

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CARLOS ALBERTO DE CARVALHO

**O CHOQUE SUB-ELETROCONVULSIVO PROTEGE
CAMUNDONGOS DE CONVULSÕES INDUZIDAS POR
ELETROCHOQUE VIA RECEPTORES DE ADENOSINA E
NMDA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Carina Rodrigues Boeck.

**CRICIÚMA
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

C331c Carvalho, Carlos Alberto de.

O choque sub-eletroconvulsivo protege camundongo de convulsões induzidas por eletrochoque via receptores de adenosina e NMDA. / Carlos Alberto de Carvalho. ; orientador : Carina Rodrigues Boeck. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.

164 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2012.

1. Eletrochoque. 2. Eletroterapia. 3. Adenosina. 4. Anticonvulsivos. 5. Epilepsias. 6. Convulsões.
I. Título.

CDD. 21ª ed. 615.845



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentado pelo candidato **Carlos Alberto de Carvalho**, sob o título “**O choque sub-eletroconvulsivo protege camundongos de convulsões induzidas por eletrochoque via receptores de adenosina e NMDA**” para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido à candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito A.

Criciúma, SC, 25 de julho de 2012

Prof. Dr. Renan Pedra de Souza

Membro Relator

Prof. Dr. João Luciano de Quevedo

Membro Interno

Prof. Dr. Paulo Roberto Barbosa

Membro Externo

Profa. Dra. Carina Rodrigues Boeck
Orientadora

Prof. Dr. Emilio Luiz Streck
Coordenador do PPGCS

AGRADECIMENTOS

A Dra Carina, minha orientadora, pela oportunidade, incentivo e confiança em mim depositada ao longo deste trabalho;

Pela constante disponibilidade, paciência, atenção e ensinamentos;

Pela grande ajuda, imensa compreensão e carinho, muito obrigado.

Agradeço a todos que ajudaram nos experimentos no laboratório.

Aos que fizeram da realização deste trabalho uma tarefa coletiva de aprendizado e construção do conhecimento científico e humano.

A minha família, pela compreensão e carinho quando da minha privação de tempo, sem o convívio deles.

Ao Dr. João Quevedo, por ter acreditado em mim, em uma conversa há três anos.

Obrigado a todos da banca.

RESUMO

A estimulação eletroconvulsiva (ECS) aplicada experimentalmente em animais é largamente utilizada como um modelo de estudo para a terapia eletroconvulsiva. O uso de um pré-tratamento com os anticonvulsivos aumenta o limiar de convulsão induzido por choque ECS em modelo animal, demonstrando que o efeito do ECS pode ser modulado. Porém, as modificações que este modelo de convulsão causa entre os vários sistemas de neurotransmissores não são conhecidas. Há uma ampla evidência do envolvimento do neurotransmissor glutamato em crises epiléticas. A adenosina, importante neuromodulador do sistema nervoso central, exerce principalmente efeitos inibitórios através dos receptores A_1 , resultando em efeitos sedativos, anticonvulsivos e neuroprotetores, através de mecanismos de inibição da excitabilidade glutamatérgica. Ou seja, a adenosina é um importante modulador da atividade glutamatérgica, inibindo a liberação pré-sináptica e ação pós-sináptica do glutamato. No presente trabalho foi avaliado o efeito do choque sub-eletroconvulsivo (sub-ECS) aplicado em diferentes tempos antes do ECS no comportamento convulsivo e na locomoção de camundongos. Também foi investigada a possível participação dos receptores adenosinérgicos e glutamatérgicos do tipo NMDA no efeito do sub-ECS a partir da administração dos antagonistas, cafeína e MK-801, respectivamente. Os camundongos CF-1 machos albinos (60 dias, 30-40 g) receberam choques sub-convulsivos e/ou convulsivos em diferentes intervalos de tempo, de acordo com os grupos: *controle (sham)*, *sub-ECS*, *ECS*, *sub-ECS + ECS 30 min*, *4h*, *8h*, *24h*, *48h* ou *72h*. Os animais foram pré-tratados com injeções intraperitoniais de solução salina (NaCl 0,9g%), 30 mg de cafeína/kg ou 0,25 mg/kg de MK-801 de animal 30min antes da aplicação do sub-ECS. O comportamento convulsivo (extensão tônica de 180° das patas traseiras) e a atividade locomotora dos camundongos foram avaliados. A aplicação do sub-ECS com 4h a 48h de intervalo entre a aplicação do ECS reduziu em de 72,7% a 90,9% o número de animais com convulsões após o ECS, efeito esse bloqueado por cafeína quando os intervalos entre sub-ECS e ECS foram maiores que 8h. O MK-801, ao contrário, só não bloqueou o efeito protetor do sub-ECS no intervalo de 30min entre o ECS. A associação dos choques sub-ECS e ECS induziu hipolocomoção nos animais quando eles foram avaliados 2h após o ECS. A cafeína não foi capaz de alterar esse efeito comportamental, mas o MK-801 bloqueou a hipolocomoção da induzida pela aplicação dos choques nos intervalos de 30min, 24h e 48h. O presente estudo

demonstra o efeito protetor do sub-ECS contra convulsões induzidas pelo ECS, com possível participação do sistema de neurotransmissão glutamatérgica e de modulação adenosinérgica.

Palavras-chave: neuroproteção; choque eletroconvulsivo; cafeína; MK-801.

ABSTRACT

Electroconvulsive shock (ECS) is widely applied experimental animal model for electroconvulsive therapy. Pretreatment with antiepileptic drugs increase the threshold for convulsion in the mouse maximal electroshock seizure model, indicating that the ECS could be modulated. However, alterations in the neurotransmitter systems induced by the ECS are not known. There are several evidences that indicate the involvement of glutamatergic system in the *status epilepticus*. Adenosine is an important neuromodulator of central nervous system that acts as inhibiting the glutamatergic excitability, resulting in sedatives, anticonvulsants and neuroprotective effects. Adenosine acting via receptors A₁ modulates glutamatergic activity inhibiting the presynaptic release of glutamate and its actions on postsynaptic. In the present study, the effect of sub-electroconvulsive shock (sub-ECS) applied at different times before ECS was evaluated on the convulsion and locomotor behaviors in mice. Besides, the possible involvement of the glutamatergic NMDA receptors and adenosinergic receptors in the effect of sub-ECS was tested within the use of antagonists, caffeine and MK-801, respectively. Male adult mice albino CF-1 (60 days, 30-40g) received sub-convulsive and convulsive shocks at different intervals of time, according the distribution at experimental groups: Control (*sham*), *sub-ECS*, *sub-ECS + ECS 30 min, 4h, 8h, 24h, 48h* ou *72h*. The animals were pre-treated with intraperitoneally injections of saline solution (NaCl 0.9g%), caffeine 30mg/kg or MK-801 0.25mg/kg of weight of animal 30min before sub-ECS application. The mice were evaluated in the convulsive behavior (tonic hindlimb extension with 180°) and the locomotor activity. Application of sub-ECS 4h up to 48h before ECS reduced the number of animals with convulsion between 72.7% up to 90.9% after ECS. The protective effect was blocked by caffeine when the intervals between sub-ECS and ECS were higher than 8h. MK-801, on the other hand, did not show block on the protector effect of sub-ECS only at the interval of 30min. The association of sub-ECS and ECS induced at the animals tested 2h after ECS. Caffeine was not able to modify the hypolocomotor effect of sub-ECS plus ECS, but MK-801 blocked the effect when the shocks were applied with 30min, 24h and 48h of intervals. The study presented herein, showed the protective effect of sub-ECS against convulsions induced by ECS, probably via glutamatergic neurotransmission and adenosinergic modulation.

Key-words: neuroprotection; electroconvulsive shock; caffeine; MK-801.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sinapse Glutamatérgica.....	18
Figura 2: Esquema da organização do complexo receptor NMDA.....	20
Figura 3: Representação esquemática da fonte de adenosina extracelular e a preferência de ligação nos receptores nos terminais nervosos glutamatérgicos.....	23
Figura 4: Representação esquemática do heterodímero receptor de adenosina.	25
Figura 5: Esquema do desenho experimental.....	30
Figura 6: Efeito do choque sub-ECS associado ou não com cafeína ou MK-801 nas convulsões dos camundongos expostos ao ECS.....	33
Figura 7: Efeito do choque sub-ECS associado ou não com cafeína ou MK-801 na locomoção dos camundongos expostos ao ECS.....	35
Figura 8: Efeito do choque sub-ECS associado ou não com cafeína ou MK-801 na atividade exploratória dos camundongos expostos ao ECS.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 ESTIMULAÇÃO ELETROCONVULSIVA.....	16
1.2 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	17
1.3 SISTEMA ADENOSINÉRGICO	21
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. ANIMAIS	29
3.2. TRATAMENTO	29
3.3. TESTE DE CONVULSÃO POR ELETROCHOQUE MÁXIMO	30
3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA	30
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
4. RESULTADOS	33
4.1 EFEITO DO CHOQUE SUB-ELETROCONVULSIVO (SUB-ECS) ASSOCIADO OU NÃO COM CAFEÍNA OU MK-801 NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR CHOQUE ELETROCONVULSIVO (ECS)	33
4.2 EFEITO DO CHOQUE SUB-ELETROCONVULSIVO (SUB-ECS) ASSOCIADO OU NÃO COM CAFEÍNA OU MK-801 NA LOCOMOÇÃO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO CHOQUE ELETROCONVULSIVO (ECS)	34
4.3 EFEITO DO CHOQUE SUB-ELETROCONVULSIVO (SUB-ECS) ASSOCIADO OU NÃO COM CAFEÍNA OU MK-801 NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO CHOQUE ELETROCONVULSIVO (ECS).....	36
5. DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESTIMULAÇÃO ELETROCONVULSIVA

A estimulação eletroconvulsiva (ECS; sigla do inglês = *electroconvulsive shock*) aplicada experimentalmente em animais é largamente utilizada como um modelo de estudo para a terapia eletroconvulsiva (Busnello, 2004; Newman et al., 1998). Segundo Rosa et al., (2004), dos tratamentos existentes para a depressão maior grave, a ECT é o tratamento mais eficaz, além de ser eficaz também em outros transtornos psiquiátricos.

