

EFEITO ANTAGÔNICO DA QUININA E MEFLOQUINA SOBRE AS ATIVIDADES EPILEPTIFORMES NÃO-SINÁPTICAS

M. F. Miranda*, L. E.C. Santos**, K.L.A. França**, A.M. Rodrigues**, F.A. Scorza*, A. C. G. Almeida**

*Disciplina de Neurociência – EPM/Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

** LANEC/DEPEB/Universidade Federal de São João del-Rei, São João Del Rei, Brasil

e-mail: maisa_ufsj@hotmail.com

Resumo: Os efeitos das drogas anti-malária quinina e mefloquina sobre a geração de crises ainda estão em debate. A hipótese mais aceita envolve a ação indireta dessas drogas, como os bloqueadores de *gap junctions*, desacoplando interneurônios GABAérgicos. No presente trabalho avaliou-se os efeitos dessas drogas sobre a atividade epileptiforme não-sináptica (AENS) induzida em fatias hipocâmpais de ratos. A AENS foi induzida irrigando as fatias com fluido cerebrospinal artificial modificado contendo alto-K⁺ e zero-Ca²⁺. Os potenciais extracelulares registrados mostraram que a quinina reduziu progressivamente a duração do evento, a componente DC, os *population spikes* e o intervalo entre os eventos. No entanto, a mefloquina aumentou a componente DC e a duração do evento. Esses efeitos opostos, anti-epiléptico para a quinina e pró-epileptogênico para mefloquina, sugerem possíveis efeitos antagônicos dos medicamentos em diferentes mecanismos não-sinápticos. Propõe-se que a inibição promovida pelo bloqueio das *gap junctions* se opõe aos efeitos excitatórios dos fármacos ao fechar os canais Kir. As diferentes intensidades dos efeitos destas drogas sobre os mecanismos podem ser responsáveis pelos efeitos opostos da quinina e mefloquina sobre as AENS.

Palavras-chave: Quinina, mefloquina, atividade epileptiforme não-sináptica.

Abstract *The effects of anti-malarial drugs quinine and mefloquine on seizure generation are still under debate. The most accepted assumption involves indirect action of these drugs as gap junction blockers uncoupling GABAergic interneurons. The effect of these drugs were evaluated in the present study on non-synaptic epileptiform activity (NEA) induced in rat hippocampus slices. NEA was induced by bathing slices with artificial cerebrospinal fluid containing high-potassium and zero-calcium. From the recorded extracellular potential, it was observed that quinine decreased progressively duration, DC-shift, population spikes and interval between events; however, mefloquine increased DC-shift and event duration. These opposite effects, anti-epileptogenic for quinine and pro-epileptogenic for mefloquine, suggest possibly antagonistic effects of the drugs on different non-synaptic mechanisms. The data suggest that the inhibition promoted by the gap junction blockage is opposes the excitatory effects of the drugs*

by closing the Kir channels. The different intensity of the effects of these drugs on the mechanisms may be responsible for the observed opposite effects of quinine and mefloquine on the non-synaptic epileptiform activity induced.

Keywords: *Quinine, mefloquine, non-synaptic epileptiform activity.*

Introdução

A quinina e a mefloquina são fármacos bastante conhecidos no tratamento da malária. Existem muitos relatos sobre os efeitos dessas drogas, no entanto os mecanismos pelos quais as drogas antimaláricas geram crises em indivíduos saudáveis e, com mais frequência, em indivíduos com histórico de epilepsia, ainda estão em debate [1].

A atividade síncrona de interneurônios GABAérgicos tem sido associada com respostas despolarizantes e, por sua vez, com descargas epileptiformes. Em algumas formas de epilepsia intratável, a inibição mediada por esses interneurônios induz à excitação, uma vez que o bloqueio do acoplamento pelas *gap junctions* (GJ) pode ter um efeito de desinibição da atividade neuronal e, portanto, levar aos efeitos excitatórios observados. A mesma linha de raciocínio foi usada por Voss *et al.* [2] para explicar o efeito excitatório da mefloquina em fatias de córtex. Aponta-se também a ação bloqueadora da quinina sobre as correntes juncionais das conexinas Cx36 e Cx50 e, de forma moderada, da Cx45 [3].

Os diversos efeitos observados da quinina e da mefloquina sobre mecanismos que não estão diretamente envolvidos com a neurotransmissão sináptica motivaram o presente estudo. A influência dessas drogas sobre a atividade epileptiforme não-sináptica (AENS) induzida em fatias de hipocampo banhadas com solução contendo alto-K⁺ e zero-Ca²⁺ foi investigada.

