

Epilepsia e Neuroproteção: O Papel do Agonista Adenosinérgico A₁ (RPia) na Modulação da Crise Induzida por Pilocarpina*

Iara Ribeiro Silva**, Astrid Nehlig***, Fernanda Elisa Rosim**, Thiago Vignoli**,
Daniele Suzete Persike**, João Paulo Blini**, Esper Abrão Cavalheiro**,
Rita Sinigaglia-Coimbra****, Maria José da Silva Fernandes**

Departamento de Neurologia e Neurocirurgia – Disciplina de Neurologia Experimental – UNIFESP – São Paulo, SP

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse estudo foi caracterizar a neuroproteção do RPia em ratos submetidos ao *status epilepticus* (SE) induzido pela pilocarpina (Pilo). **Métodos:** Avaliou-se o balanço entre utilização local da glicose cerebral (ULGC) e fluxo sanguíneo cerebral local (FSCL) após 4 horas de SE, e a marcação por Fluoro Jade-B (FJB), 24 horas e 90 dias após SE. Quatro grupos foram avaliados: Salina, Pilo, RPia+Salina e RPia+Pilo. **Resultados e Conclusão:** Aumentos significantes na ULGC foram observados na maioria das regiões avaliadas nos grupos Pilo e RPia+Pilo quando comparados ao controle. Entretanto, redução significativa na ULGC ocorreu na substância negra *pars reticulata* e giro denteado do grupo RPia+Pilo *versus* Pilo. Houve aumento significativo do FSCL em todas as áreas estudadas, comparando-se os grupos Pilo e RPia+Pilo com o controle. Foi observado um aumento significativo do FSCL durante SE em CA2, CA3, giro denteado, córtex entorrinal, corpo mamilar, núcleos talâmicos, núcleo rubro, zona incerta, núcleo oral da ponte e córtex visual, no grupo pré-tratado com RPia comparado ao tratado somente com Pilo. Grande número de células marcadas com FJB foi observado no grupo Pilo e o pré-tratamento com RPia reduziu essa marcação na formação hipocampal, córtex piriforme, amígdala basolateral e substância negra *pars compacta*.

Unitermos: Pilocarpina; neuroproteção; adenosina; metabolismo de glicose; fluxo sanguíneo cerebral.

ABSTRACT

Epilepsy and neuroprotection: Employment of the RPia during status epilepticus induced by pilocarpine

Objective: The aim of this study was to characterize the neuroprotection of the RPia in rats subjected to status epilepticus (SE) induced by pilocarpine (Pilo). **Methods:** We evaluated the mismatch between local cerebral glucose utilisation (LCGU) and local cerebral blood flow (LCBF) 4 hours after SE induction. Neuronal loss was evaluated by Fluoro Jade-B (FJB) 24 hours and 90 days after SE. Four groups were studied: Saline, Pilo, RPia+Saline and RPia+Pilo. **Results and Conclusions:** Significant increases in the LCGU were observed in the almost all brain regions of Pilo and RPia+Pilo groups compared to control. However, significant reduction in the LCGU occurred in the substantia nigra *pars reticulata* and hippocampal formation of RPia+Pilo group *versus* Pilo. There was significant increase of the LCBF in all the studied areas, comparing the Pilo and RPia+Pilo groups with the control. The increases of LCBF was more intense in rats from RPia+Pilo compared to Pilo, and located mainly in CA2, CA3, dentate gyrus, entorhinal cortex, thalamic nuclei, mammillary body, red nucleus, zone incerta, pontine nucleus and visual cortex. A great number FJB stained cells was observed in the Pilo group and RPia pretreatment reduced the staining in the hippocampal formation, piriform cortex, basolateral amygdala and substantia nigra *pars compacta*.

Key words: Pilocarpine; neuroprotection; adenosine; glucose metabolism; cerebral blood flow.

* Trabalho premiado com o Prêmio Aristides Leão durante o XXXII Congresso Brasileiro de Epilepsia.