Atualmente já existe um significativo corpo de evidências apontando que o choque eletroconvulsivo é capaz de mobilizar mecanismos cerebrais de natureza protetora e trófica (Ongur & Heckers, 2004; Altar et al., 2004; Stewart & Reid, 2000; Lamont et al., 2001). Madsen e colaboradores (2000) foram os primeiros a relatar um possível papel da eletroconvulsoterapia na neurogênese em cérebro de animais adultos. Com isso não tardaram em surgir hipóteses propondo que os mecanismos de ação da terapia eletroconvulsiva poderiam depender, em parte, da estimulação da plasticidade neuronal e sináptica em determinadas áreas do cérebro (Jacobs, 2002).

Acredita-se, normalmente, que a eficácia e os efeitos adversos da terapia eletroconvulsiva acima do limiar dependem da extensão do estímulo administrado (Sackeim et al., 1987; Sackeim et al., 2000). O limiar das crises é, portanto, um importante marcador biológico em pacientes que recebem terapia eletroconvulsiva, embora esse assunto tenha tido controvérsias (Abrams, 2002; Weiner, 2002). No passado, estes modelos foram usados para explorar os efeitos da amnésia, efeitos de neurotransmissores e outros efeitos da terapia eletroconvulsiva (Andrade et al., 2000; Andrade et al., 2002).

Os efeitos anticonvulsivantes da estimulação eletroconvulsiva em camundongos têm sido descritos na forma de reduzir as crises (para revisão, ver Kurinji & Andrade, 2003). O uso de um pré-tratamento com os anticonvulsivantes carbamazepina e topiramato aumenta o limiar de convulsão induzido por choque ECS em modelo animal, demonstrando que o efeito do ECS pode ser modulado (Luszczki et al., 2004; Swiader et al., 2005). O glutamato é responsável, em geral, por deslocamentos despolarizantes paroxísticos, característica gravada intracelularmente em associação com descargas epilépticas (Meldrum et al., 1999), e tem-se reconhecido sua função chave também na patologia da isquemia (Nishizawa, 2001).

1.2 SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

A transmissão sináptica, processo pelo qual os neurônios se comunicam com as células alvo, é essencial para todos os processos neuronais, desde um simples reflexo até o complexo processamento de informações nas regiões cerebrais especializadas. Esta transmissão sináptica é comumente mediada pela liberação de neurotransmissores do neurônio pré-sináptico e subsequente reconhecimento destas moléculas por receptores específicos nas células pós-sinápticas. As crises epiléticas são eventos do sistema nervoso central (SNC) que estão intimamente relacionadas à neurotransmissão, pois envolvem alterações na excitabilidade dos neurônios e nas suas conexões sinápticas. As anormalidades na neurotransmissão podem ocorrer através de um aumento da transmissão excitatória, diminuição da transmissão inibitória ou de ambos os eventos (Meldrum, 1984).

O sistema glutamatérgico é muito estudado nos modelos animais experimentais, pois o glutamato é o neurotransmissor mais abundante no SNC. Aproximadamente 70% do glutamato presente no tecido nervoso tem funções metabólicas (preponderantemente biossíntese de proteínas, entre outras) idênticas as exercida por este aminoácido nos outros tecidos (Dingledine & McBain, 1991). Além da função metabólica, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório em mamíferos, participando em vários processos fisiológicos, tais como: cognição, aprendizado, memória, plasticidade neuronal e formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Danbolt, 2001). Porém, o glutamato também participa de processos neurais associados a dano e morte celular que ocorrem em doenças neurodegenerativas como Doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington, e participa da epileptogênese.

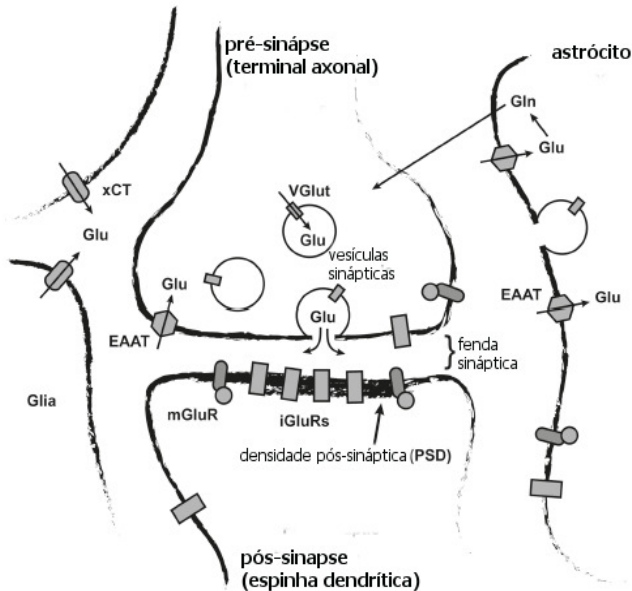
O glutamato é sintetizado nos terminais pré-sinápticos, predominantemente a partir da glutamina devido à ação da enzima glutaminase, mas pode provir também do α -cetoglutarato (intermediário do Ciclo de Krebs), via glutamato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase (Kvamme, 1998). Após ser liberado para o espaço extracelular, o glutamato exerce suas funções pela ativação de receptores específicos nas membranas pré e pós-sinápticas.

A diversidade funcional do glutamato como neurotransmissor é devida à variedade dos seus receptores existentes na membrana celular, que podem ser classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e fisiológicas (Ozawa et al., 1998). De uma forma geral, estes receptores são divididos em duas classes: receptores ionotrópicos

(iGluRs; sigla do inglês = *ionotropic glutamatergic receptors*) e receptores metabotrópicos (mGluRs; sigla do inglês = *metabotropic glutamatergic receptors*) (ver esquema em Figura 1).

Os receptores ionotrópicos são assim denominados porque são receptores-canais iônicos que permitem a passagem seletiva de cátions, e sua ativação promove a despolarização da membrana sináptica desencadeando uma resposta excitatória. Estes se subdividem, de acordo com a sua sensibilidade a agonistas, propriedades farmacológicas e fisiológicas, em receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol ácido propiônico (AMPA; sigla do inglês = α -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) e ácido caínico (KA; sigla do inglês = *kainic acid*). Os receptores AMPA são amplamente distribuídos no SNC, com predomínio nas sub-regiões do hipocampo CA1, CA3 e giro denteado, e na camada molecular do cerebelo (Cotman et al.,1995; Ozawa et al.,1998). Os receptores AMPA e KA medeiam a neurotransmissão excitatória rápida e são receptores com grande permeabilidade aos íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) e, principalmente, com baixa permeabilidade aos íons cálcio (Ca^{2+}).

Figura 1- Sinapse Glutamatérgica



O glutamato citoplasmático é armazenado em vesículas pelos transportadores vesiculares (VGLut; sigla do inglês = *vesicular glutamate transporter*) e

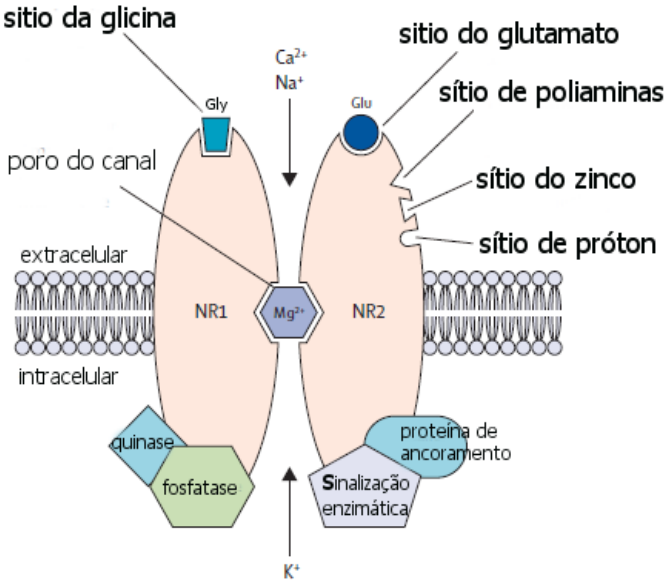
eventualmente liberados para a fenda sináptica quando as vesículas se fundem com a membrana plasmática. No espaço extracelular, o glutamato pode ativar seus receptores. A densidade pós-sináptica possui alta concentração de receptores glutamatérgicos (iGluRs e mGluRs), que também podem ser encontrados na membrana do terminal pré-sináptico, em astrócitos e em outros tipos celulares. Após a sua ação nos receptores, o glutamato será retirado do espaço extracelular pelo sistema de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs; sigla do inglês = *excitatory amino acid transportes*), presente em maior proporção em astrócitos, mas também encontrados em neurônios e outros tipos celulares. O glutamato captado pelos astrócitos é reciclado, pois é convertido a glutamina que é transportada para o meio extracelular e captada pelos neurônios, para ser novamente convertida a glutamato. O glutamato também pode ser exportado para o meio extracelular pelo trocador glutamato-cisteína, que importa cisteína no anti-transporte dos aminoácidos (xCT; sigla do inglês = *cystine-glutamate antiporters*).
Fonte: (Adaptado de Featherstone, 2010).

Os receptores de NMDA e AMPA são co-localizados, mas os receptores de KA possuem uma distribuição um pouco diferente. Os receptores NMDA estão amplamente distribuídos em todo o cérebro e também medeiam a neurotransmissão excitatória do SNC, porém por vias diferentes dos receptores AMPA. São caracterizados por serem altamente permeáveis aos íons Ca^{2+} , possuírem cinética de abertura lenta e dependente de voltagem que se prolonga mais tempo após a liberação de glutamato na fenda sináptica. A ativação do receptor NMDA e o influxo de íons através dele só ocorrem se a membrana neuronal for previamente despolarizada, por exemplo, através da ativação dos receptores do tipo AMPA, permitindo a saída do íon magnésio (Mg^{2+}) que bloqueia o receptor NMDA quando a membrana neuronal encontra-se em estado de repouso. Além do sítio de ligação para glutamato/NMDA, os receptores NMDA possuem também sítio para ligação para a glicina, o co-agonista endógeno. Determinados agentes anestésicos e psicotomiméticos bem conhecidos, como a cetamina, fenciclidina e dizocilpina (MK-801) são agentes bloqueadores seletivos dos receptores NMDA (Ozawa et al., 1998) (Figura 2).