Materiais e métodos

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 20 ratos machos da linhagem *Wistar*, com idade de 28 dias de vida. Os animais foram mantidos em biotério local, sob condições ambientais controladas: temperatura

ambiente $21 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e ração. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São João del-Rei, sob o protocolo nº 033/2010.

Indução e registro das atividades epileptiformes não-sinápticas - Os animais foram decapitados, seus encéfalos processados e os hipocampus foram seccionados em fatias com $400\mu\text{m}$ de espessura. Durante todo o procedimento, o encéfalo foi constantemente banhado com solução normal ($127,0\text{ NaCl}$; $2,0\text{ KCl}$; $1,5\text{ MgSO}_4$; $26,0\text{ NaHCO}_3$; $1,1\text{ KH}_2\text{PO}_4$; Glicose $10,0$; CaCl_2 $2,0$, em mM), resfriada de 0 a 2°C . Em seguida, as seções foram transferidas para uma câmara de perfusão, onde ficaram armazenadas por aproximadamente 40 minutos em solução normal a 31°C . Após esse período, as fatias foram transferidas para câmara de interface, onde foram perfundidas com uma segunda solução modificada (zero $[\text{Ca}^{2+}]$ e alto $[\text{K}^+]$). O pH das soluções foi ajustado em $7,4$ por meio do borbulhamento constante com carbogênio ($95\%\text{ O}_2$ e $5\%\text{ CO}_2$).

Os registros do potencial elétrico (PE) extracelular foram realizados por meio do posicionamento de um eletrodo, formado por filamentos de prata e micropipeta de vidro, na camada granular do GD. As pipetas foram preenchidas com solução de NaCl $1,0\text{ M}$, com resistência final de 5 a $10\text{ M}\Omega$, suficiente para proporcionar um baixo nível de ruído. Os filamentos de prata foram clorados, em uma fonte de corrente contínua, evitando, assim, o efeito de bateria provocado pelo acúmulo de cargas na interface líquido metal.

Drogas - A mefloquina (Sigma-Aldrich), a quinina (Sigma-Aldrich) e a cloroquina (Sigma-Aldrich) foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% antes de serem adicionadas à solução de salina para indução das AENS em fatias hipocámpais. Adicionalmente, para evitar possíveis efeitos do DMSO sobre as AENS, esse foi adicionado à solução de indução na mesma concentração utilizada para a diluição das drogas.

Análise quantitativa do potencial elétrico extracelular - A análise dos parâmetros do PE foi realizada em intervalos de tempo de 10 minutos, foram quantificados os 6 eventos subsequentes em cada intervalo de tempo. Os parâmetros extraídos a partir do PE foram: componente DC (DC); amplitude máxima dos *population spikes* (PS); duração do evento (DE) e intervalo entre os eventos (IE).

Análise estatística - Todos os dados foram registrados como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi determinada pelo teste de Friedman seguido do post-hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Resultados

Efeitos da quinina sobre as atividades epileptiformes não-sinápticas - Vinte minutos após o início das AENS, a quinina foi aplicada às fatias a uma concentração de $200\mu\text{M}$ (Figura 1A). As AENS, registradas em 8 fatias ($n = 8$ animais), mostraram uma

amplitude da componente DC de $6,88 \pm 0,37\text{ mV}$, DE de $25,02 \pm 1,74\text{ s}$, PS de $11,72 \pm 0,86\text{ mV}$, e IE de $58,43 \pm 5,02\text{ s}$. A solução contendo quinina foi perfundida durante 30 minutos. Ao longo desse período, observaram-se alterações significativas dos parâmetros eletrográficos (Figura 1B).

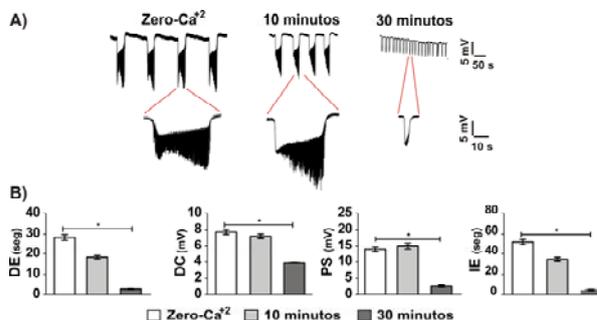


Figura 1: A) Registros típicos mostrando o efeito da quinina sobre as AENS. B) Análise dos registros do PE das AENS. Valores encontrados, média \pm EPM, para os parâmetros: DE, DC, PS e IE antes, aos 10 minutos e aos 30 minutos de atuação da droga. * $p < 0,05$.

