

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM NEUROCIÊNCIAS**

**Envolvimento do sistema endocanabinoide na
modulação de crises convulsivas experimentais**

LUCIANO REZENDE VILELA

**BELO HORIZONTE, MG
OUTUBRO/2013**

LUCIANO REZENDE VILELA

**Envolvimento do sistema endocanabinoide na
modulação de crises convulsivas experimentais**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Neurociências.

BELO HORIZONTE, MG

OUTUBRO/2013

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

Outubro/2013

Esta tese foi realizada no Laboratório de Neuropsicofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob a orientação da Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira e coorientação do Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes e com o apoio financeiro da FAPEMIG

Dedicatória

À minha esposa Andréa Lemos Baeta, pelo amor incondicional, carinho, apoio e companheirismo.

À minha mãe, meu porto seguro, que é fundamental na minha vida, obrigado pela confiança, dedicação, suporte e pelos constantes ensinamentos. Você é um exemplo de vida para mim.

Ao meu pai, pelo exemplo de luta, garra, determinação e trabalho.

Aos irmãos, sobrinhos e familiares de Três Corações, por todo incentivo e admiração pelo meu trabalho.

Ao amigo, orientador e padrinho Fabrício de Araújo Moreira pelo seu profissionalismo, seriedade, honestidade e sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela vida, saúde e possibilidade de lutar pelos meus objetivos.

Ao **Fabício de Araújo Moreira** pela orientação, pela oportunidade, paciência, ensinamentos.

Aos amigos do LNP, em especial Prof^ª. **Daniele Aguiar, Pedro Gobira, grande amigo, Thércia, Luara, Ana Flávia, Jivago, Carla** e a todos alunos de I.C que contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos amigos do Núcleo de Neurociências, ao grupo da Profa. Fabíola Mara Ribeiro do departamento de Imunologia da UFMG e ao Prof. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira pela paciência, ajuda e suporte técnico.

Ao meu amigo e irmão **Rafael Machado**, pelos muitos anos de amizade, companheirismo e incentivo.

Ao amigo **Gustavo Menezes**, por toda sua confiança, ajuda, amizade e generosidade.

Aos professores, funcionários e colegas da Pós Graduação em Neurociências.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia e Farmacologia do ICB.

À **família Lemos Baeta** por sempre me acolher e incentivar durante esse tempo.

SUMÁRIO

Lista de figuras	8
Lista de tabelas	11
Lista de abreviaturas	13
Resumo	13
Abstract	14
1. Introdução geral e justificativa	15
1.1 <i>Cannabis sativa</i> e sistema endocanabinoide	15
1.2 Epilepsia e crise convulsiva	21
1.3 Epilepsia, crise convulsiva e sistema endocanabinoide	26
2. Objetivo geral	30
2.1 Objetivos específicos	30
3. O sistema endocanabinoide e crises convulsivas agudas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)	31
3.1 Modelo de crise convulsiva induzida por PTZ em ratos	31
3.2 Animais	32
3.3 Drogas	32
3.4 Cirurgia estereotáxica para implantação de eletrodos corticais	33
3.5 Determinação do limiar da crise convulsiva	33
3.6 Eletroencefalograma (EEG)	34
3.7 Análise estatística	34
3.8 Resultados	36
3.9 Discussão	43
4. Interação do sistema endocanabinoide e endovaniloide no modelo de crise aguda induzida por PTZ em camundongos	49

4.1 Sistemas endocanabinoide e endovaniloide	49
4.2 Animais	51
4.3 Drogas	52
4.4 Determinação da crise convulsiva	52
4.5 Análise estatística	52
4.6 Resultados	54
4.7 Discussão	57
5. O sistema endocanabinoide e crises convulsivas induzidas por cocaína	60
5.1 Modelo de crise convulsiva induzida por overdose de cocaína	60
5.2 Animais	61
5.3 Drogas	62
5.4 Cirurgia estereotáxica para implantação de eletrodos corticais	
5.4 Determinação da crise convulsiva	62
4.6 Eletroencefalograma (EEG)	63
4.7 Preparação de culturas primárias de neurônios para ensaio de morte celular	64
4.8 Avaliação da morte celular em fatias de hipocampo	65
5.5 Análise estatística	66
5.6 Resultados	68
5.7 Discussão	81
6. Conclusão geral	86
7. Referências Bibliográficas	87
8. Anexos	101

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Ilustração do modelo de transmissão sináptica mediada pelo sistema endocanabinoide 20
- Figura 2 – Representação dos procedimentos experimentais no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ. 35
- Figura 3- Efeito de diferentes doses do agonista de receptor canabinoide não seletivo, WIN55212-2 (0.1; 1.0; 3.0mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e eletroencefalográfica induzida por PTZ em ratos. 37
- Figura 4- Efeito de diferentes doses do agonista seletivo de receptor canabinoide, ACEA (1.0; 2.0; 4.0 mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e eletroencefalográfica induzida por PTZ em ratos. 38
- Figura 5- Efeito de diferentes doses do antagonista de receptor canabinoide, SR141716, (0.3; 1.0; 3.0 mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e eletroencefalográfica induzida por PTZ em ratos. 39
- Figura 6- Efeito de diferentes doses do inibidor da hidrólise da anandamida, URB597 (0.3;1.0;3.0mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e eletroencefalográfica induzida por PTZ em ratos. 41
- Figura 7- Desenho experimental no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ (i.p) em camundongos. 53
- Figura 8- Efeito do inibidor dual para FAAH/TRPV1, AA-5HT (i.p.), sobre a crise tônico-clônica induzida por PTZ em camundongos. 54
- Figura 9- Efeito do antagonista para receptor CB1, AM251(i.p.), sobre a crise tônico-clônica induzida por PTZ em camundongos. 55

Figura 10- Efeito do antagonista para o receptor TRPV1, SB-366791 (i.p.), sobre a crise tônico-clônica induzida por PTZ em camundongos.	56
Figura 11 – Representação dos procedimentos experimentais no modelo de crise induzida por overdose de cocaína.	67
Figura 12- Caracterização da crise convulsiva induzida por diferentes doses de cocaína (50; 75; 100 mg/kg, i.p) em camundongos.	69
Figura 13- Efeito do ACEA agonista seletivo de receptor CB1 (1.0, 2.0 e 4.0 mg/kg, i.p), sobre a crise convulsiva induzida por cocaína em camundongos.	70
Figura 14 - Efeito de diferentes doses do inibidor da hidrólise da anandamida, URB597 (0.3;1.0;3.0mg/kg, i.p.) sobre a crise convulsiva induzida por cocaína em camundongos	71
Figura 15- Efeito do AM251, antagonista de receptor CB1, sobre a crise convulsiva induzida por cocaína em camundongos.	72
Figura 16– Envolvimento do receptor CB1 nas crises comportamentais e eletroencefalográficas induzida por cocaína em camundongos.	74
Figura 17– Avaliação da morte celular induzida por cocaína em cultura de neurônios hipocámpais e o efeito do inibidor da hidrólise da anandamida, URB597 sobre a neurotoxicidade.	77
Figura 18- Avaliação da morte neuronal em fatias de hipocampo tratadas com cocaína e com inibidor da hidrólise da anandamida.	79
Figura 19: Efeito do tratamento crônico com antagonista TRPV1, SB366791, sob a progressão da crise convulsiva no modelo de eletroestimulação da amígdala.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das crises epiléticas segundo a <i>International League Against Epilepsy</i> (ILAE).	22
Tabela 2: Efeitos dos canabinoides e inibidores da hidrólise da anandamida sobre a latência (seg) para crise tônico-clônica generalizada.	42
Tabela 3: Efeitos dos canabinoides e inibidores de hidrólise da anandamida sobre o limiar de PTZ (mg/kg) para o início da crise tônico-clônica generalizada.	42
Tabela 4 – Efeitos da administração de compostos canabinoides sobre a letalidade induzida pelo tratamento agudo com altas doses de cocaína (75mg/kg).	71
Tabela 5: Efeitos da cocaína e de compostos canabinoides sobre a porcentagem de crise comportamental.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

THC: Tetrahydrocannabinol
2-AG: Diacilglicerol lípase
 Δ 9-THC: Delta nove tetrahydrocannabinol
AEA: Araquidonoil etanolamida (anandamida)
ATP: Trifosfato de adenosina
AMPc: Monofosfato cíclico de adenosina
PKA: Proteína quinase A
PTZ: Pentilenotetrazol
CB1: Receptores canabinoides do tipo 1
CB2: Receptores canabinoides do tipo 2
FAAH: Hidrolase de amida de ácido graxo
NADA: Endocanabinoide (N-araquidonoildopamina)
ACEA: Agonista seletivo do receptor CB1
SR141716A: (Rimonabanto) Antagonista do receptor CB1
AM251: Antagonista do receptor CB1
URB597: Inibidor da hidrólise da anandamida
WIN 55212-2: Agonista do receptor CB1
AM5206: Inibidor dual da anandamida e 2-AG
GABA: Ácido gama-aminobutírico
MGL: Monoacilglicerol lipase
SNC: Sistema Nervoso Central
TRPV: Receptor vaniloide de potencial transitório
TRP: Receptor de potencial transitório
ILAE: International League Against Epilepsy
NMDA: N-metil-D-aspartato
PEPS: Potencial excitatório pós-sináptico
PET: Tomografia por emissão de pósitron
I.P: Intraperitoneal
EEG: Eletroencefalograma
DSI: Inibição da supressão induzida pela despolarização
DSE: Excitação da supressão induzida pela despolarização

μL : microlitros

μM : Micromolar

nM: Nanomolar

mM: Milimolar

aCSF: Fluido cérebro espinhal artificial

EthD-1: Etídio homedímero

CA1: Corno de Amon

DG: Giro denteado

RTX : Resiniferatoxina

LTP: Long-term potentiation

LTD: Long-term depression

SB366791: Antagonista do receptor TRPV1

AA-5-HT : Aracondoíl serotonina (Inibidor dual da FAAH/TRPV1)

RESUMO

No presente trabalho investigamos o envolvimento dos sistemas endocanabinoide e endovaniloide em modelos animais de crises convulsivas induzidas quimicamente por pentilenotetrazol (PTZ) e overdose de cocaína. Os animais foram submetidos, previamente à administração dos agentes convulsivantes, a tratamentos com compostos que atuam nesses sistemas, tais como agonistas ou antagonistas de receptores canabinoides CB1, inibidor da enzima FAAH (que hidrolisa o endocanabinoide anandamida), e inibidor dual da FAAH e de receptores vaniloides (TRPV1). Foram avaliados parâmetros relacionados à crise comportamental e eletroencefalográfica, além de morte celular no hipocampo. Demonstramos, por avaliação comportamental e eletroencefalográfica nos modelos de crise convulsiva induzida por PTZ e cocaína, que agonistas e antagonistas para receptores canabinoides CB1 induzem efeitos contraditórios ou negativos, dependendo da dose utilizada, e que o aumento da sinalização endógena por inibição da FAAH induz efeitos anticonvulsivantes consistentes nos modelos utilizados. Além disso, o inibidor da FAAH promove redução da morte neuronal *in vivo* e *in vitro* no modelo de crise induzida por cocaína, representando estratégia neuroprotetora. Demonstramos, ainda, que o aumento da sinalização endocanabinoide, associado ao bloqueio de receptores TRPV1 (bloqueio dual FAAH/TRPV1), promove efeito anticonvulsivante no modelo de administração intraperitoneal de PTZ em camundongos. A interação entre os sistemas endocanabinoide e endovaniloide é relevante na modulação de crises convulsivas, representando uma estratégia adicional para o desenvolvimento de drogas anticonvulsivantes.

ABSTRACT

In the present study we investigated the involvement of the endocannabinoid and endovanilloid systems in animal models of chemically-induced seizures by pentylenetetrazole (PTZ) and cocaine overdose. Animals were treated, prior to administration of convulsant agents, with compounds such as CB1 agonists or antagonists, FAAH inhibitor (which hydrolyzes the endocannabinoid anandamide) and the dual inhibitor of FAAH/TRPV1 (vanilloid receptor). We evaluated parameters related to behavioral and electroencephalographic (EEG) seizure, in addition to cell death in the hippocampus. The results show that CB1 agonists and antagonists induced contradictory or negative effect in PTZ and cocaine overdose models, whereas the increase in endocannabinoid signaling through FAAH inhibition induced anticonvulsant effects. In addition, the FAAH inhibitor prevented the neuronal death observed *in vivo* and *in vitro* after cocaine-induced seizures, representing neuroprotective strategy. The results also show that increasing the endocannabinoid signaling, associated with the TRPV1 receptor blockade (dual FAAH/TRPV1 blocker), promotes anticonvulsant effect in the PTZ model in mice. The interaction between the endocannabinoid and endovanilloid system are relevant in the seizure modulation, representing an additional strategy for the development of new anticonvulsant drugs.

1. Introdução geral e justificativa

1.1- Cannabis sativa e sistema endocanabinoide

A *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, representa uma das plantas mais antigas cultivadas pelo homem, tendo sua origem nas montanhas do sul da Sibéria há aproximadamente 5000 a.C. (Li, 1973). A *Cannabis sativa* é pertencente à família *Cannabaceae*, a qual possui único gênero (*Cannabis*) e uma espécie (*sativa*) altamente variável (Elshly & Slade, 2005). As espécies relevantes mais conhecidas são a *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* e a *Cannabis ruderalis*, sendo a *Cannabis sativa* a mais variável por se desenvolver em climas temperados e tropicais. A planta é conhecida como droga de abuso nas formas de maconha, constituída pelas flores e folhas secas da planta e o *hashish*, representado pela resina viscosa da planta (Bem Amar & Léonard, 2002).

O primeiro relato do uso da *Cannabis sativa* foi na China há 4000 a.C., onde as fibras da planta eram utilizadas principalmente na fabricação de cestos, cordas e outros produtos têxteis. Evidências do uso medicinal da *Cannabis sativa* foram relatadas posteriormente da Pharmacopoeia chinesa (2700 a.C.), quando se acreditava que as folhas da planta apresentavam potencial terapêutico contra dor neuropática, constipação intestinal, malária, distúrbios do sistema reprodutor e epilepsia além de ser usada em pequenas cirurgias como coadjuvante analgésico (Li, 1973). Nessa época, os chineses ainda utilizavam a *Cannabis sativa* na prática de rituais religiosos, sendo descrito pela primeira vez os possíveis efeitos psicoativos e alucinógenos da planta (Hanus, 2009; Town, 1981). O uso e consumo da *Cannabis sativa* se espalhou para o Oriente Médio, África e Europa ao longo dos séculos chegando à América do Sul, mais especificadamente ao Brasil, no século XVI (Zuardi, 2006; Fankhauser, 2002).

Entretanto, a grande contribuição para as pesquisas envolvendo a Cannabis aconteceu na metade do século XIX, pelo médico iraniano Willian B.O Shaughnesy e pelo psiquiatra francês Moreau de Tours, especialmente com relação a seus efeitos psicomiméticos e no tratamento contra o reumatismo, convulsões, espasmos musculares e tétano. O auge do consumo da *Cannabis sativa* com propósito terapêutico aconteceu no final do século XIX e início do século XX, resumidas as indicações em três grandes áreas: sedativos ou hipnóticos, analgésicos e outras, como para aumento do apetite e agente anticonvulsivante (Zuardi, 2006; Kalant, 2001).

Devido à dificuldade de se obter efeitos reprodutíveis, à extrema variabilidade de eficácia e das amostras da planta, assim como estudos que isolassem seu princípio ativo, o uso da *cannabis* na primeira década do século XX diminuiu significativamente. Finalmente, a partir de 1937, diversas restrições legais limitaram o uso experimental e medicinal da Cannabis, retomando com grande importância social a partir da década de 1960, devido à explosão de consumo por propósitos hedonísticos. O aumento do uso recreacional em diversos países ocidentais na década de 60 contribuiu para a proliferação dos estudos que identificassem os constituintes da *Cannabis sativa* (Ben Amar, 2006; Zuardi, 2006).

O mecanismo de ação da Cannabis não poderia ter sido descoberto, assim como as explorações terapêuticas não realizadas, se o princípio ativo não tivesse sido purificado e caracterizado quimicamente. Entretanto, um fator limitante para sua caracterização foi a dificuldade da purificação do extrato pelo fato da natureza altamente lipofílica do composto (Kalant, 2001).

O estudo pioneiro utilizando a Cannabis foi publicado em 1899 por Thomas Wood e colaboradores que isolaram o primeiro agente ativo “canabinol”, classificado com pouca atividade farmacológica. Baseado nesse estudo, na década de 30 Lord Alan

Todd e Roger Adams completaram a síntese e elucidação desse composto. Essa descoberta abriu as portas para o isolamento, caracterização e síntese química completa dos componentes mais importantes da *Cannabis sativa*. Sendo assim, o segundo constituinte identificado foi o “canabidiol” (Di Marzo, 2006).

Finalmente em 1964, o grupo de Rapahel Mechoulan descreveu a estrutura molecular completa do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), a principal substância ativa da *Cannabis sativa* (Gaoni & Mechoulan, 1964). Posteriormente, as pesquisas científicas aumentaram de forma expressiva, sendo identificados aproximadamente 60 compostos denominados canabinoides (Mechoulam & Hanus, 2000; Izzo et al., 2009).

Mesmo após a identificação do THC, não se conhecia seu mecanismo de ação, bem como seus locais de atuação, embora se pensasse que o mecanismo de ação dos canabinoides envolvia a dispersão dessas moléculas na bicamada lipídica da membrana celular além de reconhecer, com certa especificidade, sítios específicos nas células. Índícios apontavam a existência de um receptor canabinoide, pelo fato de que o Δ^9 THC inibia a enzima adenilato ciclase, reduzindo a conversão do trifosfato de adenosina (ATP) em monofosfato cíclico de adenosina (AMPs), com conseqüente redução da proteína quinase A (PKA) em preparos de células neuronais, fortalecendo a ideia de que o Δ^9 THC possuía afinidade por receptores acoplados a proteína G inibitória (Howlett, 1984). Dessa forma, intensos esforços farmacológicos e avanços das técnicas de biologia molecular foram necessários para se identificar os locais específicos de ligação dos canabinoides (Howlett, 1987).

Em 1988, utilizando marcação por ligante radioativo, especificamente o potente canabinoide sintético [3H]CP-55940, Devane e cols. identificaram os locais específicos no cérebro de ratos aos quais esse composto se ligava com maior afinidade, relatando ainda que a afinidade de ligação de diferentes canabinoides correlacionava-se com a

potência de sua atividade biológica (Devane et al., 1988). Finalmente, em 1990, foi clonado o primeiro receptor canabinoide, denominado receptor CB1, mais expresso no sistema nervoso central, seguido do segundo tipo, identificado como receptor canabinoide CB2, mais expresso no sistema nervoso periférico e células do sistema imune, sendo ambos pertencentes a família de receptores com sete domínios transmembrânicos (Matsuda et al., 1990; Howlett, 2002).

Diversas abordagens, como hibridização *in situ*, possibilitaram demonstrar padrões de expressão distintos de receptores CB1 principalmente em sinapses inibitórias e excitatórias, representadas respectivamente por interneurônios gabaérgicos e neurônios glutamatérgicos. O resultado funcional após ativação do receptor é a supressão da atividade neuronal e a inibição da liberação desses neurotransmissores induzida pela despolarização, decorrente da inibição de canais para cálcio dependente de voltagem (tipo L, N, P, Q) e ativação de canais para potássio (tipo A) (Howlett et al, 2004; Pacher et al, 2006).

A região de distribuição dos receptores CB1 é consistente com as características dos efeitos do Δ^9 THC no organismo, descritas como analgesia, hipotermia, catalepsia e diminuição do controle motor, relacionados intimamente a dose utilizada e a variação estrutural da molécula. Por exemplo, receptores CB1 são altamente expressos em áreas cerebrais relacionadas ao controle motor (núcleos da base e cerebelo), em regiões corticolímbicas relacionadas à regulação dos processos cognitivos e emocionais (córtex frontal, córtex cingulado, amígdala e hipocampo), e em locais relacionados ao processamento nociceptivo (gânglio espinhal da raiz dorsal, medula espinhal, substância cinzenta periaquedutal e áreas corticais relacionadas) assim como regiões com funções neuroendócrinas (hipotálamo). Ao contrário, poucos receptores do tipo CB1 são expressos em áreas envolvidas nas funções vegetativas (Herkenham et al., 1990).

A partir da clonagem do receptor CB1, intensificaram-se os esforços na descoberta de uma substância que poderia atuar como agonista endógeno deste receptor. Em 1992 foi identificada a primeira substância com essa propriedade (ou seja, um endocanabinoide), a araquidonoil-etanolamida, uma etanolamida do ácido araquidônico denominada anandamida, caracterizada como agonista endógeno com afinidade maior para receptor CB1 do que para CB2 (Devane et al., 1992). Além disso, os efeitos mediados por esse composto eram semelhantes aos exibidos pelo Δ^9 -THC (hipotermia, catalepsia, hipolocomoção e analgesia), o que consolidou a hipótese de que a anandamida seria um ligante endógeno (Fride & Mechoulam, 1993). Posteriormente, foi identificado o segundo endocanabinoide, o 2-aracidoil-glicerol (2-AG), que possui padrões de afinidade semelhante para os dois receptores. Outros compostos foram definidos como “endocanabinoides”, destacando a N-araquidonoil-dopamina, o 2-araquidonoil-gliceril éter (noladina) e a O-araquidonoil-etanolamina (virodamina).

O aspecto notável dos endocanabinoides é que eles não são estocados em células, mas sim sintetizados e liberados sob demanda após estimulação neuronal mediada por cálcio (Di Marzo & Deutsch, 1998). A rota biossintética dos endocanabinoides é um tanto quanto diferenciada dos neurotransmissores clássicos, atuando de maneira retrógrada, ou seja, do terminal pós-sináptico para o pré-sináptico. Além disso, inicia-se com sua síntese a partir da quebra de fosfolípidos da membrana plasmática, liberados por difusão. A seguir, o endocanabinoide tem sua ação no receptor localizado no terminal pré-sináptico é recaptado pelo terminal pós-sináptico, mediado possivelmente por um transportador ainda não identificado (Beltramo et al., 1997). A anandamida e 2-AG são então metabolizados por uma hidrolase de amida de ácidos graxos (FAAH) e monoacilglicerol lipase (MGL), respectivamente, altamente expressas no tecido cerebral (Cravatt et al., 1996; Piomelli, 2003). Em conjunto, os

endocanabinoides, seus receptores e suas enzimas metabólicas constituem o sistema de neurotransmissão denominado de sistema endocanabinoide, ilustrado na figura 1.

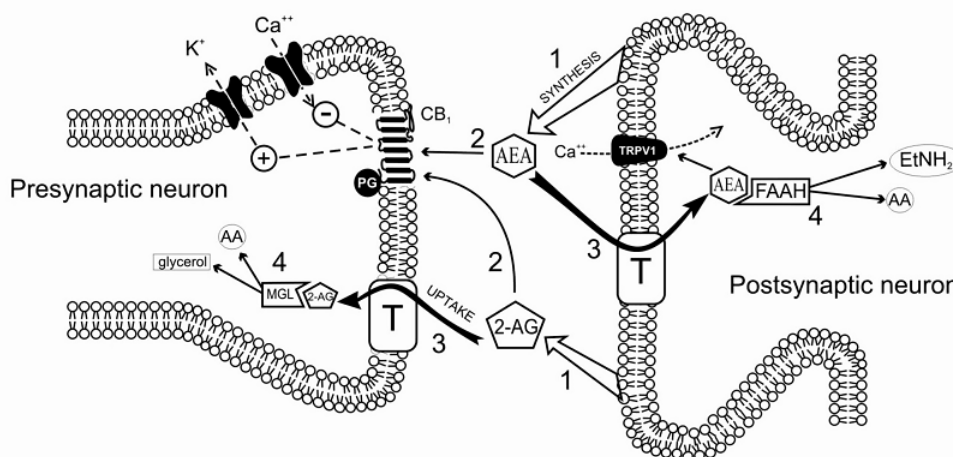


Figura 1- Ilustração do modelo de transmissão sináptica mediada pelo sistema endocanabinoide (modificado de Saito et al., 2010).

Diante da caracterização dos receptores bem como e da descoberta dos ligantes endógenos foi possível o desenvolvimento de compostos sintéticos que ligariam aos receptores CB_1 e CB_2 , como é o caso do araquidonoil-2-cloroetilamida (ACEA), agonista seletivo do receptor CB_1 e o WIN 55-212, classificado como agonista CB_1/CB_2 , além de outros compostos tais como o SR141716A (rimonabanto) e o AM251, que são antagonistas competitivos para o receptor CB_1 . Além disso, foi possível o desenvolvimento de compostos que atuassem sobre a cascata metabólica dos endocanabinoides, com o destaque para os inibidores da hidrólise da anandamida, o URB597, que é capaz de aumentar a sinalização canabinoide por inibir a $FAAH$, os quais se configuram como importantes instrumentos farmacológicos nos estudos que avaliam os papéis nesse sistema (Rinaldi-Carmona et al., 1998; Pertwee, 1999; Piomelli, 2003).

