

Efeito Neuroprotetor da Melatonina e N-Acetilserotonina na Epileptogênese e no Controle de Crises em Animais Submetidos ao Modelo da Pilocarpina*

Eliângela de Lima, Francisco Romero Cabral, Esper Abrão Cavalheiro,
Maria da Graça Naffah-Mazzacoratti, Débora Amado

Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina – UNIFESP/EPM, São Paulo, SP

Unitermos: melatonina, N-acetilserotonina, epilepsia do lobo temporal, hipocampo, modelo experimental.

ABSTRACT

Neuroprotector effect of melatonin and N-acetylserotonin in the epileptogenesis and in the control of seizures in animals submitted to the pilocarpine model

Purpose: The aim of this research was to study the effects of treatment with melatonin and N-acetylserotonin in the development of pilocarpina model of epilepsy in adult male rats. **Methods:** PART I – The animals were divided in 4 groups: SALINE – animals that received only saline; SE – animals submitted to *status epilepticus* (SE); NAS + SE – animals that received pre-treatment with N-acetylserotonin and were submitted to SE and MEL + SE – animals that received pre-treatment with melatonin and were submitted to SE. PART II – The animals were divided in 6 groups: SALINE – animals that received only saline; SE – animals submitted to *status epilepticus* (SE); PX + SE – animals submitted to pinealectomy and to SE 7 days later; SH + SE – animals submitted to sham-surgery and to SE 7 days later; SE + NAS – animals submitted to SE and treated with N-acetylserotonin (2,5 mg/kg), 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h after the SE and SE + MEL – animals submitted to SE and treated with melatonin (2,5 mg/kg), 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, 36 h and 48 h after the SE. Following the treatment the animals were continuously video-recorded for 60 days. The behavioral parameters were observed: latency for the SE in minutes, latency for the first spontaneous seizures (ie, duration of the silent period), number of spontaneous seizures during the chronic period and mortality. Five animals per group were perfused for neo-Timm assay. **Results:** PART I – The animals treated with melatonin and N-acetylserotonin presented an increased of latency for the *status epilepticus* and decreased number of spontaneous seizures during the chronic period when compared to SE group. The mortality was reduced 100% in animals treated with melatonin and these animals presented a minor mossy fibers sprouting. PART II – The latency for the first spontaneous seizures and mortality were similar in all groups. The animals treated with melatonin presented a decreased number of spontaneous seizures during the chronic period when compared to PX + SE group and a minor mossy fibers sprouting when compared to SE, SH + SE and PX + SE groups. **Conclusion:** Our data show that the melatonin and N-acetylserotonin have an important neuroprotector effect in the epileptogenesis and in the control of seizures during the chronic period of the pilocarpina model of epilepsy induced by pilocarpina.

Key words: melatonin, N-acetylserotonin, temporal lobe epilepsy, hippocampal, experimental model.

* Trabalho premiado com o Prêmio “Jovem Pesquisador – Experimental” durante o XXXI Congresso Brasileiro de Epilepsia da LBE. Received June 22, 2006; accepted June 26, 2006.

INTRODUÇÃO

A melatonina possui reconhecidas funções hormonais e cronobiológicas, porém a função de neuroproteção contra a ação de radicais livres na célula é um achado importante, e vem sendo estudado nos últimos anos (Barlow-Waden e cols., 1995; Hardeland & Rodriguez, 1995; Reiter, 1995), assim como a ação antiinflamatória da melatonina e de seu precursor N-acetilserotonina em processos inflamatórios agudo (Lotufo e cols., 2001; Oxenkrug e cols., 2001).

Pei e Cheung (2004) demonstraram um potente efeito supressor no aumento da imuno-reatividade para óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS), ciclooxigenase 2 (COX2) e mieloperoxidase (MPO), de uma única dose de melatonina (5 mg/kg), 30 minutos antes do período de 1 hora de isquemia por obstrução da artéria cerebral média, assim como seus efeitos na imuno-reatividade para G-FAP 24, 48 ou 72 horas após isquemia/lesão por reperfusão. Outros estudos em fatias de medula espinhal têm demonstrado que a melatonina potencializa os receptores GABAérgicos, hiperpolarizando as células, diminuindo então a excitabilidade neuronal, o que pode estar contribuindo para os efeitos neuroprotetores da melatonina (Wu e cols., 2001).

Todas estas circunstâncias sugerem a possível indicação terapêutica da melatonina como agente de neuroproteção no sistema nervoso central.