Os mGluRs estão acoplados às proteínas-G e modulam a atividade de efetores intracelulares como as enzimas adenilato ciclase e fosfolipase C, atuando através de segundos mensageiros tais como: monofosfato de adenosina cíclico (AMPC), diacilglicerol e inositol-3-fosfato, os quais ativam e/ou inibem diversos eventos de sinalização intracelular (Ozawa et al., 1998). Em relação a sua localização, os receptores metabotrópicos estão presentes em ambos os terminais pré e

pós-sinápticos, bem como nas células gliais, e sua ativação pode promover efeitos inibitórios ou excitatórios (Ozawa et al., 1998).

Figura 2: Esquema da organização do complexo receptor NMDA.



Nos sítios extracelulares do receptor está o sítio da glicina na sub-unidade NR1 (sigla do inglês = *subunit 1 of NMDA receptor*), e do glutamato na sub-unidade NR2 (sigla do inglês = *subunit 2 of NMDA receptor*). No poro do canal está o sítio de ligação do íon Mg^{2+} . As moléculas alvos intracelulares do receptor ativado são quinases, fosfatases, outras enzimas e proteínas de ancoramento. Essas moléculas estão acima (*upstream*) dos moduladores da função do receptor e abaixo (*downstream*) dos efetores da sua atividade.

Fonte: (adaptado de Kalia et al., 2008).

Devido a sua variedade de receptores, o glutamato também promove alterações de longa duração (LTP; sigla do inglês = *long-term potentiation*) na transmissão sináptica em neurônios do hipocampo e do córtex visual, evento extremamente importante para o processamento da memória (Artola & Singer, 1987; Ito, 1989). Por outro lado, é amplamente conhecido que a excitação excessiva dos receptores glutamatérgicos pode provocar dano ou morte neuronal, por excitotoxicidade (Olney et al., 1980). Um aumento nas concentrações de glutamato na fenda sináptica leva à estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, desencadeando uma cascata de eventos

intracelulares que incluem maior influxo de Ca^{2+} e Na^+ , aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes culminando na morte neuronal (Forder & Tymianski, 2009; Singh et al., 2003).

A ação excitatória do glutamato é finalizada pela sua remoção da fenda sináptica predominantemente por transportadores específicos localizados nas células gliais, mas a expressão de alguns desses transportadores podem ser encontrados nas membranas pré-sinápticas dos neurônios (Figura 1). Os transportadores presentes nas membranas dos astrócitos são os responsáveis pela remoção da maior parte do glutamato presente na fenda sináptica (Schousboe, 1981). A captação do glutamato da fenda sináptica envolve dois sistemas de transporte: um carreador com alta afinidade dependente de Na^+ , localizado nas membranas pré-sinápticas e gliais (Robinson & Dowd, 1997) e outro com baixa afinidade e independente de Na^+ , nas membranas das vesículas sinápticas (Fykse & Fonnum, 1996).

Em alguns estudos, uma elevação nos níveis de glutamato no hipocampo foi observada durante e após ataques epiléticos em humanos, bem como em modelos experimentais com ratos (Carlson, 1992; Lothman, 1987). Tratando-se de epilepsia, um aspecto interessante é o influxo de cálcio. O cálcio extracelular é encontrado em baixos níveis, pois o seu fluxo para o meio intracelular está aumentado (Pumain & Heinemann, 1995). Também, é conhecida a importância do receptor NMDA pós-sináptico sobre focos epiléticos, pois produz alterações paroxísticas despolarizantes capazes de gerar descargas epiléticas na epileptogênese (Chapman, 2000). Em modelos de epilepsia *in vitro* e *in vivo* têm-se buscado moduladores capazes de controlar a quebra do equilíbrio na atividade inibitória-excitatória no tecido cerebral, característica da atividade epilética (Mody, 1999). Um importante modulador do SNC é o nucleosídeo adenosina, que age controlando a sinapse glutamatérgica e têm-se confirmado possuir importante atividade anticonvulsivante (Dunwiddie, 1980; Ault & Wang, 1986; Klitgaard et al., 1993).

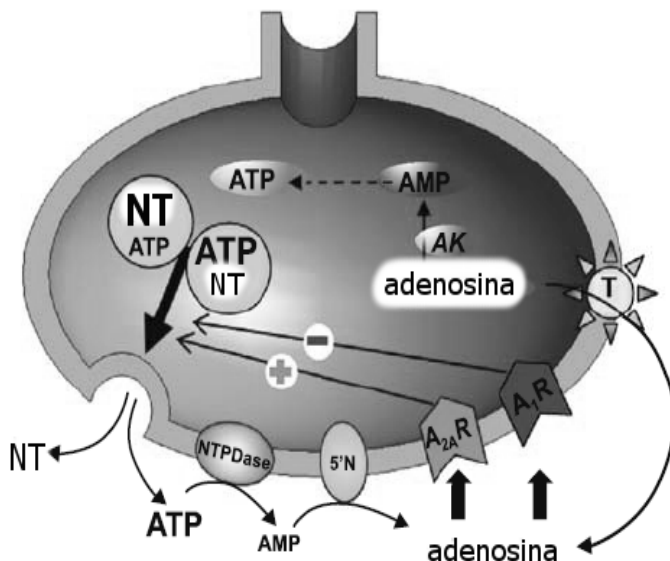
1.3 SISTEMA ADENOSINÉRGICO

No modelo animal, o sistema adenosinérgico tem sido um importante aliado e protetor de excitabilidade neuronal. A adenosina é um nucleosídeo presente em todos os tipos celulares nos meios intra e extracelular que possui sua disponibilidade altamente controlada devido ao seu papel neuromodulador e homeostático (Cunha, 2001). A

regulação da liberação de neurotransmissores excitatórios por esta molécula vem sendo importante em muitos processos patológicos, pois a adenosina pode limitar o dano causado pela excitotoxicidade, exercendo assim uma ação protetora no sistema nervoso (Zimmermann et al., 1998; Dunwiddie e Masino, 2001).

As concentrações intracelulares de adenosina encontram-se na ordem de 10 a 50 nM, enquanto que as concentrações extracelulares encontradas na fenda sináptica são de aproximadamente 0,5 a 4 μ M (Cunha, 2001). Alterações na concentração intracelular de adenosina influenciam sua concentração extracelular, devido à presença de transportadores equilibrativos e bidirecionais específicos para a adenosina. Devido à alta afinidade da enzima adenosina quinase pela adenosina, sua concentração intracelular é relativamente baixa, favorecendo o influxo de adenosina através destes transportadores (Brundege & Dunwiddie, 1997). Além da adenosina proveniente dos transportadores, existe uma importante cascata enzimática que produz adenosina a partir do AMP (sigla do inglês = *adenosine monophosphate*) (Figura 3). O ATP (sigla do inglês = *adenosine triphosphate*) é a fonte primária de substrato para esta cascata enzimática de produção de adenosina, que pode ser liberado pela maioria das terminações nervosas (Burnstock, 1999).

Figura 3: Representação esquemática da fonte de adenosina extracelular e a preferência de ligação nos receptores nos terminais nervosos glutamatérgicos



Em baixa frequência de estimulação, há uma menor liberação de ATP, na qual formará baixas quantidades de adenosina favorecendo a ativação do receptor adenosinérgico A₁. Quando houver estimulação de alta frequência, a liberação de ATP será desproporcionalmente maior, elevando os níveis de adenosina a partir da degradação do ATP pelas ecto-nucleotidases a qual ativará preferencialmente os receptores adenosinérgicos A_{2A}. NTPDase = ecto-nucleotidases capazes de converter ATP e/ou ADP até AMP; 5'N = ecto-5'-nucleotidases; T = transportador equilibrativo de nucleosídeos.

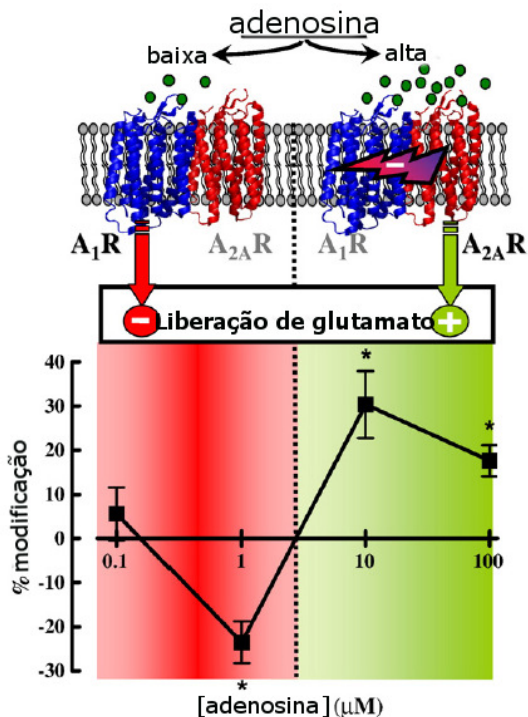
Fonte: (Adaptado de Cunha, 2005).

A presença de adenosina no meio extracelular permite a ativação de receptores adenosinérgicos específicos, classificados em: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ (Figura 4). Estes receptores também são denominados de purinérgicos P1, os quais são diferentes quanto à afinidade pela adenosina, estruturas moleculares, distribuição tecidual e perfil farmacológico (Dunwiddie & Masino, 2001). A ativação dos receptores A₁ e A_{2A}, receptores de alta afinidade pela adenosina, estão diretamente envolvidos com o papel neuromodulador, visto que a sua ativação produz inibição e facilitação da liberação de neurotransmissores,

respectivamente. A seleção do receptor que será ativado, visto que exibem co-expressão em muitas regiões neurais, pode ser feita de acordo com os sítios de liberação ou produção de adenosina extracelular. Desta forma, receptores A_1 seriam preferencialmente ativados pela adenosina liberada através dos transportadores bidirecionais de nucleosídeos e os receptores A_{2A} preferencialmente ativados pela adenosina proveniente da degradação do ATP realizada por uma cascata enzimática (Figura 4) (Cunha, 2005). Em camundongos, a ativação do sistema adenosinérgico exerce seus efeitos neuromoduladores desde fases iniciais de desenvolvimento embrionário, alcançando o padrão adulto mesmo antes do nascimento.