** Departamento de Neurologia e Neurocirurgia – Disciplina de Neurologia Experimental – UNIFESP – São Paulo, SP.

*** Université Louis Pasteur – INSERM Unité 465 – Estrasburgo, França.

**** Centro de Microscopia Eletrônica – UNIFESP – São Paulo, SP.

Received June 16, 2008; accepted July 18, 2008.

INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pelo aparecimento de crises espontâneas devido à hiperatividade neuronal.¹² A epilepsia do lobo temporal (ELT) é uma forma comum dentre as epilepsias, compreendendo cerca de 40% de todos os casos.^{5,17} O modelo da pilocarpina vem sendo extensamente utilizado por reproduzir as principais características da epilepsia do lobo temporal (ELT) humana.¹⁰ Este modelo consiste na administração (i.p.) de altas doses de pilocarpina (300-380mg/kg), desencadeando uma seqüência de alterações comportamentais e eletrencefalográficas que incluem crises límbicas e estado de mal epiléptico podendo durar até 12 horas (fase aguda), seguido por um período de normalização de aproximadamente 14 dias que caracteriza a fase latente, e o aparecimento de crises espontâneas e recorrentes marca o início da fase crônica do modelo.¹

O uso desse modelo vem contribuindo para uma melhor compreensão da fisiopatologia da ELT, bem como possibilitando o estudo de novas terapias para amenizar os efeitos deletérios da crise. Nesse contexto, Vianna e colaboradores²¹ demonstraram que o uso de agonista adenosinérgico A₁ promove neuroproteção no hipocampo de ratos submetidos ao modelo da pilocarpina.

A adenosina é um neuromodulador com potente efeito depressor na transmissão sináptica excitatória, especialmente por ativar receptores A₁, e desempenha uma importante ação neuroprotetora contra os efeitos excitotóxicos desencadeados pela alta liberação de glutamato durante a atividade ictal.^{2,3,4,6,11,21} Além da propriedade neuromodulatória, estudos apontam a vasodilatação e o aumento na produção de energia através do transporte de glicose como efeitos benéficos da adenosina.¹⁴

Alguns autores sugerem que o desequilíbrio entre o consumo de glicose cerebral local e o aporte sanguíneo durante SE pode ser um dos fatores envolvidos no processo lesional.^{7,8,13,20} Fernandes e colaboradores⁵ em um estudo do metabolismo da glicose utilizando a técnica da [C¹⁴]-2DG¹⁸ em ratos adultos tratados com lítio-pilocarpina, demonstraram uma correlação entre hipermetabolismo e morte neuronal em algumas regiões envolvidas com a circuitaria da crise. Estudos auto-radiográficos envolvendo a relação entre fluxo e metabolismo em animais adultos submetidos a crises severas ou SE confirmam que a morte neuronal pode ser resultado de um desequilíbrio entre esses dois sistemas.^{9,20}

Estudos prévios demonstraram potente efeito neuroprotetor do agonista adenosinérgico A₁, RPia, no modelo lesional induzido por pilocarpina.²¹ Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o balanço entre a utilização local de glicose cerebral e o fluxo sanguíneo cerebral local durante SE induzido por pilocarpina em ratos pré-tratados com RPia, a fim de mapear possíveis altera-

ções nesses sistemas e associá-las ao processo de neuroproteção.

MÉTODOS

Ratos machos da linhagem Wistar, pesando de 250g a 300g mantidos sob ciclo claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e a ração, foram submetidos à aplicação de cloridrato de pilocarpina (4% – Sigma), na dose de 360mg/kg, i.p., 30 minutos após tratamento com metilescopolamina (1mg/kg, s.c. – Sigma), utilizada para minimizar os efeitos periféricos da pilocarpina⁽¹⁹⁾.

