeira convulsão (LIPC) e do estado de mal epilético (LIEME).

Grupos	LIPC (min)	LIEME (%)	Taxa de Mortalidade (%)
P400	7,90 ±1,68	14,95±1,57	100
BUSP + P400	17,4 ±15,03	24,17±34,99	54
BUSP	00	00	00

As tabelas 1 e 2 mostram que, quando administrado bupiriona na dose de 5 mg/kg antes da pilocarpina há uma redução de 45,46% no percentual de animais que desenvolvem ataques convulsivos, um aumento de 54,6% do período de LIPC (17,4±15,03 min) e um aumento de 46% na porcentagem de sobrevivência em comparação com o grupo P400. Nenhum dos animais que receberam injeções de bupiriona isoladamente mostrou atividade convulsiva (Tabela 1).

De acordo com os resultados, podemos sugerir que o pré-tratamento com BUSP não produz efeitos tóxicos no SNC de camundongos e aumenta a latência para primeira convulsão, bem como diminui a taxa de mortalidade e o número de animais que convulsionaram e progridem para o estado de mal epilético.