1.2- Epilepsia e crise convulsiva

Epilepsia é um termo que teve origem na Grécia antiga “*epilambanien*” com significado de ‘tomar posse’, ‘ser invadido’, ‘dominado’. Na antiguidade a epilepsia era vista como uma condição demoníaca cujo diagnóstico estava associado a forças malignas, sobrenaturais, castigo divino, ciclo lunar, sexo e masturbação. Por outro lado, alguns registros médicos, incluindo-se relatos de Hipócrates, defendiam a ideia de que a epilepsia não possuía nenhuma conotação divina, sendo uma patologia que acomete especificamente o encéfalo (Engel, 1995; Lees et al., 2000).

Atualmente a epilepsia representa uma desordem neurológica severa que afeta aproximadamente 2-3% da população, sendo frequentemente desenvolvida após lesões cerebrais traumáticas, tumores ou infecções cerebrais, acidente vascular cerebral entre outros. (Dichter, 2009; Jacobs et al., 2009; Hauser, 1990). O termo epilepsia refere-se a uma desordem da função cerebral caracterizada por uma periódica e imprevisível ocorrência de crises convulsivas (Mcnamara, 1994). Essas últimas são, por sua vez, uma mudança temporária do comportamento devido a um desordenado, sincrônico e rítmico disparo de populações de neurônios do sistema nervoso central. Essa mudança temporária ocorre devido a alterações encefálicas que levam à hiperexcitabilidade e hipsincronismo da atividade neural, podendo ser expressa por mais de 40 tipos distintos, dependendo dos substratos neurais envolvidos (Engel, 1995). O diagnóstico clínico da epilepsia requer três elementos fundamentais:

- ✓ Histórico de pelo menos uma crise;
- ✓ Alteração contínua no encéfalo capaz de aumentar a susceptibilidade à nova crise;
- ✓ Quadro clínico esteja associado às condições neurobiológica, cognitiva e social imposta pela doença.

A *International League Against Epilepsy* (ILAE) dispõe de uma classificação internacional para as crises convulsivas conforme apresentado na tabela abaixo:

TABELA 1
Classificação das crises epiléticas

1 Crises parciais (focais)
1.1 Crises parciais simples
1.2 Crises parciais complexas
1.3 Crises parciais secundariamente generalizadas
2 Crises generalizadas
2.1 Ausência
2.1.1 Típica
2.1.2 Atípica
2.2 Mioclônica
2.3 Clônica
2.4 Tônica
2.5 Tônico-clônica
3 Não classificadas

Berg et al., 2010; Fisher et al., 2005

As crises parciais, ou focais, são aquelas que apresentam atividade eletroencefalográfica de uma rede neural epileptogênica limitada a uma porção definida do sistema nervoso central. São subclassificadas em simples ou complexa na dependência de haver ou não perda da consciência, respectivamente. As crises parciais podem evoluir para generalizadas pelo recrutamento de outras estruturas cerebrais. As crises generalizadas apresentam uma ampla atividade eletroencefalográfica, indicando um acometimento bilateral de extensas áreas do encéfalo, com presença ou não de manifestações motoras, podendo ainda manifestar-se através de períodos de ausência em que se observa suspensão da consciência, sem importante atividade motora

(ausência simples), ou acompanhada de discretas atividades motoras clônicas, atônicas, tônicas e autonômicas, e automatismos (ausências complexas) (Engel,1995; Taylor & Dudek, 1984). Segundo Blume Chair et al., 2001 os comportamentos motores envolvidos nas crises convulsivas citados anteriormente são definidos como:

- ✓ mioclônico – contração muscular súbita que pode afetar a face, as extremidades ou o tronco;
- ✓ clônico – mioclonias repetidas a intervalos regulares envolvendo os mesmos grupos musculares;
- ✓ tônico – contração mantida com duração de poucos segundos a minutos que compromete a musculatura axial e de membros;
- ✓ tônico-clônico – contração tônica simétrica e bilateral seguida de contração clônica dos membros, associadas a fenômenos autonômicos.

Além disso, o termo *epileptogênese*, também definido como período latente, refere-se ao desenvolvimento sintomático da crise convulsiva que representa o período de início da crise após a ocorrência do insulto ou até mesmo durante o insulto, culminando com a ocorrência da primeira crise espontânea. Epileptogênese refere-se também ao processo dinâmico que progressivamente altera a excitabilidade neuronal, estabelecendo interconexões sinápticas distintas antes mesmo do início da crise convulsiva. Dessa maneira, estudos clínicos e experimentais sugerem que alterações celulares e moleculares, desencadeadas por processos epileptogênicos, podem progredir e modificar quantitativamente e qualitativamente o perfil da crise convulsiva. Tais alterações podem ser neurodegeneração, neurogênese, gliose, brotamento axonal, plasticidade dendrítica, entre outros (ver revisão Pitkanen & Lukasiuk, 2011). Por outro lado, crises convulsivas podem se desenvolver após traumatismos crânio-encefálico, hipóxia cerebral, tumor cerebral e abuso de drogas, a exemplo da overdose de cocaína,

que será abordada posteriormente (Dichter, 2009; Jacobs et al., 2009; Koppel et al., 1996; Gaval Cruz et al., 2008; Xu et al., 2010).

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos dos últimos anos, ainda existem lacunas sobre os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no início e término das crises convulsivas e o impacto sobre a progressão da doença. Dessa maneira, as principais diretrizes que explicam com exatidão sobre tais mecanismos giram em torno de mecanismos: sinápticos e não-sinápticos (Mcnamara, 1994). Entre os mecanismos sinápticos destacam-se a diminuição da inibição GABAérgica, a ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) para glutamato e alteração do potencial excitatório pós-sináptico (PEPS). Em contrapartida, os mecanismos não-sinápticos são representados pelo aumento de K⁺ em micro-domínios extracelulares próximos às células piramidais corticais e da região CA1 hipocampal, que desencadeariam disparos numa frequência acima do normal para aqueles neurônios (Mcnamara, 1994).

A modalidade inicial de tratamento para a crise convulsiva e, conseqüentemente, para a epilepsia baseia-se no tratamento farmacológico, com a finalidade de diminuir a excitabilidade do tecido neural, aumentando o tônus inibitório. Outra possibilidade é o tratamento cirúrgico, que em última instância objetiva-se a ressecção do foco epileptogênico e a conseqüente diminuição de crises convulsivas recorrentes.

Atualmente os diversos fármacos são agrupados de acordo com o seu mecanismo de ação e aos inúmeros tipos de crise convulsiva, o que provavelmente explica a grande variabilidade das manifestações clínicas e as respostas aos diferentes tipos de medicamentos. Portanto, a escolha do fármaco anticonvulsivante é baseada primariamente na sua eficácia para os diferentes tipos de crises e nos aspectos farmacocinéticos que são essenciais para a otimização do tratamento. Os principais mecanismos de ação dos anticonvulsivantes incluem bloqueio de canais para sódio

voltagem dependentes, bloqueio de canais para cálcio, potencialização da inibição GABAérgica (facilitando a abertura dos canais para cloreto) e antagonismo dos receptores glutamatérgicos (Patsalos et al., 2008).

Dentre os anticonvulsivantes mais utilizados para controlar as crises convulsivas de variáveis etiologias destacam-se a carbamazepina, oxcarbazepina, clobazam, clonazepam, ácido valpróico, fenitoína, etosuximida, felbamato, fenobarbital, lamotrigina, gabapentina, levetiracetam, pregabalina, primidona, tiagabina, topiramato, vigabatrina e zonizamida (Patsalos et al., 2008; Bialer & White, 2010; Yacubian, 2005).

Atualmente existem aproximadamente 25 drogas antiepilépticas disponíveis para o tratamento da epilepsia, embora um terço dos pacientes epiléticos são classificados como resistentes ao tratamento farmacológico. A esse grupo dá-se o nome de epilepsia refratária ou farmacoresistente. Recentemente, a *International League Against Epilepsy* (ILAE) definiu a farmacoresistência da epilepsia como “*falha na tentativa apropriada de escolha de drogas antiepilépticas, monoterapia ou terapia combinada, para atingir o sucesso no controle das crises convulsivas*”. Sendo assim, mesmo com o desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas que contribuem significativamente para melhorar o perfil de segurança do tratamento, não se alterou a porcentagem de pacientes que exibem farmacoresistência (Pohmann-Eden & Weaver, 2013).

Neste contexto, é de grande importância a utilização de modelos animais de crises convulsivas, que têm fornecido avanços para a compreensão dos mecanismos moleculares da epilepsia, sobretudo sobre os processos envolvendo a epileptogênese, favorecendo a caracterização do espectro da atividade anticonvulsivante de novas drogas bem como seus efeitos adversos (Loscher, 2011). Dentre os modelos animais mais utilizados para se estudar de maneira específica as crises convulsivas e recorrência das mesmas, destacam-se o modelos por administração de drogas, tais como o ácido

kaínico, a pilocarpina, o pentilenotetrazol (PTZ) e a cocaína. São relevantes, também, os modelos de estimulação elétrica cerebral ("kindling"), de epilepsia pós-traumática, modelo de hipóxia cerebral, de crise induzida por hipertemia, e modelos genéticos, a exemplo dos ratos Wistar Audiogênicos (WAR – *Wistar audiogenic rats*), entre outros (Lutz, 2004; Giblin & Hal Blumenfeld, 2010; Lason, 2001; Klioueva et al., 2001). Além disso, os vários modelos animais de epilepsia ou crise convulsiva citados acima podem ainda serem avaliados através de diferentes categorias como crises convulsiva aguda, crise convulsiva crônica recorrente, crises parciais, crises generalizadas, crises não convulsivas, entre outros (Loscher, 2011).

1.3- Epilepsia, crise convulsiva e sistema endocanabinoide

O uso da *Cannabis sativa*, mais especificamente o *hashish*, foi descrito desde o século XV em Bagdá para o tratamento de crises convulsivas. Posteriormente, no início do século XIX, o médico iraniano W. B.O'Shaughnessy descreveu de forma mais abrangente os efeitos anticonvulsivantes do *hashish*, com expansão do uso medicinal da planta (Mechoulan, 1986). Desde então, evidências sugeriam que a utilização do canabidiol, o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) e a maconha teria efeitos antiepilépticos em alguns casos, podendo ser usado como terapia coadjuvante aos pacientes epiléticos. Por outro lado, parte dos pacientes apresentaram efeitos contrários, ou seja, aumento significativo da frequência e severidade das crises, o que limitou a utilização dos compostos na terapia contra crise convulsiva (Gordon & Devinsky, 2001; Schneir & Baumbacher, 2012). Durante as últimas três décadas, os esforços se voltaram para a utilização de modelos animais de crise convulsiva ou de epilepsia a fim de verificar os efeitos de canabinoides exógenos sobre a ocorrência das crises. Similarmente aos estudos utilizando humanos, os canabinoides realmente exercem ambos efeitos, anti ou

pró-convulsivantes, dependendo do modelo utilizado (Lutz, 2004) Estudos iniciais destacaram o efeito anticonvulsivante do Δ^9 -THC e do agonista CB1, WIN55,212-2 em modelos de eletrochoque de crise convulsiva generalizada, sendo esse efeito revertido pela administração de antagonista CB1 (Wallace et al., 2001). A partir daí diversos trabalhos utilizaram diferentes modelos de crise convulsiva e diferentes abordagens experimentais *in vivo* ou *in vitro*, demonstrando que o tratamento com agonistas para receptor CB1 poderia induzir efeito anticonvulsivante modulando a frequência e a severidade das crises (Blair et al., 2006; Blaskaran & Smith, 2010; Jones et al., 2010; Shafaroodi et al., 2004, 2007; Wallace et al., 2002). Segundo Luszczycki et al., 2010, 2011 a co-administração dos agonistas ACEA e WIN55,212-2 a anticonvulsivantes clássicos como a carbamazepina, fenitoína e fenobarbital foi capaz de potencializar os efeitos anticonvulsivantes das drogas antiepiléticas no modelo de crise induzida por eletrochoque. Por outro lado, a deleção ou o bloqueio farmacológico dos receptores CB1 facilitou a ocorrência das crises convulsivas aumentando significativamente a severidade das mesmas e colocando em pauta o envolvimento do sistema canabinoide nas crises convulsivas (Marsicano et al., 2003; Monory et al., 2006). Nesse sentido, estudos apontaram que o tratamento com antagonistas CB1 previamente ao agonista CB1 aumentava a frequência e duração das crises convulsivas bem como as descargas epileptiformes por causar atividade semelhante a *status epilepticus* (Kosan et al., 2009; Deshpande et al., 2007; Cakil et al., 2010; Marsicano et al., 2003; Monory et al., 2006).

Por outro lado, muitos trabalhos apontaram efeitos contraditórios dos antagonistas CB1. Segundo Echegoyen et al., 2009 a única exposição ao antagonista CB1, SR141716, preveniu a hiperexcitabilidade neuronal no modelo de crise convulsiva pós-traumática. Além disso, o tratamento com os antagonistas AM251 e SR141716

apresentou propriedade anti-epileptogênica em culturas de neurônios hipocampais tratadas com agonista do receptor glutamato (Karr et al., 2010). Por fim, o antagonista CB1, AM251, administrado em doses baixas aumentou o efeito anticonvulsivante do agonista seletivo ACEA no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ em camundongos (Gholizadeh et al., 2004).

Paradoxalmente, há evidência de que os agonistas para receptor CB1 poderiam induzir efeitos pró-convulsivantes dependendo da dose ou modelo utilizado. Efeitos complexos foram também identificados após a exposição prolongada do canabinoide sintético WIN55,212-2 que resultou em tolerância do efeito anticonvulsivante e exacerbação da atividade da crise (Blair et al., 2009). Embora existam evidências sobre o efeito anticonvulsivante dos canabinoides, pouco ainda se sabe sobre as razões dessas discrepâncias envolvendo agonistas e antagonistas sintéticos (Lutz, 2004).

Dessa maneira, recentemente a pesquisa científica tem desviado a atenção para o sistema endocanabinoide, que possuem potencial para o desenvolvimento de futuras drogas antiepilépticas. Esse argumento é baseado principalmente em três aspectos: **a)** os endocannabinoides são produzidos sob demanda após a despolarização neuronal, controlando de forma eficaz a excitabilidade neuronal através do balanço entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios; **b)** compostos que inibem enzimas que metabolizam os endocannabinoides anandamida e 2-AG aumentam significativamente os níveis dos mesmos, controlando de maneira eficaz a excitabilidade neuronal sem o desenvolvimento de efeitos adversos ou contraditórios encontrados pela ativação direta de receptores canabinoides; **c)** o sistema endocanabinoide é ativado durante condições epileptogênicas experimentais. Baseado nesses argumentos, pesquisadores tem encontrado, principalmente nos inibidores da FAAH, a melhor estratégia farmacológica envolvendo o sistema endocanabinoide. Segundo Marsicano et al., 2003 os níveis de

anandamida aumentaram significativamente após a crise convulsiva induzida por ácido kaínico, fornecendo proteção sob demanda contra a excitotoxicidade e que camundongos geneticamente modificados, com receptores CB1 deletados em neurônios prosencefálicos, apresentavam limiar reduzido para crise convulsiva induzida pelo agente convulsivante. Trabalhos recentes apontaram que inibidores da FAAH de nova geração reduziram eventos excitotóxicos *in vivo* e *in vitro* no modelo do ácido kaínico promovendo neuroproteção contra insulto cerebral (Naido et al., 2010, 2012) e que camundongos geneticamente modificados que não apresentavam a enzima FAAH exibiam aumento da susceptibilidade das crises convulsivas quando expostos ao ácido kaínico (Clement et al., 2003). Do ponto de vista clínico, dados utilizando tomografia por emissão de pósitron (PET) mostraram que o sistema endocanabinoide, mais especificadamente o receptor CB1, apresentou alterações de expressão em zonas epileptogênicas sugerindo papel do sistema endocanabinoide na patofisiologia das crises convulsivas (Goffin et al., 2011). Além disso, foram encontrados baixos níveis de anandamida no líquor de pacientes não tratados com epilepsia do lobo temporal quando comparado com pacientes sadios suportando a hipótese de disfunção primária do sistema endocanabinoide em pacientes epiléticos (Romigi et al., 2010).

Embora existam importantes evidências sugerindo uma função anticonvulsivante do sistema endocanabinoide, os principais mecanismos responsáveis pela interação desse sistema com os processos epileptogênicos ainda são pouco compreendido. Sendo assim, levantamos a hipótese de que compostos que atuam sobre o sistema endocanabinoide como agonistas de receptores canabinoides CB1 e o inibidor da enzima FAAH representariam uma estratégia eficaz contra as crise convulsivas e a neurotoxicidade induzida pela administração de PTZ e de altas doses de cocaína

2. Objetivo geral

O objetivo central deste estudo foi caracterizar os efeitos de compostos que interferem com o sistema endocanabinoide sobre a crise convulsiva induzida por pentilenotetrazol (PTZ) e neurotoxicidade induzida pela cocaína em roedores através de abordagens comportamentais, eletrofisiológicas e moleculares.

2.1- Objetivos específicos

- ✓ Testar a hipótese de que a ativação de receptores CB1 possa ter efeito anticonvulsivante sob as crises convulsivas comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e cocaína.
- ✓ Testar a hipótese de que inibidores da hidrólise da anandamida possam atenuar as crises convulsivas comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por PTZ e cocaína.
- ✓ Testar a hipótese de que inibidores da hidrólise da anandamida possam atenuar a neurotoxicidade induzida por cocaína in vivo in vitro.
- ✓ Testar a hipótese de que o bloqueador dual do receptor TRPV1 (vaniloide de potencial transitório subtipo 1) e da enzima FAAH, aradonoil serotonina, possa prevenir a crise convulsiva induzida por PTZ em camundongos investigando a influência dos receptores CB1 e TRPV1 sobre tais efeitos.

3. O sistema endocanabinoide e crises convulsivas agudas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e cocaína

3.1. Modelo de crise convulsiva induzida por Pentilenotetrazol (PTZ)

PTZ, também conhecido como pentetrazol e metrazol, é um estimulante do sistema nervoso central utilizado em estudos experimental de fenômenos de crise convulsiva. Do ponto de vista farmacológico, a droga atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, antagonizando receptores do ácido gama-aminobutírico do subtipo GABA_A (Loscher, 2009). Sendo assim, o PTZ é comumente utilizado para se estudar as alterações comportamentais e eletroencefalográficas induzida pela excitabilidade neuronal (Klioueva et al., 2001). A administração do PTZ induz, dependendo da dose, dois tipos de crises convulsivas: crises mioclônicas e crises tônico-clônica-generalizada (Velisek, 1992). A primeira, conhecida como crise mínina, envolve manifestações mais tais como espasmos, mastigação, clonias de cabeça e membros, elevação e queda onde estão envolvidas estruturas do sistema límbico exemplificadas principalmente pelo hipocampo (Brevard et al, 2006). Já a segunda também chamada de crises máxima, tem sua manifestação motora na forma de convulsões tônico-clônicas e envolvem estruturas por todo encéfalo, principalmente áreas de tronco encefálico, caracterizando um modelo de epilepsia generalizada. As crises convulsivas induzidas por PTZ são acompanhadas por atividade eletroencefalográfica aberrante, disparos generalizados em várias frequências, acompanhadas por atividade cortical isoelétrica (Klioueva et al., 2001).

A avaliação dos efeitos de drogas nesse modelo pode ser determinada pela infusão intravenosa de PTZ. Geralmente, a infusão se dá de maneira contínua através de fluxo constante em ratos ou camundongos, até a ocorrência inicial das crises convulsivas. Deste modo, pode-se determinar a dose de PTZ (em mg/kg) necessária para induzir a crise (“limiar de PTZ”), bem como o tempo de latência para o início da

mesma (White et al., 2008). Drogas anticonvulsivantes atrasarão a ocorrência de crises, enquanto drogas pró-convulsivantes exercem efeitos opostos.

Como alternativa para infusão intravenosa, o PTZ pode ser administrado em ratos ou camundongos por via intraperitoneal ou subcutânea em doses previamente estabelecidas. A latência, severidade e duração da crise convulsiva são os principais parâmetros utilizados para determinar os efeitos pró ou anticonvulsivante de outras classes de drogas (Loscher, 2009).

Considerando os resultados sugerindo a função neuroprotetora do sistema endocanabinoide em crises convulsivas, testamos a hipótese de que a sua facilitação atenuaria as crises convulsivas induzidas por PTZ.

3.2 Animais

Ratos Wistar machos, pesando entre 270-310 g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG foram mantidos sob ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Todos os experimentos foram realizados de acordo com a Sociedade Brasileira de Neurociências e o Comitê de Ética de experimentação animal (CETEA) da UFMG sob o número de protocolo 127/2011.

3.3 Drogas

Foram utilizadas, nestes experimentos, as seguintes drogas, todas adquiridas da Cayman Chemicals: o agonista canabinoide sintético não-seletivo (R)-(+)-[2,3-Diidro-5-metil-3-(4-morfolinilmetil)pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1 naphthalenilmetanona (WIN-55,212-2) e o agonista seletivo para receptor CB1, araquidonoil-2-cloroetilamida (ACEA); o antagonista CB1 5-(4-Chlorofnil)-1-(2,4-dicloro-fenil)-4-metil-N-(piperidin-1-il)-1H-pirazol-3-carboxamida (SR141716,

rimonabant) e o inibidor seletivo da hidrólise da anandamida (inibidor da FAAH) [3-(3-carbamoilfenyl)fenyl] N-ciclohexilcarbamato (URB597). As drogas foram dissolvidas em um veículo constituído por etanol, cremofor e salina 0,9% na proporção de 1:1:18. As soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos e todas as injeções foram administradas intraperitonealmente (i.p) no volume de 1 ml/kg peso corporal, trinta minutos antes da administração do PTZ. As faixas de doses foram escolhidas a partir de trabalhos prévios (Bahremand, et al. 2008, Shafaroodi, et al. 2008, Shafaroodi, et al. 2004, Wendt, et al. 2011). O agente convulsivante PTZ (Sigma) foi diluído em salina 0,9% e infundido, via intravenosa, na concentração de 10 mg/ml (Cota et al., 2009).

3.4 Cirurgia estereotáxica para implantação de eletrodos corticais

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p) com ketamina (60mg/kg) e xilazina (8mg/kg) e fixados em um aparelho estereotáxico (David Kopf model 960) para a implantação de eletrodos (Fine Sciences Tools, mod.19010-00) posicionados no córtex parietal esquerdo e direito e no osso nasal. Após o correto posicionamento, os eletrodos foram fixados e soldados a um conector telefônico (modelo RJ-11 6x6). Foi utilizado pentabiótico Baytril® na dose 5,0 mg/kg, como medida profilática contra infecções e antiinflamatório Banamine® (flunixin meglumine, 1 ml/Kg). Após a recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (cinco dias) e então submetidos aos procedimentos experimentais.

3.5 Determinação do limiar da crise convulsiva

No dia do experimento, os animais foram submetidos à canulação da veia da cauda para infusão do PTZ, através de uma bomba de infusão, na velocidade de 0,5

ml/min. A severidade da crise comportamental foi quantificada de acordo com a escala (0-5) descrita por Velisek et al., 1992. A latência (em segundos) para início da crise mínima ou mioclônica (escala 3) representada por mioclonia bilateral das patas anteriores e da crise máxima ou tônico-clônica generalizada (escala 5) caracterizada por crise tônico-clônica acompanhada de corrida, pulos, perda de reflexo postural podendo evoluir com morte do animal foram correlacionadas com a dose de PTZ injetada e normalizada pelo peso corporal (limiar de PTZ) (Shafaroodi et al., 2004, 2007). Todos os experimentos foram gravados em vídeo para análise comportamental.

3.6 Eletroencefalograma (EEG)

O protocolo de gravação do video-EEG foi iniciado um minuto antes da infusão do PTZ até trinta segundos depois da crise tônico-clônica generalizada. O sinal do EEG foi amplificado (5000x), filtrado (1Hz alta frequência e 500 Hz baixa frequência) com amostra de 1kHz e estocado em um computador convencional. As gravações foram analisadas *off-line* de acordo com as seguintes variáveis: (1) latência para o início da primeira descarga epileptiforme; (2) duração da crise eletroencefalográfica mioclônica e (3) início da crise eletroencefalográfica tônico-clônica. Foram consideradas crises eletroencefalográficas quando os disparos (“*spikes*”) excediam duas ou três vezes da amplitude basal, com frequência > 3Hz (crise mioclônica) e frequência >8Hz (crise tônico-clônica generalizada).