O principal sistema de neurotransmissão afetado pela inibição adenosinérgica via ativação de receptores A_1 é o sistema glutamatérgico, porém os sistemas colinérgico, dopaminérgico e serotoninérgico podem ser modulados por este nucleosídeo (Dunwiddie & Masino, 2001). A participação dos receptores A_{2A} ocorreu em situações de plasticidade sináptica, atividade locomotora e comportamental, e na modulação de respostas sinápticas excitatórias no SNC (Ribeiro & Sebastião, 1996). A ativação dos receptores adenosinérgicos do tipo A_{2A} desencadeia uma resposta antagônica àquela dos receptores do tipo A_1 pela ativação da proteína-G estimulatória (Gs), a qual aumenta os níveis intracelulares de AMPc (Correia de Sá & Ribeiro, 1994; Latini et al., 1996; Kessey & Mogul, 1998). Os receptores do tipo A_{2B} possuem baixa expressão no SNC (Gessi et al., 2005; Zhong et al., 2005). Assim como os receptores A_{2A} , os receptores A_{2B} são acoplados a proteína-G estimulatória (Gs), promovendo o aumento dos níveis de AMPc, mas existem evidências sugerindo o envolvimento da fosfolipase C como mediadora de muitas respostas à ativação dos receptores A_{2B} (Yaar et al., 2005). Os receptores A_3 são expressos de forma moderada no cerebelo e hipocampo e com baixa expressão no restante do cérebro (Lopes et al., 2003; Baines et al., 2011).

Figura 4: Representação esquemática do heterodímero receptor de adenosina.



O esquema mostra uma proposta de mudança no receptor dependente de concentração. O painel de cima mostra a eficiência de adenosina estimular os receptores A₁ e A_{2A} no heterodímero A₁/A_{2A}. Baixas concentrações de adenosina ativam preferencialmente os receptores A₁ o qual inibe a liberação de glutamato. Altas concentrações de adenosina também ativam os receptores A_{2A}, que através da interação intramembrana de A₁/A_{2A} antagoniza a função de A₁, e assim facilitando a liberação de glutamato. O painel de baixo apresenta uma proposta de cinética de controle da liberação do glutamato mediada pelo heterodímero A₁/A_{2A}.

Fonte: (Adaptado de Ciruela et al., 2011).

A adenosina, importante neuromodulador do SNC, exerce principalmente efeitos inibitórios através dos receptores A₁, resultando em efeitos sedativos, anticonvulsivos e neuroprotetores, através de

mecanismos de inibição da excitabilidade glutamatérgica. Então, a adenosina age como um importante modulador da atividade glutamatérgica, inibindo a liberação pré-sináptica e ação pós-sináptica do glutamato através dos receptores A_1 (Dall'igna et al., 2003).

Estudos eletrofisiológicos e neuroquímicos revelam que a ativação dos receptores de adenosina A_1 inibe a liberação de aminoácidos excitatórios, o que contribui para a supressão da convulsão e neuroproteção. No SNC, os receptores de adenosina A_1 estão localizados principalmente no córtex cerebral, cerebelo e hipocampo, e sua ativação resulta na abertura dos canais de K^+ , o que induz efeitos hiperpolarizantes e redução na excitabilidade de neurônios pós-sinápticos (Luszczki et al., 2005). Crises convulsivas induzidas por agentes pró-convulsivantes induzem um aumento nos níveis de adenosina (Winn et al., 1979; Berman et al., 2000).

Uma importante forma de análise do sistema adenosinérgico e de sua interação com outros sistemas de neurotransmissão baseia-se na utilização de agonistas e antagonistas dos seus receptores. Os agonistas e antagonistas auxiliam na determinação de receptores adenosinérgicos, especificamente aqueles que estão envolvidos nos mecanismos de modulação exercidos pela ativação destes receptores.

A cafeína é um antagonista não específico do receptor de adenosina, um psicoestimulante muito usado que induz a estimulação comportamental nos roedores e nos seres humanos (Dall'igna et al., 2003). Diversos estudos demonstram que os efeitos da cafeína no SNC estão ligados a sua habilidade de antagonizar as ações da adenosina endógena obstruindo seus receptores (Hoexter & Rosa, 2005). A cafeína é uma xantina que bloqueia de forma não específica os receptores A_1 , A_{2A} e A_{2B} , sendo ineficaz no bloqueio do subtipo A_3 (Fredholm et al., 1999). A cafeína, em concentrações milimolares é capaz de inibir a enzima fosfodiesterase, estimular a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, além de inibir receptores gabaérgicos (Fredholm et al., 1999).

A cafeína pode tanto reduzir o limiar de convulsão em modelos experimentais de epilepsia (Czuczwar et al., 1987; Cutrufo et al., 1992; El Yacoubi et al., 2000) ou induzir convulsões quando administrada em doses acima de 400 mg/kg em camundongos (Chu, 1981; Czuczwar et al., 1990; Chrościńska-Krawczyk et al., 2011). Em modelo animal de convulsão por PTZ (pentilenotetrazol), a cafeína reduziu o limiar de convulsão e reduziu o efeito anticonvulsivante da etosuximida em camundongos (Luszczki et al., 2006). Contudo, alta dose de cafeína administrada antes de PTZ em ratos teve efeito pró-

convulsivo (Kulkarni et al., 1991). Cafeína em baixas doses também diminui o efeito protetor de anticonvulsivantes clássicos em modelo animal de convulsão por eletrochoque (Gasior et al., 1997). Dados clínicos mostram que cafeína pode aumentar a frequência de convulsões epiléticas em pacientes, mas não precipitar as convulsões (Kaufman & Sachdeo, 2003; Nakken et al., 2005).

Assim, as hipóteses deste trabalho são:

- Se o choque sub-eletroconvulsivo aplicado em diferentes tempos antes do choque eletroconvulsivo tem efeito no comportamento convulsivo e na locomoção de camundongos;
- Se os receptores NMDA e adenosinérgicos participam do efeito do choque sub-eletroconvulsivo no comportamento dos animais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se o choque sub-eletroconvulsivo (sub-ECS) é capaz de proteger camundongos da convulsão induzida pelo ECS e se esse efeito é modificado pela presença de antagonista de NMDA ou de adenosina.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do sub-ECS na convulsão induzida pelo ECS em camundongos.
- Verificar se o antagonista dos receptores de adenosina (cafeína) ou antagonista do receptor NMDA (MK-801) altera a proteção do sub-ECS na convulsão induzida pelo ECS em camundongos.
- Avaliar a atividade locomotora e exploratória dos camundongos após receberem ECS com os diferentes pré-tratamentos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os camundongos albinos CF-1 (*Mus musculus*) machos, adultos, com peso corporal de 30-40 g foram usados neste estudo. Os animais foram mantidos em um ciclo luz/escurecimento por 12 horas, com o alimento e a água livremente disponíveis. Após 7 dias de adaptação à condição do biotério, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos experimentais. Todos os testes foram executados entre 7 e 19 horas para evitar mudanças de ciclo circadiano. Os protocolos e os procedimentos experimentais descritos neste projeto foram realizados de acordo com instruções para cuidados e manejo no uso de animais da Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório – SBCAL, evitando-se desconforto e risco casual aos animais. O experimento sempre foi programado de modo a evitar barulhos excessivos, presença de pessoas que não estavam envolvidas no experimento. O ambiente foi limpo e higienizado antes dos experimentos e ao seu término. O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA/UNESC, protocolo n° 90/2011.

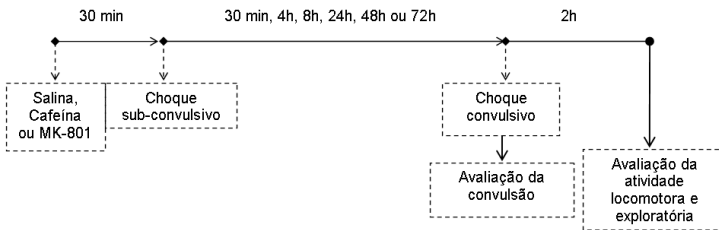
3.2. TRATAMENTO

Os camundongos foram tratados com choque sub-eletroconvulsivo (sub-ECS) aplicado com ou sem o pré-tratamento com 30mg/kg de cafeína (Calbiochem, U.S) ou 0,25mg/kg de MK-801 (Sigma/St.Louis,Mo,USA) dissolvidas, cada uma delas, em uma solução salina de 0,9% de NaCl e administradas via intraperitoneal (i.p.). Foram usados de 7 a 13 animais por grupo, totalizando 237 camundongos para a realização do estudo. A cafeína e o MK-801 foram administrados 30 minutos antes do choque sub-ECS. As doses utilizadas e os tempos de pré-tratamento foram escolhidos conforme doses mínimas e tempo médio de efeito do fármaco conforme previamente descrito (Schwartz & Wasterlain, 1993, Dall'igna et al., 2003 e da Silva et al., 2005). O volume de solução injetada i.p. foi de 10 mL/kg de animal.

O sub-ECS foi aplicado em 30min, ou 4h, ou 8h ou 24h, ou 48h, ou 72h antes do choque convulsivo (ECS). Todos os animais foram observados para alterações comportamentais como convulsão durante a aplicação do ECS e locomoção após o ECS, conforme esquema na Figura 5 e descrição detalhada nos itens a seguir.

Os animais experimentais foram distribuídos entre os seguintes grupos: controle [*sham*: receberam pré-tratamento com solução salina (NaCl 0,9g%) e os grampos de eletrodos foram fixados nas orelhas, porém sem aplicação de choque], sub-ECS, ECS, sub-ECS+ECS. Cada grupo foi dividido conforme o regime de tratamento: salina, cafeína ou MK-801. Os animais do grupo sub-ECS+ECS foram ainda distribuídos conforme o tempo de aplicação do ECS após o sub-ECS (30min, 1h, 4h, 8h, 24h, 48h ou 72h).

