

PARTICIPAÇÃO DA INOS NO PROCESSO DE EPILEPTOGÊNESE NO MODELO DE EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL INDUZIDO PELA PILOCARPINA EM RATOS

Jacqueline Nunes de Menezes¹; Ricardo Henrique Marques²

Estudante do Curso de Medicina; e-mail: jacque_menezes@hotmail¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: rmarques@umc.br²

Área do Conhecimento: Fisiopatologia.

Palavras-chave: Epileptogênese; Pilocarpina; iNOS; Hipocampo; 1400W.

INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença crônica, recorrente, caracterizada por alterações paroxísticas da atividade intelectual, sensorial, motora, autonômica ou afetiva, sendo tempo-limitada e presumivelmente relacionada à hiperreatividade neuronal síncrona (Alter et al, 1972). Atingindo 50 milhões de pessoas no mundo, é considerada o transtorno neurológico sério mais frequente na população (Scott et al, 2001). A epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de crise parcial complexa (Hauser et al, 1996; Wieser, 2004), sendo a variante que mais apresenta refratariedade ao tratamento com drogas antiepilépticas (Engel, 1993). Suas características principais são: (1) localização dos focos de convulsão no sistema límbico, particularmente no hipocampo, córtex entorrinal e amígdala (Bartolomei et al, 2005); (2) frequente achado de uma “injúria precipitante” que antecede o surgimento da ELT (Mathern et al, 2002); (3) período latente seguido da “injúria precipitante”, ou seja, um intervalo caracterizado pela ausência de crises convulsivas. Estudos *in vitro* sugerem que um aumento de glutamato extracelular e da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), assim como a resultante peroxidação lipídica, podem estar relacionados com este fenômeno (Cohen et al., 1987; Candelario-Jalil et al., 2000). A geração de EROs tem sido considerada como parte dos mecanismos envolvidos com a excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* (Bonfoco, 1995) e *in vivo* (Bondy e Lee, 1993; Bruce e Baudry, 1995; Ueda et al., 1997). As EROs são essenciais na manutenção da homeostase celular. O ambiente redox intracelular é constantemente controlado e mantido em estado redutor, a não ser que a célula seja exposta a situações oxidantes extremas. O ambiente redox também é importante para manter a atividade biológica e a geração adequada tanto de Eros, quanto de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Schafer e Buettner, 2001). O estresse oxidativo está presente em uma variedade de condições patológicas incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e epilepsia, levando ao prejuízo oxidativo irreversível dos lipídios, proteínas, DNA e ativação de processos de apoptose (Bruce e Baudry, 1995;; Todorova et al., 2004; Valko et al., 2007). Além disso, há evidências de que a inflamação, tendo efeitos significantes sobre a integridade da barreira hematoencefálica, afeta a função cerebral normal e contribui na fisiopatologia das convulsões (Marchi et al, 2007; Seiffert et al, 2004). A resposta inflamatória envolve a produção de vários mediadores pró-inflamatórios e radicais livres, como o óxido nítrico (NO), o qual está associado à transdução de vias de sinalização ativadas pelo stress, levando à morte

neuronal (Meda et al, 2001; Minagar et al, 2002). A ativação da NOS, essencial à síntese do NO, ocorre principalmente devido à estimulação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Snyder SH, 1992), tendo sido identificadas três isoformas desta enzima: as constitutivas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), além da forma induzida (iNOS) (Mayer & Hemmens, 1997). Foi demonstrado que, no hipocampo de uma determinada espécie de ratos, nNOS e iNOS tiveram elevação de suas concentrações proporcionalmente ao desenvolvimento da epileptogenicidade (Murashima et al, 2000), o que corrobora a relação entre a produção de radicais livres e a ocorrência do mal epilético. Com base nesses dados, a utilização de fármacos inibidores da NOS pode ser um importante recurso ao se estudar o papel exercido por cada isoforma da enzima no processo de epileptogênese. Através da utilização de um inibidor seletivo da iNOS, o 1400W, pretende-se, neste projeto, estabelecer o papel da iNOS na epileptogênese.