3.7 Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão e submetidos à análise de variância *One-way* (ANOVA) seguida por análise de comparação múltipla de Newman-Keuls. O nível de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

A figura abaixo sumariza a sequência experimental:

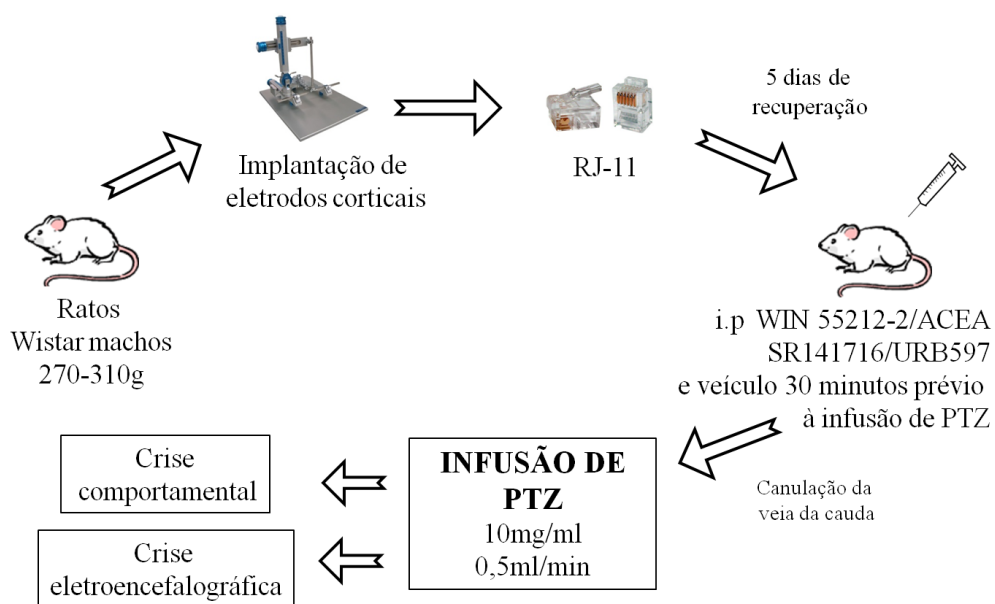


Figura 2 – Representação dos procedimentos experimentais no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ.

3.8 Resultados

Os efeitos de diferentes doses do WIN-55212-2 (0.3; 1.0; 3.0 mg/kg, i.p) sobre o limiar da crise mioclônica induzida por PTZ podem ser vistos na Fig. 3. Esta droga, na dose de 1.0 mg/kg, reduziu significativamente o limiar da crise comportamental ($F_{3,28} = 5,371$, $P < 0,004$; Fig. 3A). Além disso, o WIN-55212-2 apresentou efeito sobre a duração da crise eletroencefalográfica comparado ao grupo veículo ($F_{3,14} = 3,767$, $p < 0,03$; Fig. 3B). Análise com Newman-Keuls revelou que o WIN55212-2 na dose de 1.0 mg/kg aumentou a duração da crise eletroencefalográfica quando comparado ao grupo veículo, condizente com um efeito pró-convulsivante ($P < 0,05$). Porém, nenhuma das doses exerceu efeito sobre o limiar para a ocorrência das crises eletroencefalográficas ($F_{3,15} = 2,570$, n.s; Fig. 3C).

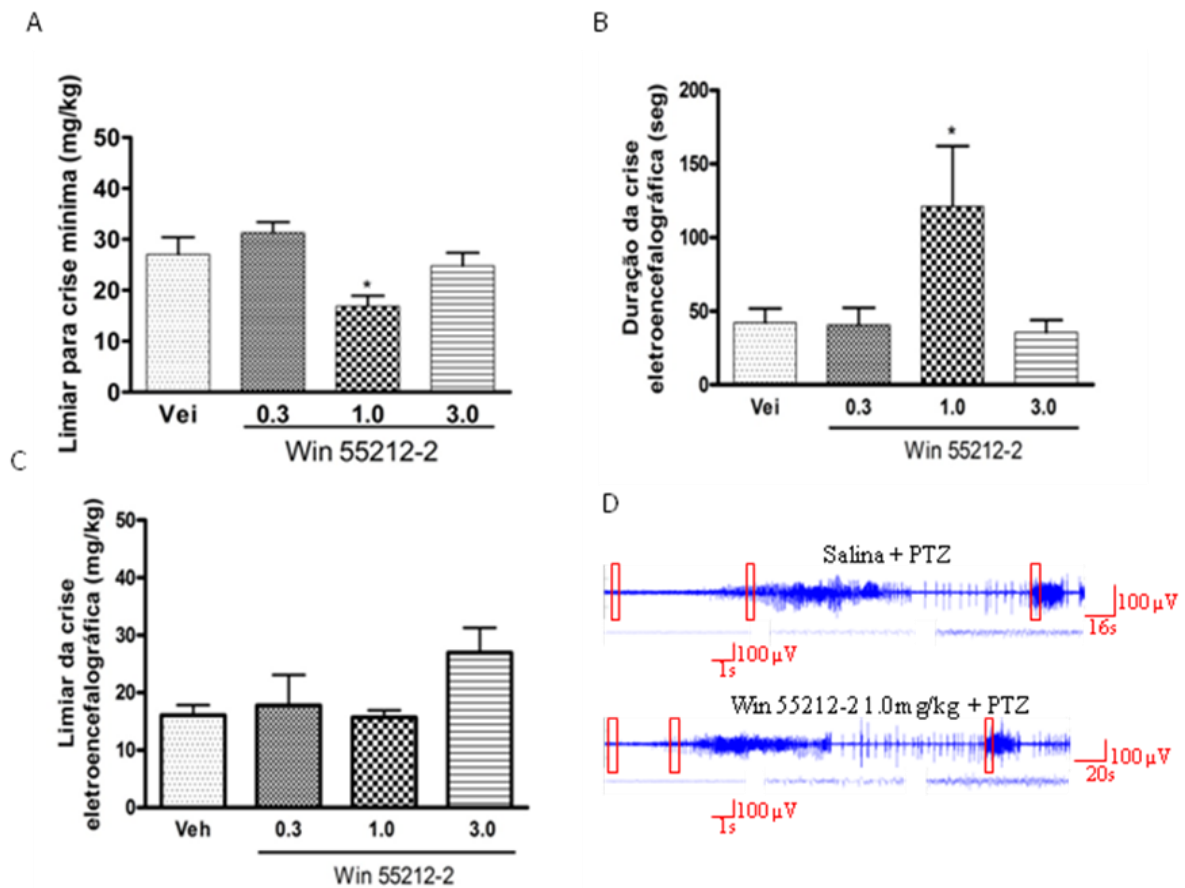


Figura 3- Efeito de diferentes doses do agonista de receptor canabinoide não seletivo, WIN55212-2 (0.1; 1.0; 3.0 mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e electroencefalográfica em ratos. O WIN-55212-2 (1.0mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o limiar de PTZ necessário para induzir a crise comportamental (A) e aumentou significativamente a duração da crise electroencefalográfica (B), mas não exerceu efeito sobre o limiar da crise electroencefalográfica (C). Uma imagem representativa da análise dos dados electroencefalográficos pode ser vista em D. As marcações em vermelho representam, respectivamente, o início da infusão do PTZ, o início da crise mínima (mioclônica) e o início da crise máxima (tônico-clônica). *P <0.05 comparado com grupo veículo. Os dados foram expressos como media \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 7-8 ratos.

Os efeitos do ACEA estão apresentados na Fig. 4. Este agonista seletivo CB1 reduziu o limiar da crise mioclônica induzida por PTZ ($F_{3,24} = 6,036$, $P < 0.003$). A

análise *post hoc* com Newman-Keuls revelou efeito pró-convulsivante do ACEA em todas as doses (Fig. 4A). Além disso, este composto aumentou a duração da crise eletroencefalográfica ($F_{3,12}=6,465$, $P<0,007$). A dose de 2.0mg/kg aumentou significativamente a duração da crise eletroencefalográfica quando comparado ao grupo veículo ($p<0,01$; Fig. 4B). O tratamento com ACEA nas doses de (1.0; 2.0; 4.0 mg/kg i.p) não causou nenhuma mudança sobre o limiar da crise eletroencefalográfica com relação ao veículo ($F_{3,15}=0,909$, n.s) (Fig. 4C).

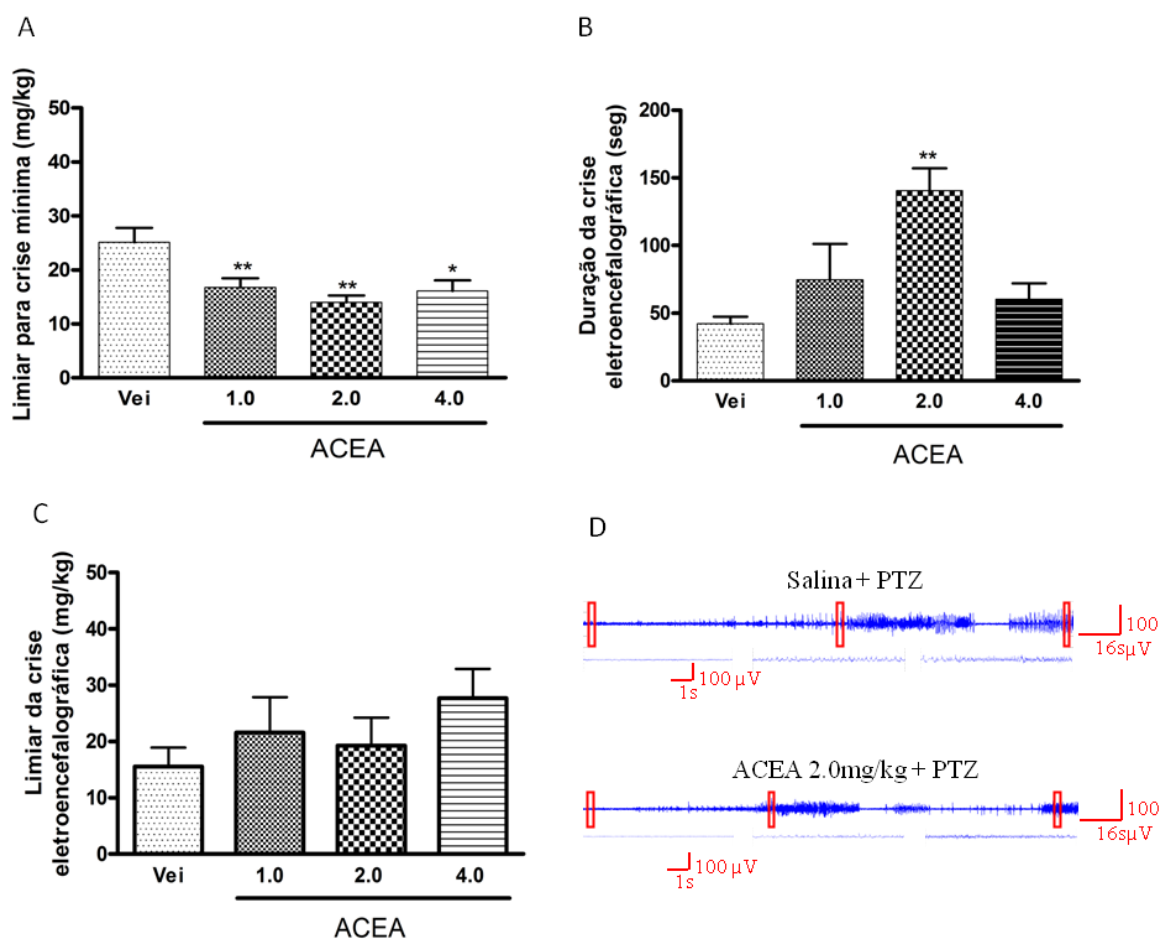


Figura 4- Efeito de diferentes doses do agonista seletivo de receptor canabinoide, ACEA (1.0; 2.0; 4.0 mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e eletroencefalográfica em ratos. Todas as doses reduziram o limiar da crise comportamental (A) e a dose de 2.0 mg/kg aumentou a duração da crise eletroencefalográfica (B). Porém, o ACEA não exerceu efeito sobre o limiar da crise

eletroencefalográfica (C). A imagem representativa da análise dos dados eletroencefalográficos pode ser vista em D. *P <0.05 comparado com grupo veículo. **P <0.01 comparado com grupo veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 7-8 ratos.

Conforme apresentado na Figura 5A, nenhuma das diferentes doses do antagonista específico para CB1 SR141716 (0.3;1.0;3.0mg/kg, i.p.) teve efeito sobre o limiar da crise mioclônica ($F_{3,34} = 0,557$, n.s) comparado ao grupo veículo. Além disso, o pré-tratamento com SR141716 (0.3; 1.0; 3.0 mg/kg) não alterou significativamente o limiar e a duração das crises comportamental e eletroencefalográfica ($F_{3,12}=0,734$, n.s; $F_{3,15}=0,798$,n.s) (Figuras 5B e 5C).

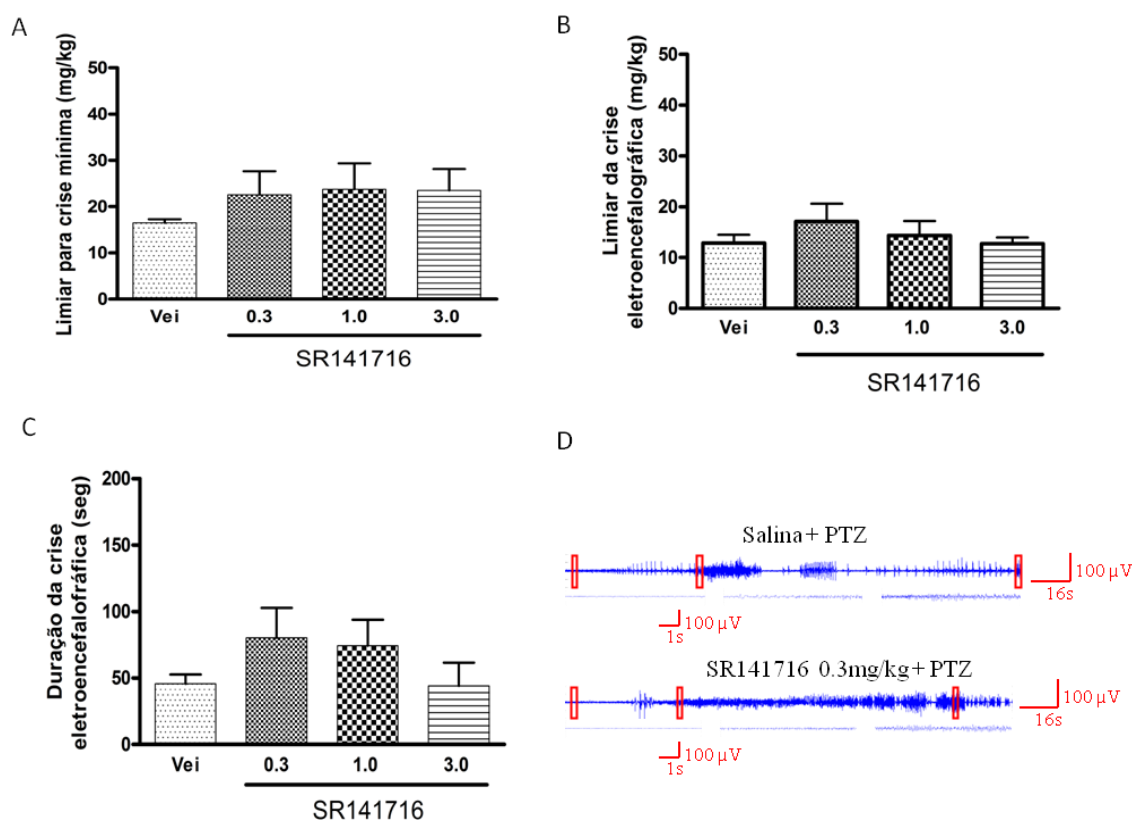


Figura 5- Efeito de diferentes doses do antagonista de receptor canabinoide, SR141716, (0.3; 1.0; 3.0 mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e eletroencefalográfica em ratos. Nenhuma das doses utilizadas do SR141716 exerceram efeito sobre a crise comportamental e eletroencefalográfica (A-C). Figura representativa da análise dos

dados eletroencefalográficos pode ser vista em D. Os dados foram expressos como $\text{media} \pm \text{erro padrão}$. Cada grupo foi constituído de 7-8 ratos.

Os resultados apresentados na figura 6A revelaram que o URB597 significativamente aumentou o limiar para crise mioclônica quando comparado com o grupo veículo ($F_{3,25} = 5,252, P < 0,006$). Dessa forma, a análise *post hoc* revelou efeito anticonvulsivante na dose de 3.0 mg/kg comparado com grupo veículo ($P < 0,01$). Por outro lado, o pré-tratamento com URB597 (0.3 and 1.0 mg/kg) não alterou significativamente o limiar da crise mioclônica ($P > 0,05$). Além disso, a análise com Newman-Keuls apresentou que URB597 alterou significativamente a duração da crise eletroencefalográfica ($F_{3,13} = 14,30, P < 0,0002$), mas não o limiar da crise eletroencefalográfica ($F_{3,13} = 1,194, n.s$) (Figs 6B e 6C). Análise *post hoc* com Newman-Keuls revelou que URB597 nas doses de (0.3; 1.0; 3.0 mg/kg i.p.) reduziu a duração da crise eletroencefalográfica comparado com o grupo veículo ($P < 0,001$).

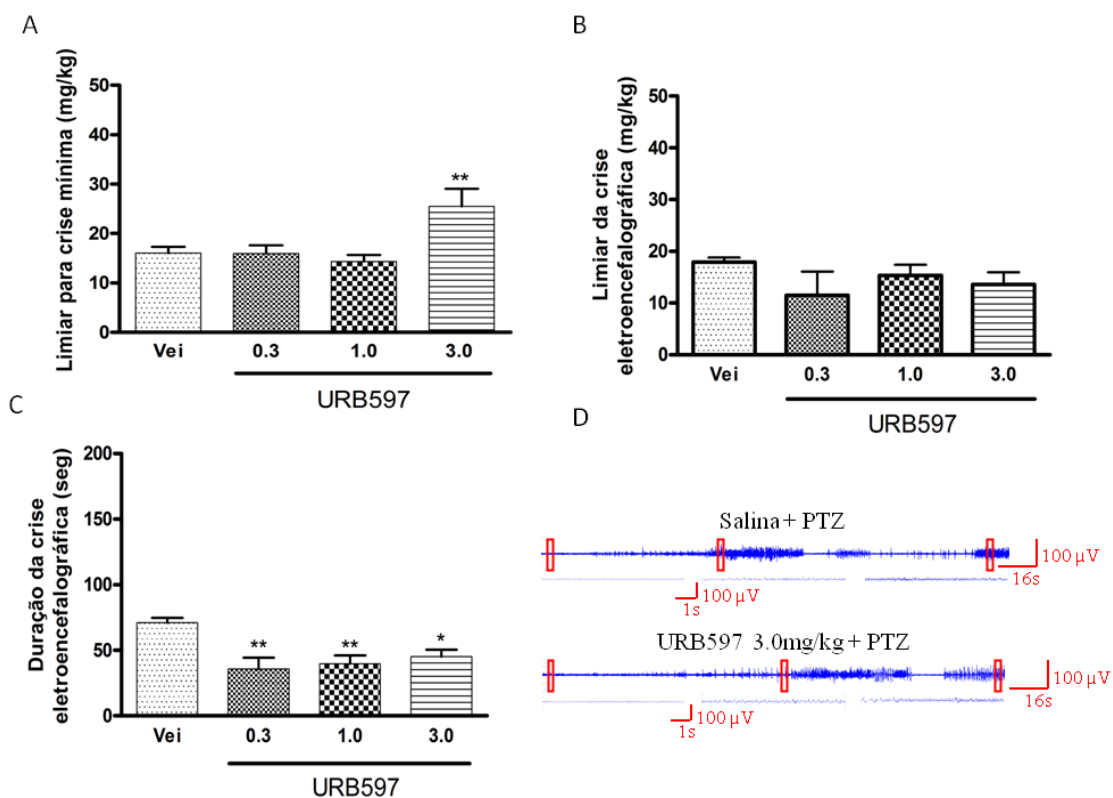


Figura 6- Efeito de diferentes doses do inibidor da hidrólise da anandamida, URB597 (0.3;1.0;3.0mg/kg, i.p.) sobre o limiar da crise comportamental e eletroencefalográfica em ratos. Administração do URB597 (3.0 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente o limiar da crise comportamental (A) sem alterar a duração da crise eletroencefalográfica (B). Porém, reduziu a duração da crise eletroencefalográfica (C). Figura representativa da análise dos dados eletroencefalográficos pode ser vista em D. *P <0.05 comparado com grupo veículo. **P <0.01 comparado com grupo veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 7-8 ratos.

Para melhor caracterização da interação dos compostos canabinoides na modulação da susceptibilidade das crises convulsivas, foram avaliados a latência e o limiar da crise generalizada tônico-clônica induzida por PTZ. Nenhum dos compostos alterou a latência (Tabela 2) ou o limiar (Tabela 3) para crise generalizada tônico-clônica comparado com o grupo veículo (P > 0,05).

Tabela 2: Efeitos dos compostos que interferem com o sistema endocanabinoide sobre a latência (seg) para crise tônico-clônica generalizada.

Veículo	Tratamento	0.1mg/kg	1.0mg/kg	3.0mg/kg
260,0 ± 26,6	WIN55212-2	238,3 ± 12,3	217,0 ± 14,6	256,0 ± 11,8
191,9 ± 14,4	SR141716	225,7 ± 18,7	219,3 ± 33,4	203,6 ± 19,0
224,7 ± 10,7	URB597	219,0 ± 18,9	218,7 ± 10,6	251,6 ± 12,0
	Tratamento	1.0mg/kg	2.0mg/kg	4.0mg/kg
239,4 ± 19,4	ACEA	214,1 ± 17,8	236,3 ± 14,0	234,8 ± 13,5

Dados são expressos como média ± erro padrão (n= 7-12).

Tabela 3: Efeitos dos canabinoides e inibidores de hidrólise da anandamida sobre o limiar de PTZ (mg/kg) para o início da crise tônico-clônica generalizada

Veículo	Tratamento	0.1mg/kg	1.0mg/kg	3.0mg/kg
64,3 ± 5,6	WIN55212-2	69,5 ± 3,8	58,2 ± 3,8	73,5 ± 2,5
52,6 ± 4,8	SR141716	59,8 ± 5,1	57,0 ± 8,8	52,6 ± 5,1
59,9 ± 2,8	URB597	57,2 ± 4,8	58,2 ± 3,4	65,4 ± 3,2
	Tratamento	1.0mg/kg	2.0mg/kg	4.0mg/kg
58,8 ± 3,9	ACEA	54,9 ± 3,8	61,2 ± 3,8	60,6 ± 3,2

Dados são expressos como média ± erro padrão (n= 7-12).

3.9 Discussão

Os resultados apresentados demonstram que a administração sistêmica de compostos canabinoides exercem efeitos sobre as crises comportamental e eletroencefalográfica induzidas por PTZ em ratos. Surpreendentemente, nossos resultados mostram que a ativação direta de receptores CB1 através dos agonistas exógenos WIN55212-2 e ACEA, reduziu significativamente o limiar para crise convulsiva, representando efeito pró-convulsivante. Adicionalmente, a administração do SR141716, antagonista do receptor CB1, não induziu efeito sobre a crise comportamental e eletroencefalográfica induzida por PTZ. No entanto, a facilitação da sinalização endocanabinoide, por meio da inibição da hidrólise da anandamida, resultou no aumento do limiar e redução da duração da crise induzida por PTZ, característicos de efeitos anticonvulsivantes.

Uma das formas mais comumente utilizadas para se estudar as alterações comportamentais e eletroencefalográficas induzidas pelo aumento da excitabilidade neuronal é a aplicação PTZ que induz a crise mínima (doses baixas de PTZ) e máxima ou tônico-clônica generalizada (doses altas), tendo como substratos neurais estruturas do sistema límbico, tronco encefálico e prosencéfalo (Eells et al., 2003; Brevard et al., 2006; Moraes et al., 2005). Nossos resultados demonstraram que a infusão intravenosa de PTZ na concentração de 10mg/ml promoveu alterações comportamentais e eletroencefalográficas determinados pela ocorrência da crise mínima e máxima. Todos os efeitos observados pela administração dos compostos canabinoides foram encontrados apenas na crise mínima ou mioclônica, cujo substrato neural se correlacionada com estruturas límbicas, tais como amígdala e hipocampo, sendo regiões com intensa expressão de receptores canabinoides CB1 (Herkenham et al.,1990). Por outro lado, a crise tônico-clônica generalizada ou máxima, com ativação de áreas com

baixa expressão de receptores CB1, não apresentou alterações comportamentais e eletroencefalográficas significativas quando administrados compostos canabinoides.

