

Adenosina e Neuroproteção na Epilepsia do Lobo Temporal: Da ativação do receptor A_1 ao bloqueio do receptor A_{2A}

Fernanda Elisa Rosim, Iara Ribeiro Silva, Daniele Suzete Persike, Thiago Vignoli,
Maria José da Silva Fernandes

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

RESUMO

Objetivo: Caracterizar o efeito do bloqueio do receptor A_{2A} pelo SCH58261 na modulação da crise e neuroproteção de áreas cerebrais vulneráveis à lesão por pilocarpina. O efeito do SCH58261 foi também analisado em combinação com a ativação dos receptores A_1 por R-Pia. **Métodos:** Oito grupos foram estudados: Pilo, SCH+Pilo, R-Pia+Pilo, R-Pia+SCH+Pilo, e seus respectivos controles. O número de animais em *status epilepticus* (SE), a latência para o início do SE e a taxa de mortalidade foram avaliados. O método de Fluoro Jade B (FJB) foi realizado 24 horas e sete dias após SE. **Resultados:** O pré-tratamento com SCH58261, R-Pia e R-Pia+ SCH58261 reduziu o número de animais em SE, aumentou a latência para o SE e diminuiu a taxa de mortalidade, comparado ao tratamento com pilocarpina. Os grupos R-Pia e R-Pia+SCH58261 apresentaram uma redução no número de células marcadas com FJB em CA3 e hilo, 24 horas e sete dias após SE, e no córtex piriforme apenas 24 horas após SE, comparado ao grupo Pilo. **Conclusão:** O antagonista A_{2A} demonstrou um potente efeito anticonvulsivante, enquanto o agonista A_1 teve um papel crucial na modulação da crise e promoveu significativa neuroproteção.

Unitermos: Pilocarpina; antagonista A_{2A} ; agonista A_1 ; modulação da crise; neuroproteção.

ABSTRACT

Adenosine and neuroprotection in the Temporal Lobe Epilepsy: From A_1 receptor activation to A_{2A} receptor blockade

Objective: To characterize the effect of the A_{2A} receptor blockage by the SCH58261 in the seizure modulation and neuroprotection of the brain areas vulnerable to injury by pilocarpine. The effect of SCH58261 was also analyzed in combination with the activation of the A_1 receptors by R-Pia. **Methods:** Eight groups were studied: Pilo, SCH+Pilo, R-Pia+Pilo, R-Pia+SCH+Pilo, and respective controls. The number of animals in *status epilepticus* (SE), the latency to the SE onset and the mortality rate were evaluated. The Fluoro Jade B (FJB) method was performed 24 hours and seven days after SE. **Results:** The pretreatment with SCH58261, R-Pia and R-Pia+SCH58261 reduced the number of animals in SE, increased the latency to the SE and decreased the mortality rate, compared to pilocarpine treatment. The R-Pia and R-Pia+SCH58261 groups exhibited a reduction in the number of FJB stained cells in CA3 and hilus, 24 hours and seven days after SE, and in the piriform cortex only 24 hours after SE, compared to Pilo group. **Conclusion:** The A_{2A} antagonist demonstrated a potent anticonvulsant effect, while the A_1 agonist had a crucial role in the seizure modulation and promoted significant neuroprotection.

Keywords: Pilocarpine; A_{2A} antagonist; A_1 agonist; seizure modulation; neuroprotection.

INTRODUÇÃO

Epilepsia é um distúrbio crônico da função cerebral caracterizado pela presença de crises epiléticas espontâneas e recorrentes que ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril.⁶ Dentre as formas de epilepsia, a mais comum é a epilepsia do lobo temporal (ELT), representando 40% de todos os casos.¹⁷ O modelo da pilocarpina reproduz as principais características desta síndrome e consiste na administração (i.p.) de altas doses (300-380mg/kg) de pilocarpina, desencadeando crises límbicas e *status epilepticus* (SE) com duração de até 12 horas (fase aguda), seguido por um período de normalização comportamental e eletroencefalográfica de cerca de 14 dias (fase latente), e pelo aparecimento da primeira crise espontânea, que marca a fase crônica.¹⁸ O seu emprego tem possibilitado o estudo de mecanismos capazes de bloquear ou reduzir os processos de morte neuronal ativados pelo SE. Nesse contexto, a adenosina e seus análogos têm se destacado por suas propriedades anticonvulsivante e neuroprotetora.¹⁹