OBJETIVOS

Avaliar a participação da enzima Óxido Nítrico Sintetase induzida na epileptogênese em ratos submetidos ao modelo de epilepsia do lobo temporal induzido pela pilocarpina.

METODOLOGIA

Animais

Nos experimentos foram utilizados ratos machos da espécie Wistar, com peso entre 260 e 300 g. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade de Mogi das Cruzes.

Grupos Experimentais

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: A. SAL – n=8; B. PILO – n=8; C. PILO-1400W n=8; D. SAL-1400 n=8

Modelo da Pilocarpina

Os animais foram previamente tratados com metil-escopolamina, visando minimizar os efeitos periféricos da PILO. Posteriormente, esses animais foram injetados com PILO diluída em salina estéril e administrada intraperitonealmente. Após 4 horas do início do SE foi administrado diazepam e o 1400W tratamento este que ocorreu por 4 dias pós SE. Os animais tratados com PILO que apresentarem SE foram monitorados diariamente durante 24hs por dia, a partir do 3o dia pós SE. Após ter sido estabelecido o padrão de crises os animais serão levados a eutanásia. Uma vez retirado do crânio o encéfalo será mantido em formol 10% por uma semana, após sete dias os encéfalos serão cortados por congelamento. As fatias referentes às coordenadas do hipocampo serão montadas em laminas gelatinizadas e coradas, pela Técnica de Nissl e NeoTim, após 24 horas

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em conformidade com a descrição do modelo experimental, uma única dose de PILO induziu uma sequência de alterações comportamentais características de atividade epilética. A fase aguda foi seguida por um período latente, durante o qual os animais se mostraram inicialmente muito debilitados devido ao SE, retornando progressivamente ao comportamento normal, usualmente dentro de 48-72 após o SE. A mortalidade pós-SE não foi reduzida no grupo de animais tratados com o 1400W, comparativamente ao grupo crônico sem tratamento. O grupo de animais tratados apenas com veículo apresentou os mesmos sintomas, atingindo um índice de mortalidade pós-SE sem diferença para o

grupo crônico.

O marco inicial do período crônico do modelo experimental da PILO foi determinado pelo aparecimento da primeira crise espontânea dos animais, caracterizada por movimentos mastigatórios, eventual salivação seguido por abalos clônicos de um ou dos dois membros anteriores, elevação do corpo com apoio nas patas posteriores concomitantemente a clonias das patas anteriores, perda do equilíbrio postural e convulsão tônico-clônico generalizada.

Ao determinar o intervalo de tempo entre o SE e a ocorrência da primeira crise epilética espontânea nos animais sobreviventes ao procedimento experimental, observou-se que o tratamento com o inibidor promoveu discreto aumento do período de latência.

Por fim, cabe ressaltar que, em relação aos grupos PILO e PILO-1400, os animais que sobreviveram ao SE continuarão sendo monitorados para determinação da frequência de crises, porém devido a alta mortalidade dos animais no modelo novos grupos deverão ser formados para melhor avaliação do período de latência e frequência de crises espontâneas e recorrentes.

Os dados preliminares em relação a frequência de crises mostram uma discreta redução. Animais crônicos dos diferentes grupos experimentais discutidos na seção anterior foram sacrificados para avaliação histológica de seus respectivos hipocampus. Cortes histológicos, analisados qualitativamente pela coloração de Nissl, sugerem uma discreta preservação celular nas regiões CA1 e CA3 em animais tratados com o inibidor 1400W. Nos animais dos grupos PILO-VEÍCULO e PILO, observou-se perda neuronal nas regiões CA1 e CA3, a qual foi mais evidente em hipocampus de animais do grupo PILO. Observando a região do hilo do giro denteado, notou-se uma variabilidade na dispersão celular em animais tratados com o inibidor 1400W, quando comparado à mesma região em animais dos grupos PILO-VEÍCULO e PILO.

Quando cortes histológicos da formação hipocampal foram analisados pela coloração de Neo-Timm, não foi observada diferença marcante no padrão de brotamento axonal de fibras musgosas entre os grupos experimentais.