Está bem estabelecido que o sistema endocanabinoide modula a atividade neuronal através do balanço entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios no sistema nervoso central (Lutz, 2004; Marsicano & Lutz, 2006). Tais efeitos são mediados pela redução do influxo de cálcio neuronal e pelos eventos sinápticos como supressão da inibição induzida pela despolarização (DSI) e supressão da excitação induzida pela despolarização (DSE) (Piomelli, 2003). Porém, estudos em humanos com epilepsia relatam que o consumo de maconha pode causar efeitos anticonvulsivantes ou proconvulsivantes (Consroe et al.,1975; Ellison et al.,1990; Ng et al., 1990; Cunha et al.,1980; Keeler & Reifler,1967) assim como encontrado na administração de compostos canabinoides em modelos animais, demonstrando que dependendo da dose ou modelo utilizado são encontrados efeitos pró ou anticonvulsivantes (Lutz, 2004).

Os efeitos anticonvulsivantes dos canabinoides são mediados através da ativação do receptor CB1 e identificados em diversos modelos animais como na crise convulsiva induzida por eletroestimulação (Wallace et al., 2001, 2002), modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, representada como modelo ideal no estudo de crises recorrentes espontâneas, (Wallace et al., 2003; Falenski et al., 2007, 2009), modelo de cultura de neurônios hipocámpais *in vitro* com avaliação do *status epilepticus* (Blair et al., 2006; Deshpande et al.,2007), modelo de crise convulsiva induzida por PTZ em camundongos (Shafaroodi et al., 2004; Gholizadeh et al., 2007) e modelo que estuda atividade epileptiforme induzida por penicilina (Kozan et al., 2009). Por outro lado, os efeitos anticonvulsivantes não são observados em animais geneticamente modificados (*knockout*) para receptor CB1 (Ledent et al., 1999) e são completamente bloqueados por antagonistas seletivos CB1 (Wallace et al., 2002; Shafaroodi et al., 2004), sugerindo que

esses efeitos são mediados através da ativação de receptores CB1 (Deshpande et al., 2007).

No presente estudo, nós usamos agonistas exógenos para receptor CB1, ACEA (agonista seletivo) e WIN55212-2 (agonista não seletivo). ACEA nas doses de 1.0, 2.0 e 4.0 mg/kg e WIN 55212-2 nas doses de 1.0mg/kg reduziram o limiar para crise mioclônica induzida por PTZ exercendo efeito pró-convulsivante. Além disso, a dose de 1.0 mg/kg de WIN55212-2 e de 2.0mg/kg de ACEA aumentou a duração da crise eletroencefalográfica induzida por PTZ. Esses achados não estão de acordo com resultados prévios identificando efeito anticonvulsivante dos agonistas CB1 ACEA e WIN 55212-2 (Luszczki et al., 2006; Gholizadeh et al., 2007; Bahreman et al., 2008) embora pesquisas comprovaram que a exposição prolongada *in vitro* do WIN 55212-2 desenvolveu tolerância ao efeito anticonvulsivante dos canabinoides promovendo exacerbação da atividade da crise convulsiva. Ainda nesse estudo, a técnica de colocalização por imunofluorescência revelou que o receptor CB1 está localizado em ambos os terminais pré-sinápticos glutamatérgicos e gabaérgicos indicando que a localização desse receptor regula a neurotransmissão excitatória e inibitória (Blair et al., 2009). Adicionalmente, os receptores CB1 estão mais frequentemente localizados em terminais GABAérgicos inibitórios (Katona et al., 1999, 2000) e medeiam a inibição da supressão induzida pela despolarização (DSI) (Alger & Pitler, 1995; Wilson & Nicoll, 2001). Portanto, a ação típica da ativação de receptores CB1 poderia reduzir a liberação de GABA e, por interferência, aumentar a duração reduzindo o limiar da crise induzida por PTZ. Uma possível justificativa para os efeitos proconvulsivantes encontrados após a administração de agonistas canabinoides é demonstrado pela afinidade que agonistas exógenos possuem dependendo da dose administrada para receptores vanilóide de potencial transitório subtipo 1 (TRPV1), que quando ativados aumentam a liberação de

neurotransmissores excitatórios e o influxo de cálcio, eventos esses que participam dos processos epileptogênicos (Mezey et al., 2000).

A modulação farmacológica através da administração de antagonistas exógenos CB1 foi descrita em modelos animais de crise convulsiva reportando efeitos duais. O tratamento com SR141716 (Rimonabant) aumentou a frequência da atividade epileptiforme durante estados hiperexcitáveis sugerindo que tal efeito foi mediado por receptor CB1 através do bloqueio da inibição da supressão induzida pela despolarização (DSI) (Armstrong et al., 2009). Além disso, antagonista CB1 aumentou a frequência e reduziu o limiar durante a hiperexcitabilidade neuronal em modelos de *kindling* químico e elétrico (Wallace et al., 2002; Marsicano et al., 2003; Bernard et al., 2005; Chen et al., 2007). Resultados similares foram obtidos pela administração do antagonista de receptor CB1 SR141716A (1 μ M) ou AM251 (1 μ M) em cultura de neurônios demonstrado pelo aumento da atividade epileptiforme e pelo desenvolvimento de *status epilepticus* (Deshpande et al., 2007). Do ponto de vista clínico, o tratamento para controle de peso corporal com SR141716 induziu efeito pró-convulsivante em pacientes com história epilepsia confirmando que antagonistas CB1 interferem diretamente na gênese da crise convulsiva (Braakman et al., 2009).

Paradoxalmente, outros trabalhos mostraram que o antagonista CB1 AM251 reduziu o disparo neuronal *in vitro* sugerindo efeito anticonvulsivante (Dennis et al., 2008; Ma et al., 2008). Similarmente, a única aplicação do SR141716 (Rimonabant) preveniu a ocorrência da atividade epileptiforme no modelo de epilepsia pós-traumática (Echegoyen et al., 2009) assim como no estudo da atividade epileptiforme em cultura de neurônios expostos com agonista glutamatérgico, o tratamento com SR141716 ou AM251 exerceu propriedades anti-epileptogênicas sugerindo papel dos receptores CB1 na epileptogênese. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com antagonista

CB1, SR141716, não induziu efeito sobre a crise comportamental e eletroencefalográfica induzida por PTZ em ratos, sugerindo que a aplicação de antagonista CB1 induz efeitos contraditórios não representando estratégia ideal contra crises convulsivas experimentais.

Finalmente, nós testamos a influência do sistema endocanabinoide sobre a crise convulsiva induzida por PTZ utilizando o inibidor da FAAH, URB597, que aumenta a sinalização endocanabinoide por prevenir a hidrólise da anandamida (Di Marzo et al., 1994). A administração sistêmica do URB597 na dose de 3.0mg/kg promoveu proteção contra a crise comportamental e eletroencefalográfica. Tais resultados corroboram outros estudos que consideram os endocanabinoides um importante sistema neuromodulatório, por ser sintetizado sob demanda quando os neurônios são estimulados fornecendo proteção contra a excitotoxicidade no sistema nervoso central (Marsicano et al., 2003). Em outras palavras, o sistema endocanabinoide pode atuar como um sistema anti-crise endógeno mediado pela principalmente pela anandamida agindo em receptores CB1. Seus efeitos neuroprotetores foram demonstrados através do modelo de crise convulsiva por eletroquocoe (Wallace et al., 2002), crise induzida por ácido caínico (Karanian et al., 2007) e modelo de crise *in vitro* através de cultura de neurônio hipocampal (Deshpande et al., 2007). Trabalhos recentes utilizando inibidores duais da FAAH e MGL, enzimas que hidrolizam respectivamente a anandamida e o 2-AG, demonstram efeito neuroprotetor e anticonvulsivante contra a excitotoxicidade induzida pelo ácido kaínico, reforçando a ideia que o aumento da sinalização endógena sob demanda representaria a melhor estratégia contra a excitotoxicidade neuronal (Naidoo et al., 2010, 2012).

Sendo assim, nossos resultados sugerem que os receptores CB1 exercem complexo efeito modulatório sobre a crise induzida por PTZ em ratos. A ativação direta

de receptor CB1 facilita a crise comportamental e eletroencefalográfica exercendo efeito pró-convulsivante. Por outro lado, a facilitação do sistema endocanabinoide por inibição da enzima que hidrolisa a anandamida, mostrou efeito anticonvulsivante consistente, representando estratégia ideal contra crises convulsivas induzidas por PTZ.

4. Interação do sistema endocanabinoide e endovaniloide no modelo de crise aguda induzida por PTZ em camundongos

4.1- Sistemas endocanabinoide e endovanilóide

Os resultados apresentados até aqui demonstraram que a ativação do sistema endocanabinoide, através da inibição da hidrólise da anandamida, representa uma estratégia anticonvulsivante e neuroprotetora contra os modelos de crise convulsiva induzida por PTZ e pela cocaína. Tais efeitos são mediados por receptor canabinoide CB1 no sistema nervoso central. Porém, a anandamida também se liga a outro alvo, o canal de potencial receptor transitório vaniloide do tipo 1 (*transient receptor potential cation channel, subfamily Vanilloid, member 1*, TRPV1) o qual pode mediar funções distintas dessa substância. Pouco se tem estudado quanto ao possível envolvimento desse sistema nos efeitos dos endocanabinoides sobre crises convulsivas.

O receptor TRPV1 foi o primeiro membro da família de receptores vaniloides (TRPV1 à TRPV6) a ser caracterizado a partir de células de ratos localizadas em fibras aferentes primárias (Starowicz et al, 2007a; 2007b; Caterina et al, 1997). Esses receptores representam um subtipo não seletivo de canais para cátions que estão relacionados com a família de receptores de potencial transitório (TRP). Os do tipo vaniloide são assim denominados pelo fato de seus principais agonistas, a capsaicina [(8-methyl-N-vanilil-6-nonanamida), mais irritante constituinte ativo da *Capsicum sp*, popularmente conhecida como pimenta vermelha, e o seu potente análogo, a resiniferatoxina (RTX), possuírem em sua estrutura química o grupamento homovanilil (Szalassi & Blumberg, 1999). Os receptores TRPV1 estão envolvidos principalmente no desenvolvimento da dor neuropática e na inflamação em neurônios sensoriais. Eles são ativados por estímulos físicos tais como calor (>43°) e baixo pH, ou químicos, tais

como a capsaicina, além de ligantes endógenos como anandamida, a N-araquidonoildopamina (NADA), 12-S-ácido hidroperoxieicosatetranoico (12-HPETE), oleoiletanolamida e N-oleoildopamina (Caterina et al., 1997; Ross et al., 2001; Di Marzo, 2004; Starowicz et al, 2007b).

Embora os receptores TRPV1 e CB1 sejam coexpressos em várias regiões, incluindo o hipotálamo, cerebelo, córtex cerebral, estriado, mesencéfalo, hipocampo e substância negra, eles podem ter papéis opostos na modulação da atividade neuronal. Enquanto os canabinoides inibem atividade dos canais para cálcio, reduzindo a atividade neural e a liberação de neurotransmissores a ativação dos canais TRPV1 promove a liberação de glutamato, afetando indiretamente a liberação de GABA, dopamina e outras catecolaminas além de aumentar o influxo de cálcio e conseqüentemente o disparo neuronal contribuindo significativamente nos eventos epileptogênicos (Mezey et al., 2000; Roberts et al., 2004; Cristino et al., 2006). Além disso, a ativação do receptor TRPV1 desencadeia morte neuronal em culturas de células e interferem diretamente sobre a plasticidade sináptica levando a uma facilitação da LTP (*long-term potentiation*) e a uma supressão da LTD (*long-term depression*), eventos que aumentam a excitabilidade de células piramidais e estão intimamente relacionados com alterações moleculares encontradas na epilepsia (Marsch et al., 2007; Li et al., 2008). Dessa maneira, uma possível estratégia para o desenvolvimento de fármacos antiepilépticos com foco especificamente sobre canais TRPV1 incluiriam bloqueadores, antagonistas ou drogas que interferissem na sua sensibilização (Fu et al., 2009).

Considerando que a anandamida pode mediar efeitos opostos via receptor CB1 e TRPV1, uma estratégia interessante para o desenvolvimento de novos fármacos seria a utilização de drogas que bloqueassem de maneira dual a FAAH e a ativação dos

receptores TRPV1, direcionando as ações do ligante endógeno para a ativação de CB1 (Li et al., 2008). Dessa maneira, Micale et al., 2009 demonstraram que o inibidor dual da FAAH e receptores TRPV1, aradonoil serotonina (AA-5-HT), exerceu maior efeito ansiolítico em ratos que os inibidores seletivos da FAAH. Isto sugere que a ativação indireta simultânea de receptores CB1 pela inibição da FAAH, associado ao antagonismo de receptores TRPV1, poderia representar uma nova estratégia farmacológica no tratamento de transtornos de ansiedade.

Sendo assim, consideramos que o mesmo raciocínio poderia se aplicar a modelos de crises convulsivas. Portanto, testamos a hipótese de que AA-5-HT poderia prevenir a crise convulsiva induzida por PTZ (Pentilenotetrazol) em camundongos investigando a influência dos receptores CB1 e TRPV1 sobre tais efeitos.

4.2- Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, pesando entre 20-30 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos em grupos de cinco por gaiola, com livre acesso à água e comida, sob ciclo claro-escuro de doze horas (início às 7:00 horas) e temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os procedimentos para criação e experimentação animal estavam de acordo com os critérios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento e com o Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG. Os métodos propostos já foram aprovados por este comitê, com o protocolo número 127/2011.

4.3- Drogas

Inibidor dual da FAAH/TRPV1 aracdonoil serotonina, (AA-5-HT, Cayman Chemicals); antagonista seletivo de receptores CB1, (AM251, Cayman Chemical), antagonista para receptor TRPV1, (SB366791, Cayman Chemical) e Pentilenotrazol (PTZ, Sigma). Os compostos foram diluídos em etanol absoluto, cremofor e salina 0,9% na proporção de 1:1:18. As soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos e todas as injeções administradas intraperitonealmente (i.p) no volume de 1 ml/kg peso corporal, trinta minutos antes da administração do PTZ. O PTZ (Sigma) foi diluído em salina 0,9% e administrado na dose de 60mg/kg de acordo com Marquesan et al., 2013.

4.4- Determinação da crise convulsiva

Imediatamente após a administração intraperitoneal do PTZ (60mg/kg) todos os animais foram monitorados durante quinze minutos e a latência e duração (em segundos) para a crise tônico-clônica generalizada foram mensuradas. As crises generalizadas foram acompanhadas por ocorrência de corrida, pulos, perda de reflexo postural podendo evoluir com morte do animal. Todos os experimentos foram gravados em vídeo para análise comportamental.

4.5- Análise estatística

Os dados foram expressos como média +erro padrão e submetidos à análise de variância One-way (ANOVA) seguida pelo *pos test* de Dunnet com o nível de significância de $p < 0.05$.

A figura abaixo ilustra a sequência experimental utilizada:

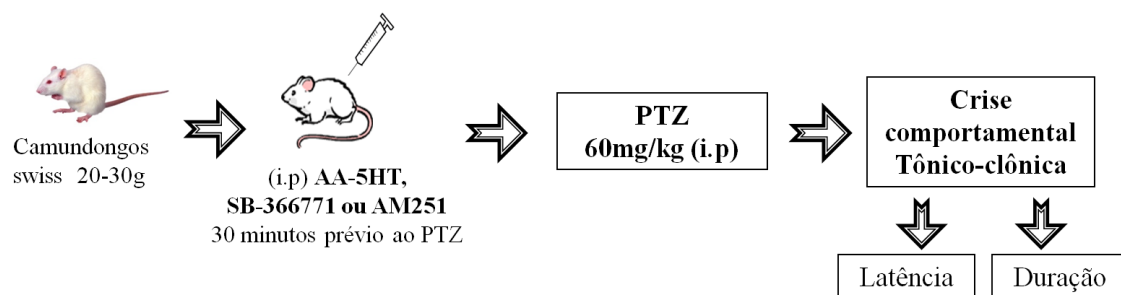


Figura 7: Desenho experimental no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ em camundongos.

4.6- Resultados

A figura 8 apresenta o efeito da injeção aguda de diferentes doses do inibidor dual da FAAH/TRPV1, AA-5-HT, sobre a crise tônico-clônica generalizada induzida por PTZ em camundongos. AA-5-HT na dose de 3.0 mg/kg aumentou a latência para ocorrência da crise tônico-clônica generalizada induzida por PTZ ($F_{3,34}=3.691$, $p=0.02$, Figura 8A) e reduziu a duração da crise ($F_{3,34}=4.196$, $p= 0.01$, Figura 8 B), revelando efeito anticonvulsivante.

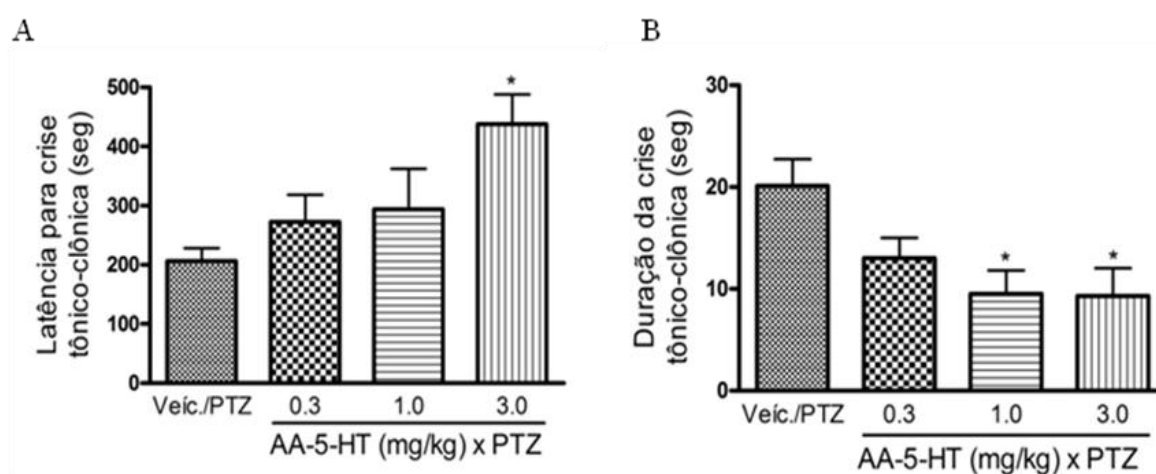


Figura 8- Efeito do inibidor dual para FAAH/TRPV1, AA-5HT (i.p.), sobre a crise tônico-clônica induzida por PTZ em camundongos. (A) AA-5HT na dose de 3.0 mg/kg aumentou significativamente a latência para a crise convulsiva induzida por PTZ comparado com o grupo Veículo/PTZ. (B) Administração intraperitoneal da AA-5HT na dose de 1.0 e 3.0 mg/kg reduziu significativamente a duração da crise tônico-clônica comparado com o grupo veículo/PTZ. * $p < 0.05$ comparado com o grupo veículo/PTZ. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 9-10 camundongos.

Para testar o papel dos receptores CB1 sobre os efeitos da AA-5HT, pré-tratamos os animais com diferentes doses do antagonista seletivo, AM251. Na dose maior, o antagonista CB1 foi capaz de prevenir o efeito anticonvulsivante do AA-5HT,

interferindo sobre a latência ($F_{3,45}=2.82$, $p<0.05$) e duração ($F_{3,45}= 3.047$, $p<0.05$) (Figura 9A e 9B).

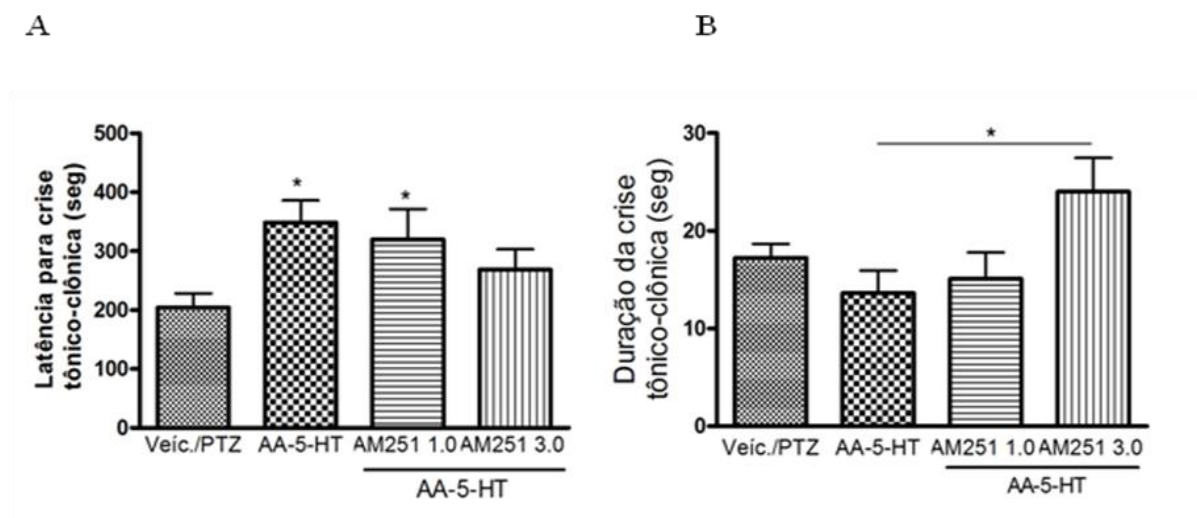


Figura 9- Efeito do antagonista para receptor CB1, AM251(i.p.), sobre a crise tônico clônica induzida por PTZ em camundongos. (A) AM251 na dose de 3.0 mg/kg preveniu o efeito anticonvulsivante mediado pela AA-5-HT. (B) Administração intraperitoneal de AM251 na dose de 3.0 mg/kg aumentou significativamente a duração da crise tônico-clônica comparado com o grupo veículo/PTZ. * $p < 0.05$ comparado com o grupo veículo/PTZ. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 10-13 camundongos.

A fim de investigar se os receptores TRPV1 exercem efeito por si só contra a crise convulsiva induzida por PTZ, testamos o antagonista seletivo, SB-366791 (0.1, 0.3, 1.0 mg/kg, i.p.). A administração do SB-366791 tendeu a induzir efeito anticonvulsivante embora a análise de variância ANOVA não detectou efeito significativo sobre a latência ($F_{3,41} = 1.327$, $p=0.279$, Figura 10A) e duração ($F_{3,41} = 2.145$, $p= 0.109$, Figura 10B). Por outro lado, a análise *pos hoc* com Dunnet detectou efeito da dose intermediária sobre a duração da crise ($p<0.05$).

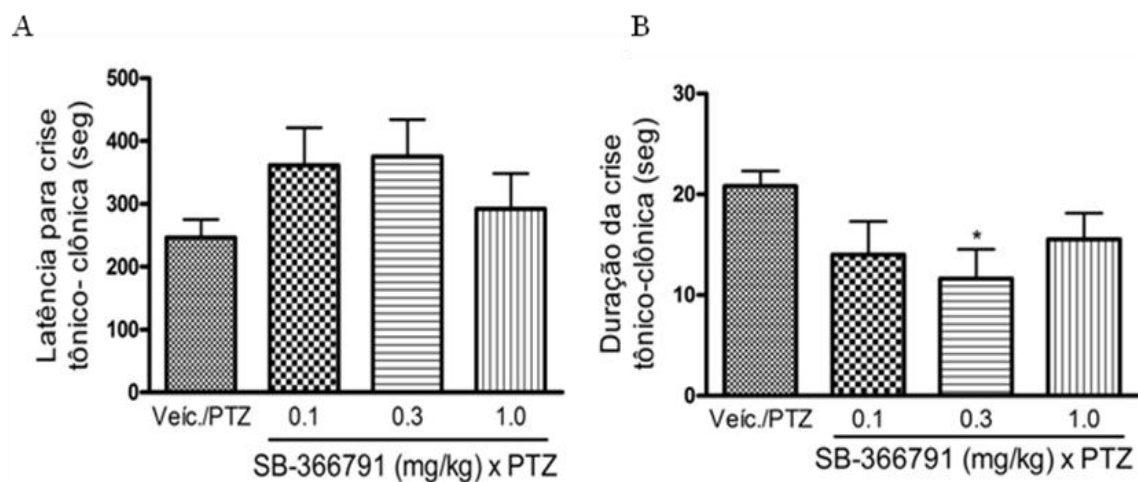


Figura 10- Efeito do antagonista para o receptor TRPV1, SB-366791 (i.p.), sobre a crise tônico clônica induzida por PTZ em camundongos. (A) SB-366791 não exerceu efeito sobre a latência para crise convulsiva induzida por PTZ em camundongo embora haja tendência anticonvulsivante da dose intermediária. (B) Administração intraperitoneal do SB-366791 na dose de 1.0 mg/kg reduziu significativamente a duração da crise tônico-clônica comparado com o grupo veículo/PTZ. * $p < 0.05$ comparado com o grupo veículo/PTZ. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 11-12 camundongos.