Figura 5: Esquema do desenho experimental



Fonte: Do pesquisador

3.3. TESTE DE CONVULSÃO POR ELETROCHOQUE MÁXIMO

A convulsão foi induzida por eletrochoque que foi administrado aos animais através do grampo de eletrodo na orelha com os seguintes parâmetros através de um estimulador Ugo basile: ECS: 100V, 0,2s, 0,5ms, 40mA. O sub-ECS foi aplicado com os seguintes parâmetros: 95V, 0,2s, 0,5ms, 20mA. A medida para a ocorrência da atividade de convulsão foi a avaliação da extensão dos membros dianteiros com hiperextensão de 180° do corpo dos animais (Luszczki et al., 2005).

3.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

A avaliação da atividade locomotora e exploratória dos animais foi avaliada 2h após a aplicação do sub-ECS, ECS ou colocação dos grampos nos animais do grupo controle através do teste do Campo Aberto. Embora seja ainda de difícil definição, o termo “atividade exploratória” é amplamente utilizado em pesquisas relacionadas ao comportamento animal. Num sentido geral, refere-se a todas as atividades relacionadas à obtenção de informação acerca do ambiente, as quais abrangem não só respostas reflexas atencionais imediatas, como

também as respostas voluntárias típicas. O pressuposto básico envolvido em estudos de confinamento em um novo ambiente é que no intuito de explorar o ambiente, o animal precisa locomover-se nele. Dessa forma, a quantidade de movimento passa a ser um indicador de atividade exploratória. A resposta exploratória de levantar-se nas patas traseiras é também muito comum em roedores e tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade uma vez que esse comportamento frequentemente se correlacionam com outras atividades como a auto-limpeza corporal, defesa e reações sexuais.

O teste foi realizado em um campo aberto de 40 x 40 cm delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura, sendo 3 de madeira e uma de vidro transparente. O piso do campo aberto é dividido em 16 quadrados iguais marcados por linhas pretas. Os animais foram cuidadosamente colocados no quadrado do canto posterior esquerdo do aparelho, a partir do qual explorou livremente o ambiente por 5 minutos. Imediatamente após, os animais retornaram para a caixa moradia. Os números de cruzamentos através das linhas pretas e o número de “rearings” foram avaliados (Barros et al., 2006).

No momento da avaliação locomotora, os animais dos grupos controle, sub-ECS ou ECS sozinhos haviam recebido salina, cafeína ou MK-801 2,5h antes do teste no Campo Aberto.

Ao final da experimentação, os animais que receberam solução salina retornaram para a sua caixa-moradia para o período de *washout*, em que não foram manipulados por no mínimo duas semanas. Esses animais participaram de outro estudo, porém de modo randomizados entre grupos. Os demais animais que receberam tratamento com cafeína ou MK-801 foram mortos por deslocamento cervical seguido de decapitação com guilhotina. As carcaças foram armazenadas em saco branco leitoso e encaminhadas para o freezer para depois seguirem para tratamento e descarte por empresa contratada pela Instituição.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados através do pacote estatístico SPSS versão 14.0. O parâmetro de normalidade foi determinado pelo teste de Shapiro–Wilk ($p < 0,05$) e a igualdade de variâncias pelo teste de Levene. Os resultados obtidos pelo campo aberto foram considerados paramétricos, analisados pela análise de variância por One-way ANOVA, usando como post-hoc o teste de Tukey. Para a ocorrência de convulsões entre os grupos foi usado o teste exato de Fischer (2 x 2). Os

valores de p menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO CHOQUE SUB-ELETROCONVULSIVO (SUB-ECS) ASSOCIADO OU NÃO COM CAFEÍNA OU MK-801 NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR CHOQUE ELETROCONVULSIVO (ECS)

Os efeitos anticonvulsivantes da estimulação eletroconvulsiva em camundongos têm sido descritos na forma de reduzir as crises (Furinji et al., 2003). Os camundongos do presente estudo receberam um pré-tratamento com sub-ECS 30 min, 1h, 4h, 8h, 24h, 48h e 72h antes do ECS.

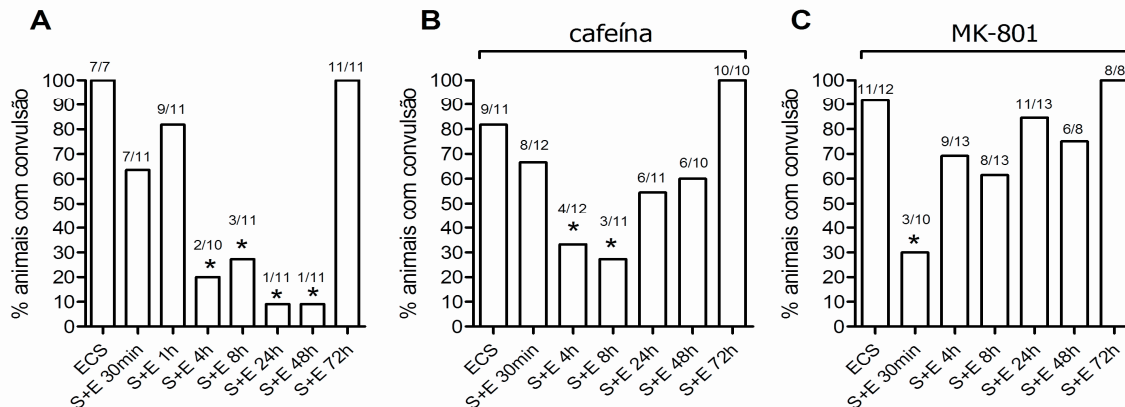
O pré-tratamento de 30 min ou 1h antes do ECS não afetou as convulsões induzidas; assim, para os pré-tratamentos com sub-ECS associados com cafeína ou MK-801 não foram realizadas as avaliações no tempo de 1h de intervalo.

O sub-ECS administrado 4h antes do ECS causou uma proteção de 80% ($p=0,0022$) contra a incidência de convulsões; quando o sub-ECS foi administrado 8h antes a proteção foi de 72,7% ($p=0,0040$) e para os tempos de 24 e 48h de intervalo a proteção foi de 90,9% ($p=0,0002$). Contudo, a proteção do sub-ECS não foi observada quando o animal recebeu o ECS 72h após (Figura 6A).

O pré-tratamento com cafeína (30 mg/kg, i.p.) 30min antes do sub-ECS preveniu as convulsões dos animais dos grupos que receberam ECS em 4h ou 8h após o sub-ECS, com 66,6% ($p=0,036$) e 72,7% ($p=0,029$), respectivamente. Entretanto, os demais grupos que receberam sub-ECS associado à cafeína 30min, 24h, 48h ou 72h antes do ECS não foi observado nenhuma proteção nas convulsões, indicando que a cafeína modificou o efeito protetor do sub-ECS nesses tempos de intervalo (Figura 6B).

O pré-tratamento com MK-801 (0,25 mg/kg) 30min antes do choque sub-ECS preveniu as convulsões apenas dos animais do grupo que recebeu ECS 30min após o sub-ECS, com proteção de 70% ($p=0,006$). No entanto, todos os demais grupos de animais que receberam o tratamento sub-ECS associado ao MK-801 e ECS com intervalos de 4h, 8h, 24h, 48h ou 72h não foi observada a proteção, indicando que o MK-801 bloqueou o efeito protetor do sub-ECS nas convulsões induzidas por ECS (Figura 6C).

Figura 6: Efeito do choque sub-ECS associado ou não com cafeína ou MK-801 nas convulsões dos camundongos expostos ao ECS



(A) Os animais receberam sub-ECS em diferentes tempos antes da aplicação do ECS. (B) Cafeína ou (C) MK-801 foram administrados 30 min antes do sub-ECS ou ECS nos camundongos. Os dados estão expressos como porcentagem de animais que apresentaram convulsões em relação ao número total de animais do grupo ($n = 7-13$). * $p < 0,05$ comparado ao grupo ECS. S = sub-choque eletroconvulsivo; E = choque eletroconvulsivo.

Fonte: Do pesquisador

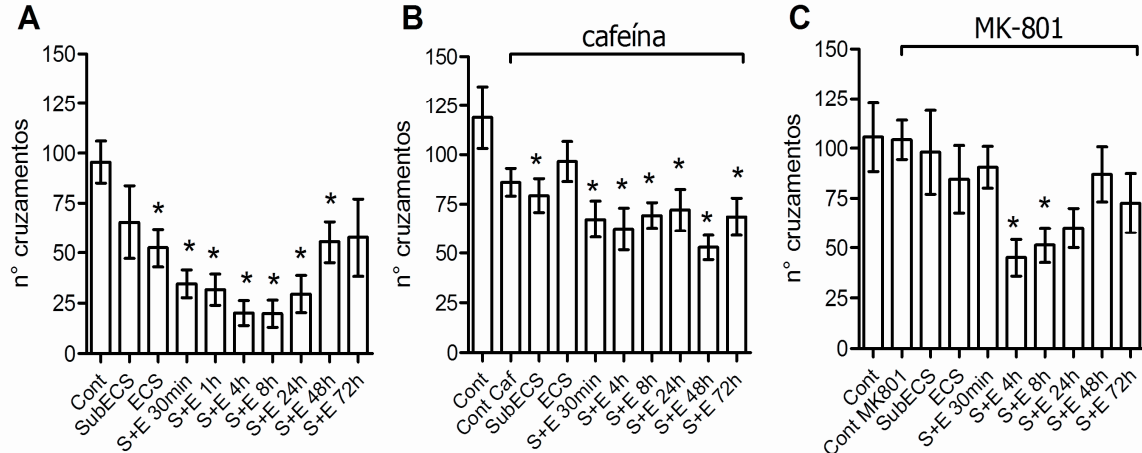
4.2 EFEITO DO CHOQUE SUB-ELETROCONVULSIVO (SUB-ECS) ASSOCIADO OU NÃO COM CAFEÍNA OU MK-801 NA LOCOMOÇÃO APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO CHOQUE ELETROCONVULSIVO (ECS)

Os camundongos tiveram a atividade locomotora avaliada 2h após a aplicação do ECS. O ECS induziu uma hipolocomoção nos animais, que não foi revertida pelo pré-tratamento com sub-ECS nos intervalos de tempo de 30min a 48h. Porém, no intervalo de tempo de 72h não se observou esse efeito sobre a locomoção a partir da associação do sub-ECS com ECS (Figura 7A).

