

MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE ANTIAPOPTÓTICA DO ÁCIDO LIPÓICO DURANTE AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PILOCARPINA

*Pauline Sousa dos Santos (Bolsista IC-CNPq), Rivelilson Mendes de Freitas
(Orientador, Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI)*

INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma condição crônica de etiologia diversa, caracterizada por crises repetidas, devido a uma descarga excessiva neuronal. No modelo de epilepsia induzido por pilocarpina pode ser observado várias alterações neuroquímicas. Essas alterações podem estar envolvidas diretamente nos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela epileptogênese, no entanto, esses mecanismos ainda não foram completamente estabelecidos.

As principais alterações histopatológicas identificadas durante a fase aguda desse modelo são a perda neuronal, a gliose e a degeneração vacuolar típica, em várias estruturas cerebrais (hipocampo, córtex fronto-parietal e corpo estriado). A apoptose pode apresentar um papel essencial nessas alterações (NAKAMURA; LIPTON, 2009). Uma das principais implicações clínicas do processo de apoptose nas doenças neurodegenerativas é a produção de radicais livres e a perda neuronal. Ao contrário dos radicais livres, compostos antioxidantes parecem proteger as células neuronais contra apoptose. Contudo, ainda permanecem indeterminados os mecanismos envolvidos na atividade antiapoptótica do ácido lipóico, quais as vias celulares envolvidas nesse processo durante as convulsões induzidas por pilocarpina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (2 meses de idade, 250-280 g), provenientes do Biotério Central da UFPI. Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro/escuro alternado de 12 h, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI.

Todos os grupos foram observados durante 24h e em seguida eutanasiados. Os animais controles foram tratados com solução salina 0.9% (i.p.). Os grupos AL10 e AL20 foram tratados com ácido lipóico (20 mg/kg, i.p.). Já o grupo AL20 + P400 os animais foram pré-tratados com ácido lipóico (20mg/kg, i.p.) e 30 min após essa administração foram tratados com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). E no último grupo, os animais foram tratados com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os animais desse grupo que apresentaram convulsão, estado epiléptico e sobreviveram ao período de observação foram eutanasiados.

Para a avaliação dos efeitos do AL nas alterações histopatológicas os animais que apresentaram convulsão, estado epiléptico e sobreviveram após o período de observação foram decapitados, os seus cérebros removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para serem submetidos às análises histopatológicas (BUREAU *et al.*, 1994). A toxicidade mitocondrial foi avaliada pelo método de MTT (PRICE; MCMILLAN, 1982), a caracterização da

presença ou não de apoptose por da técnica de microscopia de fluorescência (MEILHAC *et al.*, 1999), da atividade da caspase-3, dos conteúdos dos cit c, AIF e Bid (NAPOLI *et al.*, 2000).

Os resultados que obedecerem a uma distribuição paramétrica foram analisados pela ANOVA e pelo *t-Student Newman Keuls* como *post hoc* teste através do programa GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, San Diego California USA, Copyright (c) 1994-1999.

RESULTADOS

Os resultados mostram que, quando administrado AL na dose (20 mg/kg), 30 min antes da pilocarpina, o ácido lipóico reduz em 50% o percentual de animais convulsionados aumenta em 154% a latência para a primeira convulsão (LPC) e a taxa de sobrevivência em 60%.

Nenhum dos animais que receberam injeções apenas de solução salina (controle) ou ácido lipóico demonstrou convulsões ou alterações histopatológicas no hipocampo. No entanto, a perda neuronal, gliose e degeneração vacuolar típica são observadas na região do hipocampo nos animais tratados com pilocarpina. É relevante que alterações histopatológicas não foram observadas no hipocampo do grupo tratado com ácido lipóico + pilocarpina.

Tabela 1: Efeito do pré-tratamento com AL após convulsões induzidas por pilocarpina.

Grupos	LPC (min)	Taxa de Convulsão (%)	Taxa de sobrevivência (%)	n
Pilocarpina	35,00 ± 0,70	60	40	24
AL + Pilocarpina	89,00 ± 1,95 ^c	10 ^a	100 ^a	24
AL	00	00 ^{a,b}	100 ^a	24

Os resultados para LPC foram expressos em minutos como média ± SEM. Os resultados da taxa de convulsões e sobrevivência foram expressos em porcentagem do número de animais de cada grupo experimental. ^a $p < 0,0001$, comparado ao grupo pilocarpina; ^b $p < 0,0001$, comparado ao grupo AL + pilocarpina (χ^2 -teste). ^c $p < 0,0001$, comparado ao grupo pilocarpina (ANOVA e Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

Na análise histopatológica, 24 h após as convulsões, as células hipocampais foram significativamente aumentadas, no grupo tratado previamente com AL, em comparação com grupo tratado com pilocarpina ($p < 0,001$) (Fig. 1). Os neurônios das regiões CA1 e CA3, 24 h após as convulsões, foram significativamente aumentados no grupo tratado com AL + pilocarpina em comparação com o grupo pilocarpina. A análise semi-quantitativa de sobrevivência CA1 e CA3 ($p < 0,001$) das células coradas em hematoxilina e eosina (HE) foi significativamente maior no grupo AL (Fig. 2).