O agonista adenosinérgico A₁ RPia (R(-)-N6-(2-fenilisopropil)adenosina, Sigma), foi administrado na dose de 25µg/kg (i.p.), 15 minutos antes da injeção de pilocarpina ou de salina. De acordo com o tratamento, foram obtidos os seguintes grupos (n=18/grupo, sendo 5 para estudo do metabolismo, 5 para estudo do fluxo e 8 para o estudo do FJB): *Salina*: animais tratados com salina e DMSO; *Pilo*: animais tratados com pilocarpina, após pré-tratamento com salina e dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma); *RPia+Salina*: animais tratados com salina, após pré-tratamento com RPia; *RPia+Pilo*: animais tratados com pilocarpina, após pré-tratamento com RPia. Os grupos que foram submetidos à aplicação de RPia foram tratados com 1,5mg/kg de 8pSPT (8-p-sulfofenil)teofilina (i.p.), um antagonista adenosinérgico que minimiza os efeitos periféricos da adenosina. As drogas foram dissolvidas em DMSO e solução salina, na proporção de 1:5 (v/v).

Aproximadamente 24 horas antes da injeção de [C¹⁴]-2DG ou [C¹⁴]-IAP os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implantação dos cateteres (PE-50, Clay Adams) na artéria e veia femoral. A ULGC foi mensurada através do método de Sokoloff.¹⁸ A [C¹⁴]-2DG (300-350mCi/mmol – PerkinElmer) foi injetada por via intravenosa em concentração traço de 100µCi/kg, 4 horas após o início do SE (grupos experimentais) ou da aplicação de salina (grupos controles). Durante a administração de [C¹⁴]-2DG, amostras de sangue foram coletadas pelo cateter arterial para a obtenção do pico da concentração plasmática do radioisótopo e para análise da glicose sanguínea plasmática (Kit Glicose enzimática Líquida – Wiener). Após 45 minutos do início da administração de [C¹⁴]-2DG, os animais foram decapitados, os cérebros retirados, congelados em metilbutano (Sigma) à -25°C e estocados em -80°C até procedimentos seguintes.

A medida do fluxo sanguíneo cerebral local foi realizada através do método de Sakurada.¹⁶ Um volume de 1,0mL de IAP (56mCi/mmol; Amersham; 25mCi/mL) foi infundido por via intravenosa durante 1 minuto. Amostras de sangue arterial foram recolhidas e tratadas com 0,5 mL de solubilizador de tecido e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 30%, antes de ser submetido à contagem do C¹⁴ pelo equipamento contador de cintilação beta. Ao fi-

nal do procedimento (1min), os ratos foram decapitados, seus cérebros retirados e congelados em metilbutano a -25°C e estocados a -80°C até serem processados. Cortes coronais (20µm) foram feitos em criostato a -20°C e recuperados em lâminulas para montagem dos filmes autoradiográficos. Os padrões de C¹⁴ (Amersham) foram usados para a construção da curva de densidade óptica no momento da leitura dos filmes no sistema de análise de imagens. As concentrações das regiões cerebrais foram estimadas de acordo com o nível de cinza em relação à curva padrão.

Animais experimentais, 24 horas ou 3 meses após o insulto, e seus respectivos controles foram anestesiados e perfundidos por via transcardíaca com solução fixadora de formaldeído tamponado a 4%. Após, os cérebros foram fatiados em vibrátomo em cortes coronais de 40µm. As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e secas a temperatura ambiente. A reação foi feita em imersões consecutivas de álcool (80 e 70%), água destilada, permanganato de potássio 0.06% (15min), seguido de lavagens com água destilada, imersão em solução de FJB a 0.01% em ácido acético 0.1% sob leve agitação por 30min e sucessivas lavagens em água destilada. As lâminas foram secas em placa aquecida (50°C -10min), desidratadas em álcool, diafanizadas em xileno e montadas com "Vecta Mount" (Vector).