4.7 Discussão

Os últimos resultados apresentados envolvendo a participação do sistema endovaniloide sobre a crise convulsiva induzida por PTZ demonstraram claramente que o inibidor dual da enzima que hidrolisa a anandamida (FAAH) e dos receptores TRPV1 aumentou a latência e reduziu a duração da crise comportamental tônico-clônica induzida pela administração intraperitoneal de PTZ em camundongos. Esse efeito foi revertido pela administração do antagonista CB1, AM251 e parcialmente mimetizado pelo antagonista TRPV1, SB366791.

PTZ representa uma típica droga de ação pró-convulsivante do sistema nervoso central podendo ser administrada por via endovenosa, subcutânea ou intraperitoneal em ratos ou camundongos e seus efeitos são mensurados através da análise sobre a latência e duração da crise convulsiva (Loscher, 2009; Craig & Colassanti, 1987). Nossos resultados comprovaram que a administração intraperitoneal do PTZ na dose de 60mg/kg induziu crises convulsivas do tipo tônico-clônica generalizada em 100% dos animais tratados com a droga. Trabalho recente demonstrou que a administração intraperitoneal de PTZ na mesma dose em camundongos promoveu crise convulsiva comportamental tônico-clônica sem induzir letalidade observado nos modelos de infusão intravenosa contínua (Marquezan et al., 2012).

Vários estudos tem destacado a relevância do sistema endocanabinoide no controle do circuito epileptogênico através da ativação do receptor CB1 no sistema nervoso central, fornecendo proteção sob demanda contra a excitotoxicidade aguda (Monory et al., 2006). Inibidores seletivos da FAAH reduzem a severidade e duração das crises convulsivas conferindo neuroproteção contra os insultos neuronais gerados por excitotoxicidade aguda (Naidoo et al., 2012). Demonstramos anteriormente que o inibidor da FAAH, URB597, exerce efeito anticonvulsivante por aumentar a latência da

crise comportamental e reduzir a duração da crise eletroencefalográfica no modelo de infusão intravenosa de PTZ em ratos (Vilela et al., 2013). Além disso, a utilização desses inibidores da FAAH não induzem efeitos psicotrópicos e contraditórios observados na ativação direta do receptor CB1 (Clement et al., 2003).

Por outro lado, Deshpande et al., 2007 demonstraram que o antagonista do receptor CB1, AM251, alterou o tônus endocanabinoide causando o desenvolvimento de *status epilepticus* em modelo de cultura de neurônios hipocampais. Adicionalmente, *in vivo*, experimentos demonstraram que o AM251 promoveu efeito pró-convulsivante nas doses entre 0.75–3.0 mg/kg (i.p.) sobre a crise induzida por PTZ em camundongos (Shafaroodi et al., 2004). Nossos resultados apontaram que a administração intraperitoneal do antagonista CB1, AM251, não induziu crise convulsiva por si só, porém na dose de 3.0mg/kg preveniu o efeito anticonvulsivante observado com o AA-5HT.

Demonstramos também que o antagonista TRPV1, SB366791 mimetizou parcialmente os efeitos do AA-5HT. Dessa forma, entendemos que o bloqueio dos receptores TRPV1 pode ser necessário para a potencialização do efeito anticonvulsivante observado com AA-5HT, embora esse mecanismo sozinho seja menos eficaz. A anandamida, representada como principal endocanabinoide, pode se ligar a canais iônicos do tipo TRPV1, independente de sua ação a receptores CB1, exercendo implicações sobre a neurotransmissão e na função neuronal (Van der Stelt & Di Marzo, 2005). Recentemente foi demonstrado que anandamida pode exercer efeitos pró ou anticonvulsivantes, dependendo da dose administrada, por ativação TRPV1 e CB1, respectivamente, no modelo de crise convulsiva induzida por PTZ em camundongos (Manna & Umathe, 2012). A ativação TRPV1 tem papel durante mecanismos epileptogênicos através da permeabilidade para Na⁺ e Ca²⁺, causando

despolarização e aumento do disparo neuronal, aumento da liberação de glutamato e facilitação do LTP e supressão do LTD no hipocampo (Starowicz et al., 2007a; 2007b; Manna & Umathe, 2012). Estudo recente com humanos demonstrou que o polimorfismo genético do receptor TRPV1 afeta a excitabilidade neuronal mensurada por estimulação elétrica transcraniana, enfatizando o papel desses canais na modulação da excitabilidade cortical (Mori et al., 2012). Consistente com essa ideia, estudos comprovaram um significativo aumento da expressão de TRPV1 no hipocampo e córtex de pacientes epiléticos e no giro denteado de camundongos com epilepsia do lobo temporal quando comparado aos seus respectivos controles (Bhaskaran & Smith, 2010; Sun et al., 2013). Embora nos últimos anos tenham se intensificado estudos sobre a interação do sistema endovaniloide e endocanabinoide sobre a excitabilidade neuronal, são necessárias mais pesquisas clínicas e experimentais para se compreender a interação dos sistemas visando estratégias futuras inovadoras contra eventos excitotóxicos.

Portanto, como conclusão parcial, nossos resultados indicam que o aumento da sinalização CB1-anandamida associado ao bloqueio TRPV1 promove efeito anticonvulsivante no modelo de administração intraperitoneal de PTZ em camundongos. A interação entre os sistemas endocanabinoide e endovaniloide parece extremamente relevante na modulação da crise, podendo representar novas estratégias para o desenvolvimento de drogas antiepiléticas.

5. O sistema endocanabinoide e crises convulsivas induzidas por cocaína

5.1. Modelo de crise convulsiva induzida por overdose de cocaína

A cocaína é um alcalóide extraído da *Erythroxylum coca*, com ação psicoestimulante e psicotomimética, que quando consumida causa euforia, diminuição da fadiga e aumento da atividade locomotora. O uso dessa substância pode levar à dependência, complicações cardiovasculares, distúrbios neurológicos e psiquiátricos (Lason, 2001; Nieoczym et al., 2009). Geralmente, a cocaína é apresentada na forma de pó, podendo ser administrada por via intranasal ou intravenosa, assim como a sua forma de base livre (“crack”) pode ser inalada (Associação Brasileira de Psiquiatria, 2012). Atualmente, a cocaína é uma das drogas mais utilizadas no Brasil de maneira abusiva e não aprovada, representando um grave problema social por seu potencial tóxico e adictivo (Duailibi et al., 2008).

Do ponto de vista farmacológico, a cocaína pertence ao grupo das substâncias simpaticomiméticas de ação indireta, provocando aumento de neurotransmissores na fenda sináptica, particularmente dopamina, noradrenalina e serotonina. Sua ação ocorre primariamente nos sistemas mesolímbico e mesocortical, aumentando a sinalização monoaminérgica principalmente através do bloqueio da recaptção (Macedo et al., 2010). Além disso, essa substância pode interferir com outras classes de neurotransmissores, tais como sistema glutamatérgico e gabaérgico (Lason, 2001).

Como mencionado anteriormente, a exposição a altas doses de cocaína pode exercer efeitos deletérios no sistema cardiovascular e sistema nervoso central. Aproximadamente 3-10% dos indivíduos intoxicados por cocaína admitidos em serviços de emergência desenvolvem episódios de crise convulsiva (Koppel et al., 1996). De modo geral, as crises convulsivas induzidas por cocaína se manifestam como ataques

tônico-clônicos generalizados ou estado de mal epilético (*status epilepticus*) capazes de produzir modificações epileptogênicas (Majlesi et al., 2009). Essas crises são, na maioria das vezes, resistentes a anticonvulsivantes clássicos, tais como benzodiazepínicos e barbitúricos, constituindo a maior fração de morte relacionada à overdose por cocaína (Koppel et al., 1996; Gaval Cruz et al., 2008; Xu et al., 2010). Por outro lado, as crises convulsivas podem ser também desencadeadas por abuso de cocaína em pacientes com desordens neurológicas preexistentes como epilepsia idiopática ou doenças cerebrovasculares (Koppel et al., 1996, Leach et al., 2012).

Diferentes trabalhos em animais experimentais vêm demonstrando que a administração aguda com altas doses de cocaína promove, de fato, crises convulsivas, *status epilepticus*, dessincronização eletroencefalográfica e morte (Kiyatkin & Smirnov, 2010). Paralelamente, é reconhecido que as crises convulsivas induzidas por overdose de cocaína aumentam o estresse oxidativo celular, o que poderia levar à neurodegeneração.

Considerando o efeito protetor do sistema endocanabinoide contra crises convulsivas induzidas por PTZ, especialmente através da inibição da hidrólise da anandamida, testamos a hipótese de que este sistema também poderia exercer efeito contra a crise convulsiva induzida por altas doses de cocaína.

5.2 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, pesando entre 25-30 gramas, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos em grupos de cinco por gaiola, com livre acesso à água e comida, sob ciclo claro-escuro de 12 horas (início às 7:00 horas) e temperatura controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$). Todos os procedimentos para criação e experimentação animal

estavam de acordo com os critérios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento e com o Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG. Os métodos propostos já foram aprovados por este comitê, com o protocolo número 242/2013.

5.3 Drogas

Inibidor da FAAH, URB597 (Cayman Chemicals); antagonista seletivo de receptores CB1, (AM251, Cayman Chemical), agonista seletivo para receptor CB1, (ACEA) e cocaína (Merck). Os compostos canabinoides foram diluídos em etanol absoluto, cremofor e salina 0,9% na proporção de 1:1:18. As soluções foram preparadas imediatamente antes dos experimentos e todas as injeções administradas intraperitonealmente (i.p) no volume de 1 ml/kg peso corporal, trinta minutos antes da administração da cocaína. A cocaína (Sigma) foi diluída em salina 0,9% e administrada nas doses de 50mg/kg, 75 mg/kg e 100mg/kg, conforme trabalhos previamente publicados (Lason, 2001; Hayase et al., 2001; Gasior et al.,2004).

5.4 Cirurgia estereotáxica para implantação de eletrodos corticais

Os animais foram anestesiados intraperitonealmente (i.p) com ketamina (60mg/kg) e xilazina (8mg/kg) e fixados em um aparelho estereotáxico (Davis Kopf model 960) para a implantação de eletrodos (*Fine Sciences Tools*, mod.19010-00) posicionados no córtex parietal esquerdo e direito e no osso nasal. Após o correto posicionamento, os eletrodos foram fixados e soldados a um conector modelo barra de pinos. Foi utilizado pentabiótico Baytril® na dose 5,0 mg/kg, como medida profilática contra infecções e antiinflamatório Banamine® (flunixin meglumine, 1 ml/Kg). Após a

recuperação da anestesia, os animais foram alojados no biotério até seu restabelecimento (cinco dias) e então submetidos aos procedimentos experimentais.

5.5 Determinação da crise convulsiva

Todos os animais receberam cocaína (50, 75 e 100 mg/kg) ou veículo trinta minutos após o tratamento com compostos canabinoides. Imediatamente após a injeção de cocaína, os animais foram colocados na arena, constituída por cilindro de acrílico transparente (40 cm de diâmetro e 50 cm de altura), aberto na extremidade superior e cuja base inferior está encaixada em um plano geométrico quadrado para avaliação comportamental da crise convulsiva.

As crises foram definidas como perda da resposta de endireitamento e ocorrências de movimentos clônicos das patas dianteiras de acordo com a escala de severidade de Velisek et al., 1992. Uma vez desenvolvida a crise, a perda da resposta locomotora foi avaliada por trinta minutos. O efeito anticonvulsivante dos compostos canabinoides foram definidos como habilidade de suprimir as crises convulsivas induzidas por cocaína de acordo com Gasior et al.,(1997; 1999; 2004). Foram avaliadas a latência, duração da mioclonia das patas dianteiras assim como a porcentagem de letalidade. Todos os experimentos foram gravados em vídeo para análise comportamental.

5.6 Eletroencefalograma (EEG)

O protocolo de gravação do video-EEG foi iniciado um minuto antes da administração intraperitoneal da cocaína até 10 minutos após a crise generalizada tônico-clônica. O sinal do EEG foi amplificado (5000x), filtrado (1Hz alta frequência e 500 Hz baixa frequência) com amostra de 1kHz e estocado em um computador convencional. As gravações foram analisadas off-line de acordo com as seguintes

variáveis: (1) latência para o início da primeira descarga epileptiforme; (2) duração da crise eletroencefalográfica - mioclônica e (3) início da crise eletroencefalográfica - tônico-clônica. Foram consideradas crises eletroencefalográficas quando os disparos (“*spikes*”) excediam duas ou três vezes da amplitude basal, com frequência > 3Hz (crise mioclônica) e frequência >8Hz (crise generalizada tônico-clônica).

5.7 Preparação de culturas primárias de neurônios para o ensaio de morte celular

Para testar a hipótese de que compostos que facilitam as ações do sistema endocanabinoide possam atenuar a morte celular induzida por cocaína, foram realizados experimentos *in vitro* com cultura de células, em triplicada. Culturas neuronais foram preparadas a partir do hipocampo do cérebro de neonatos de camundongos da linhagem C57. Após a dissecação, o tecido referente ao hipocampo foi submetido à digestão com tripsina e dissociado com pipeta Pasteur polida no fogo. Células foram plaqueadas em placas tratadas com poli-L-ornitina em meio neurobasal suplementado com N2 e B27, glutamax 2 mM, penicilina 50 mg/ml e streptomicina 50 mg/ml. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ em uma incubadora com umidificador e cultivadas entre dez a doze dias *in vitro* (DIV) com troca de meio a cada quatro dias. Para investigar o mecanismo molecular neuroprotetor dos canabinoides contra a atividade neurotóxica da cocaína, culturas primárias de neurônios foram incubadas por vinte horas com cocaína 500 µM na presença ou na ausência de URB597 (1, 10 e 100 nM). A morte neuronal foi determinada utilizando o *live/dead assay kit*. A marcação dos neurônios com calceína-AM (2 µM) e homodímero de etídio (2 µM) determinou a fração de células vivas e mortas, respectivamente. Neurônios foram visualizados por microscópio de fluorescência e as imagens foram capturadas por uma câmera CCD e o software

Northern Eclipse. As células mortas foram expressas como porcentagem do número total de células.

5.8 Avaliação da morte celular em fatias de hipocampo

Vinte e quatro horas após a administração intraperitoneal de 75mg/kg cocaína os animais foram sacrificados por decapitação. Na sequência, o encéfalo foi rapidamente e cuidadosamente removido e transferido para imersão em solução gelada (4°C) de aCSF (em mM: NaCl 125, KCl 2,5, MgCl₂ 3,0, CaCl₂ 0,1, glicose 25, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1,25; pH 7,4) oxigenada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5 % CO₂) e seccionados em fatias transversais de 400µm em vibrátomo (Vibratome, Series 1000 – *Technical Products International*).

Para quantificação da morte celular foi utilizado o marcador homodímero de etídio (EthD-1; Molecular Probes Inc.,USA). Após a secção dos encéfalos, as fatias de ambos os grupos foram submetidas, separadamente, aos seguintes procedimentos, todos realizados à temperatura ambiente e protegidos da luz:

- ✓ Marcação com EthD-1 (2mM), por 30 minutos, em presença de aCSF oxigenado e contendo glicose.
- ✓ Lavagem com aCSF oxigenado e contendo glicose por 15min;
- ✓ Fixação em paraformaldeído 4% por 15 minutos;
- ✓ Lavagem com tampão fosfato (PB) por 5 minutos;
- ✓ Lavagem rápida com aCSF, duas vezes;
- ✓ Montagem em lâminas com hydromount (National Diagnostics, USA);
- ✓ Aquisição das imagens em microscópio de fluorescência (Axio Imager M2 - Zeiss).

As imagens no microscópio de fluorescência foram adquiridas através do software Carl Zeiss Axiovision 4.8, com aumentos de 20x. As regiões CA1 e giro

denteado foram selecionadas e a captação da fluorescência resultante da marcação com EthD-1 foi realizada através de um filtro óptico correspondente a seu comprimento de onda (excitação/emissão: 528/617nm). As imagens adquiridas foram salvas em alta resolução (1024x768) e gravadas em arquivos no formato *.tif para posterior quantificação.

A análise quantitativa das imagens foram realizadas no software livre ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). As imagens foram inicialmente convertidas para 8-bits e processadas igualmente para diminuição do background. A porcentagem de células mortas marcadas foram quantificadas equivalentes a intensidade dos pixels por região selecionada.

5.9 Análise estatística

Os dados foram expressos como média +erro padrão e submetidos à análise de variância One-way (ANOVA) seguida por análise de comparação múltipla de Newman-Keuls. Os dados de porcentagem foram avaliados pelo teste Qui-quadrado. O nível de significância estabelecido será $p < 0,05$.

A figura abaixo sumariza a sequência experimental *in vivo* e *in vitro*:

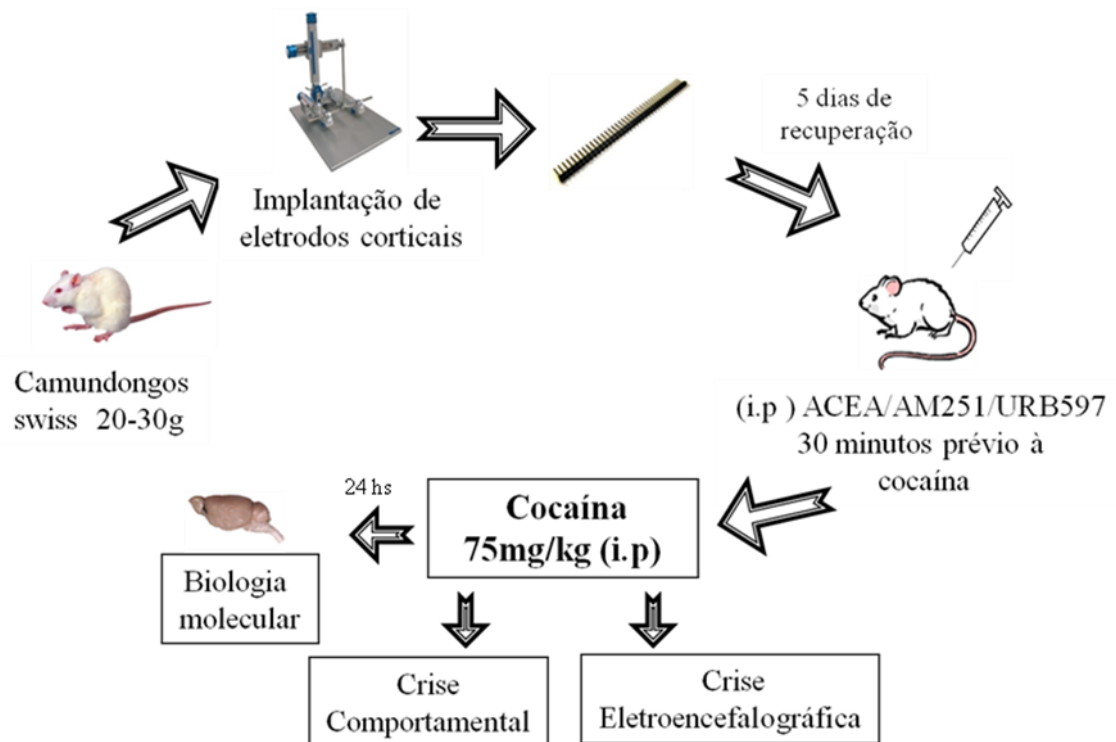


Figura 11 – Representação dos procedimentos experimentais no modelo de crise induzida por overdose de cocaína.

5.10 Resultados

Diferentes doses de cocaína foram administradas (50 mg/kg; 75 mg/kg; 100 mg/kg, i.p) com objetivo de estabelecer a dose mais eficaz para o desenvolvimento das crises convulsivas. Todas as doses utilizadas foram baseadas em trabalhos publicados anteriormente (Witkin et al., 2008; Kathleen et al., 2000).

A administração de cocaína nas doses de 75 mg/kg e 100 mg/kg produziu efeito significativo sobre a latência para o início da crise mioclônica ($F_{3,22} = 244.9$, $P < 0,0001$). A análise *pos hoc* utilizando o teste Newman-Keuls mostrou que a cocaína administrada nas doses de 75 mg/kg e 100 mg/kg reduziu a latência para o início da crise mioclônica (efeito pró-convulsivante) quando comparado ao grupo veículo ($P < 0,001$) (Figura 12A). Com relação à duração da crise mioclônica o pré-tratamento com cocaína na dose de 75 mg/kg produziu efeito significativo quando comparado ao grupo veículo ($F_{3,24} = 14.81$, $P < 0,0001$). A análise *pos hoc* mostrou que o pré-tratamento com cocaína na dose de 75 mg/kg aumentou a duração da crise mioclônica ($P < 0,001$) quando comparado ao grupo veículo (Figura 12B). Além disso, a dose de 75 mg/kg foi mais eficaz por não produzir efeito sobre a letalidade induzida por overdose de cocaína, diferentemente da dose de 100 mg/kg que apresentou aumento significativo sobre a letalidade (dados não apresentados). Dessa forma, a dose escolhida para determinar os efeitos dos compostos canabinoides sobre a crise convulsiva induzida por cocaína foi a de 75 mg/kg.

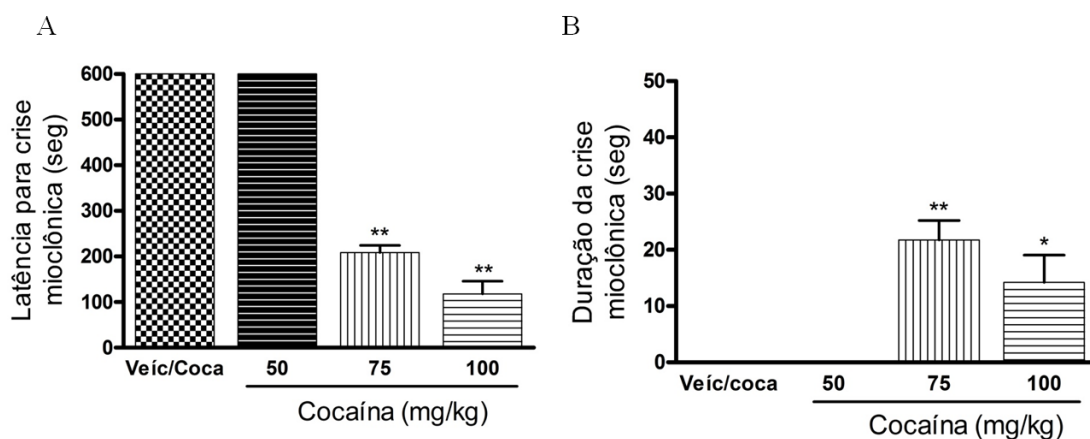


Figura12 - Caracterização da crise convulsiva induzida por diferentes doses de cocaína (50; 75; 100 mg/kg, i.p). (A) Administração de cocaína nas doses de 75 mg/kg e 100 mg/kg reduziu significativamente a latência para o início da crise mioclônica (efeito proconvulsivante) comparado com grupo veículo. (B) Administração aguda de cocaína nas doses de 75 mg/kg e 100mg/kg produziu um aumento da duração da crise mioclônica quando comprado ao grupo veículo. **P <0.001 comparado com grupo veículo. *P <0.01 comparado com grupo veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 6-8 camundongos.

A fim de testar se a ativação direta do receptor canabinoide CB1 influenciaria na expressão das crises convulsivas induzidas por cocaína, utilizamos o agonista seletivo do receptor canabinoide CB1, ACEA, trinta minutos antes da administração intraperitoneal de cocaína. O tratamento com ACEA na dose de 2.0mg/kg aumentou significativamente a latência para crise comportamental mioclônica quando comparado ao grupo veículo ($F_{3,28}=3.748$, $p<0.02$). A análise *pos hoc* confirmou que o ACEA na mesma dose apresenta efeito anticonvulsivante quando comparado ao grupo controle ($p<0.05$) (Figura 13A).