O tratamento de cafeína 30 min antes do sub-ECS não alterou o efeito hipolocomotor observado após o ECS em qualquer dos tempos de intervalo entre os choques. A cafeína *per se* não levou a qualquer alteração na locomoção. Porém, a cafeína impediu a hipolocomoção induzida pelo ECS quando esse foi aplicado sozinho (Figura 7B).

Nos animais que receberam o tratamento com MK-801 antes do sub-ECS verificou-se que somente os grupos de animais que receberam os choques com intervalos de tempo de 4h e 8h mantiveram a diminuição na locomoção. Os demais grupos de animais não apresentaram o efeito hipolocomotor da associação dos choques (Figura 7C).

Figura 7: Efeito do choque sub-ECS associado ou não com cafeína ou MK-801 na locomoção dos camundongos expostos ao ECS.



A atividade locomotora dos camundongos foi avaliada 2 h após a indução da convulsão por eletrochoque. (A) Os animais receberam sub-ECS em diferentes tempos antes da aplicação do ECS. (B) Cafeína ou (C) MK-801 foram administrados 30 min antes do sub-ECS ou ECS nos camundongos. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média (n = 7-13). *p < 0,05 comparado ao grupo controle (*sham*). S = sub-choque eletroconvulsivo; E = choque eletroconvulsivo. Fonte: Do pesquisador

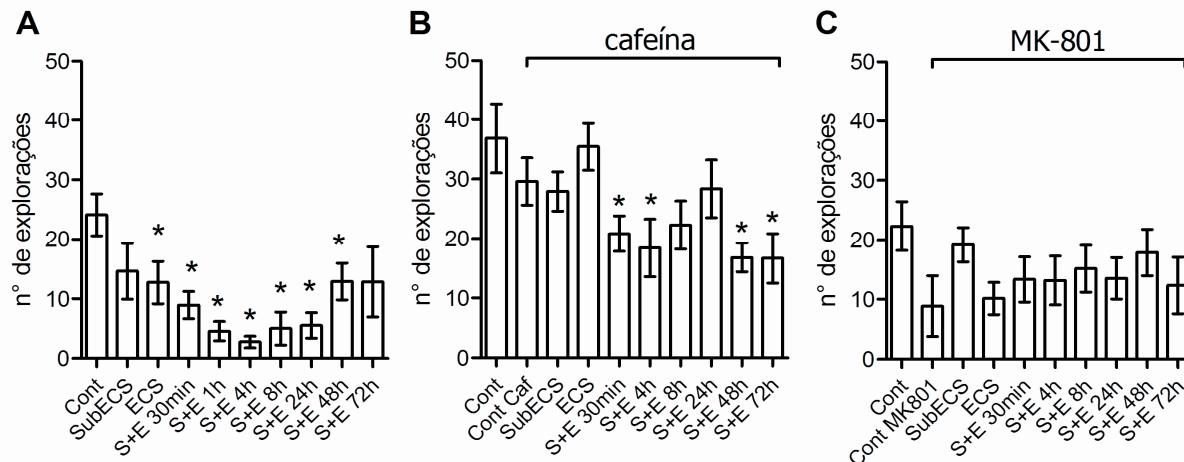
4.3 EFEITO DO CHOQUE SUB-ELETROCONVULSIVO (SUB-ECS) ASSOCIADO OU NÃO COM CAFEÍNA OU MK-801 NA ATIVIDADE EXPLORATÓRIA APÓS A ADMINISTRAÇÃO DO CHOQUE ELETROCONVULSIVO (ECS)

Os camundongos tiveram a atividade exploratória avaliada 2h após a aplicação do ECS. O ECS induziu uma diminuição na exploração dos animais no ambiente do Campo Aberto, que não foi revertida pelo pré-tratamento com sub-ECS nos intervalos de tempo de 30min à 48h. Porém, no intervalo de tempo de 72h não se observou esse efeito sobre a atividade exploratória a partir da associação do sub-ECS com ECS (Figura 8A).

O tratamento de cafeína 30 min antes do sub-ECS não alterou o efeito hipolocomotor observado após o ECS em qualquer dos tempos de intervalo entre os choques. A cafeína *per se* não levou a qualquer alteração na locomoção. Porém, a cafeína impediu a hipolocomoção induzida pelo ECS quando esse foi aplicado sozinho e quando aplicado 8h e 24h após o sub-ECS (Figura 8B).

Nos animais que receberam o tratamento com MK-801 antes do sub-ECS verificou-se que nenhum dos grupos de animais apresentou a redução na atividade exploratória observada quando houve associação dos choques (Figura 8C).

Figura 8: Efeito do choque sub-ECS associado ou não com cafeína ou MK-801 na atividade exploratória dos camundongos expostos ao ECS



A atividade exploratória dos camundongos foi avaliada 2h após a indução da convulsão por eletrochoque. (A) Os animais receberam sub-ECS em diferentes tempos antes da aplicação do ECS. (B) Cafeína ou (C) MK-801 foram administrados 30 min antes do sub-ECS ou do ECS nos camundongos. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 7-13$). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (*sham*). S = sub-choque eletroconvulsivo; E = choque eletroconvulsivo.

Fonte: Do pesquisador

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a aplicação do sub-ECS em diferentes tempos antes do ECS teve um efeito protetor contra as convulsões nos camundongos. Além disso, se observou nesse estudo que os animais que receberam sub-ECS antes do ECS, apresentaram uma diminuição da atividade locomotora e exploratória, caracterizada como hipolocomoção. Esses resultados demonstram que apesar do sub-ECS não prevenir uma convulsão subsequente induzida por ECS em todos os animais, ele causa mudanças no sistema adenosinérgico e glutamatérgico, o que foi observado pelo uso dos antagonistas cafeína e MK-801, respectivamente. Foi verificado que, cafeína ou MK-801 foram capazes de impedir o efeito protetor do sub-ECS em alguns intervalos de tempo entre as aplicações dos choques.

O sub-ECS quando aplicado antes do ECS induziu uma proteção nas convulsões induzidas nos camundongos, indicando que a aplicação de choque, quando aplicado com parâmetros que não induzem convulsões, levou a uma tolerância do animal a um choque subsequente de parâmetros convulsivos.

O uso de sub-ECS como protetor também foi identificado em modelo animal de epilepsia, onde se observou que a aplicação prévia de parâmetros mínimos para convulsão, isto é, abaixo do limiar de convulsões tônicas, reduziram a fragmentação do DNA induzida por doses convulsivas de cainato (Kondratyev et al., 2001). Em outro estudo, o sub-ECS foi usado como tratamento após o adrenalectomia em ratos e se observou redução da morte celular no hipocampo (Masco et al., 1999). Quando repetidos choques são aplicados antes da indução do *status epilepticus* em ratos, verifica-se proteção nas convulsões, mas não no dano hipocampal decorrente das convulsões por pilocarpina (André et al., 2000). A tolerância epiléptica apresenta mecanismos comuns com aqueles da tolerância isquêmica, tais como a janela temporal para a proteção se manifestar assim como a janela temporal restrita que aparece depois que o evento se finalizou (Jimenez-Mateos & Henshall, 2009).

O resultado de pesquisas com ECT em modelos experimentais não são facilmente extrapolados para o contexto clínico. Contudo, estes experimentos podem ser úteis para gerar e testar hipóteses que possam ter aplicação clínica (Kurinji, 2003).

Recentemente demonstrou-se em experimentos com camundongos, que as convulsões por choque eletroconvulsivo tiveram o limiar convulsivo diminuído por repetidos choques sub-eletroconvulsivo em dias subsequentes (Andrade, 2003).

Uma única aplicação de ECS convulsivo assim como repetidas aplicações por 10 dias induzem um aumento na neurogênese e na sinaptogênese na região do giro denteado do hipocampo de ratos (Chen et al., 2009; Ito et al., 2010). Ambos os eventos podem estar relacionado com a plasticidade neuronal, que inclui as mudanças morfológicas das sinapses, que refletem também uma alteração na função bioquímica, que pode alterar expressivamente a neurotransmissão (Hering & Sheng, 2001). Uma das vias de sinalização que é estimulada pelo desafio com uma aplicação ou repetidas aplicações de ECS é a via da proteína quinase regulada por sinal extracelular, a ERK1/2 (sigla do inglês = *extracellular signal-regulated kinase*) (Kodama et al., 2005; Kang et al., 2006).

A estimulação da ERK pós-ECS pode ser decorrente da sinalização do fator trófico derivado do cérebro, o BDNF (sigla do inglês = *brain-derived neurotrophic factor*), pois esse também está aumentado após o ECS (Kodama et al., 2005). O BDNF exerce suas funções através do receptor TrkB (tirosina quinase B), que quando ativado leva a ativação de vias intracelulares que inclui a via da ERK, da PI3k/Akt (sigla do inglês = *phosphatidylinositol-3-OH-kinase/Akt kinase*). Então, essas vias ativadas pelo BDNF após ECS podem contribuir para a adaptação celular que ocorre na plasticidade neuronal após as aplicações do choque, que inclui o aumento no número de células endoteliais e o aumento do comprimento vascular na região do giro denteado do hipocampo, eventos caracterizados como angiogênese (Kim et al., 2004; Hellsten et al., 2005).

Os efeitos neuroprotetores do NMDA contra os danos causados pelos agonistas de receptores glutamatérgicos foram observados em culturas de neurônios de ratos *in vitro* (Boeck & Ganzella, 2004).

Os efeitos do sub-ECS na prevenção das convulsões induzidas pelo ECS e também na hipolocomoção observados no presente estudo foram bloqueados pela administração prévia de cafeína ou MK-801. Porém, esse efeito não pode ser explicado simplesmente pelo antagonismo dos receptores de adenosina ou de NMDA. Ambos, cafeína e MK-801, nas doses aplicadas possuem efeito hiperlocomotor, porém quando os camundongos foram testados na atividade locomotora os fármacos não possuem mais esse efeito (Schwartz & Wasterlain, 1993, Dall'igna et al., 2003 e da Silva et al., 2005). A cafeína bloqueia os receptores A₁ e A_{2A} de adenosina, mas age com maior afinidade nos receptores A_{2A}, o que elevaria os níveis intracelulares de AMPc devida a estimulação da adenilato ciclase via proteína-G_s (Fredholm et al., 1999). Além da sua ação nos receptores adenosinérgicos,

intracelularmente a cafeína inibe fosfodiesterases e causa a liberação de Ca^{2+} dos estoques (Ribeiro & Sebastião, 2010).