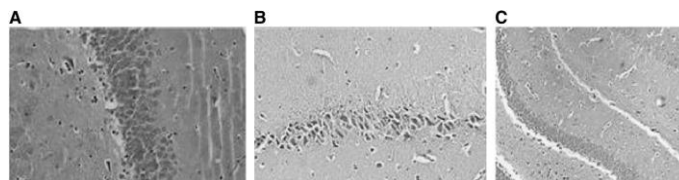


Fig. 1: Redução da morte celular no hipocampo pelo AL.

A comparação da gravidade da lesão foi expressa como média ± E.P.M de escores de danos com base em uma escala de zero (nenhum) para 100 (total) de porcentagem de comprometimento do hipocampo. A lesão cerebral foi considerada quando pelo menos 50% de comprometimento do hipocampo. Imagens (100 x) mostradas a partir de experimento representativo de $n = 5$. Legendas: A: grupo salina; B: grupo pilocarpina, e C: grupo AL+ pilocarpina.

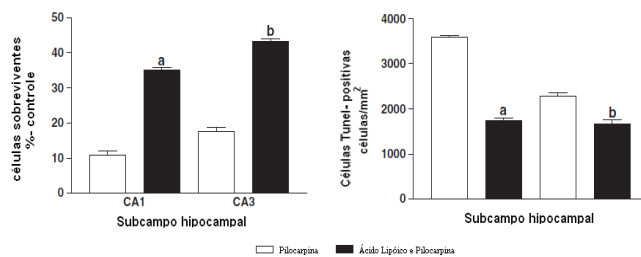


Fig. 2: Análise semi-quantitativa de células TUNEL positivas nos CA1 e CA3 no hipocampo dos ratos tratados com AL e pilocarpina. ^a $p < 0,0001$ comparado com grupo pilocarpina), ^b $p < 0,0001$ comparado com grupo pilocarpina (*t*-Student-Newman-Keuls-teste).

Na análise de Western blot, a imunorreatividade do citocromo *c* foi evidenciada na fração citosólica de ratos após convulsão, enquanto que a imunorreatividade do citocromo *c* em fração citosólica do grupo controle não foi detectada. A quantidade de citocromo *c* foi significativamente reduzida no grupo tratado com AL após a convulsão (Fig. 3).

A administração apenas de AL não alterou a quantidade de citocromo *c* de mitocôndrias no grupo controle. Em contraste, nos ratos tratados com AL e pilocarpina houve uma diminuição da imunoreatividade do citocromo *c*. Na análise de Western blot, o AIF mitocondrial no grupo tratado com pilocarpina aumentou após as convulsões. Considerando o AIF nos ratos tratados com o AL houve uma diminuição, após as convulsões. A quantidade de AIF nos ratos tratados com o AL foi significativamente reduzida ($p < 0,001$) (Fig. 3).

A quantidade total da caspase-3 foi significativamente reduzida nos ratos pré-tratados com o AL em comparação aos ratos que apresentaram convulsões. A atividade da caspase 3 foi significativamente diminuída em ratos tratados com o AL em comparação aos ratos que apresentaram convulsão em 24 h após a administração de pilocarpina ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa nessa atividade entre grupo tratado com salina ou AL (Fig. 4).

A quantidade de fragmentação de DNA foi significativamente diminuída pelo tratamento com o ácido lipóico em comparação com ratos tratados com pilocarpina. Além disso, a fragmentação do DNA apoptótico foi significativamente menor no grupo tratado com AL (Fig.4).

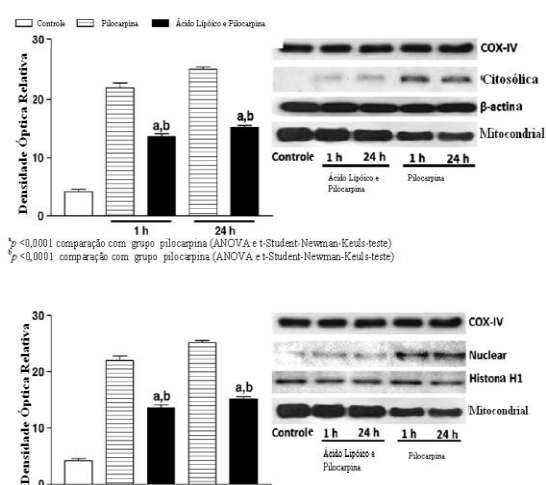


Fig. 3: Redução do citocromo *c* e translocação nuclear de AIF a partir da mitocôndria pelo AL.