A adenosina é um neuromodulador endógeno e suas ações são mediadas via receptores purinérgicos do tipo P1, dentre os quais se destacam os receptores A₁, inibitórios e os receptores A_{2A}, facilitatórios. Na epilepsia, os receptores A₁ têm um papel crucial na modulação da crise e na neuroproteção, promovendo depressão da transmissão sináptica excitatória e proteção contra os efeitos excitotóxicos desencadeados pela alta liberação de glutamato durante a atividade ictal^(2,5). Em contrapartida, pouco se conhece a respeito do papel do receptor A_{2A} nesta condição. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o efeito do bloqueio do receptor A_{2A} pelo antagonista seletivo SCH58261, associado ou não, à ativação do receptor A₁ pelo agonista R-Pia na modulação da crise e na neuroproteção de áreas cerebrais vulneráveis à lesão no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina.

MÉTODOS

Ratos machos Wistar (250g) foram submetidos à aplicação de 360mg/kg (i.p.) de cloridrato de pilocarpina 4% (Sigma), 30 min após tratamento com metilescopolamina (1mg/kg, s.c.) (Sigma), utilizada para minimizar os efeitos periféricos da pilocarpina. O [7-(2-phenylethyl)-5-amino-2(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine] (SCH58261) (Tocris Bioscience) foi administrado (0,2mg/kg, i.p.) 5 min antes da injeção de pilocarpina ou salina, e o R-N⁶-phenylisopropyladenosine (R-Pia) (Sigma) foi administrado (25µg/kg, i.p.) 15 min antes da injeção de pilocarpina ou salina. Foram obtidos oito grupos (n=4/grupo): *Salina*: animais tratados com salina e dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma); *Pilo*: animais tratados com pilocarpina após salina e DMSO; *SCH+Salina*: animais

tratados com salina após SCH58261; *SCH+Pilo*: animais tratados com pilocarpina após SCH58261; *R-Pia+Salina*: animais tratados com salina após R-Pia; *R-Pia+Pilo*: animais tratados com pilocarpina após R-Pia; *R-Pia+SCH+Salina*: animais tratados com salina após R-Pia+SCH58261; *R-Pia+SCH+Pilo*: animais tratados com pilocarpina após R-Pia+SCH58261. Após a injeção de pilocarpina, avaliou-se o número de animais em SE, a latência para o início do SE e a taxa de mortalidade após insulto. Animais de todos os grupos, 24 horas ou sete dias após insulto, foram anestesiados e perfundidos por via transcardíaca com solução fixadora de formaldeído 4%. Os encéfalos foram fatiados em vibratomo em cortes coronais de 40 µm. A neurodegeneração foi avaliada pela técnica de Fluoro Jade B (FJB). As secções cerebrais foram montadas em lâminas gelatinizadas e submetidas a imersões consecutivas em álcool (80 e 70%), água destilada, permanganato de potássio 0,06% (15 min), seguido de lavagens com água destilada, imersão em solução de FJB (Sigma) 0,01% + ácido acético 0,1% (30 min), e sucessivas lavagens em água destilada. As lâminas foram secas em placa aquecida (50°C, 10 min), desidratadas em álcool, diafanizadas em xileno e montadas com "Vecta Mount" (Vector). A histoquímica de FJB foi avaliada quantitativamente, através de contagem celular.

RESULTADOS

No grupo *Pilo* o SE teve início em um tempo médio de 42±12 min após a injeção de pilocarpina. O pré-tratamento com SCH58261, R-Pia e R-Pia+SCH58261 retardou significativamente o início do SE para 58±6 min (p<0,001), 74±10 min (p<0,001) e 80±7 min (p<0,001), respectivamente, comparado ao grupo *Pilo* (ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni). Também houve diferença significativa entre os grupos *R-Pia+Pilo* e *SCH+Pilo* (p<0,001), e os grupos *R-Pia+SCH+Pilo* e *SCH+Pilo* (p<0,001) (ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni). No grupo *Pilo* (n=43), o SE ocorreu em 72% dos animais e a taxa de mortalidade após insulto foi de 65%. No grupo *SCH+Pilo* (n=95), 32% dos animais desenvolveram SE e 37% deles morreram. No grupo *R-Pia+Pilo* (n=80), o SE ocorreu em 20% dos animais e a taxa de mortalidade foi de 31%. No grupo *R-Pia+SCH+Pilo* (n=94), 14% dos animais manifestaram SE e 31% deles morreram. Em todos os grupos houve diferença estatística significativa entre o número de animais que desenvolveram ou não SE (p<0,0001) e entre o número de animais que morreram ou sobreviveram após insulto (p<0,05) (Teste Qui-Quadrado sem tendência).

Em todos os grupos, exceto controles, houve presença de células FJB positivas em CA3, hilo do giro dentado, amígdala, córtex entorrinal e córtex piriforme, 24 horas

e sete dias após SE (Tabela 1). Após 24 horas do insulto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos SCH+Pilo e Pilo em relação ao número de células FJB positivas nestas regiões cerebrais. O pré-tratamento com R-Pia e R-Pia+SCH58261 reduziu significativamente o número de células em CA3 ($p<0,001$), hilo do giro denteado ($p<0,01$) e córtex piriforme ($p<0,001$), comparado ao tratamento com pilocarpina, mas não houve diferença entre os grupos R-Pia+Pilo e R-Pia+SCH+Pilo (ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni). Após sete dias do SE, também não houve diferença significativa entre os grupos SCH+Pilo e Pilo. O pré-tratamento com R-Pia e R-Pia+SCH58261 reduziu significativamente o número de células FJB positivas em CA3 ($p<0,001$) e hilo do giro denteado ($p<0,01$), comparado ao tratamento com pilocarpina, e não houve diferença entre os grupos R-Pilo+Pilo e R-Pia+SCH+Pilo (ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni) (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A propriedade antiepiléptica do receptor A_1 tem sido amplamente demonstrada através da investigação científica, diferentemente do receptor A_{2A} , cujo papel na modulação da crise ainda é pouco esclarecido.

Os receptores A_{2A} estão presentes no hipocampo, em terminais glutamatérgicos, favorecendo a liberação de glutamato. Eles podem estar co-localizados com receptores A_1 , de modo que sua ativação atenua o efeito inibitório de A_1 sobre a liberação de glutamato.² Também há receptores A_{2A} na membrana pós-sináptica de neurônios hipocámpais, favorecendo sua despolarização.¹⁰ O efeito anticonvulsivante mediado pelo SCH58261 no presente estudo pode ser decorrente da diminuição da transmissão sináptica excitatória no hipocampo, em consequência da menor liberação de glutamato no terminal pré-sináptico e da menor despolarização pós-sináptica. Estudos com

antagonistas A_{2A} em modelos de epilepsia apresentam resultados que corroboram com esse achado. Porciúncula e colaboradores (2004)¹⁴ demonstraram que o SCH58261 preveniu crises no modelo do ácido caínico. Etherington e Frenguelli (2004)⁷ verificaram que o ZM241385 reduziu a atividade epileptiforme hipocámpal *in vitro*. Li e Henry (1998)¹⁰ demonstraram que o DMPX bloqueou os efeitos despolarizantes promovidos pelo agonista A_{2A} CGS21680 no hipocampo *in vitro*.

O efeito anticonvulsivante obtido com o agonista A_1 R-Pia está de acordo com a vasta literatura que aponta o papel inibitório do receptor A_1 sobre a atividade ictal.^{1,4,12,19,21} Esses receptores são altamente expressos no hipocampo e sua ativação modula a transmissão sináptica excitatória por diminuir a liberação de glutamato, através da inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, e deprime a excitabilidade neuronal por aumentar a condutância da membrana aos íons K^+ , hiperpolarizando a célula.^{2,5}

Nossos dados demonstraram que houve diferença significativa em todos os grupos experimentais, quanto ao número de animais que desenvolveram ou não SE e quanto à morte e sobrevida após insulto. O teste estatístico Qui-Quadrado nos permitiu verificar que essas diferenças não ocorreram ao acaso e, portanto, afirmar que os agentes adenosinérgicos SCH58261 e R-Pia, combinados ou não, promovem efeito anticonvulsivante e reduzem a mortalidade após crises induzidas por pilocarpina.

Houve intensa neurodegeneração em CA3, hilo do giro denteado, amígdala, córtex entorrinal e córtex piriforme de animais tratados com pilocarpina, 24 horas e sete dias após insulto. Alguns autores avaliaram processos de neurodegeneração pela técnica de FJB nos modelos da pilocarpina e do lítio-pilocarpina. Fabene e colaboradores (2004)⁸ verificaram grande quantidade de neurônios FJB positivos no hipocampo, oito e 24 horas após SE induzido

Tabela 1. Número de células FJB positivas após SE induzido por pilocarpina.

	CA3	Hilo	AMG	CE	CP
24 h após SE					
Pilo	22±2	32±7	120±8	47±7	93±16
SCH+Pilo	22±3	29±6	120±10	44±8	91±16
R-Pia+Pilo	6±1**	11±7*	123±4	45±9	35±2**
R-Pia+SCH+Pilo	8±1**	12±6*	122±11	43±14	34±4**
sete dias após SE					
Pilo	27±5	23±3	96±13	36±7	25±10
SCH+Pilo	24±5	26±6	96±12	33±8	28±11
R-Pia+Pilo	7±4**	12±1*	95±13	35±7	14±2
R-Pia+SCH+Pilo	6±6**	12±2*	96±13	33±8	16±8

AMG - amígdala; CE - córtex entorrinal; CP - córtex piriforme.
* $p<0,01$ e ** $p<0,001$, quando comparado ao grupo Pilo.

por pilocarpina. Voutsinos-Porche e colaboradores (2004)²⁰ constataram a presença de células FJB positivas nas diversas regiões cerebrais estudadas durante os períodos agudo e latente do modelo do lítio-pilocarpina. A morte neuronal no modelo da pilocarpina pode ser desencadeada por mecanismos diversos, especialmente a excitotoxicidade. O SE prolongado promove ativação de cascatas excitotóxicas em que o Ca^{2+} tem um papel fundamental. O glutamato, excessivamente liberado em consequência da ativação colinérgica, atua em receptores cainato, AMPA e NMDA, promovendo influxo maciço deste íon na célula, podendo acionar cascatas de reações que resultam na produção de radicais livres, ativação de proteases, lipases e endonucleotidasas, com consequente morte celular.³

O antagonista A_{2A} não alterou o padrão de marcação por FJ-B nas regiões cerebrais estudadas, comparado ao tratamento com pilocarpina. A intensa neurodegeneração demonstra que este agente não promoveu neuroproteção. O desequilíbrio entre o metabolismo de glicose e o fluxo sanguíneo cerebral que ocorre durante crises severas ou SE tem sido proposto como um dos mecanismos envolvidos na gênese do processo lesional.¹³ Os receptores A_{2A} estão presentes em vasos sanguíneos cerebrais, promovendo vasodilatação e autorregulação do fluxo sanguíneo cerebral.¹⁶ Portanto, o SCH58261 pode ter modificado as propriedades vasodilatadoras e regulatórias do fluxo sanguíneo cerebral, favorecendo o desequilíbrio entre a demanda metabólica e o aporte energético durante o SE. A neurodegeneração também pode ser explicada pela distribuição desses receptores no sistema nervoso central (SNC). Em estudo do mapeamento dos receptores A_{2A} no SNC de rato, Rosin e colaboradores (1998)¹⁵ verificaram escassa distribuição na formação hipocampal.

O R-Pia reduziu a marcação por FJB em CA3, hilo do giro denteado e córtex piriforme. Este achado corrobora com a extensa literatura a respeito das propriedades neuroprotetoras desencadeadas pelo uso de agonistas A_1 em modelos de epilepsia.^{2,11,19} A ativação desses receptores diminui a liberação de glutamato, inibe os receptores NMDA e hiperpolariza a membrana neuronal.⁵ Esses efeitos são determinantes para a manutenção da homeostase intracelular de Ca^{2+} , e são mecanismos neuroprotetores mediados por A_1 . Além disso, verificamos que a neuroproteção obtida com a combinação R-Pia+ SCH58261 foi similar à encontrada no cérebro de animais tratados com R-Pia. Considerando a intensa neurodegeneração no tratamento com SCH58261, podemos inferir que o efeito neuroprotetor obtido com a combinação desses agentes adenosinérgicos é decorrente apenas da ação do R-Pia, reforçando a propriedade neuroprotetora deste agonista A_1 no modelo da pilocarpina.