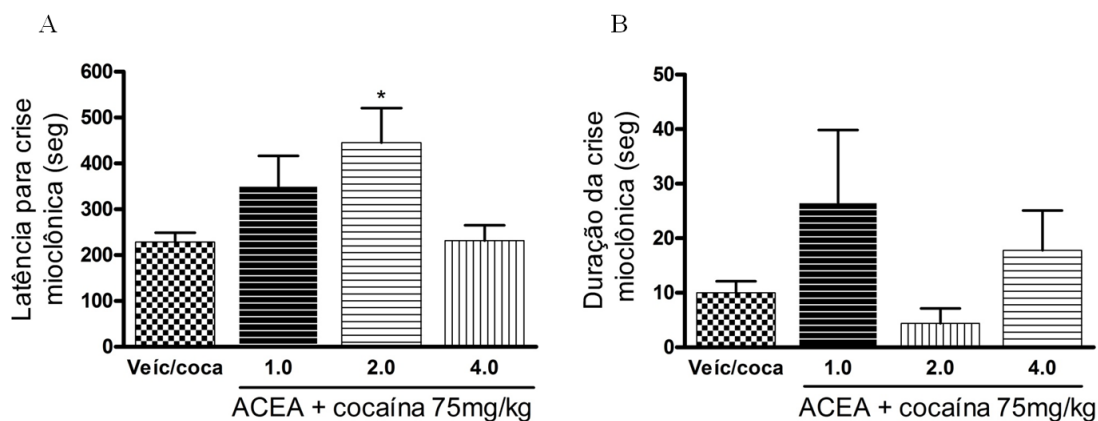


Figura 13- Efeito do ACEA, agonista seletivo de receptor CB1, sobre a crise convulsiva induzida por cocaína. (A) O tratamento com ACEA na dose de 2.0mg/kg previamente a cocaína aumentou significativamente a latência da crise mioclônica em relação ao grupo veículo/cocaína. (B) Administração intraperitoneal (i.p) do ACEA nas doses de 1.0, 2.0 e 4.0 mg/kg não exerceu efeito sobre a duração da crise comportamental mioclônica. *P <0.05 comparado com grupo veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 8 camundongos.

Nesse contexto, procuramos investigar se a ativação do receptor canabinoide sob demanda pelo aumento dos níveis endógenos de anandamida através do inibidor da FAAH, URB597, promoveria efeito similar a ativação direta do receptor CB1. Surpreendentemente, a administração do URB597 na dose de 1.0 mg/kg, trinta minutos antes da administração de cocaína (i.p) na dose de 75 mg/kg, produziu efeito significativo sobre a latência para início da crise mioclônica ($F_{2,29}=5.779$, $P<0,003$) e duração da crise mioclônica ($F_{3,28}=3,853$, $P<0,02$). A análise *pos hoc* com Newman-Keuls demonstrou que a dose de 1.0 mg/kg de URB597 foi capaz de aumentar a latência para início da crise mioclônica ($P<0,01$) (Figura 14A) e reduzir a duração da mesma ($P<0,01$) exercendo novamente efeito anticonvulsivante (Figura 14B). Além disso, a administração de URB597 na dose de 1.0 mg/kg reduziu drasticamente a letalidade induzida pela cocaína (Tabela 4).

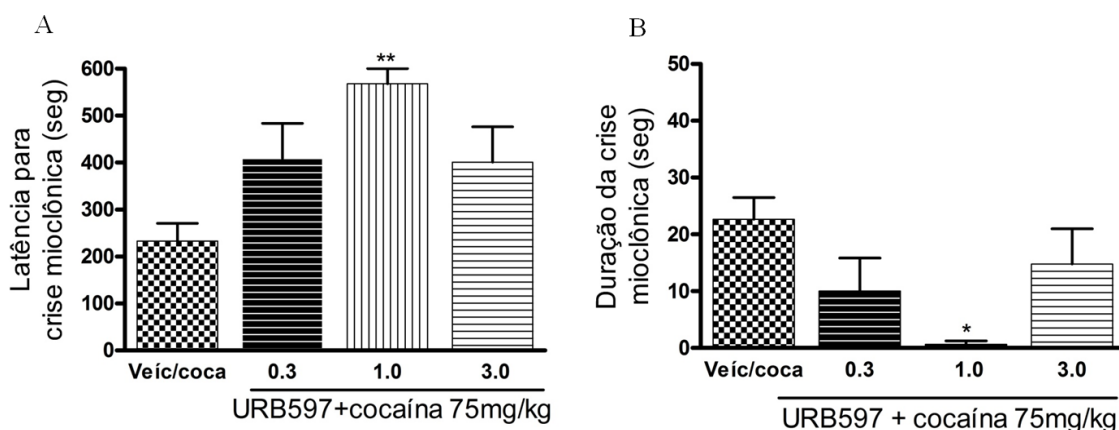


Figura 14 - Efeito de diferentes doses do inibidor da hidrólise da anandamida, URB597 (0.3;1.0;3.0mg/kg, i.p.) sobre a crise convulsiva induzida por cocaína em camundongos. (A) Administração do URB597 (1.0 mg/kg, i.p.) aumentou significativamente a latência para o início da crise mioclônica (efeito anticonvulsivante) quando comparado com grupo veículo (B) Administração do URB597 na dose de 1.0mg/kg reduziu a duração da crise mioclônica comparado ao grupo veículo. *P < 0.05 comparado com grupo veículo. **P < 0.01 comparado com grupo veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 8-9 camundongos.

Tabela 4 – Efeitos da administração de compostos canabinoides sobre a letalidade induzida pelo tratamento agudo com altas doses de cocaína (75mg/kg).

Veíc./cocaína	URB597 1.0/cocaína	AM251 1.0/URB597 1.0/cocaína
2/10 (20%)	0/10 (0%)	4/10 (40%)

Para certificar a participação dos receptores CB1 no controle da crise comportamental induzida por altas doses de cocaína, testamos o antagonista de receptor CB1, AM251 em três diferentes doses, conforme apresentado em trabalhos prévios. Interessantemente, nenhuma das doses administradas de AM251 exerceu efeito sobre os parâmetros avaliados latência ($F_{3,34}=0.2114$, n.s) e duração ($F_{3,34}=0.7025$, n.s) da crise convulsiva, conforme apresentado na figura 15 abaixo:

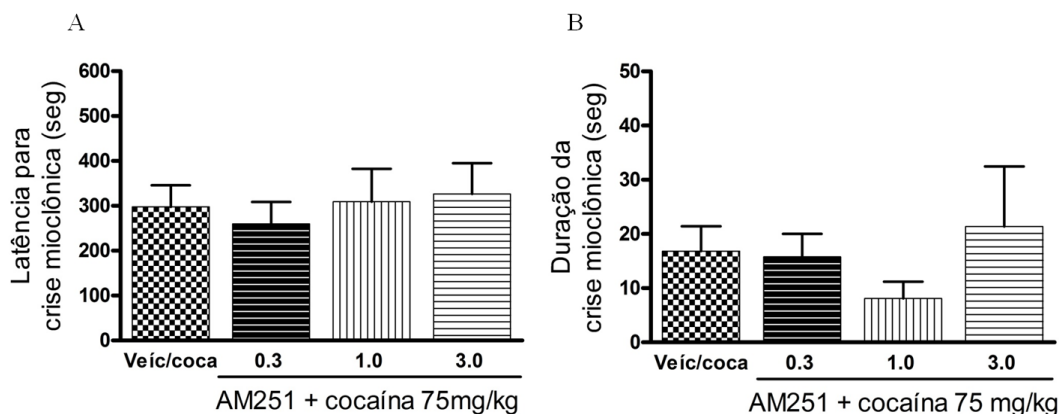
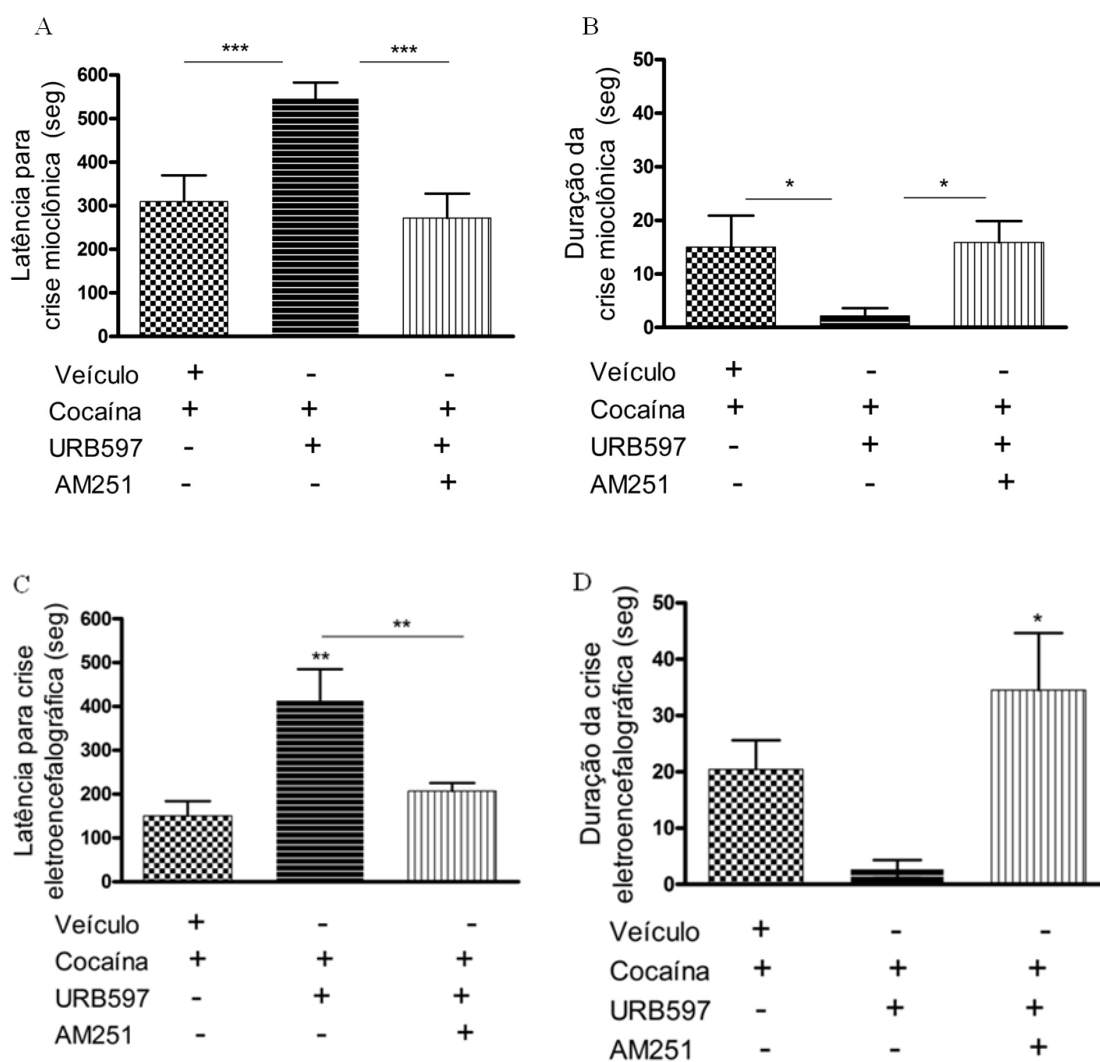


Figura 15- Efeito do AM251, antagonista de receptor CB1, sobre a crise convulsiva induzida por cocaína. (A,B) O tratamento com AM251 nas doses de 0.3, 1.0 e 3.0 mg/kg não promoveu efeito sobre a latência e duração da crise mioclônica induzida por cocaína (75mg/kg) em relação ao grupo veículo/cocaína ($p > 0.05$). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 9-11 camundongos.

Tendo em vista a consistência dos resultados que o inibidor da hidrólise da anandamida, URB597, na dose de 1.0mg/kg promoveu efeito anticonvulsivante nos parâmetros de latência e duração da crise convulsiva, além de promover efeito neuroprotetor contra a letalidade induzida por cocaína, procuramos investigar se esses efeitos seriam mediados por receptor CB1. Para tal, administramos previamente ao URB597 na dose de 1.0mg/kg, o antagonista CB1, AM251, na mesma dose. Interessantemente, o tratamento com AM251 na dose de 1.0mg/kg promoveu efeito sobre a latência ($F_{2,27}=8.325$, $p < 0.001$) e a duração ($F_{2,27}=3.359$, $p < 0.04$) da crise induzida por cocaína. A análise *post hoc* confirmou que o AM251 na dose de 1.0 mg/kg, administrado previamente, preveniu os efeitos do URB597, aumentando a latência ($P < 0,001$) e reduzindo a duração da crise mioclônica ($P < 0,05$) (Figura 16A e 16B). Comprovado o envolvimento do receptor CB1 no controle da crise comportamental induzida por altas doses de cocaína utilizamos uma abordagem específica através da avaliação da crise eletroencefalográfica induzida por cocaína.

Dessa forma, a administração do URB597 na dose de 1.0mg/kg aumentou a latência para a crise eletroencefalográfica ($F_{2,20}=8.538$, $p<0.002$), comprovado pelo teste *pos hoc* com Newman-Keuls (efeito anticonvulsivante) ($p<0.01$) e o pré tratamento com AM251 na mesma dose reduziu a latência ($F_{2,20}=8.538$, $p<0.002$) e aumentou a duração ($F_{2,20}=5.746$, $p<0.01$) da crise eletroencefalográfica. Análise *pos hoc* confirmou que o AM251 reverteu os efeitos do URB597 promovendo redução da latência ($p<0.01$) e aumento da duração ($p<0.01$) da crise eletroencefalográfica (Figura 16C e 16D). Imagens representativas do eletroencefalograma podem ser vistas na figura 16E.



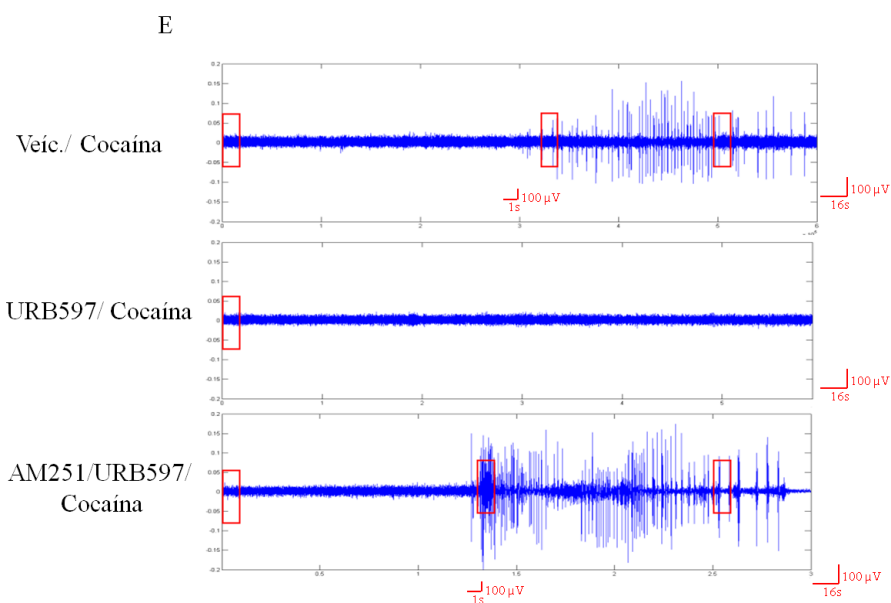


Figura 16– Envolvimento do receptor CB1 nas crises comportamentais e eletroencefalográficas induzida por cocaína. O tratamento com AM251 na dose de 1.0mg/kg previamente ao URB597 aumentou a latência (A) e reduziu a duração (B) da crise comportamental mioclônica induzida por cocaína. (C) Administração intraperitoneal (i.p) do AM251 na dose de 1.0mg/kg previamente ao URB597 reduziu a latência para crise eletroencefalográfica quando comparado ao URB597. (D) AM251 na dose de 1.0mg/kg aumentou a duração da crise eletroencefalográfica quando comparado ao grupo URB597/cocaína. (E) Figura representativa da análise dos dados eletroencefalográficos pode ser vista em E *P <0.05 comparado com grupo URB597. **P <0.01.. ***P <0.001. Os dados foram expressos como media \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 7-10 camundongos.

A tabela abaixo sumariza os efeitos dos compostos canabinoides e do inibidor da hidrólise da anandamida sobre a porcentagem de crise convulsiva induzida por cocaína.

Tabela 5: Efeitos da cocaína e de compostos canabinoides sobre a porcentagem de crise comportamental

Tratamento	Veíc/cocaína	50mg/kg	75mg/kg	100mg/kg
Cocaína	6/6 (100%)	0/6 (0%)	8/8 (100%)	6/6 (100%)
	Veículo	0.1mg/kg	1.0mg/kg	3.0mg/kg
AM251	9/9 (100%)	8/9 (88.8%)	6/9 (66.6%)	6/9 (66.6%)
URB597	9/9 (100%)	4/8 (50%)	1/8 (12.5%)*	4/8 (50%)
	Veículo	1.0mg/kg	2.0mg/kg	4.0mg/kg
ACEA	8/8 (100%)	6/8 (75%)	5/8 (62.5%)	8/8 (100%)

*** p<0.001

Conforme os resultados apresentados anteriormente, o inibidor da FAAH, URB597 promoveu efeito anticonvulsivante nas crises comportamentais e eletroencefalográficas além de reduzir a porcentagem de ocorrência das mesmas. Dessa maneira, passamos a analisar através de outras abordagens metodológicas o papel dos inibidores da hidrólise da anandamida sobre a neurotoxicidade induzida por cocaína. Culturas de neurônios hipocâmpais tratadas com diferentes concentrações de cocaína (25,100, 250, 500, 750 e 1000 μ M) exibiram de maneira dose dependente aumento da porcentagem de morte neuronal em comparação a cultura não tratada ($F_{6,21}=10.95$, $p<0.0001$). A análise *pos hoc* por Newman-Keuls confirmou que o tratamento de cocaína nas concentrações de 100, 250 e 750 μ M ($p<0.01$) e 500 e 1000 μ M ($p<0.001$) apresentaram aumento da porcentagem de morte celular (efeito neurotóxico) quando comparadas ao grupo não tratado (figura 17A). Para avaliação *in vitro* do inibidor da hidrólise da anandamida URB597 sobre a morte neuronal induzida por cocaína utilizamos a concentração de 500 μ M de cocaína na presença ou não do URB597 em três diferentes concentrações (1, 10 e 100nM). URB597 na concentração de 10nM reduziu a porcentagem de morte neuronal induzido por cocaína na concentração de 500 μ M apresentando efeito neuroprotetor ($F_{4,17}=6.728$, $p<0.001$). O teste *pos hoc*

confirmou o efeito neuroprotetor induzido por URB597 na concentração de 10nM ($p < 0.05$) (figura 17C). Com intuito de comprovar se efeito neuroprotetor do URB597 na concentração de 10nM foi mediado por receptor CB1, utilizamos o antagonista do receptor CB1, AM251, na concentração de 1nM previamente ao URB597. Novamente observamos que cultura de neurônios hipocampais tratadas com cocaína na concentração de 500 μ M apresentaram maior porcentagem de morte celular, sendo esse efeito revertido pelo URB597 ($F_{3,17}=19,13$, $p < 0.0001$) e que o pré-tratamento com AM251 na concentração de 1nM aumentou significativamente a porcentagem de morte celular em comparação com o grupo URB597 confirmado pelo teste *pos hoc* ($p < 0.05$) (figura 17E), mostrando assim que o efeito neuroprotetor contra a morte celular induzida por cocaína foi mediado através de receptor CB1. As imagens representativas para marcação de células vivas por calceína (verde) e células mortas por homodímero de etídio (vermelho) são vistas nas figuras 17B, 17D e 17F.

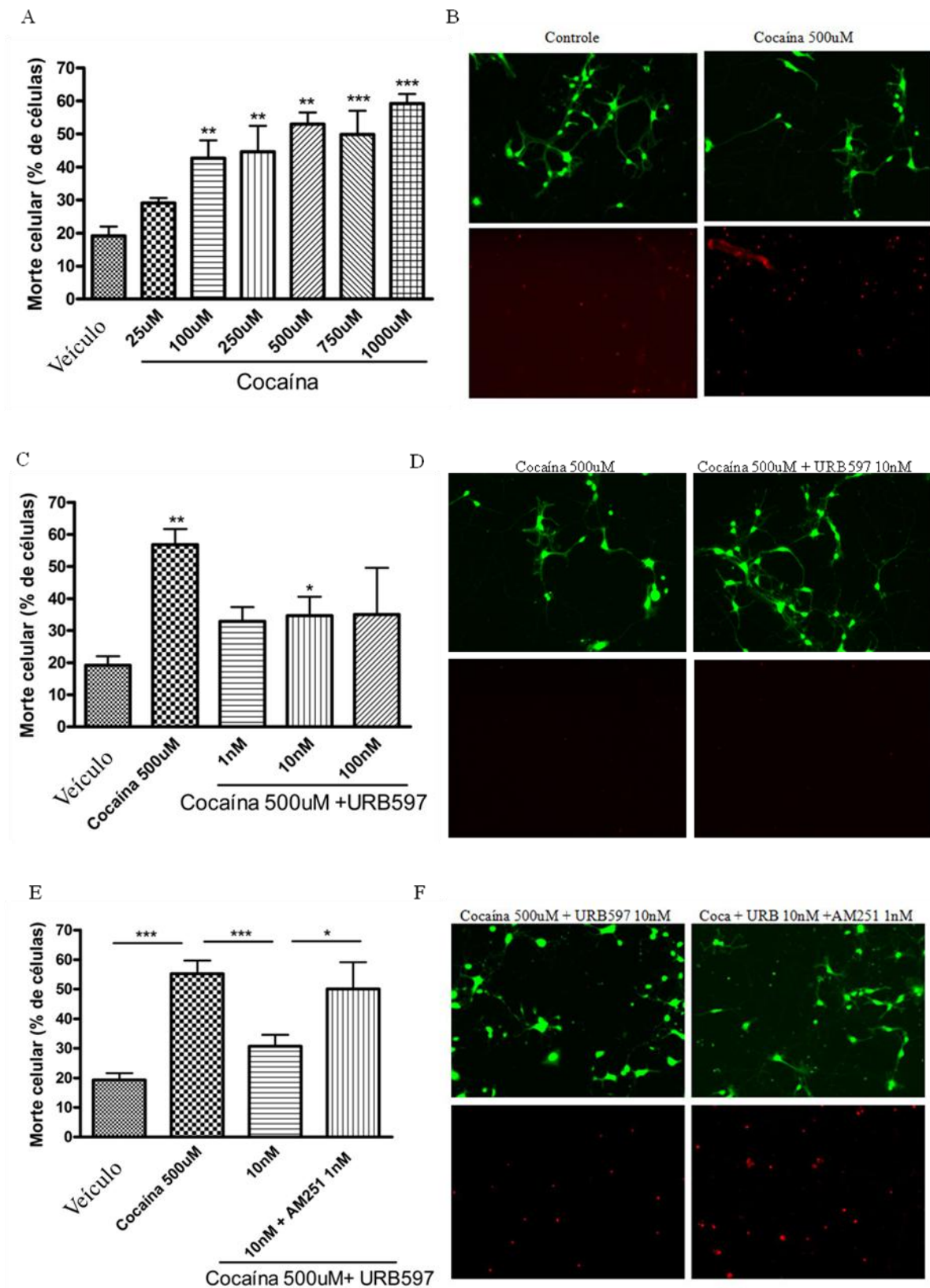


Figura 17– Avaliação da morte celular induzida por cocaína em cultura de neurônios hipocâmpais e o efeito do inibidor da hidrólise da anandamida, URB597 sobre a neurotoxicidade. (A) O tratamento com diferentes concentrações de cocaína (100, 250,

500, 750 e 1000 μM) promoveu aumento significativo da morte celular em culturas de neurônios hipocâmpais. (B, D, F) Imagens representativas de neurônios hipocâmpais marcados com Calceína-AM (células vivas, verde) e com homodímero de etídio (células mortas, vermelho) do grupo controle (esquerdo) e grupo experimental (direito). (C) O pré-tratamento com inibidor da hidrólise da anandamida, URB597, na concentração de 10nM reduziu significativamente a porcentagem de morte celular induzida por exposição a cocaína em culturas neuronais. (E) O tratamento com antagonista de receptor CB1, AM251, na concentração de 1nM reverteu o efeito do URB597 em culturas de neurônios hipocâmpais mostrando envolvimento do receptor CB1 na neuroproteção contra a morte celular promovida por cocaína. *P <0.05. **P <0.01. ***P <0.001. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes. As células mortas foram expressas como porcentagem do número total de células.