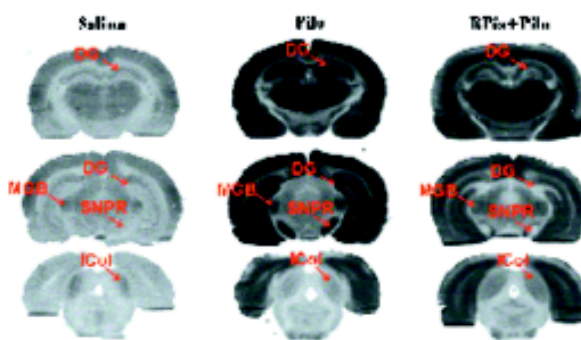
RESULTADOS

Não foram observadas diferenças significantes nos níveis de pressão arterial, glicose arterial, pH, pCO₂ e pO₂ entre os grupos estudados durante o experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos do SE e do RPia nas variáveis fisiológicas.

	Salina	Pilo	RPia+Pilo
Pressão Arterial (mmHg)	118,7 ± 13,3	130,0 ± 9	115,3 ± 8,6
Glicose Arterial (mg/dL)	115 ± 6,9	119,7 ± 9,5	113,2 ± 2,8
pH	7,48 ± 0,04	7,45 ± 0,03	7,43 ± 0,07
pCO ₂ (mmHg)	45,2 ± 1,7	33 ± 1,4	36,9 ± 6,1
pO ₂ (mmHg)	89,6 ± 2	83,5 ± 0,7	89,1 ± 3,7

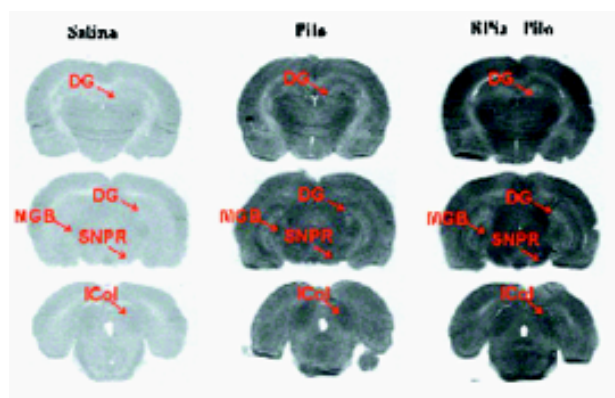
Aumentos significantes na ULGC foram observados em 38 das 44 regiões cerebrais de ratos do grupo Pilo comparados ao grupo controle e em 43 das 44 regiões do grupo RPia+Pilo quando comparado ao controle (ANOVA pós-teste de Bonferroni). A comparação entre os grupos experimentais Pilo e RPia+Pilo revelou diminuição significativa na ULGC do giro denteado (-54,01%; p<0.001) e da substância negra *pars reticulata* (-67,96%; p<0.001) nos animais do grupo RPia+Pilo (Figura 1).



* Giro denteado (DG), corpo geniculado medial (MGB), substância negra *pars reticulata* (SNPR) e colículo inferior (ICol).

Figura 1. Auto-radiogramas de [C¹⁴]2DG de secções coronais de cérebros de ratos adultos dos diferentes grupos: controle (Salina), Pilo, RPia+Pilo.

Foram observados aumentos significantes dos valores de FSCL em todas as áreas avaliadas, quando comparados os grupos experimentais Pilo e RPia+Pilo com seus respectivos controles. Durante SE houve aumento significativo do FSCL em CA2 (27,68%, p<0,05); CA3 (27,43%, p<0,01); giro denteado (27,53%, p<0,05); córtex entorrinal (29,46%, p<0,05); corpo mamilar (31,25%, p<0,05); tálamo médio-dorsal (38,57%, p<0,01); tálamo ventropóstero medial (30,07%, p<0,05); núcleo rubro (14,72%, p<0,05); tálamo posterior (34,82%, p<0,05); corpo geniculado medial (30,71%, p<0,05); zona incerta (31,87%, p<0,01); núcleo oral da ponte (34,82%, p<0,05); córtex visual (40,41%, p<0,05) no grupo pré-tratado com RPia em relação ao grupo tratado somente com pilocarpina (Figura 2).



*Giro denteado (DG), corpo geniculado medial (MGB), substância negra *pars reticulata* (SNPR) e colículo inferior (ICol).