CONCLUSÕES

Concluir se os objetivos foram alcançados, tomando como referencial a discussão dos resultados. Apresentar, se necessário, sugestão para futuras pesquisas relacionadas ao projeto desenvolvido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTER, M.; MASLAND, R.L.; KURTZKE, J.F. Proposed definitions and classifications of epilepsy for epidemiological purposes. In M. Alter & W.A. Hauser (eds.): The Epidemiology of Epilepsy: a Workshop. NINDS Monograph 14, Bethesda, 1972, p. 147.

BARTOLOMEI, F.; KHALIL, M.; WENDLING, F.; SONTHEIMER, A.; REGIS, J.; RANJEVA, J.P. et al. Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia* 2005; 46: 677-687

BONDY SC, LEE DK (1993) Oxidative stress induced by glutamate receptor agonists. *Brain Res.* 610:229-33.

BONFOCO E, KRAINIC D, ANKARCRONA M, NICOTERA P, LIPTON SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:7162-6.

BRUCE AJ, BAUDRY M (1995) Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. *Free Radic Biol Med*. 18:993-1002.

CANDELARIO-JALIL E, AJAMIEH HH, SAM S, MARTINEZ G, LEON FERNANDEZ OS (2000) Nimesulide limits kainate-induced oxidative damage in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol*. 390:295-8.

COHEN MR, RAMCHAND CN, SAILER V, FERNANDEZ M, MCAMIS W, SRIDHARA N, ALSTON C (1987) Detoxification enzymes following kainic acid. *Neurochem Res*. 12:425-9.

ENGEL, J. JR. 1993. Clinical neurophysiology, neuroimaging, and the surgical treatment of epilepsy. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6: 240-249.

HAUSER, W.A.; ANNEGERS, J.F., ROCCA, W.A. Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 1996; 71: 576-586

MARCHI, N.; Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, et al. 2007. Seizure-promoting effect on blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 48: 732-742.

MATHERN, G.W.; ADELSON, P.D.; CAHAN, L.D.; LEITE, J.P. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 2002; 135: 237-251.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 477-481.

MEDA, L.; BARON, P.; SCARLATO, G. Glial activation in Alzheimer's disease: the role of abeta and its associated proteins. *Neurobiol Aging* 2001 22: 885-893.

MINAGER, A.; SHAPSSHAK, P.; FUJIMORA, R.; OWNBY, R.; HEYES, M., EISDORFER, C. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 2002 202: 13-23.

MURASHIMA Y.L.; YOSHI M.; SUZUKI J. Role of nitric oxide in the epileptogenesis of EL mice. *Epilepsia* 2000; 41 (Suppl. 6): S195-199.

SEIFFERT, E.; DREIER, J.P.; IVENS, S.; BECHMANN, I.; TOMKINS, O. et al. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2004 24: 7829-7836.

SCHAFER FQ, BUETTNER GR (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione. *Free Radic Biol Med.* 30: 1191-212.

SCOTT, R.A.; LHATOO, S.D.; SANDER, J.W. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? *Bull World Health Organ.* 2001;79(4):344-51.

SNYDER SH. Nitric oxide: first in a class of neurotransmitters. *Science* 1992; 257: 494-496.

TODOROVA VK, HARMS SA, KAUFMANN Y, LUO S, LUO KQ, BABB K, KLIMBERG VS (2004) Effect of dietary glutamine on tumor glutathione levels and apoptosis- related proteins in DMBA-induced breast cancer of rats. *Breast Cancer Res Treat* 88: 247–56.

UEDA Y, YOKOYAMA H, NIWA R, KONAKA R, OHYA-NISHIGUCHI H, KAMADA H (1997) Generation of lipid radicals in the hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. *Epilepsy Res.* 26:329-33.

VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J (2007) Free radicals and antioxidants in normal functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44-84.

WIESER HG. ILAE Commision on Neurosurgery of Epilepsy. ILAE Comission Report. Mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2004; 45:

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, Fapesp, Capes e Faep pelo apoio financeiro este projeto.