CONCLUSÕES

Apesar da importante propriedade antiepiléptica do antagonista A_{2A} SCH58261, este agente não promoveu neuroproteção de áreas cerebrais vulneráveis à lesão. Além do papel crucial na modulação da crise, o agonista A_1 R-Pia promoveu importante neuroproteção em CA3, hilo do giro denteado e córtex piriforme.

REFERÊNCIAS

- Alasvand-Zarasvand M, Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Palizvan MR. Anticonvulsant effect of bilateral injection of N^6 -cyclohexyladenosine into the CA1 region of the hippocampus in amygdala-kindled rats. *Epilepsy Res* 2001;47:141-9.
- Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A_1 receptor activation to A_{2A} receptor blockade. *Purinergic Signal* 2005;1(2):111-34.
- DeLorenzo RJ, Sun DA. Basic mechanisms in status epilepticus: role of calcium in neuronal injury and the induction of epileptogenesis. *Adv Neurol* 2006;97:187-97.
- Dunwiddie TV. Adenosine and suppression of seizures. *Adv Neurol* 1999;79:1001-10.
- Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Ann Rev Neurosci* 2001;24:31-55.
- Engel Jr J. International League Against Epilepsy (ILAE). A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia* 2001;42(6):796-803.
- Etherington LA, Frenguelli BG. Endogenous adenosine modulates epileptiform activity in rat hippocampus in a receptor subtype-dependent manner. *Eur J Neurosci* 2004;19:2539-50.
- Fabene PF, Andrioli A, Priel MR, Cavaleiro EA, Bentivoglio M. Fos induction and persistence, neurodegeneration, and interneuron activation in the hippocampus of epilepsy-resistant versus epilepsy-prone rats after pilocarpine-induced seizures. *Hippocampus* 2004;14(7):895-907.
- Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, Vaugeois JM. Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:385-412.
- Li H, Henry JL. Adenosine A_{2A} receptor mediation of pre- and postsynaptic excitatory effects of adenosine in rat hippocampus in vitro. *Eur J Pharmacol* 1998;347:173-82.
- MacGregor DG, Stones TW. Inhibition by adenosine analogue (R)- N^6 -phenylisopropyladenosine of kainic acid neurotoxicity in rat hippocampus after systemic administration. *Br J Pharmacol* 1993;109:316-21.
- Mirnajafi-Zadeh J, Fathollahi Y, Pourgholami MH. Intraperitoneal and intraamygdala N^6 -cyclohexyladenosine suppress hippocampal kindled seizures in rats. *Brain Res* 2000;858:48-54.
- Pereira de Vasconcelos A, Ferrandon A, Nehlig A. 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. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22(2):196-205.
- Porciúncula LO, Canas P, Oliveira CR, Cunha RA. Blockade of adenosine A_{2A} receptors prevents kainate-induced convulsions and neuronal cell death. 4th International Symposium of Nucleosides and Nucleotides 2004; 69T.
- Rosin DL, Robeva A, Woodard R, Guyenet PG, Linden J. Immunohistochemical localization of adenosine A_{2A} receptors in the rat central nervous system. *The Journal of Comparative Neurology* 1998;401:163-86.
- Shi Y, Gebremedhin D, Falck JR, Harder DR, Koehler RC. Interaction of mechanisms involving epoxyeicosatrienoic acids, adenosine receptors, and metabotropic glutamate receptors in neurovascular coupling in rat whisker-barred cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007.

17. Sloviter S. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *Comptes Rendus Biologies* 2005;328:143-53.
18. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983;9(3):315-35.
19. Vianna ER, Ferreira AT, Dona F, Cavalheiro EA, Fernandes MJS. Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. *Epilepsia* 2005;5:166-73.
20. Voutsinos-Porche B, Koning E, Kaplan H, Ferrandon A, Guenounou M, Nehlig A, Motte J. Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2004; 17(3): 385-402.
21. Zuchora B, Wielosz M, Urbanska EM. Adenosine A₁ receptors and the anticonvulsivant potential of drugs effective in the model of 3-nitropropionic acid-induced seizures in mice. *European Neuropsychopharmacology* 2005;15:85-93.

Autor para correspondência:
Maria José da Silva Fernandes
Rua Pedro de Toledo, 781, 6^º andar – Vila Clementino
E-mail: <fernandes.nexp@epm.br>