Após esse período, os eventos ficaram estáveis em sua morfologia, sem alterações dos parâmetros, mesmo com a retirada de perfusão com quinina, até o final do experimento. O efeito da quinina sobre as AENS consistiu em uma redução progressiva dos parâmetros quantificados. Aos 30 minutos, todos os parâmetros foram alterados de forma significativa. As alterações máximas encontradas foram: amplitude da componente DC de $4,69 \pm 0,34\text{ mV}$, DE de $4,38 \pm 0,72\text{ s}$, PS de $2,94 \pm 0,71\text{ mV}$, e IE de $12,58 \pm 1,55\text{ s}$.

Efeitos da mefloquina sobre as atividades epileptiformes não-sinápticas - A mefloquina, um análogo sintético da quinina, foi adicionada a solução normal a uma concentração de $100\mu\text{M}$ e perfundida ($n = 6$ animais) 20 minutos após a indução das AENS, sendo mantida durante 30 minutos. As atividades registradas mostraram, consistentemente, o mesmo tipo de efeito em todos os experimentos realizados. As características básicas dos efeitos observados foram: aumento progressivo de DE e DC e nenhuma mudança significativa de IE (Figura 2A e Figura 2B).

Durante a indução das AENS, antes da perfusão com mefloquina, a quantificação mostrou uma amplitude da componente DC de $4,89,12 \pm 0,22\text{ mV}$, DE de $21,51 \pm 1,46\text{ s}$, PS de $7,63 \pm 0,62\text{ mV}$, e IE de $36,58,42 \pm 1,57\text{ s}$. Aos 30 minutos de atuação da droga, a quantificação dos parâmetros apresentou mudanças significativas, como o aumento progressivo na componente DC, chegando a $12,35 \pm 0,79\text{ mV}$, e de DE, que atingiu $24,08 \pm 1,47\text{ s}$. Além disso, houve uma tendência de redução dos PS ($7,10 \pm 0,24\text{ mV}$) e o IE não alterou significativamente, ficando em $31,22 \pm 1,24\text{ s}$. Apesar do aumento na componente DC, em todos os experimentos realizados, nenhuma transição das AENS para depressão alastrante (DA) foi registrada.

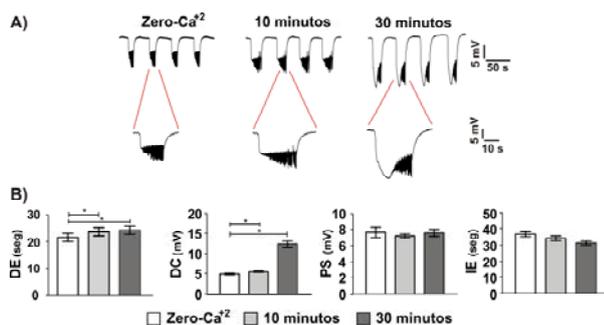


Figura 2: A) Registros típicos, mostrando o efeito da mefloquina sobre as AENS. B) Análise dos registros do PE das AENS. Valores encontrados, média \pm EPM, para os parâmetros: DE, DC, PS e IE antes, aos 10 minutos e aos 30 minutos de atuação da droga. * $p < 0,05$.

Efeitos da cloroquina sobre as atividades epileptiformes não-sinápticas - A partir dos resultados obtidos durante a perfusão com a mefloquina, os quais mostraram um aumento progressivo da componente DC, indicando um provável acúmulo iônico no meio extracelular, com fortes suspeitas sobre os já reportados efeitos da mefloquina como bloqueadora de canais retificadores de K⁺, fez-se necessário o uso de drogas com ação mais direta sobre esse tipo de canal, como por exemplo, a cloroquina, com o intuito de comparar os efeitos (Figura 3). A cloroquina está inserida em uma classe de medicamentos antimaláricos e amebicidas, que inibe os canais retificadores de potássio Kir, especificamente o subtipo Kir6.2 [4], sem, contudo, bloquear as *gap-junctions*.