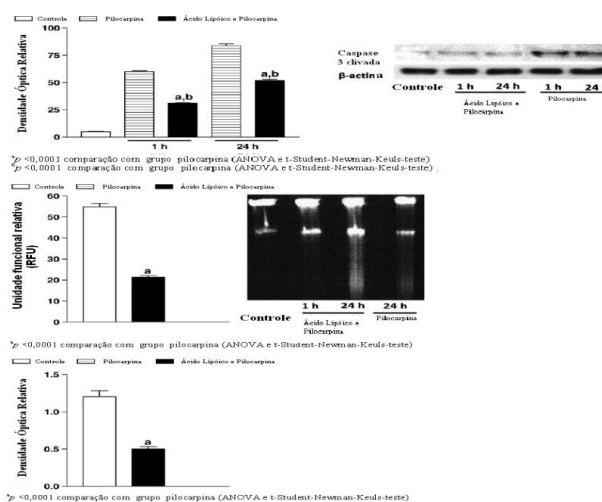


Fig. 4: A inibição das vias caspase-dependente e independente no hipocampo após o tratamento com AL e pilocarpina.

Discussão

Todos os animais estudados apresentaram convulsões tônico-clônicas generalizadas com estado de mal epiléptico. Todos os animais pré-tratados com o ácido lipóico selecionados para este estudo foram observados entre 1 e 24 h após administração de pilocarpina.

Os resultados mostram que quando administrado em uma dose de 20 mg/kg antes de pilocarpina, o AL reduz o percentual de animais que convulsionam, há um aumento da LPC e da taxa de sobrevivência, em comparação com o grupo pilocarpina. O AL apresenta um efeito anticonvulsivante, e pode melhorar alguns parâmetros relacionados com as convulsões.

Em primeiro lugar, o AL reduziu a fragmentação do DNA após convulsão. Em segundo lugar, AL inibe tanto a via caspase-dependente (citocromo *c* e posterior clivagem da caspase) e vias independentes (translocação nuclear do AIF) após convulsões induzidas por pilocarpina. Relatos recentes demonstram que há translocação nuclear do AIF durante as convulsões (CHEUNG *et al.*, 2005). Tanto a via de morte celular caspase-independente quando a caspase-dependente (HENSHALL *et al.*, 2000), estão envolvidas na convulsão e ambas as vias são inibidas pelo tratamento com o AL (LOVELL *et al.*, 2003).

Conclusão

Em suma, podemos sugerir que o ácido lipóico pode apresentar um efeito neuroprotetor contra a morte celular no hipocampo de ratos após convulsões induzidas por pilocarpina, por meio da inibição das vias apoptóticas caspase-dependente e independente.

Referências

- BUREAU, Y.R.J.; PEREDERY, O.; PERSINGER, M.A. Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380mg/kg) or lithium (3 mEq/kg)/pilocarpine (30 mg/kg) induced seizures. **Brain Research** v. 648, p. 265-269, 1994.
- CHEUNG, E.C.C.; MELANSON-DRAPEAU L; CREGAN, S.P.; VANDERLUIT, J.L.; FERGUSON, K.L.; MCINTOSH, W.C.; Park, D.S.; Bennett, A.A.L.; Slack, R.S. Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. **J Neurosci.**v. 25, p.1324, 2005.
- HENSHALL, D.C.; SINCLAIR, J.; SIMON, R.P. Spatio-temporal profile of DNA fragmentation and its relationship to patterns of epileptiform activity following focally evoked limbic seizures. **Brain Research.** v.858, p.290-302, 2000.
- LOVELL, M.A.; XIE, C.; XIONG, S.; MARKESBERY, W.R. Protection against amyloid beta peptide and iron/hydrogen peroxide toxicity by alpha lipoic acid. **J Alzheimers Dis.** v. 5, p.229–239, 2003.
- MEILHAC, O.; ESCARGUEIL-BLANC, I.; THIERS, J.C.; SALVAYRE, R.; NEGRE-SALVAYRE, A. Bcl-2 alters the balance between apoptosis and necrosis, but does not prevent cell death induced by oxidized low density lipoproteins. **FASEB J.** v. 13, p. 485-494, 1999.
- NAKAMURA, T.; LIPTON, S.A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis** v. 14, p. 455-468, 2009.
- PRICE, P.; MCMILLAN, T.J. Use of the tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation. **Cancer Res.** v. 50, p. 1392-1396, 1990.

Palavras chaves: Apoptose, Convulsões, Caspase, Hipocampo, Pilocarpina.