O MK-801 afeta um complexo de transmissão polissináptico que envolve glutamato, dopamina e acetilcolina (Olney & Farber, 1995). Ahn e colls. (2002) mostraram que MK-801 em dose-dependentemente aumenta a expressão da proteína c-Fos, reconhecido como marcadora de ativação neuronal. Nesse estudo, a aplicação de ECS também aumentou a expressão de c-Fos, efeito esse que só foi bloqueado por MK-801 quando aplicado em altas doses, indicando que a sinalização intracelular envolvida na ativação neuronal desencadeada pelo ECS não depende totalmente de receptores NMDA, mesmo que MK-801 tenha inibido as convulsões induzidas pelo choque. Em outros estudos também foi verificado o efeito protetor do MK-801 contra convulsões induzidas por ECS (Kulkarni & Ticku, 1989; Gasior et al., 1999). Além do MK-801, outros antagonistas de receptor NMDA, como cetamina e agmatina, também apresentam efeito anti-convulsivo em camundongos estimulados por uma única aplicação de ECS (Manocha et al., 2001; Su et al., 2004), mas ambos não interagem apenas com o sistema glutamatérgico.

Assim, desde que o ECS (e possivelmente o sub-ECS) causa liberação de glutamato e GABA (sigla do inglês = *gamma-aminobutyric acid*) (Rowley et al., 1997), e ambos podem ser modulados pela adenosina, o presente estudo contribui para o entendimento de possíveis sistemas de neurotransmissão que participam da neuroproteção induzida pelo sub-ECS, mas não podemos confirmar todos os mecanismos envolvidos no processo. Apesar dessa limitação, a maior contribuição do trabalho é a possibilidade de usar o sub-ECS como indutor de tolerância contra convulsões em modelos animais. O próximo passo é investigar se essa proteção também ocorre para o possível dano celular decorrente do ECS convulsivo, e assim, com o uso de antagonistas específicos dos receptores adenosinérgicos e glutamatérgicos, esclarecer melhor o mecanismo de proteção.

REFERÊNCIAS

- Abrams R. Stimulus titration and ECT dosing. *Journal of ECT*. 2002; 18:3-9.
- Altar CA, Laeng P, Jurata LW, Brockman JA, Lemire A, Bullard J, Bukhman YV, Young TA, Charles V, Palfreyman MG. Electroconvulsive seizures regulate gene expression of distinct neurotrophic signaling pathways. *The Journal of Neuroscience*. 2004; 17;24(11): 2667-2677.
- Ahn YM, Kang UG, Park JB, Kim YS. Effects of MK-801 and electroconvulsive shock on c-Fos expression in the rat hippocampus and frontal cortex. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2002; 26(3):513-517.
- Andrade C, Sudha S, Venkataraman VB, Herbal treatments for ECS-induced memory deficits: a review of research and a discussion on animal models. *Journal of ECT*. 2000; 16:144-56.
- Andrade C, Srinivasamurthy GM, Vishwasenani A, et al. High but not low ECS stimulus intensity augments apomorphine-stimulated dopamine postsynaptic receptor functioning in rats. *Journal of ECT*. 2002; 18:81-3.
- Andrade C, Thyagarajan S, Vinod PS, et al. Effect of stimulus intensity and number of treatments on ECS-related seizure duration and retrograde amnesia in rats. *Journal of ECT*. 2002; 18:197-202.
- André V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A. The lesional and epileptogenic consequences of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus are affected by previous exposure to isolated seizures: effects of amygdala kindling and maximal electroshocks. *Neuroscience*. 2000; 99(3):469-81.
- Artola A, Singer W. Long term potentiation and NMDA receptors in rat visual cortex. *Nature*. 1987; 330: 649-652.
- Ault B, Wang CM. Adenosine inhibits epileptiform activity arising in hippocampal area CA3. *British Journal of Pharmacology*. 1986; 87:695-703.
- Baines AE, Corrêa SA, Irving AJ, Frenguelli BG. Differential trafficking of adenosine receptors in hippocampal neurons monitored using GFP- and super-ecliptic pHluorin-tagged receptors. *Neuropharmacology*. 2011; 61(1-2):1-11.
- Barros D, Amaral OB, Izquierdo I, Geracitano L, Raseira, MCB, Henriques, AT, Ramirez MR. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacological Biochemistry Behaviour*. 2006; 84:229-234.

Berman RF, Fredholm BB, Aden U, Connor WTO. Evidence for increased dorsal hippocampal adenosine release and metabolism during pharmacologically induced seizures in rats. *Brain Research*. 2000; 872:44-53.

Boeck CR, Ganzella M, Lottermann A, Vendite D. NMDA preconditioning protects against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. *Epilepsia*. 2004; 45:745-750.

Brundege JM, Dunwiddie TV. Role of adenosine as a modulator of synaptic activity in the central nervous system. *Advances in pharmacology*. 1997; 39:353-391.

Burnstock G. Purinergic cotransmission. *Brain Research Bulletin*. 1999; 50(5/6):355-357.

Busnello E, Agostinho F, Feier G, Martins MR, Quevedo J. Eletroconvulsoterapia. In: Kapczinski F, Quevedo J, Izquierdo I. *Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos*. Artes Médicas, Porto Alegre. 2004; 181-189.

Carlson H, Ronne-Engstrom, Ungerstedt U, Hillered L: Seizure-related elevations of extracellular amino acids in human focal epilepsy. *Neuroscience Letters*. 1992; 140:30-32.

Chapman AG. Glutamate and Epilepsy. *The Journal of Nutrition*. 2000; 130:1043-1045.

Chen F, Madsen TM, Wegener G, Nyengaard JR. Repeated electroconvulsive seizures increase the total number of synapses in adult male rat hippocampus. *European of Neuropsychopharmacology*. 2009; 19(5):329-38.

Chościńska-Krawczyk M, Jargiełło-Baszak M, Wałek M, Tylus B, Czuczwar SJ. Caffeine and the anticonvulsant potency of antiepileptic drugs: experimental and clinical data. *Pharmacological Reports*. 2011; 63(1):12-8.

Chu NS. Caffeine and aminophylline induced seizures. *Epilepsia*. 1981; 22(1):85-94.

Ciruela F, Gómez-Soler M, Guidolin D, Borroto-Escuela DO, Agnati LF, Fuxe K, Fernández-Dueñas V. Adenosine receptor containing oligomers: Their role in the control of dopamine and glutamate neurotransmission in the brain. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011; 1808:1245-1255.

Correia-de-Sá P, Ribeiro JA. Evidence that the presynaptic A2A-adenosine receptor of the rat motor nerve endings positively coupled to adenylylase. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 1994; 350(5):514-522.

Cotman CW, Kahle JS, Miller SE, Ulas J, Bridges RJ.

Excitatory amino acid neurotransmission. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Eds Bloom & Kupfer, Raven Press, New York. 1995; 7:75-85.

Cunha RA. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors.. *Neurochemistry International*. 2001; 38(2):107-25.

Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A1 receptor activation to A2A receptor blockage. *Purinergic Signalling*. 2005; 1:111-134.

Cutrufo C, Bortot L, Giachetti A, Manzini S. Different effects of various xanthines on pentylenetetrazole-induced seizures in rats: An EEG and behavioural study. *European Journal of Pharmacology*. 1992; 222:1-6.

Czuczwar SJ, Janusz W, Wamil A, Kleinrok Z. Inhibition of aminophylline-induced convulsions in mice by antiepileptic drugs and other agents. *European Journal of Pharmacology*. 1987; 144:309-315.

Czuczwar SJ, Gasior M, Janusz W, Szczepanik B, Wodarczyk D, Kleinrok Z. Influence of different methylxanthines on the anticonvulsant action of common antiepileptic drugs in mice. *Epilepsia*. 1990; 31:318-323.

Dall'igna OP, da Silva AL, Dietrich MO, Hoffmann A, de Oliveira RV, Souza DO, Lara DR. Chronic treatment with caffeine blunts the hyperlocomotor but not cognitive effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in mice. *Psychopharmacology*. 2003; 166:258-63.

Danbolt NC. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*. 2001; 65:1-105.

Dingledine R, McBain CJ, McNamara JO. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*. Special Report.1991; 49-53.

Dunwiddie TV. Endogenously released adenosine regulates excitability in the in vitro hippocampus. *Epilepsia*. 1980; 21(5):541-8.

Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous. *Annual Review*. 2001; 24:31-55.

El Yacoubi M, Ledent C, Menard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. The stimulant effects of caffeine on locomotor behavior in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors. *British Journal of Pharmacology*. 2000; 129(7): 1465- 1473.

Featherstone DA. Intercellular glutamate signaling in the nervous system and beyond. *ACS Chemical Neuroscience*. 2010; 1(1):4-

12.

Forder JP, Tymianski M. Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density, proteins, radicals, and oxidant molecules. *Neuroscience*. 2009; 158: 293-300.

Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Review*. 1999; 51(1):83-133.

Fykse EM & Fonnum F. Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochemistry Research*. 1996; 21:1053-1060.

Gasior M, Borowicz K, Kleinrok Z, Starownik R, Czuczwar SJ. Anticonvulsant and adverse effects of MK-801, LY 235959, and GYKI 52466 in combination with Ca²⁺ channel inhibitors in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 1997; 56(4):629-35.

Gasior M, Borowicz K, Buszewicz G, Kleinrok Z, Czuczwar SJ. Anticonvulsant activity of phenobarbital and valproate against maximal electroshock in mice during chronic treatment with caffeine and caffeine discontinuation. *Epilepsia*. 1999; 51:83-133.

Gessi S, Varani K, Merighi S, Cattabriga E, Pancaldi C, Szabadkai Y, Rizzuto R, Klotz KN, Leung E, Mac Lennan S, Baraldi PG, Borea PA. Expression, pharmacological profile, and functional coupling of A2B receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand. *Molecular Pharmacology*. 2005; 67(6):2137-2147.

Hellsten J, West MJ, Arvidsson A, Ekstrand J, Jansson L, Wennström M, Tingström A. Electroconvulsive seizures induce angiogenesis in adult rat hippocampus. *Biological Psychiatry*. 2005; 58(11):871-8.