Nosso próximo passo foi investigar se as alterações observadas em culturas de neurônios hipocâmpais *in vitro* poderiam ser reproduzidas *in vivo* através de um ensaio em fatias de hipocampo vinte e quatro horas após a administração de cocaína na dose de 75mg/kg. De acordo com a figura abaixo a administração de cocaína induziu aumento da morte neuronal no giro dentado ($F_{3,17}=8.157, p<0.001$) e região CA1 (figura C-D)($F_{3,16}=9.112, p<0.0009$) do hipocampo. A análise *pos hoc* confirmou que a cocaína aumentou a porcentagem de morte neuronal no giro dentado ($p<0.01$) (figura 18 A-B) e região CA1($p<0.001$) (figura 18 C-D) do hipocampo quando comparado ao grupo veículo. O pré-tratamento com URB597 na dose de 1.0mg/kg trinta minutos antes da administração da cocaína reverteu o efeito induzido pela cocaína reduzindo a porcentagem de morte neuronal no giro dentado ($p<0.01$) e na região CA1 do hipocampo ($p<0.05$). O tratamento com URB597 por si só não promoveu alteração significativa sobre a porcentagem de morte celular em comparação ao grupo veículo ($p>0.05$).

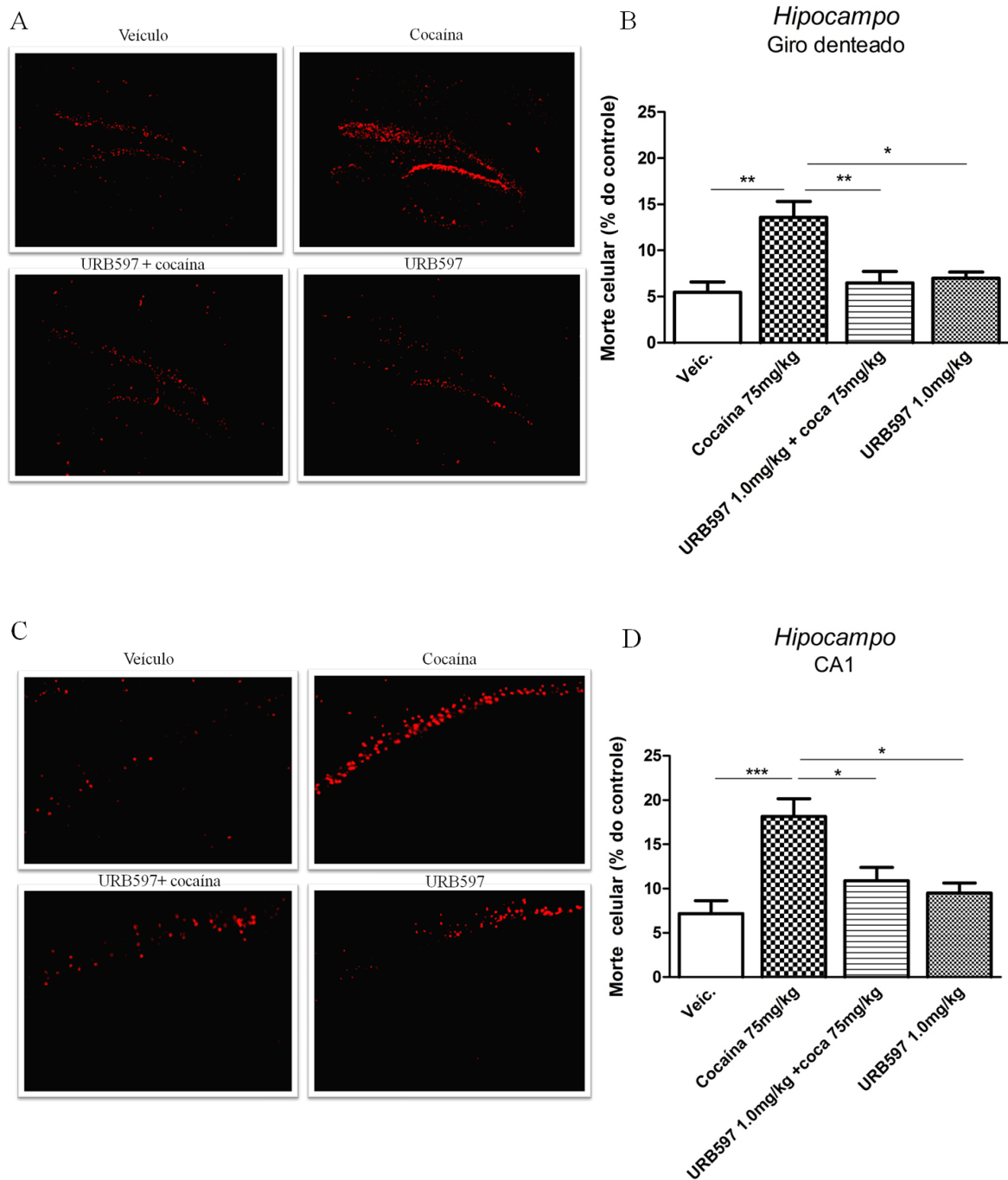


Figura 18- Avaliação da morte neuronal em fatias de hipocampo tratadas com cocaína e com inibidor da hidrólise da anandamida. (A-C) Imagens do microscópio de fluorescência das regiões do giro denteado e CA1 do hipocampo respectivamente de animais tratados com cocaína e/ou inibidor da hidrólise da anandamida, URB597. A porcentagem de morte celular foi quantificada de acordo com a intensidade de pixel (cor vermelho) de cada região. Os animais tratados com URB597 tiveram menor intensidade de marcação (vermelho) no giro denteado e CA1 do hipocampo quando comparado ao grupo cocaína. (B-D) Gráficos representativos da avaliação da morte celular em fatias

da região do giro denteado e CA1 do hipocampo de animais tratados com cocaína e/ou URB597. O tratamento com cocaína aumentou a morte celular no giro denteado e região CA1 do hipocampo respectivamente. O pré-tratamento com URB597 reduziu a porcentagem de morte celular induzida por cocaína. O tratamento com URB597 por si só não alterou a porcentagem de morte celular. *P <0.05. **P <0.01. ***P <0.001. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As células mortas foram expressas como porcentagem do número total de células. A análise quantitativa das imagens foram realizadas no software livre *ImageJ*. (n= 4-5 animais por grupo).

5.11 Discussão

Nossos resultados mostraram que a administração sistêmica aguda de altas doses de cocaína (75mg/kg) induz crises convulsivas comportamentais (mioclônicas) e eletroencefalográficas em camundongos e que tais eventos são acompanhados morte neuronal no hipocampo. Adicionalmente, demonstramos pela primeira vez que a facilitação da sinalização endocanabinoide, através da inibição da hidrólise da anandamida, reduz drasticamente as crises comportamentais e eletroencefalográficas induzidas por cocaína, além de diminuir a porcentagem de morte celular no hipocampo, identificadas através de abordagens experimentais *in vitro* e *in vivo*. Os efeitos neuroprotetores e anticonvulsivantes observados pelo inibidor da hidrólise da anandamida foram mediados pelo receptor CB1, comprovado pelo tratamento com agonistas e antagonistas CB1.

Administração aguda intraperitoneal de dose alta de cocaína em animais experimentais é empregada para se estudar seus efeitos neurotóxicos e para compreensão dos mecanismos envolvidos na crise convulsiva induzida por overdose em humanos. Vários mecanismos são propostos nas crises, incluindo o aumento da sinalização monoaminérgica, serotoninérgica, glutamatérgica, assim como interferência no sistema inibitório GABAérgico, canais para sódio voltagem dependentes, entre outros. Entretanto, pouco se sabe sobre a interação desses sistemas na susceptibilidade das crises convulsivas e sobre a alta taxa de mortalidade induzida pela toxicidade da cocaína (Pursell et al., 2013; Lason, 2001).

Em nossos resultados, demonstramos que as doses de 75 mg/kg e 100 mg/kg foram capazes de evocar crises convulsivas do tipo mioclônicas, podendo ou não evoluírem para crises do tipo tônico-clônico generalizadas e morte. O grupo de animais que recebeu a dose de 100 mg/kg apresentou maior porcentagem de crises máximas ou

tônico-clônicos generalizadas evoluindo na maioria das vezes para óbito. Sendo assim, passamos a utilizar a dose de 75mg/kg que apresentava 100% de crises e baixa porcentagem de letalidade. As doses escolhidas estão entre as utilizadas na literatura, variando entre 60mg/kg, classificada como dose convulsivante e 125mg/kg, classificada como dose letal (Brackett et al., 2000).

Após a administração sistêmica de cocaína, podem-se observar, concomitante à crise comportamental, alterações eletroencefalográficas caracterizadas por alteração da amplitude com aumento do sincronismo e frequência de disparo (Pursell et al., 2013). Nossos resultados demonstraram que cocaína intraperitoneal na dose de 75 mg/kg promoveu alterações eletroencefalográficas significativas, indicando crise eletroencefalográfica na maioria dos animais, avaliadas pela latência para o início da crise e duração da mesma.

Padronizado o modelo de crise comportamental e eletroencefalográfica induzida por cocaína, passamos a investigar o envolvimento de receptores canabinoides CB1. O pré-tratamento com agonista seletivo para este receptor, ACEA, na dose de 2.0mg/kg, aumentou estatisticamente a latência para crise mioclônica induzida por cocaína sem interferir na duração e crise eletroencefalográfica. Esse resultado corrobora com o estudo isolado que avaliou o papel de canabinoides na letalidade e atividade locomotora induzida por cocaína na dose de 75mg/kg. Os resultados demonstraram que o ACEA, na dose de 5mg/kg, reduziu a hiperatividade locomotora e a letalidade induzida pela overdose de cocaína (Hayase et al., 2001). Nossos resultados mostraram ainda que a administração do antagonista AM251 não induziu efeito sobre a crise comportamental e eletroencefalográfica. Esses dados tem sido amplamente discutidos tendo em vista as divergências encontradas na utilização de compostos canabinoides exógenos. A ocorrência de efeitos contraditórios e indesejados na utilização de canabinoides

sintéticos restringem a indicação desses compostos contra crises convulsivas (Lutz, 2004; Hofmann & Frazier, 2011). Além disso, a carência na replicação de resultados positivos limitam o uso e a indicação de tais compostos. Diversos trabalhos clínicos e experimentais já demonstraram respostas duais, pro ou anticonvulsivante, dependendo da dose utilizada e a ocorrência de efeitos colaterais que limitam a eficácia dos compostos (Braakman et al., 2009, Blair et al., 2006; Deshpande et al., 2007; Falenski et al., 2007, 2009; Gholizadeh et al., 2007; Kozan et al., 2009; Naderi et al., 2011, 2012; Shafaroodi et al., 2004; Wallace et al., 2002; Wendt et al., 2011).

Dessa maneira nosso próximo passo foi investigar se a facilitação do sistema endocanabinoide através da inibição da hidrólise da anandamida induz efeito anticonvulsivante contra a neurotoxicidade da cocaína. Surpreendentemente, o pré-tratamento com URB597 na dose de 1.0mg/kg aumentou a latência e reduziu a duração da crise comportamental e eletroencefalográfica além de reduzir drasticamente a porcentagem de animais que desenvolveram a crise, mostrando claramente o efeito anticonvulsivante dos endocanabinoides, não encontrado com a administração de compostos sintéticos. O pré-tratamento com antagonista seletivo CB1 confirmou que os efeitos anticonvulsivantes foram, de fato, mediados por este receptor, tanto nas crises comportamentais quanto eletroencefalográficas. Embora existam evidências para o papel do sistema endocanabinoide na modulação da transmissão dopaminérgica em circuitos relacionados aos efeitos da cocaína no sistema nervoso central, pouco se sabe sobre o papel dos endocanabinoides nos eventos neurotóxicos gerados pela administração abusiva da droga.

Sendo assim, identificamos um aumento significativo da morte neuronal vinte e quatro horas após a crise convulsiva induzida por overdose de cocaína. Esses eventos

excitotóxicos foram mostrados no hipocampo dos animais submetidos a altas concentrações da droga através de abordagens *in vivo* e *in vitro*. Diferentes trabalhos em animais experimentais vêm demonstrando que a administração aguda com altas doses de cocaína promove, de fato, além de crises convulsivas, *status epilepticus* e desincronização eletroencefalográfica, morte neuronal (Kiyatkin & Smirnov, 2010). Paralelamente, é reconhecido que as crises convulsivas induzidas por overdose de cocaína aumentam o estresse oxidativo celular, o que poderia levar à neurodegeneração. Nesse contexto, Poon et al. (2007) demonstraram que o estresse oxidativo precede a morte celular em culturas de células neuronais humanas expostas a cocaína.

Interessantemente, a administração prévia do URB597, reduziu a porcentagem de morte neuronal *in vivo* e *in vitro* mostrando que o sistema endocanabinoide além de anticonvulsivante atua com neuroprotetor contra eventos que levam a morte de neurônios. Além disso, esses eventos neuroprotetores foram mediados pela ativação do receptor CB1 tendo em vista que o tratamento prévio com antagonista CB1, AM251, reverteu o efeito observado com URB597. Tais efeitos neuroprotetores dos endocanabinoides são baseados principalmente pela redução da sinalização excitatória, redução da corrente e influxo de cálcio e da geração do stress oxidativo, ativação de vias intracelulares relacionadas à sobrevivência celular e produção de fatores neurotróficos, anteriormente descritos em modelos de neuroinflamação, neurodegeneração e excitotoxicidade neuronal (Bisogno & Di Marzo, 2009; Fernández Ruiz et al., 2010). A produção sob demanda após a despolarização neuronal, a ligação ao receptor CB1 culminando com a modulação da liberação de neurotransmissores suporta e direciona a utilização dos endocanabinoides nos eventos de excitotoxicidade neuronal (Lutz, 2004).

Recentemente foi demonstrado que o inibidor dual da anandamida e 2-AG, AM5206, promoveu efeito anticonvulsivante e neuroprotetor *in vivo* e *in vitro* no

modelo da excitotoxicidade induzida por ácido kaínico, reforçando que um novo composto que age em duas vias distintas dos endocanabinoides promove efeito neuroprotetor contra eventos excitotóxicos (Naidoo et al., 2012).

Portanto, nossos resultados demonstraram claramente que a facilitação do sistema endocanabinoide através da inibição da enzima que hidrolisa a anandamida exerceu efeito anticonvulsivante e neuroprotetor contra a toxicidade induzida por altas doses de cocaína em camundongos.

6. Conclusão geral

Nossos resultados demonstraram claramente a capacidade modulatória e neuroprotetora do sistema endocanabinoide sobre as crises comportamentais, eletroencefalográficas e sobre a neurotoxicidade em diferentes modelos. Dessa forma, compostos que inibem a hidrólise de anandamida, aumentando o tônus endocanabinoide, mostraram-se eficazes no controle das crises comportamentais e eletroencefalográficas. Além disso, reduziram o dano neuronal induzido pela toxicidade de drogas convulsivantes, sendo possível alvo para o desenvolvimento futuro de terapias antiepilépticas. Por outro lado, demonstramos que o tratamento com agonistas e/ou antagonistas canabinoides oferecem efeitos contraditórios com relação ao modelo ou dose utilizada e não representam estratégias ideais para o tratamento de crises convulsivas.

Por fim, demonstramos que a inibição dual da hidrólise da anandamida e de receptores TRPV1 exerce efeito anticonvulsivante, mostrando a influência de receptores CB1 e TRPV1 no controle das crises convulsivas experimentais.

7. Referências Bibliográficas

Alger BE, Pitler TA. (1995) Retrograde signaling at GABAA-receptor synapses in the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 18:333-340.

Armstrong C, Morgan RJ, Soltesz I. (2009) Pursuing paradoxical proconvulsant prophylaxis for epileptogenesis. *Epilepsia* 50:1657-1669.

Associação Brasileira de Psiquiatria (2012). Abuse and addiction: crack. *Rev Assoc Med Bras.* 58(2):141-53.

Bahreman A, Shafaroodi H, Ghasemi M, Nasrabady SE, Gholizadeh S, Dehpour AR. (2008) The cannabinoid anticonvulsant effect on pentylenetetrazole-induced seizure is potentiated by ultra-low dose naltrexone in mice. *Epilepsy Res* 81:44-51.

Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D. (1997) Functional role of high-affinity anandamidetransport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277:1094-7.

Ben Amar M. (2006) Cannabinoids in medicine: A review of their therapeutic potential. *J Ethnopharmacol.* 21;105(1-2):1-25.

Ben Amar, M., Leonard, L. (2002). Chapter 16: Cannabis. In: Leonard, L., Ben Amar, M. (Eds.), *Les Psychotropes: Pharmacologie et Toxicomanie*. Les Presses de l'Université de Montreal, Montreal, pp. 571–627.

Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia.* 51(4):676-85.

Bernard C, Milh M, Morozov YM, Ben-Ari Y, Freund TF, Gozlan H. (2005) Altering cannabinoid signaling during development disrupts neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:9388-9393.

Bhaskaran MD, Smith BN. (2010) Cannabinoid-mediated inhibition of recurrent excitatory circuitry in the dentate gyrus in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *PLoS ONE.* 5:10683.

Bialer M, White HS. (2010) Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 9:68–82.

Bisogno T, Di Marzo V. (2010) Cannabinoid receptors and endocannabinoids: role in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 9(5):564-73.

Blair RE, Deshpande LS, Sombati S, Elphick MR, Martin BR, DeLorenzo RJ. (2009) Prolonged exposure to WIN55,212-2 causes downregulation of the CB1 receptor and the development of tolerance to its anticonvulsant effects in the hippocampal neuronal culture model of acquired epilepsy. *Neuropharmacology* 57:208-218.

Blair RE, Deshpande LS, Sombati S, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. (2006) Activation of the cannabinoid type-1 receptor mediates the anticonvulsant properties of cannabinoids in the hippocampal neuronal culture models of acquired epilepsy and status epilepticus. *J Pharmacol Exp Ther* 317:1072-1078.

Blume-Chair, W.; Luders, H. O.; Mizrahi, E.; Tassinari, C.; Boas, W. E; Engel-Jr, J. (2001) Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, v. 42, n 9, p. 1212-1218.

Braakman HM, van Oostenbrugge RJ, van Kranen-Mastenbroek VH, de Krom MC. (2009) Rimonabant induces partial seizures in a patient with a history of generalized epilepsy. *Epilepsia*, 50(9):2167–2173.

Brevard ME, Kulkarni P, King JA, Ferris CF. (2006) Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 47:745-754.

Cakil D, Yildirim M, Ayyildiz M, Agar E. (2011) The effect of co-administration of the NMDA blocker with agonist and antagonist of CB1-receptor on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsy Res*. 93(2-3):128-37.

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653):816–824.

Chen K, Neu A, Howard AL, Foldy C, Echevoyen J, Hilgenberg L, Smith M, Mackie K, Soltesz I. (2007) Prevention of plasticity of endocannabinoid signaling inhibits persistent limbic hyperexcitability caused by developmental seizures. *J Neurosci* 27:46-58.

Clement AB, Hawkins EG, Lichtman AH, Cravatt BF (2003) Increased seizure susceptibility and proconvulsant activity of anandamide in mice lacking fatty acid amide hydrolase. *J Neurosci* 23:3916–3923.

Consroe PF, Wood GC, Buchsbaum H. (1975) Anticonvulsant nature of marihuana smoking. *JAMA* 234:306-307.

Cota VR, Medeiros D de C, Vilela MR, Doretto MC, Moraes MF.(2009). Distinct patterns of electrical stimulation of the basolateral amygdala influence pentylenetetrazole seizure outcome. *Epilepsy Behav.* 1:26-31.

Craig CR, Colasanti BK. (1988) A study of pentylenetetrazol kindling in rats and mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 31(4):867-70.

Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, LernerRA, Gilula NB. (1996) Molecular characterization of an enzymethat degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:82-87.

Cristino L, De Petrocellis L, Pryce G, Baker D, Guglielmotti V, Di Marzo V (2006). Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139: 1405–1415.

Cunha JM, Carlini EA, Pereira AE, Ramos OL, Pimentel C, Gagliardi R, Sanvito WL, Lander N, Mechoulam R. (1980) Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology* 21:175-185.

de Guzman P, D'Antuono M, Avoli M. (2004) Initiation of electrographic seizures by neuronal networks in entorhinal and perirhinal cortices in vitro. *Neuroscience.* 123(4):875-86.

Dennis I, Whalley BJ, Stephens GJ. (2008) Effects of Delta9-tetrahydrocannabivarin on [35S] GTPgammaS binding in mouse brain cerebellum and piriform cortex membranes. *Br J Pharmacol.*154(6):1349-58

Deshpande LS, Blair RE, Ziobro JM, Sombati S, Martin BR, DeLorenzo RJ. (2007) Endocannabinoids block status epilepticus in cultured hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol* 558:52-59.

Devane WA, Dysarz FA, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988). Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34:605-13.

Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, et al. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoids receptor. *Science* .258:1946-9.

Di Marzo V and Deutsch DG (1998) Biochemistry of the endogenous ligands of cannabinoid receptors. *Neurobiol Dis.* 5: 386–404.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-691.

Di Marzo V. (2006) A brief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. *Trends Pharmacol Sci.* 27(3):134-4.

Dichter MA. (2009) Emerging concepts in the pathogenesis of epilepsy and epileptogenesis. *Arch Neurol* 66:443-447.

Duailibi LB, Ribeiro M, Laranjeira R.(2008). Profile of cocaine and crack users in Brazil. *Cad Saude Publica.* 24 Suppl 4:s545-57.

Echegoyen J, Armstrong C, Morgan RJ, Soltesz I. (2009) Single application of a CB1 receptor antagonist rapidly following head injury prevents long-term hyperexcitability in a rat model. *Epilepsy Res* 85:123-127.

Eells JB, Clough RW, Browning RA, Jobe PC. (2003) Comparative fos immunoreactivity in the brain after forebrain, brainstem, or combined seizures induced by electroshock, pentylenetetrazol, focally induced and audiogenic seizures in rats. *Neuroscience* 123:279-292.

Ellison JM, Gelwan E, Ogletree J. (1990) Complex partial seizure symptoms affected by marijuana abuse. *J Clin Psychiatry* 51:439-440.

Elsohly MA, Slade D. (2005) Chemical constituents of marijuana: the complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sci.* 22;78(5):539-48.

Engel, J. (1995). "Concepts of epilepsy". *Epilepsia.*, vol. 36, 23-29.

Fankhauser M. (2002). History of cannabis in Western Medicine. In: Grotenhermen F, Russo E, eds. *Cannabis and Cannabinoids*. New York: The Haworth Integrative Healing Press. Chapter 4. p. 37-51.

Falenski KW, Blair RE, Sim-Selley LJ, Martin BR, DeLorenzo RJ. (2007) Status epilepticus causes a long-lasting redistribution of hippocampal cannabinoid type 1 receptor expression and function in the rat pilocarpine model of acquired epilepsy. *Neuroscience* 146:1232-1244.

Falenski KW, Carter DS, Harrison AJ, Martin BR, Blair RE, DeLorenzo RJ. (2009) Temporal characterization of changes in hippocampal cannabinoid CB(1) receptor expression following pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 1262:64-72.

Fernandez-Ruiz J, Garcia C, Sagredo O, Gomez-Ruiz M, de Lago E (2010) The endocannabinoid system as a target for the treatment of neuronal damage. *Expert Opin Ther Targets* 14:387–404.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46:470-472.

Fride E, Mechoulam R. (1993) Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist anandamide, a brain constituent. *Eur J Pharmacol.* 231:313-4.

Fu M, Xie Z, Zuo H (2009) TRPV1: a potential target for antiepileptogenesis. *Med Hypotheses* 73(1):100–102

Gaoni Y and Mechoulam R (1964) Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc.* 86: 1646.

Gasior M, Kaminski R, Witkin JM. (2004a). Pharmacological modulation of GABA receptors affects cocaine-induced seizures in mice. *Psychopharmacology.* 174,211–219

Gasior M, Kaminski R, Witkin JM. (2004b). Pharmacological modulation of GABA(B) receptors affects cocaine-induced seizures in mice. *Psychopharmacology.* 174(2):211-9.

Gasior M., Carter R.B., Goldberg S.R., Witkin J.M. (1997). Anticonvulsant and behavioral effects of neuroactive steroids alone and in conjunction with diazepam. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 282,543–553.

Gasior M., Ungard J.T., Witkin J.M. (1999). Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 290,1148–1156.

Gaval-Cruz M, Schroeder JP, Liles LC, Javors MA, Weinschenker D. (2008) Effects of disulfiram and dopamine beta-hydroxylase knockout on cocaine-induced seizures. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 89 556–562.

Giblin, KA, Blumenfeld, H (2010). Is epilepsy a preventable disorder? New evidence from animal models. *Neuroscientist.* 16(3):253-75.