Figura 2. Auto-radiogramas de [C¹⁴]-IAP de secções coronais de cérebros de ratos adultos dos diferentes grupos: controle (Salina), Pilo e RPia+Pilo.

O pré-tratamento com RPia reduziu a intensidade da marcação por FJB na formação hipocampal e no córtex piriforme 24 horas após início do SE (Figura 3). Além des-

nas áreas, 90 dias após o insulto, observou-se neuroproteção na amígdala basolateral e substância negra *pars compacta*. A reação foi negativa nos animais controles (Figura 4).

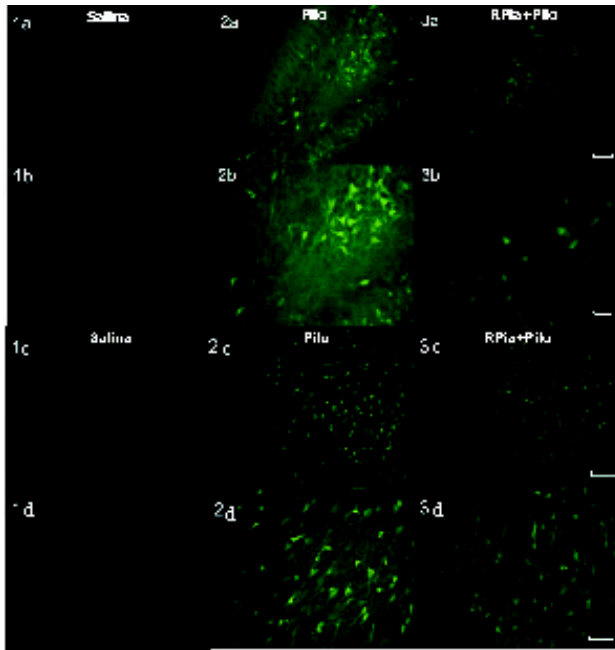


Figura 3. Coloração por FJB no hilo do giro dentado (a,b) e córtex piriforme (c,d) de ratos adultos durante condições controle salina (1), 24h após Pilo (2) e 24h após RPia+Pilo (3). (a,c) barra 50 μ m; (b,d) barra 20 μ m.

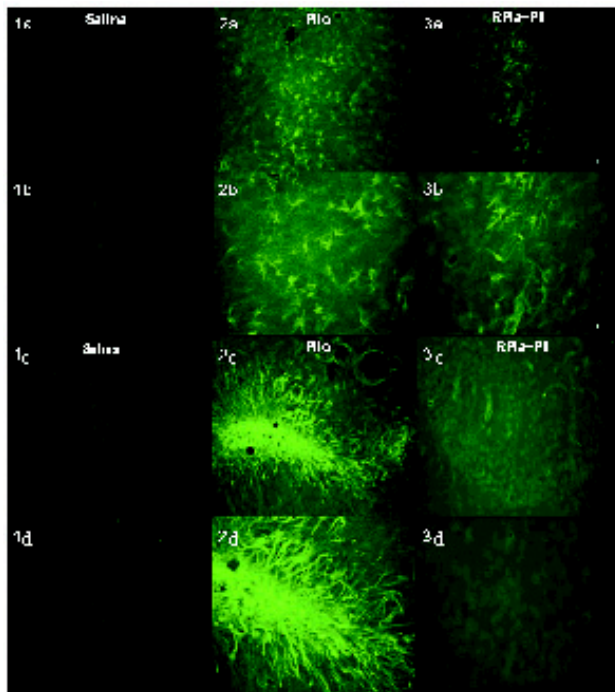


Figura 4: Coloração por FJB da amígdala basolateral (a,b) e córtex piriforme (c,d) de ratos adultos durante condições controle salina (1), 3 meses após Pilo (2) e 3 meses após RPia+Pilo (3). (a,c) barra 50 μ m; (b,d) barra 20 μ m.