Dentre as síndromes epilépticas refratárias, a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a mais freqüente, onde 20% dos pacientes mostram-se refratários aos anticonvulsivantes disponíveis no mercado (Yacubian 1998). Para se compreender melhor estes eventos, os modelos experimentais são muito úteis uma vez que reproduzem as características comportamentais, eletrográficas e morfológicas da ELT humana (Cavalheiro 1995). Um dos modelos de epilepsia que mais tem sido usado é o modelo da pilocarpina descrito por Turski e cols., 1983. Em ratos adultos, a pilocarpina desencadeia uma seqüência de distúrbios convulsivos e eletrográficos que podem ser divididos em três fases: aguda (*status epilepticus* – SE), silenciosa (sem alterações comportamentais e eletrográficas) e crônica (ocorrência de crises espontâneas e recorrentes). Estudo recente realizado por nosso grupo verificou que animais pinealectomizados e submetidos ao modelo da pilocarpina apresentaram um menor período silencioso, uma maior freqüência de crises na fase crônica e um maior grau de brotamento das fibras musgosas no giro denteado, indicando que a pinealectomia promove um aumento da excitabilidade neuronal e uma facilitação do processo epileptogênico neste modelo. Verificou-se também que o pré-tratamento com melatonina nestes animais protege os neurônios da morte celular por apoptose evidenciando seu papel neuroprotetor (Lima e cols., 2005).

Nosso grupo tem se dedicado ao estudo da ELT e dentre inúmeros estudos, um deles é verificar o papel da melatonina e de seu precursor N-acetilserotonina na epileptogênese como um agente terapêutico, uma vez que, uma terapia anticonvulsivante sem efeitos tóxicos, capaz de antagonizar os receptores glutamatérgicos é um ponto importante na pesquisa da epilepsia.

OBJETIVO

Considerando os possíveis efeitos da melatonina em potencializar a transmissão GABAérgica, diminuindo a excitabilidade neuronal, exercendo sua função neuroprotetora (antioxidante) e o seu efeito antiinflamatório bem como de seu precursor N-acetilserotonina, o objetivo deste estudo é verificar a influência da melatonina e de seu precursor N-acetilserotonina na epileptogênese e no controle das crises em animais submetidos ao modelo da pilocarpina.

MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo/Universidade Federal de São Paulo, processo nº 0999/03. Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento do animal, de acordo com a International Ethical Guidelines (CIOMS/OMS, 1985).

Para realização deste trabalho utilizamos ratos Wistar, machos, adultos, pesando entre 200-250 g no início do experimento. Os animais foram divididos em grupos de acordo com o protocolo a ser estudado.

PARTE I – Efeito do pré-tratamento com melatonina e N-acetilserotonina na dose de 2,5 mg/kg administradas em 4 tempos diferentes

Grupo 1 – Animais que receberam somente salina (SAL, n = 5). Estes animais foram sacrificados para a técnica de neo-Timm;

Grupo 2 – Animais que receberam somente pilocarpina e apresentaram SE (SE, n = 14);

Grupo 3 – Animais que receberam N-acetilserotonina na dose de 2,5 mg/kg aos 20 minutos anteriores à administração de pilocarpina; imediatamente após a administração de pilocarpina; 1 h e 2 h após o início do SE (NAS + SE, n = 14);

Grupo 4 – Animais que receberam melatonina na dose de 2,5 mg/kg aos 20 minutos anteriores à administração de pilocarpina; imediatamente após a administração de pilocarpina; 1 h e 2 h após o início do SE (MEL + SE, n = 24);

Os animais dos grupos SE; NAS + SE e MEL + SE foram vídeo-monitorados por 60 dias após a primeira crise espontânea e após este período foram sacrificados para a técnica de neo-Timm.

Os animais injetados com pilocarpina, foram pré-tratados com metil-escopolamina 30 minutos antes da pilocarpina através de injeção subcutânea (1 mg/kg), para minimizar os efeitos periféricos provocados pela mesma.

As doses de melatonina e N-acetilserotonina foram preparadas no mesmo dia da administração, dissolvendo-se as quantidades necessárias em uma solução contendo 5% de etanol absoluto em salina (v:v). A administração foi feita por via intraperitoneal.

PARTE II – Efeito do pós-tratamento com melatonina e N-acetilserotonina nas doses de 2,5 mg/kg cada, administradas em 9 tempos diferentes

Grupo 1 – Animais que somente receberam solução salina (SAL, n = 5);

Grupo 2 – Animais que receberam pilocarpina e apresentaram SE (SE, n = 14);

Grupo 3 – Animais pinealectomizados (PX) que receberam pilocarpina 7 dias após o procedimento cirúrgico e apresentaram SE (PX + SE, n = 12);

Grupo 4 – Animais falso-operados (SHAM) que receberam pilocarpina 7 dias após o procedimento cirúrgico e apresentaram SE (SH + SE, n = 6);

Grupo 5 – Animais tratados com N-Acetilserotonina (9 × 2,5 mg/kg) aos 30 minutos, 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 12 h; 24 h; 36 h e 48 h após o início do SE (SE + NAS, n = 6);

Grupo 6 – Animais tratados com melatonina (9 × 2,5 mg/kg) aos 30 minutos 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 12 h; 24 h; 36 h e 48 h após o início do SE (SE + MEL, n = 10).

Os animais do grupo SE, PX + SE, SH + SE, SE + NAS e SE + MEL foram vídeo-monitorados por 60 dias após a primeira crise espontânea e após este período os animais foram sacrificados para a técnica de neo-Timm.

RESULTADOS

PARTE I – Efeito do pré-tratamento com melatonina e N-acetilserotonina (4 × 2,5 mg/kg)

Os animais pré-tratados com melatonina ou N-acetilserotonina apresentaram uma diminuição na latência para a ocorrência do SE. Podemos observar uma média de 29,11 ± 7,38 minutos para o grupo SE; 44,5 ± 11,61 para o grupo NAS + SE (p < 0,001) e 39,00 ± 16,21 para o grupo MEL ± SE (p < 0,05). Quando observamos a latência para a primeira crise espontânea não observamos diferença entre os grupos.

Os animais dos grupos NAS + SE e MEL + SE apresentaram uma diminuição na frequência de crises (0,55 ± 0,62, p < 0,01 e 1,51 ± 0,77, p < 0,05, respectivamente) quando comparados com os animais do grupo SE (2,61 ± 0,64).

Os animais do grupo SE apresentaram uma mortalidade de 60%, enquanto que os animais do grupo MEL +

SE (animais que receberam melatonina antes do SE) tiveram uma taxa de sobrevivência de 100%. Quanto aos aspectos morfológicos, verificamos que os animais que receberam melatonina tiveram uma diminuição no brotamento das fibras musgosas quando comparados com o grupo SE.

PARTE II – Efeito do pós-tratamento com melatonina e N-acetilserotonina (9 × 2,5 mg/kg)

Não observamos diferença entre os grupos quando observamos a latência para a ocorrência da primeira crise espontânea e a mortalidade após o SE. No entanto, os animais pinealectomizados apresentaram um aumento na frequência de crises por semana (PX + SE – 5,33 ± 1,88, p < 0,01) quando comparados com o grupo SE (2,61 ± 0,64). Os animais tratados com melatonina (SE + MEL) apresentaram uma diminuição na frequência de crises por semana (1,39 ± 0,49, p < 0,001 e p < 0,05) quando comparados com os animais dos grupos PX + SE (5,33 ± 1,88) e SH + SE (3,88 ± 0,55). Quanto à análise morfológica, os animais tratados com melatonina apresentaram uma diminuição no brotamento das fibras musgosas quando comparados com os grupos SE, SH + SE e PX + SE.

CONCLUSÃO

Nossos dados apontam para um importante efeito neuroprotetor da melatonina e N-acetilserotonina quando administradas antes da pilocarpina, uma vez que os animais que receberam o pré-tratamento com ambas apresentaram uma melhora nos aspectos comportamentais que se seguem após a injeção de pilocarpina. Além disso, os animais que receberam o pré-tratamento com melatonina apresentaram uma diminuição no brotamento das fibras musgosas e uma taxa de 100% de sobrevivência.

O pós-tratamento não se mostrou tão eficaz quanto aos aspectos comportamentais, no entanto, observamos uma diminuição no brotamento das fibras musgosas nesses animais. Quando observamos os animais que foram pinealectomizados, ou seja, animais que não tem a melatonina endógena, verificamos um aumento na frequência de crises e um aumento no brotamento das fibras musgosas quando comparados com os animais do grupo SE.

Observando nossos dados, acreditamos que a melatonina e a N-acetilserotonina possa vir a ser usada como uma possível ferramenta terapêutica coadjuvante no tratamento das epilepsias.

REFERÊNCIAS

- Barlow-Walden L, Reiter JJ, Abe M; Pablos M, Mendez-Pelaez A, Chen LD, Poeggeler B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995; 26:497-502.
- Cavalleiro EA. The pilocarpine model of epilepsy. *Ital J Neurol Sci* 1995; 16(1-2):33-7.

- CIOMS/OMS. Council for International Organizations of Medical Services. WHO Distribution and sales service, 1211 Geneva 27, Switzerland, International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, 1985.
- Hardeland R, Rodriguez C. Versatile melatonin: a pervasive molecule serves various functions in signaling and protection. *Chronobiol Int* 1995; 12:157-65.
- Lima E, Soares JM, Garrido YCS, Valente SG, Priel MR, Baracat EC, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, Amado D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal lobe epilepsy in rats. *Brain Res* 2005; 1043(1-2):24-31.
- Lotufo CMC, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SH, Markus RP. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 2001; 430:351-7.
- Oxenkrug G, Requentina P, Bachurin S. Antioxidant and antiaging activity of N-acetylserotonin *in vivo* models. *Ann NY Academy of Sci* 2001; 939:190-9.
- Pei Z, Cheung RT. Pretreatment with melatonin exerts anti-inflammatory effects against ischemia/reperfusion injury in a rat middle cerebral artery occlusion stroke model. *J Pineal Res* 2004; 37:85-91.
- Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *Fedn Am Soc Exp Biol J* 1995; 9: 526-33.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarcz M, Czuczwarz SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983; 9:315-35.
- Wu FS, Yang YC, Tsai JJ. Melatonin potentiates the GABA_A receptor-mediated current in cultured chick spinal cord neurons. *Neurosci Lett* 1999; 260:177-80.
- Yacubian EMT. Epilepsias refratárias em adultos. In: Costa JC, editor. *Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos*. São Paulo: Lemos Editorial; 1998. p. 807-16.

Endereço para correspondência:
Débora Amado
Rua Botucatu, 862 – Ed. Leal Prado
CEP 04023-900, São Paulo, SP, Brasil
E-mail: amado.nexp@epm.br