Gholizadeh S, Shafaroodi H, Ghasemi M, Bahremand A, Sharifzadeh M, Dehpour AR. (2007) Ultra-low dose cannabinoid antagonist AM251 enhances cannabinoid anticonvulsant effects in the pentylenetetrazole-induced seizure in mice. *Neuropharmacology* 53:763-770.

Goffin K, Van Paesschen W, Van Laere K. (2011) In vivo activation of endocannabinoid system in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Brain* 134:1033-1040.

Gordon E, Devinsky O. (2001) Alcohol and marijuana: effects on epilepsy and use by patients with epilepsy. *Epilepsia* 42:1266–1272.

Hanus LO. (2009) Pharmacological and therapeutic secrets of plant and brain (endo)cannabinoids. *Med Res Rev.* 29(2):213-71.

Hauser WA. (1990) Prevention of post-traumatic epilepsy. *N Engl J Med* 323:540-542.

Hayase T, Yamamoto Y, Yamamoto K (2001). Protective effects of cannabinoid receptor ligands analogous to anandamide against cocaine toxicity. *36(6):596-608.*

Herkenham M, Lynn AB, Little MD, et al. (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1932–1936.

Hofmann ME, Frazier CJ. (2013). Marijuana, endocannabinoids, and epilepsy: potential and challenges for improved therapeutic intervention. *Exp Neurol.* 244:43-50.

Howlett AC (1987) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: relative activity of constituents and metabolites of marijuana. *Neuropharmacology* 26: 507–512.

Howlett AC, Barth F, Bonner TI, et al. (2002) International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev* 54:161–202. Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, et al. (2004) Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology* 47(Suppl 1): 345–358.

Howlett AC, Fleming RM. (1984). Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* .26:532-8.

Izzo AA, Borrelli F, Capasso R, Di Marzo V, Mechoulam R. (2009) Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* 30(10):515-27.

Jacobs MP, Leblanc GG, Brooks-Kayal A, Jensen FE, Lowenstein DH, Noebels JL, Spencer DD, Swann JW. (2009) Curing epilepsy: progress and future directions. *Epilepsy Behav* 14:438-445.

Jones NA, Hill AJ, Smith I, Bevan SA, Williams CM, Whalley BJ, Stephens GJ. (2010). Cannabidiol displays antiepileptiform and antiseizure properties in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 332:569–577.

Kalant H. (2001) Medicinal use of cannabis: history and current status. *Pain Res Manag.* 6(2):80-91.

Karanian DA, Karim SL, Wood JT, Williams JS, Lin S, Makriyannis A, Bahr BA. (2007) Endocannabinoid enhancement protects against kainic acid-induced seizures and associated brain damage. *J Pharmacol Exp Ther* 322:1059-1066.

Karr L, Pan YZ, Rutecki PA. (2010) CB1 antagonism impairs the induction of epileptiform activity by group I metabotropic glutamate receptor activation. *Epilepsia.* 51(Suppl 3): 121–125.

Katona I, Sperlagh B, Magloczky Z, Santha E, Kofalvi A, Czirjak S, Mackie K, Vizi ES, Freund TF. (2000) GABAergic interneurons are the targets of cannabinoid actions in the human hippocampus. *Neuroscience* 100:797-804.

Katona I, Sperlagh B, Sik A, Kafalvi A, Vizi ES, Mackie K, Freund TF. (1999) Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon terminals of specific hippocampal interneurons. *J Neurosci* 19:4544-4558.

Keeler MH, Reifler CB. (1967) Grand mal convulsions subsequent to marijuana use. Case report. *Dis Nerv Syst* 28:474-475.

Kiyatkin EA, Smirnov MS. (2010). Rapid EEG desynchronization and EMG activation induced by intravenous cocaine in freely moving rats: a peripheral, nondopamine neural triggering. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298(2):R285-300.

Klioueva IA, van Luijtelaar EL, Chepurnova NE, Chepurnov SA. (2001) PTZ-induced seizures in rats: effects of age and strain. *Physiol Behav* 72:421-426.

Koppel B.S., Samkoff L., Daras M. (1996) Relation of cocaine use to seizures and epilepsy. *Epilepsia* 37,875–878.

Kozan R, Ayyildiz M, Agar E. (2009) The effects of intracerebroventricular AM-251, a CB1-receptor antagonist, and ACEA, a CB1-receptor agonist, on penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Epilepsia* 50:1760-1767.

Lasoñ W.(2001) Neurochemical and pharmacological aspects of cocaine-induced seizures. *PolJPharmacol.* 53,57–60.

Leach JP, Mohanraj R, Borland W. (2012) Alcohol and drugs in epilepsy: Pathophysiology, presentation, possibilities, and prevention *Epilepsia*, 53(Suppl. 4):48–57.

Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Böhme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M. (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*. 283(5400):401-4.

Lees, G. V.; Jones, E. G.; Mcnamara, J.(2000) *Epilepsy. Neurobiology of Disease*, v. 7, p. 549-551.

Li HB, Mao RR, Zhang JC, Yang Y, Cao J, Xu L (2008) Antistress effect of TRPV1 channel on synaptic plasticity and spatial memory. *Biol Psychiatry* 64(4):286–292.

Li HL, Lin H. (1974). An archaeological and historical account of cannabis in China. *Econ Bot.* 28(4):437-47.

Loscher W. (2011) Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure* 20:359-368.

Loscher W. (2009) Animal models of drug-resistant epilepsy. In: Schwartzkroin PA, editor. *Encyclopedia of basic epilepsy research*. Oxford: Academic Press; p.1123–8.

Luszczki JJ, Czuczwar P, Cioczek-Czuczwar A, Czuczwar SJ. (2006) Arachidonyl-2'-chloroethylamide, a highly selective cannabinoid CB1 receptor agonist, enhances the anticonvulsant action of valproate in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *Eur J Pharmacol.* 547:65–74.

Luszczki JJ, Czuczwar P, Cioczek-Czuczwar A, Dudra-Jastrzebska M, Andres-Mach M, Czuczwar SJ. (2010) Effect of arachidonyl-2'-chloroethylamide, a selective cannabinoid CB1 receptor agonist, on the protective action of the various antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:18-25.

Lutz B. (2004) On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochem Pharmacol* 68:1691-1698.

McNamara, J. O. (1994) "Cellular and Molecular Basis of Epilepsy", *The Journal of Neuroscience*, vol14, 3413-3425.

Ma YL, Weston SE, Whalley BJ, Stephens GJ. (2008) The phytocannabinoid Delta(9)-tetrahydrocannabinol modulates inhibitory neurotransmission in the cerebellum. *Br J Pharmacol* 154:204-215.

Macêdo DS, Vasconcelos SM, Andrade-Neto M, Belchior LD, Honório Júnior JE, Gonçalves DO, Fonteles MM, Silva MI, Aguiar LM, Viana GS, de Sousa FC. (2010). Cocaine-induced status epilepticus and death generate oxidative stress in prefrontal cortex and striatum of mice. *Neurochem Int.* 56(1):183-7.

Majlesi N, Shih R, Fiesseler FW, Hung O, Debellonio R. (2010) Cocaine-Associated Seizures and Incidence of Status Epilepticus. *West J Emerg Med.*11(2):157-60.

Manna SS, Umathe SN. (2012) Involvement of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the pro-convulsant effect of anandamide in pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy Research.* 100, 113—124

Marquezan BP, Funck VR, Oliveira CV, Pereira LM, Araújo SM, Zarzecki MS, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS. (2013) Pentylenetetrazol-induced seizures are associated with Na⁺,K⁺-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. *Epilepsy Res.* 105(3):396-400.

Marsch R, Foeller E, Rammes G, Bunck M, Kössl M, Holsboer F et al (2007). Reduced anxiety, conditioned fear, and hippocampal long-term potentiation in transient receptor potential vanilloid type 1 receptor-deficient mice. *J Neurosci.* 27: 832–839

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutierrez SO, van der Stelt M, Lopez-Rodriguez ML, Casanova E, Schutz G, Zieglgansberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* 302:84-88.

Marsicano G, Lutz B. (2006) Neuromodulatory functions of the endocannabinoid system. *J Endocrinol Invest* 29:27-46.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, and Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561–564.

Mechoulam R & Hanus L (2000). A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids* 108: 1–13.

Mechoulam R. (1986). The Pharmacohistory of Cannabis sativa. In: Mechoulam R, editor. *Cannabinoids as Therapeutic Agents*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc. p. 1–19.

Mechoulam R. (1970). Marijuana chemistry. *Science*.168:1159-66.

Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg PM, Szallasi A. (2000) Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 3655—3660.

Micale V, Cristino L, Tamburella A, Petrosino S, Leggio GM, Drago F, Di Marzo V. (2009) Anxiolytic Effects in Mice of a Dual Blocker of Fatty Acid Amide Hydrolase and Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channels *Neuropsychopharmacology* 34,593–606

Monory K, Massa F, Egertova M, Eder M, Blaudzun H, Westenbroek R, Kelsch W, Jacob W, Marsch R, Ekker M, Long J, Rubenstein JL, Goebbels S, Nave KA, Doring M, Klugmann M, Wolfel B, Dodt HU, Zieglgansberger W, Wotjak CT, Mackie K, Elphick MR, Marsicano G, Beat Lutz. (2006) The Endocannabinoid System Controls Key Epileptogenic Circuits in the Hippocampus. *Neuron*. 17; 51(4): 455–466.

Moraes MF, Chavali M, Mishra PK, Jobe PC, Garcia-Cairasco N. (2005) A comprehensive electrographic and behavioral analysis of generalized tonic-clonic seizures of GEPR-9s. *Brain Res* 1033:1-12.

Mori F, Ribolsi M, Kusayanagi H et al (2012) TRPV1 channels regulate cortical excitability in humans. *J Neurosci* 32(3):873–879.

Naderi N, Ahmad-Molaei L, Aziz Ahari F, Motamedi F. (2011) Modulation of anticonvulsant effects of cannabinoid compounds by GABA-A receptor agonist in acute pentylenetetrazole model of seizure in rat. *Neurochem Res*. 36:1520-1525.

Naderi N, Ahmad-Molaei L, Mazar-Atabaki A, Ronaghi A, Shirazi-Zand Z, Motiei-Langroudi SM, Eslahkar S. (2012) L-type calcium channel mediates anticonvulsant effect of cannabinoids in acute and chronic murine models of seizure. *Neurochem Res* 37:279-287.

Naidoo V, Karanian DA, Vadivel SK, Locklear JR, Wood JT, Nasr M, Quizon PM, Graves EE, Shukla V, Makriyannis A, Bahr BA. (2012) Equipotent Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase and Monoacylglycerol Lipase—Dual Targets of the Endocannabinoid System to Protect against Seizure Pathology. *Neurotherapeutics*. 9(4):801-13.

Naidoo V, Nikas SP, Karanian DA, Hwang J, Zhao J, Wood JT, Alapafuja SO, Vadivel SK, Butler D, Makriyannis A, Bahr BA . (2011) A New Generation Fatty

Acid Amide Hydrolase Inhibitor Protects Against Kainate-Induced Excitotoxicity. *J Mol Neurosci.* 43(3):493-502.

Ng SK, Brust JC, Hauser WA, Susser M. (1990) Illicit drug use and the risk of new-onset seizures. *Am J Epidemiol* 132:47-57.

Nieoczym D, Socala K, Wlaz P. (2009). Lack of effect of sildenafil on cocaine induced convulsions in mice. *Pharmacol Rep.* 61(5):930-4.

Pacher P, Batakai S, Kunos G (2006). The endocannabinoid system as an emerging target of Pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):389-462.

Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, Leppik IE, Tomson T, Perucca E. (2008) Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia.* 49(7):1239-76.

Pertwee RG (1999). Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. *Curr Med Chem.* 6:635–664.

Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. (2010) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB and CB. *Pharmacol Rev* 62:588-631.

Piomelli D. (2003) The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci* 4:873-884.

Pitkänen A, Lukasiuk K. (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol.* 10(2):173-86.

Pohlmann-Eden B, Weaver DF. (2013) The puzzle(s) of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia.* 54 Suppl 2:1-4.

Poon HF, Abdullah L, Mullan MA, Mullan MJ, Crawford FC. (2007). Cocaine induced oxidative stress precedes cell death in human neuronal progenitor cells. *Neurochem Int.* Jan;50(1):69-73.

Purcell RH, Papale LA, Makinson CD, Sawyer NT, Schroeder JP, Escayg A, Weinshenker D. (2013) Effects of an epilepsy-causing mutation in the SCN1A sodium channel gene on cocaine-induced seizure susceptibility in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 228(2):263-70.

Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, Derocq JM, Casellas P, Congy C, Oustric D, Sarran M, Bouaboula M, Calandra B, et al. (1998) SR 144528, the first

potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 284:644–650.

Roberts, J.C., Davis, J.B., Benham, C.D. (2004) [3H] Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* 995, 176—183.

Romigi A, Bari M, Placidi F, Marciani MG, Malaponti M, Torelli F, Izzi F, Prosperetti C, Zannino S, Corte F, Chiaramonte C, Maccarrone M. (2010). Cerebrospinal fluid levels of the endocannabinoid anandamide are reduced in patients with untreated newly diagnosed temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*.51(5):768-72.

Ross, R.A., Gibson, T.M., Brockie, H.C., Leslie, M., Pashmi, G., Craib, S.J., Di Marzo, V., Pertwee, R.G. (2001) Structure—activity relationship for the endogenous cannabinoid, anandamide, and certain of its analogues at vanilloid receptors in transfected cells and vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 132, 631—640.

Saito VM, Wotjak CT, Moreira FA. (2010). Pharmacological exploitation of the endocannabinoid system: new perspectives for the treatment of depression and anxiety disorders? *Rev Bras Psiquiatr.* 32 Suppl 1:S7-14.

Schneir AB, Baumbacher T. (2012) Convulsions associated with the use of a synthetic cannabinoid product. *J Med Toxicol.* 8(1):62-4

Shafaroodi H, Asadi S, Sadeghipour H, Ghasemi M, Ebrahimi F, Tavakoli S, Hajrasouliha AR, Dehpour AR. (2007) Role of ATP-sensitive potassium channels in the biphasic effects of morphine on pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice. *Epilepsy Res* 75:63-69.

Shafaroodi H, Ghasemi M, Dehpour AR. (2008) Elevation of pentylenetetrazole-induced seizure threshold in cholestatic mice: interaction between opioid and cannabinoid systems. *J Gastroenterol Hepatol* 23:251-257.

Shafaroodi H, Samini M, Moezi L, Homayoun H, Sadeghipour H, Tavakoli S, Hajrasouliha AR, Dehpour AR. (2004) The interaction of cannabinoids and opioids on pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice. *Neuropharmacology* 47:390-400.

Starowicz K, Maione S, Cristino L, Palazzo E, Marabese I, Rossi F et al (2007a). Tonic endovanilloid facilitation of glutamate release in brainstem descending antinociceptive pathways. *J Neurosci* 27: 13739–13749.

Starowicz K, Nigam S, Di Marzo V (2007b). Biochemistry and pharmacology of endovanilloids. *Pharmacol Ther* 114: 13–33

- Sun FJ, Guo W, Zheng DH, Zhang CQ, Li S, Liu SY, Yin Q, Yang H, Shu HF. (2013) Increased Expression of TRPV1 in the Cortex and Hippocampus from Patients with Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *J Mol Neurosci.* 49(1):182-93
- Szallasi, A. & Blumberg, P. M. (1999) *Pharmacol. Rev.* 51,159 –212.
- Taylor, C. P., Dudek, E. (1984). “Excitation of hippocampal pyramidal cells by an electrical field effect”. *Jornal of neurophysiology*, vol.52, 126-142.
- Toun M. (1981) The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs.*13(1):23-34.
- Van der Stelt M, Di Marzo. (2004) Endovanilloids: putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur J Biochem.* 271:1827-34.
- Velisek L, Kubova H, Pohl M, Stankova L, Mares P, Schickerova R. (1992) Pentylentetrazol-induced seizures in rats: an ontogenetic study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346:588-591.
- Vilela LR, Medeiros DC, Rezende GH, de Oliveira AC, Moraes MF, Moreira FA. (2013). Effects of cannabinoids and endocannabinoid hydrolysis inhibition on pentylentetrazole-induced seizure and electroencephalographic activity in rats. *Epilepsy Res.* 104(3):195-202.
- Wallace MJ, Blair RE, Falenski KW, Martin BR, DeLorenzo RJ. (2003) The endogenous cannabinoid system regulates seizure frequency and duration in a model of temporal lobe epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 307:129-137.
- Wallace MJ, Martin BR, DeLorenzo RJ. (2002) Evidence for a physiological role of endocannabinoids in the modulation of seizure threshold and severity. *Eur J Pharmacol* 452:295-301.
- Wallace MJ, Wiley JL, Martin BR, DeLorenzo RJ. (2001) Assessment of the role of CB1 receptors in cannabinoid anticonvulsant effects. *Eur J Pharmacol* 428:51-57.
- Wendt H, Soerensen J, Wotjak CT, Potschka H. (2011) Targeting the endocannabinoid system in the amygdala kindling model of temporal lobe epilepsy in mice. *Epilepsia* 52:62-65.
- White, H.S., Porter, R.J., Kupferberg, H.J. (2008) Screening of new compounds and the role of the pharmaceutical industry, In: Engel, J.J., Pedley, T.A. (Eds.), *Epilepsy. A Comprehensive Textbook*, Second edition. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1469–1485.

Wilson RI, Kunos G, Nicoll RA. (2001) Presynaptic specificity of endocannabinoid signaling in the hippocampus. *Neuron* 31:453-462.

Xu YT, Kaushal N, Shaikh J, Wilson LL, Mésangeau C, McCurdy CR, Matsumoto RR (2010) A Novel Substituted Piperazine, CM156, Attenuates the Stimulant and Toxic Effects of Cocaine in Mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 333(2):491-500.

Yacubian, E. M. T. (2005) "Valproato. O amplo espectro de um solvente", *Tratamento Medicamentoso das Epilepsias*, 2 edn, E. M. T. Yacubian, ed., Lemos Editorial & Gráficos Ltda., São Paulo, 97-113.

Zuardi AW. (2006) History of cannabis as a medicine: a review. *Rev Bras Psiquiatr.* 28(2):153-7.

8. Anexo

Conforme documentos em anexo, foi realizado no período de Outubro/12 à Abril/2013 estágio de doutorado no exterior junto à LUDWIG MAXIMILIANS UNIVERSITÄT (LMU) –MÜNCHEN, ALEMANHA, tendo em vista a bolsa concedida pelo Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE-CAPEB. O estágio foi realizado no departamento de Farmacologia e Toxicologia da LMU sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Heidrun Potschka com o projeto intitulado: Impacto do sistema modulação farmacológica e genética do sistema endovanilóide sobre a epileptogênese e ictogênese no modelo de *kindling* de epilepsia do lobo temporal.

O objetivo geral do estudo foi avaliar o efeito do antagonista de receptor TRPV1, SB366791, ou efeito da deleção genética do receptor TRPV1 (TRPV1-KO) sobre a progressão da crise comportamental, eletroencefalográfica e a neurogênese no modelo crônico de eletroestimulação da amígdala (epilepsia do lobo temporal).

Camundongos machos da linhagem NMRI foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implantação de eletrodos profundos no núcleo basolateral da amígdala e após quatorze dias de recuperação os mesmos foram submetidos a eletroestimulação para a determinação do limiar para crise tônico-clônica generalizada. Na sequência, os animais receberam estimulações diárias com 700 μ A durante quinze dias avaliando a latência, o limiar e a severidade da crise tônico-clônica generalizada. Durante todo procedimento experimental os animais receberam administração intraperitoneal do antagonista TRPV1, SB366791, na dose de 1.0mg/kg ou veículo. Por outro lado, os animais TRPV1-KO receberam apenas estimulação elétrica. Ao final dos

experimentos com eletroestimulação da amígdala foram avaliados novamente o limiar da estimulação elétrica para produção da crise comportamental e eletroencefalográfica.

Os resultados obtidos demonstraram que a modulação farmacológica ou genética de receptores TRPV1 não promoveu efeito sobre a progressão da crise convulsiva no modelo de epilepsia do lobo temporal (Figura 19). Esses resultados divergem de resultados prévios do grupo ao analisar o impacto da modulação farmacológica e genética de receptores CB1 no mesmo modelo. Nesse contexto, o antagonista CB1, SR141716 e a deleção do receptor CB1 (CB1-KO) em neurônios prosencefálicos aumentaram a duração da crise convulsiva quando comparados ao grupo controle.

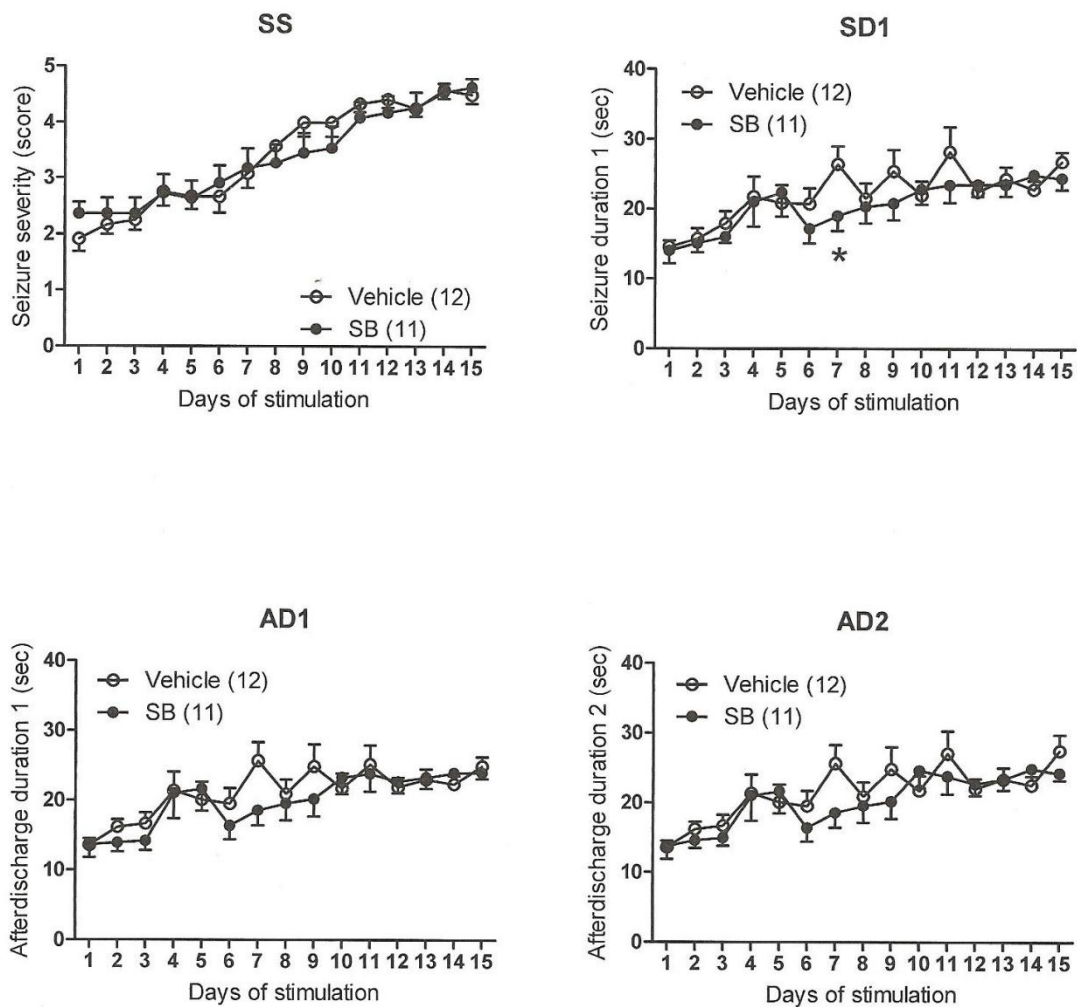


Figura 19: Efeito do tratamento crônico com antagonista TRPV1, SB366791, sob a progressão da crise convulsiva no modelo de eletroestimulação da amígdala. O tratamento prévio a estimulação elétrica na amígdala durante quinze dias consecutivos não induziu efeito nos parâmetros de crise avaliados. *P <0.05 comparado com grupo veículo. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. Cada grupo foi constituído de 11-12 camundongos.

Os dados indicam que a sinalização endocanabinoide afeta a susceptibilidade da crise e que o sistema endovaniloide não interfere sobre tais parâmetros.

Os resultados obtidos durante o período de estágio de doutorado no exterior fazem parte do projeto *Impact of the endocannabinoid and endovanilloid system on*

the generation of a hyperexcitable neuronal network, conforme resumo apresentado a seguir:

