

AUMENTO DA DISPONIBILIDADE DE GLICOSE NO HIPOCAMPO ATENUA OS DANOS PELO STATUS EPILEPTICUS

Melo, I.S.¹, Silva, V.O.³, Silva, S.R.³, Pacheco, A.L.D.², Santos, Y.M.O.¹, Freitas-Santos, J.¹, Costa, M.A.¹, Cavalcante, C.M.B.², Borbely, A.U.³, Sabino-Silva, R.^{3,4}, Castro, O.W.^{3,5,6}.

1. Estudantes de doutorado do Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió/AL.
2. Estudantes de mestrado do Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió/AL.
3. Estudantes de iniciação científica do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió/AL.
4. Docentes do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Maceió/AL.
 5. Docente do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia/MG.
 6. Docente do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas (UFAL)/Orientador.

Resumo:

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da disponibilidade de glicose no processo de neurodegeneração, bem como na consolidação da memória e no comportamento das crises límbicas. Ratos Wistar foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de uma cânula no hipocampo e induzidos ao status epilepticus por meio da administração central de pilocarpina (PILO). A glicose foi administrada no hipocampo antes ou depois do tratamento com PILO. O comportamento das crises epiléticas, a neurodegeneração e os danos na memória foram avaliados. O aumento de glicose (3mM) após administração de PILO, reduz a gravidade das crises, bem como o tempo e quantidade de crises graves (classe 5 na escala de Racine, 1972). O dano cognitivo é prevenido quando foi administrada as concentrações 1mM e 3mM de glicose depois e antes da PILO, respectivamente. Todas as concentrações de glicose depois da PILO atenuaram o processo neurodegenerativo, identificados por células fluoro-Jade positivas (FJ+). Nosso achados sugerem que o aumento da disponibilidade de glicose protege o cérebro na fase aguda da epileptogênese.

Autorização legal: Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFAL (04/2016).

Palavras-chave: Epilepsia. Pilocarpina. Neurodegeneração.

Apoio financeiro: FAPEAL, CAPES, CNPQ.

Introdução:

Estudos neuropatológicos anteriores de pacientes definem o status epilepticus (SE) como uma emergência clínica associada a crises contínuas e prolongadas com duração de cinco minutos ou mais (Sánchez and Rincon, 2016; Sloviter, 1999). SE é uma condição capaz de promover a morte neuronal em várias áreas do cérebro, gliose e muitas mudanças moleculares no hipocampo (Castro et al., 2011; Melo et al., 2016; Trinka and Kälviäinen, 2017). Além disso, SE funciona como uma precipitante inicial capaz de levar à epilepsia do lobo temporal (TLE), caracterizada por crises recorrentes espontâneas (CREs), neurodegeneração do hipocampo e outros (Sharma et al., 2007; Van Liefferinge et al., 2013).

A glicose é a principal fonte energética do cérebro e é importante para o disparo de impulsos nervosos (Mergenthaler et al., 2013). Por ser uma molécula apolar, a glicose é levada para células por seus transportadores (Wright et al., 2011). Atualmente, dois grandes grupos de transportadores de glicose podem ser encontrados em estruturas cerebrais: 1) transportadores de glicose por difusão facilitada (GLUTs) e 2) cotransportadores de sódio/glicose (SGLTs) (Poppe et al., 1997; Yu et al., 2010, 2013; Zhao et al., 2010). O transportador de glicose 1 (GLUT1) é expresso na barreira hematoencefálica e células gliais (Devaskar et al., 1991) e transportador de glicose 3 (GLUT3), no neurônio (Mantych et al., 1992); enquanto os cotransportadores de sódio/glicose 1 e 2 (SGLT1 e SGLT2) foram observados no hipocampo (Yu et al., 2013, 2010).

A modulação do metabolismo da glicose é necessária para manter a fisiologia do cérebro. Por outro lado, o dano à disponibilidade de glicose, bem como a sua interdependência com mecanismos de morte neuronal, podem tornar-se mais suscetíveis ao desenvolvimento de crises epiléticas (Mergenthaler et al., 2013). Em particular, é sabido que, durante uma crise epilética ou SE, os neurônios se tornam superexcitados, o que aumenta a absorção de glicose (Chugani and Chugani, 1999; McDonald et al., 2017; Vielhaber et al.,

2003). De fato, a regulação dos níveis de glicose pode ser uma ferramenta fundamental para tratar o SE. O propósito deste estudo foi o de investigar o efeito da disponibilidade de glicose no processo de neurodegeneração, bem como na consolidação da memória e no comportamento das crises límbicas.

Metodologia:

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), entre 60-90 dias de idade [240-350g (n=108)], obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFAL (04/2016). Os animais foram acondicionados no Biotério do Laboratório de Neurofarmacologia e Fisiologia Integrativa do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (UFAL), nas seguintes condições: a) 12/12 horas de claro/escuro, luzes acesas às 6:00hs; b) temperatura ambiente \pm 23°C; e c) oferta plena de água e ração.

Os animais foram anestesiados com xilazina (8mg/kg, ip) e cetamina (80 mg/kg, ip). Os animais foram submetidos a cirurgias estereotáxicas para implantação de uma cânula no hilus do giro dentado do hipocampo esquerdo, seguindo coordenadas pré-determinadas (Paxinos and Watson, 2007): 6,30 mm antero-posterior (em relação ao bregma); 4,50 mm medio-lateral (em relação ao seio sagital) e - 4,50 mm dorso-ventral (em relação à dura-máter).

Os animais VEH+PILO e GLI+PILO receberam microinjeções de veículo (VEH, solução salina 0,9%, 1 μ L) ou glicose (GLI, 1, 2 ou 3 mM), respectivamente, no hipocampo. Depois de 30 minutos, receberam pilocarpina (PILO) (1,2mg/ μ L). Adicionalmente, PILO+GLI recebeu GLI (1, 2 ou 3 mM) após 5 minutos da PILO. Todos os animais que tiveram SE foram resgatados com diazepam (5 mg/kg; ip), após os 90 minutos de SE terem se estabelecidos.

Os animais foram inseridos na plataforma do aparato, na sessão do treino, e ao descer completamente com as 4 patas recebeu um choque de 0,5mA por 2s. Os animais foram testados para a retenção da memória 24h (memória de longo prazo) após o treino. Nas sessões de teste, o choque nas patas foi omitido, ou seja, o estímulo condicionado (o aparato) não foi seguido por um estímulo não condicionado (choque elétrico). Além disso, nesta sessão mediu-se o tempo que o animal levou para descer da plataforma (latência máxima de 300s).

A análise comportamental das crises foi realizada durante 90 minutos de SE, de acordo com a escala de Racine (1972). Esses 90 minutos de observação foram divididos em intervalos de 5 minutos, sendo avaliada a crise mais grave em cada quadro de 5 minutos até o término dos 90 minutos. Para analisar a gravidade das crises, a classe mais grave de cada janela foi somada e o valor resultante foi dividido pelo número de janelas.

Além disso, os animais foram perfundidos após 24 horas de SE e a neurodegeneração foi avaliada por histoquímica de Fluoro-Jade (FJ). Neurônio FJ positivos (FJ+) foram contados (ImageJ-NIH) no hipocampo dorsal, medial e ventral.

No teste de memória, os resultados foram expressos como mediana com intervalo interquartil, comparados pelo teste de Kruskal-Wallis; enquanto para as crises límbicas e os neurônios FJ+, como média \pm SEM, comparados com o teste t não pareado e one-way-ANOVA, seguido pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls.