Hering H, Sheng M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001; 12:880-8.

Hoexter MQ, Rosa PS, Tufik S, Mello LE. Consequences of Prolonged Caffeine Administration and Its Withdrawal on Pilocarpine – and Kainate – induced Seizures in Rats. *Epilepsia*. 2005; 46(9):1401-1406.

Jacobs BL. Adult brain neurogenesis and depression. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2002; 16(5): 602-609.

Jimenez-Mateos EM, Henshall DC. Seizure preconditioning and epileptic tolerance: models and mechanisms. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*. 2009; 1(2):180-191.

Ito M. Long-term depression. *Annual Review of Neuroscience*.

1989; 12:85-102.

Ito M, Seki T, Liu J, Nakamura K, Namba T, Matsubara Y, Suzuki T, Arai H. Effects of repeated electroconvulsive seizure on cell proliferation in the rat hippocampus. *Synapse*. 2010; 64(11):814-21.

Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. Review - NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *The Lancet Neurology*. 2008; 7(8):742-755.

Kang UG, Koo YJ, Jeon WJ, Park DB, Juhnn YS, Park JB, Kim YS. Activation of extracellular signal-regulated kinase signaling by chronic electroconvulsive shock in the rat frontal cortex. *Psychiatry Research*. 2006; 145: 75-78.

Kaufman K, Sachdeo R. Caffeinated beverages and decreased seizure control. *Seizure*. 2003; 12:519-521.

Kessey K, Mogul DJ. Adenosine A2 receptors modulate hippocampal synaptic transmission via a cyclic-AMP-dependent pathway. *Neuroscience Reserch*. 1998; 84(1):59-69.

Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA. Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. *The Journal of Biological Chemical*. 2004; 279:33538–335-46.

Klitgaard H, Knutsen LJS, Thomsen C. Contrasting effects of adenosine A1 and A2 receptor ligands in different chemoconvulsive rodent models. *European Journal of Pharmacology*. 1993; 242:221-228.

Kodama M, Russel DS, Duman RS. Electroconvulsive seizures increase the expression of MAP kinase phosphatases in limbic regions of rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 2005; 30:360-371.

Kondratyev A, Sahibzada N, Gale K. Electroconvulsive shock exposure prevents neuronal apoptosis after kainic acid-evoked status epilepticus. *Molecular Brain Research*. 2001; 91(1-2):1-13.

Kulkarni C, Joseph T, David J. Influence of adenosine receptor antagonists, aminophylline and caffeine, on seizure protective ability of antiepileptic drugs in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1991; 29:751-754.

Kulkarni SK, Ticku MK. Interaction between GABAergic anticonvulsants and the NMDA receptor antagonist MK 801 against MES- and picrotoxin-induced convulsions in rats. *Life Sciences*. 1989; 44(18):1317-23.

Kurinji S, Andrade C. ECS seizure threshold: normal variations, and kindling effects of subconvulsive stimuli. *The Journal of ECT*. 2003; 19:31-37.

Kvamme E. Synthesis of glutamate and its regulation. *Progress*

in *Brain Research*. 1998; 116: 73-85.

Lamont SR, Paulls A, Stewart CA. Repeated electroconvulsive stimulation, but not antidepressant drugs, induces mossy fibre sprouting in the rat hippocampus. *Brain Research*. 2001; 893(1-2): 53-58.

Latini S, Pazzagli M, Pepeu G, Pedata F. A2 adenosine receptors: their presence and neuromodulatory role in the central nervous system. *General Pharmacology*. 1996; 27(6):925-933.

Lopes LV, Rebola N, Pinheiro PC, Richardson PJ, Oliveira CR, Cunha RA. Adenosine A3 receptors are located in neurons of the rat hippocampus. *Neuroreports*. 2003; 26;14(12):1645-8.

Lothman EW, Bennet JP, Perlin JB. Alterations in neurotransmitter amino acids in hippocampal kindled seizures. *Epilepsy Research*. 1987; 1:313-320.

Luszczki JJ, Kozicka M, Swiader MJ, Czuczwar SJ. 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine enhances the anticonvulsant action of carbamazepine in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. *Pharmacological Reports*. 2004; 57:787-794.

Luszczki JJ, Czuczwar SJ. How significant is the difference between drug doses influencing the threshold for electroconvulsions? *Pharmacological Reports*. 2005; 57:782-786.

Luszczki JJ, Zuchora M, Sawicka KM, Kozińska J, Czuczwar SJ. Acute exposure to caffeine decreases the anticonvulsant action of ethosuximide, but not that of clonazepam, phenobarbital and valproate against pentetrazole-induced seizures in mice. *Pharmacological Reports*. 2006; 58(5):652-659.

Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingstrom A. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biological Psychiatry*. 2000; 47:1043-1049.

Manocha A, Sharma KK, Mediratta PK. Possible mechanism of anticonvulsant effect of ketamine in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2001; 39(10):1002-8.

Masco D, Sahibzada N, Switzer R, Gale K. Electroshock seizures protect against apoptotic hippocampal cell death induced by adrenalectomy. *Neuroscience*. 1999; 91(4):1315-9.

Meldrum BS. Amino acid neurotransmitters in new approaches to an anticonvulsant drug action. *Epilepsia*. 1984; 22:140-149.

Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic an acquired models of epilepsy. *Epilepsy Research*. 1999; 36:189-204.

Mody I. Synaptic plasticity in kindling. *Advances in neurology*. 1999; 79:631-643.

Nakken KO, Solaas MH, Kjeldsen MJ, Friis ML, Pellock JM, Corey LA. Which seizure-precipitating factors do patients with epilepsy most frequently report? *Epilepsy Behaviour*. 2005; 6(1):85-89.

Newman ME, Gur E, Shapira B, Lerer B. Neurochemical mechanisms of action of ECS: evidence from in vivo studies. *The Journal of ECT*. 1998; 14(3):153-171.

Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sciences*. 2001; 69:369-381.

Ogita K, Okuda H, Yamamoto Y, Nishiyama N, Yoneda Y. In vivo neuroprotective role of NMDA receptors against kainate-induced excitotoxicity in murine hippocampal pyramidal neurons. *Journal of Neurochemistry*. 2003; 85:1336-1346.

Olney JW. Excitotoxic mechanisms of neurotoxicity. In: Spencer PS, Schaumburg HH. Eds. *Clinical and Experimental Neurotoxicology*. Williams and Wilkins, Baltimore. 1980; 272-294.

Olney JW, Farber NB. NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1995; 13: 335-45.

Ongur D, Heckers S. A role for glia in the action of electroconvulsive therapy. *Harvard Review of Psychiatry*. 2004; 12(5): 253-262.

Ozawa A, Kamiya H, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology*. 1998; 54:581-618.

Pumain R, Heinemann U. Stimulus and amino acid-induced calcium and potassium changes in rat neocortex. *Journal of Neurophysiology*. 1995; 53:1-16.

Ribeiro JA, De Mendonça A, Correia-de-Sá P, Cunha RA, Sebastião AM. Purinoceptors and synaptic plasticity. *Drug Development Research*. 1996; 39:353-360.

Ribeiro JA, Sebastião AM. Caffeine and adenosine. *Journal Alzheimer Disease: JAD*; 2010; 20 Suppl 1:S3-15.

Robinson MD, Dowd LA. Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Advances in Pharmacology*. 1997; 37:69-115.

Rosa MA, Odebrecht M, Rigonatti SP, Marcolin MA. Magnetoconvulsoterapia: indução de convulsões com estimulação magnética transcraniana. *Revista de Psiquiatria Clínica*. São Paulo. 2004; 31(5):262-265.

Rowley HL, Marsden CA, Martin KF. Generalised seizure-induced changes in rat hippocampal glutamate but not GABA release are potentiated by repeated seizures. *Neuroscience Letters*. 1997; 3:234(2-3):143-6.

Sackeim HA, Decina P, Kanzler M, et al. Effects of electrode placement on the efficacy of titrated low-dose ECT. *American Journal of Psychiatry*. 1987; 144:1449-55.

Sackeim HA, Prudic J, Devanand DP, et al. A prospective, randomized, double-blind comparison of bilateral and right unilateral electroconvulsive therapy at different stimulus intensities. *Archives of General Psychiatry*. 2000; 57:425-34.

Schousboe A. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *International Review of Neurobiology*. 1981; 22:1-45.

Schwartz PH, Wasterlain CG. Determination of serum and brain concentrations of neuroprotective and non-neuroprotective doses of MK-801. *Journal of the Neurological Sciences*. 1993; 115(1):26-31.

da Silva RS, Hoffman A, Souza OG, Lara D, Bonan CD. Maternal caffeine intake impairs MK-801-induced hyperlocomotion in young rats. *European Journal of Pharmacology*. 2005; 509:155-159.

Singh P, Mann KA, Mangat HK, Kaur G. Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2003; 243:139-145.

Stewart CA, Reid IC. Repeated ECS and fluoxetine administration have equivalent effects on hippocampal synaptic plasticity. *Psychopharmacology*. 2000; 148(3): 217-223.

Su RB, Wei XL, Zheng JQ, Liu Y, Lu XQ, Li J. Anticonvulsive effect of agmatine in mice. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. 2004; 77(2):345-9.

Swiader MJ, Luszczki JL, Zwolan A, Wielosz M, Czuczwar S. Effects of some convulsant agents on the protective activity of topiramate against maximal electroshock-induced seizures in mice. *Pharmacological Reports*. 2005; 57:373- 379.

Weiner R. The choice of stimulus intensity with ECT. *Journal of ECT*. 2002; 18:13-4.

Winn HR, Welsii JE, Bryner C, Rubio R, Berne RM. Brain adenosine production during the initial 60 seconds of bicuculline seizures in rats. *Acta Neurologica Scandinavica*. 1979; 60:536-537.

Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K. Animal models for the study of adenosine receptors functions. *Journal of Cellular Physiology*. 2005; 202:9-20.

Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Zeng D. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2005; 32(1):2-8.

Zimmermann H, Braun N, Kegel B, Heine P. New insights into molecular structure and function of ectonucleotidases in the nervous system. *Neurochemistry International*. 1998; 32:421-425.