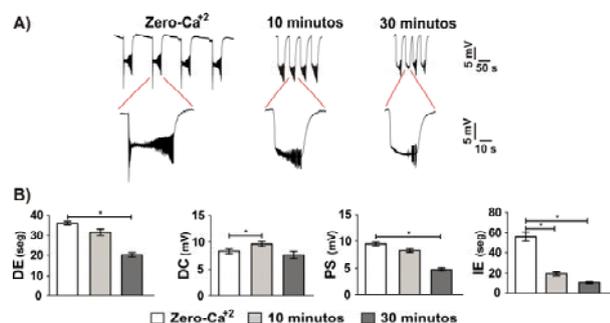


Figura 3: A) Registros típicos, mostrando o efeito da cloroquina sobre as AENS. B) Análise dos registros do PE das AENS. Valores encontrados, média \pm EPM, para os parâmetros: DE, DC, PS e IE antes, aos 10 minutos e aos 30 minutos de atuação da droga. * $p < 0,05$.

Vinte minutos após o início das AENS, a cloroquina foi aplicada às fatias ($n=6$ animais) a uma concentração de 200 μ M (Figura 3A). Após 20 minutos de perfusão, a cloroquina foi adicionada a solução, sendo perfundida por 30 minutos. Ao longo desse período, observaram-se alterações significativas dos parâmetros eletrográficos (Figura 3B), tais como: aumento na componente DC, redução da DE, IE e PS. Aos 30 minutos, os valores encontrados foram de $9,62 \pm 0,46$ mV para componente DC, $20,27 \pm 1,06$ s para DE, $4,73 \pm 0,29$ mV para PS, e $10,54 \pm 1,03$ s para o IE.

Discussão

Os resultados encontrados indicaram que esses fármacos possuem diferentes efeitos sobre as AENS. A quinina afetou a DE reduzindo-os progressivamente. Concomitantemente, foi observada uma redução dos PS, e dos IE. Esses efeitos podem estar associados a alterações menos intensas dos gradientes iônicos transmembrânicos, devido à presença de eventos mais curtos, os quais são responsáveis por uma rápida recuperação dos níveis iônicos, favorecendo o surgimento de outro evento. Assim, em condições onde o K⁺ extracelular não é sustentado em um nível elevado, como mantido experimentalmente, a resposta evocada por estímulos no GD, sob os efeitos da quinina, pode ser seguida por uma sequência curta de pós-descargas [5].

Os registros sugerem que a quinina é capaz de interromper a despolarização sustentada induzida pelo acoplamento mútuo entre as células granulares, promovido pela ligação axo-axônica das GJ. Essa redução na condutância das GJ presentes no GD pode ser em decorrência de uma alcalinização causada pela quinina sobre o tecido, o que, segundo González-Nieto *et al.* [6], é uma característica peculiar das Cx36.

Apesar da elevada afinidade da mefloquina para a Cx36, o efeito desse fármaco sobre as AENS não foi antiepiléptico como nos experimentos com quinina. A mefloquina interferiu sobre as AENS aumentando a componente DC, que, segundo a simulação computacional previamente realizada [7,8] pode ser devido a um acúmulo de íons K⁺ no meio extracelular. Apesar dessa acumulação iônica, nossos resultados com mefloquina não apresentaram transição de AENS para ondas de DA. Considerando-se a atuação da mefloquina sobre os canais retificadores de K⁺, especificamente a subunidade K_{ATP}, o incremento observado da componente DC sem transição para DA pode ser explicado. Experimentos utilizando o Ba²⁺, um bloqueador de canais conhecidos como Kir, realizados em retina, mostraram que pulsos de BaCl₂ inicialmente induziram a DA e, posteriormente, impediram a propagação da onda, bloqueando-a [9,10]. A caracterização molecular do Kir6.2, um tipo específico de canal retificador de K⁺, presente em tecidos musculares [11], mas também expresso no cérebro, mostrou forte presença no GD, predominantemente na camada granular, região em que foram realizados nossos estudos. No que se refere à condutibilidade desses canais, alterações na condutância dos Kir6.2 foram avaliadas em oócitos de *Xenopus* por meio da codificação com RNA_m [11]. Este estudo mostrou que as drogas antimaláricas do grupo das quiloninas podem fechar canais K_{ATP}, sugerindo uma explicação para os resultados encontrados para o grupo da mefloquina.

Nossos resultados utilizando a cloroquina, um bloqueador específico dos canais Kir, apresentaram efeitos semelhantes aos encontrados para o grupo da mefloquina sugerindo assim, que os efeitos encontrados para o grupo da mefloquina sejam decorrentes da atuação dessa droga sobre os canais Kir.