Resultados e Discussão:

O aumento de glicose (3mM) após a PILO reduziu a gravidade das crises, porém quanto às demais concentrações de glicose antes e depois da PILO não influenciou neste parâmetro comportamental. O número e o tempo total da classe 5 foram menor nos animais que receberam apenas a concentração 3mM de glicose depois da PILO. Além disso, as concentrações de glicose 1mM e 3mM depois e antes da PILO, respectivamente, preveniram contra os danos cognitivos gerados pelo SE.

Em análise do hipocampo total, a elevação nos níveis de glicose (1 e 3mM) antes da PILO reduziu a quantidade de células FJ+ no hilus e nas subáreas CA3 e CA1 em relação ao grupo PILO, porém a concentração de glicose de 2mM agravou o processo de degeneração apenas em CA1. Além disso, o aumento de glicose (1, 2 e 3 mM) depois da PILO atenuou o número de neurônios em degeneração em todas as subáreas do hipocampo comparada ao controle.

Conclusões:

Em conjunto, nossos dados sugerem que o aumento da disponibilidade de glicose (3mM) intra-hipocampal após a administração de PILO previne contra o déficit de memória, atenua a gravidade das crises epiléticas e a morte neuronal, protegendo o cérebro na fase aguda do processo epileptogênico.

Referências bibliográficas

- Castro, O.W. et al., 2011. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Res.* 1374, 43–55.
- Chugani, H.T., Chugani, D.C., 1999. Basic mechanisms of childhood epilepsies: studies with positron emission tomography. *Adv. Neurol.* 79, 883–91.
- Devaskar, S. et al., 1991. Developmental regulation of the distribution of rat brain insulin-insensitive (Glut 1) glucose transporter. *Endocrinology* 129, 1530–40.
- Maher, F., Davies-Hill, T.M., Simpson, I.A., 1996. Substrate specificity and kinetic parameters of GLUT3 in rat cerebellar granule neurons. *Biochem. J.* 315 (Pt 3, 827–31.
- Mantych, G.J. et al., 1992. Cellular localization and characterization of Glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology* 131, 1270–8.
- McDonald, T.S. et al., 2017. Alterations in Cytosolic and Mitochondrial [U- 13 C]-Glucose Metabolism in a Chronic Epilepsy Mouse Model. *eneuro* 4, ENEURO.0341-16.2017. doi:10.1523/ENEURO.0341-16.2017
- Melo, I.S. et al., 2016. Inhibition of sodium glucose cotransporters following status epilepticus induced by intrahippocampal pilocarpine affects neurodegeneration process in hippocampus. *Epilepsy Behav.* 61, 258–68.
- Mergenthaler, P. et al., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci.* 36, 587–97.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th ed. San Diego: Academic Press.
- Poppe, R. et al., 1997. Expression of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in neurons. *J. Neurochem.* 69, 84–94.
- Sánchez, S., Rincon, F., 2016. Status Epilepticus: Epidemiology and Public Health Needs. *J. Clin. Med.* 5.
- Sharma, A.K. et al., 2007. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol. Pathol.* 35, 984–999.
- Sloviter, R.S., 1999. Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization. *Epilepsia* 40, 34–39.
- Trinka, E., Kälviäinen, R., 2017. 25 years of advances in the definition, classification and treatment of status epilepticus. *Seizure* 44, 65–73.
- Van Liefferinge et al., 2013. Are vesicular neurotransmitter transporters potential treatment targets for temporal lobe epilepsy? *Front. Cell. Neurosci.* 7, 139.
- Vielhaber, S. et al., 2003. Correlation of hippocampal glucose oxidation capacity and interictal FDG-PET in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 44, 193–9.
- Wright, E., Loo, D., Hirayama, B., 2011. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiol. Rev.* 91, 733–794.
- Yu, A.S. et al., 2010. Functional expression of SGLTs in rat brain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C1277–C1284.
- Yu, A.S. et al., 2013. Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 304, C240-7.
- Zhao, Y. et al., 2010. Neuronal glucose transporter isoform 3 deficient mice demonstrate features of autism spectrum disorders. *Mol. Psychiatry.*