CONCLUSÕES

O pré-tratamento com RPia em ratos submetidos ao modelo da pilocarpina promoveu hipometabolismo durante o SE em regiões envolvidas na circuitaria da crise, como por exemplo, o giro dentado e a substância negra *pars reticulata*. Concomitantemente, detectou-se hiperfluxo em áreas como CA2; CA3; giro dentado; córtex entorrinal; corpo mamilar; núcleos médio-dorsal, ventro-póstero medial e posterior do tálamo; corpo geniculado medial; núcleo rubro; zona incerta; núcleo oral da ponte e córtex visual. O resultado indica modulação desses sistemas pelo RPia favorecendo processos de neuroproteção que foi demonstrada pela redução na densidade de células marcadas pelo FJB no hipocampo, córtex piriforme, amígdala basolateral e substância negra *pars compacta* de ratos pré-tratados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro do CnPq, Capes, Fapesp e Fap-Unifesp.

REFERÊNCIAS

1. Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci.* 1995; 16(1-2):33-7.
2. Dunwiddie TV. Adenosine and Supression of Seizures. *Advances in Neurology* 1999; 3:1001-10.
3. Dunwiddie TV, Fredholm BB. Adenosine A1 receptors inhibit adenylate cyclase activity and neurotransmitter release and hyperpolarize pyramidal neurons in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 249:31-7.
4. Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 2001; 24: 31-55.
5. Fernandes MJS, Dube C, Boyet S e col. Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1999; 19(2):195-9.
6. Gouder N, Fritschy JM, Boison D. Seizure suppression by adenosine A₁ receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 2003; 44(7):877-85.
7. Handforth A, Treiman DM. Functional mapping of the early stages of status epilepticus: a ¹⁴C-deoxyglucose study in the lithium-pilocarpine model in rat. *Neuroscience* 1995; 64: 1057-73.
8. Ingvar M. Cerebral blood flow and metabolic rate during seizures: relationship to epileptic brain damage. *Ann NY Acad Sci* 1986; 462:207-23.
9. Ingvar M, Siesjö BK. Local blood flow and glucose consumption in the rat brain during sustained bicuculine-induced seizures. *Acta Neurol Scand* 1983; 68:129-44.
10. Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research* 2002; 50:93-103.
11. MacGregor DG, Stones TW. Inhibition by adenosine analogue, (R)-N6- phenylisopropiladenosine, of kainic acid neurotoxicity in rat hippocampus after systemic administration. *Br J Pharmacol* 1993; 109:316-21.
12. McNamara J.O. Emerging insights into the Genesis of epilepsy. *Nature* 1999; 399:A15-22.

13. Meldrum, BS. Metabolic factors during prolonged seizures and their relation to nerve cell death. *Adv Neurol* 1983; 34:261-75.
14. Ramkumar V, Nie Z, Rybak L, Maggirwar SB. Adenosine, antioxidant enzymes and cytoprotection. *TiPS* 1995; 16:283-5.
15. Regesta G, Tanganelli P. Clinical aspects and biological bases of drug-resistant epilepsies. *Epilepsy Res* 1999; 34(2-3):109-22.
16. Sakurada O, Kennedy C, Jehle J e col. Measurement of local cerebral blood flow [¹⁴C] iodoantipyrine. *Am J Physiol* 1978; 234: H59-66.
17. Sloviter RS. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *Comptes Rendus Biologies* 2005; 328:143-53.
18. Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C e col. The [¹⁴C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of Neurochemistry* 1977; 28:897-916.
19. Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z e col. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* 1983; 9(12):1408-11.
20. Vasconcelos, A P. Local Cerebral Blood flow during lithium-pilocarpine seizures in the developing and adult rat: role of coupling between blood flow and metabolism in the genesis of neuronal damage. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2002; 22:196-205.
21. Vianna EPM, Ferreira AT, Dona F e cols. Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. *Epilepsia* 2005; 46(5):166-73.

Endereço para correspondência:

Maria José da Silva Fernandes
Rua Pedro de Toledo, 781 – 6^o andar
CEP: 04039-032, São Paulo, SP, Brasil
E-mail: fernandes.nexp@epm.br