Diante disso, os efeitos reportados sobre a atuação da quinina e da mefloquina durante as AENS demonstram que essas drogas apresentam ações antagônicas sobre as células granulares. Uma delas é antiepileptogênica, provavelmente devido à ação sobre as GJ, e a outra é epileptogênica, possivelmente fechando os canais Kir. Assim, sugere-se que o efeito antiepileptico da quinina sobre as AENS deve-se a uma ação mais proeminente sobre as GJ do que sobre canais Kir, enquanto que a mefloquina deve atuar de forma mais intensa nos canais Kir do que sobre as GJ.

A partir dos nossos resultados, o efeito excitatório da mefloquina pode ser explorado pela ação direta da droga sobre os mecanismos não-sinápticos, e, não necessariamente, por um processo indireto de desinibição, envolvendo o desacoplamento das GJ entre interneurônios, como proposto por Voss *et al.* [2]. As observações de que os canais Kir são regulados nas células do GD na epilepsia do lobo temporal (ELT) [12], juntamente com os resultados do presente trabalho, indicam que mais estudos são necessários para identificar uma possível ação de drogas antimaláricas em pacientes com ELT.

Conclusão

A quinina e a mefloquina, duas drogas análogas, utilizadas no tratamento da malária, apresentam efeitos antagônicos sobre as atividades epileptiformes não-sinápticas. A ação antagônica dessas drogas se deve, provavelmente, à intensidade diferente com que atuam sobre as *gap junctions* e sobre os canais Kir. A quinina demonstra maior ação no bloqueio das *gap junctions* do que a mefloquina, que parece ter maior efeito sobre os canais Kir.

Agradecimentos

A CAPES, FAPEMIG, CNPq, FAPESP.

Referências

- [1] Zaccara G., Musca G.C., Messon A. Clinical features, pathogenesis and management of drug-induced seizures. *Drug Safety*; 1990. p.109-151.
- [2] Voss L.J., Jacobson G., Sleigh J.W., Steyn-Ross A., Steyn-Ross M. Excitatory effects of gap junction blockers on cerebral cortex seizure-like activity in rats and mice. *Epilepsia*; 2009. p. 1971–78.
- [3] Srinivas M., Hopperstad M.G., Spray D.C. Quinine blocs specific gap junction channel subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 2001. p. 10942-47.
- [4] Ponce-Balbuena D., Rodríguez-Menchaca A.A, López-Izquierdo A., Ferrer T., Kurata H.T., Nichols C.G., Sánchez-Chapula J.A. Molecular Mechanisms of Chloroquine Inhibition of Heterologously Expressed Kir6.2/SUR2A Channels. *Molecular Pharmacology*; 2012. p. 803–13.
- [5] Bikson M., Bihi I.D., Vreugdenhil M., Köhling R., Fox J.E., Jefferys F.G.R. Quinine suppresses extracellular potassium transients and ictal epileptiform activity without decreasing neuronal excitability in vitro. *Neuroscience*; 2002. p.251-61.
- [6] González-Nieto D., Gómez-Hernández J.M., Larrosa B., Gutiérrez C., Muñoz M.D., Fasciani I., O'Brien J., Zappalà A., Cicirata F., Barrio L.C. Regulation of neural connexin-36 channels by pH. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 2008. p.17169-74.
- [7] Almeida A.C.G., Texeira H.Z., Duarte M.A., Infantsi A.F.C., Modeling extracellular space electrodiffusion during Leão's spreading depression. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2004;p.450-8.
- [8] Almeida A.C.G., Rodrigues A.M., Scorza F.A., Cavalheiro E.A., Texeira H.Z., Duarte M.A., Silveira G.A. Mechanistic hypothesis for nonsynaptic epileptiform activity induction and its transition from interictal to ictal state – Computational simulation. *Epilepsia*. 2008; p. 1908-24.
- [9] Do Carmo R., Martins-Ferreira H. Spreading depression of Leão probed with ion-selective microelectrodes. *An Acad Bras Cienc.* 1984; p.401-21.
- [10] Ribeiro L.J.C., Martins-Ferreira H. Elicitation of retinal spreading depression by barium ions, Brazilian. *J Med Biol Res.* 1994; p.2457-60.
- [11] Gribble F.M., Davis T.M.E., Higham C.E., Clark A., Ashcroft F.M. The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K-channels. *Br J Pharmacology*. 2000; p.756-60.
- [12] Young C.C., Stegen M., Bernard R., Müller M., Bischofberger J., Veh R.W., Haas C.A., Wolfart J. Uperegulation of inward rectifier K⁺ (Kir2) channels in dentate gyrus granule cells in temporal lobe epilepsy. *J Physiol*. 2009; p.4213-33.