UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

ALBERTH JONNATHAN CARREÑO-GONZÁLEZ

**Avaliação daAtividadeNeuroprotetora do Ácido Clorogênico no Hipocampo de
ratos Wistar, submetidos a *Status Epilepticus* por Lítio-Pilocarpina.**

Ribeirão Preto

2016

ALBERTH JONNATHAN CARREÑO-GONZÁLEZ

**Avaliação da atividade neuroprotetora do Ácido Clorogênico no Hipocampo de
ratos Wistar, submetidos a *Status Epilepticus* por Lítio-Pilocarpina.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientação: Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos
(departamento de Biologia).

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a divulgação e reprodução total ou parcial deste trabalho, por meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Carreño-González, Alberth Jonnathan

Avaliação da Atividade Neuroprotetorado Ácido Clorogênico no Hipocampo de ratos Wistar, submetidos ao *Status Epilepticus* por Lítio-Pílocarpina / AlberthJonnathanCarreño-González ; Orientador Wagner Ferreira dos Santos.

Ribeirão Preto, 2016

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós- Graduação em Psicobiologia. Área de concentração: Psicobiologia)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

1 Ácido Clorogênico 2. Modelo intraperitoneal Lítio-Pilocarpina 3. Neuroproteção
4. Antioxidativo 5. Estresse Oxidativo

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALBERTH JONNATHAN CARREÑO-GONZÁLEZ

Avaliação da Atividade Neuroprotetora do Ácido Clorogênico no Hipocampo de ratos Wistar, submetidos a *Status Epilepticus* por Lítio-Pilocarpina.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título Mestre em Ciências.

Área de concentração: Psicobiologia

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À minha família. Pelo amor, respeito e sobre tudo por ter me ajudado nos piores momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos, pelos ensinamentos científicos e profissionais, paciência e sobre tudo pela oportunidade de trabalhar com a extraordinária equipe do laboratório.

Ao Dr. José Luiz Liberato, fundamental em todas e cada uma das etapas do meu processo de mestrado.

Ao Dr. Javier Marín-Prida, pela ajuda e facilitação de protocolos de estresse oxidativo. Ao Sr.

Amaury R. Pinhal pela colaboração e ensinamentos sobre as técnicas histológicas.

Ao Paulo Heinen, Doutorando em Bioquímica orientado pela professora Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli, pela ajuda com as leituras no espectrofotômetro.

Ao Marcus Vinicius Batista Celani, pela ajuda valiosíssima com as perfusões e a indução das crises.

Ao time do Laboratório de Neurobiologia e Peçonhas Lívea, Marcell, Aline, Marcus, Thiago, Eduardo, Tainá, Tamiris, Samia, Carol.

À minha Mãe, por te me ensinado a lutar.

À minha companheira Isa, pela compreensão, amor e apoio.

Aos meus irmãos, especialmente David, por ter dado tudo para que eu me sentisse bem.

À CAPES – PROEX, CNPq, FAPESP e FFCLRP pelo apoio ao projeto.

EPÍGRAFE

Alegria, bela centelha dos deuses/ Filha de Elysium/ Entra embriagado com fogo/ Celestial
/ teu santuário / Onde se reúne tua magia / Cortante como una espada / Tornando um pedinte
em príncipe / Sempre que abrem tuas gentis asas.

Johann Christoph Friedrich von Schiller

RESUMO

Carreño-González, A.J. Avaliação da atividade neuroprotetora do Ácido Clorogênico no Hipocampo de ratos Wistar, submetidos a *Status Epilepticus* por Lítio-Pilocarpina. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A epilepsia é uma enfermidade, caracterizada por eventos cerebrais paroxísticos auto-sustentados e recorrentes, que apresenta manifestações eletro-clínicas e neuropatológicas únicas, que podem alterar a estrutura e funcionamento do encéfalo, cujas manifestações são diferentes entre si. Afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo. Modelos animais e ferramentas biológicas são importantes para se entender lesões neuronais. Sabe-se que logo depois da administração de Li-Pilo em ratos - *status epilepticus* (SE), inicia-se uma cadeia de eventos neuroquímicos, como a produção de radicais livres, dentre outros, que podem piorar ou perpetuar as crises posteriores. A utilização de agentes antioxidantes, com ação no Sistema Nervoso Central pode significar uma alternativa co-adjuvante na prevenção das epilepsias secundárias, de animais de laboratório e talvez em humanos. Neste trabalho avaliou-se a ação antioxidativa e neuroprotetora do ácido clorogênico (AC), in vivo, em ratos submetidos ao SE. Comparou-se ademais o efeito do AC com o efeito de um antioxidante, o ácido ascórbico.

Ao tratar os animais com AC (30 mg/kg), houve uma diminuição significativa (50%), [F (7, 40)= 14,42; P < 0,0001], da produção de MDA, importante produto da peroxidação lipídica; assim como uma diminuição significativa (72%), [F (7,40)= 11,26; P < 0,0001], na atividade da SOD, enzima que atua como agente antioxidante endógeno. A ação do AC, diminuindo a concentração de MDA (49%), que é um dos substratos da SOD, levaria a uma menor taxa de SOD (59%). Pensando no que acontece com um fármaco que iniba essa cascata de peroxidação, esses resultados estão de acordo com a literatura, na qual se ressalta que a ação da SOD pode estar diretamente relacionada com a presença do MDA. E o mais importante, constatou-se que o AC (30 mg/kg) protegeu as células hipocâmpais, ou seja, diminuiu significativamente a perda de células nas regiões CA3 [F (4,25)= 15,55; P < 0,0001] (48%), e no *hilus* do hipocampo [F (4,25)= 6,276, P<0,0001] (75%). Da mesma forma, houve uma diminuição significativa de neurônios em degeneração (Fluoro Jade C+) na CA3 [F(2,15)= 40,90; P<0,0001]. Podemos concluir que o AC é um eficiente inibidor da proliferação de agentes oxidantes, que levam à morte celular, quando comparado com o ácido ascórbico, no hipocampo de ratos Wistar, quando induzido o SE com Li-Pilo. Portanto, sendo neuroprotetor.

Palavras chave: Estresse oxidativo, Modelo Lítio-Pilo, Ácido Clorogênico.

ABSTRACT

Carreño-González, A.J. Evaluation of the neuroprotective activity of Chlorogenic Acid in the Hippocampus of Wistar rats submitted to Status Epilepticus by Lithium-Pilocarpine. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Epilepsy is a disorder characterized by paroxysmal self-sustained and recurrent brain events, featuring electro-clinical and neuropathological phenomena unique, which may change the structure and functioning of the brain, whose manifestations are different. It affects about 50 million people worldwide. Animal models and are important biological tools for understanding neuronal injury. It is known that soon after the administration of Li-Pilo in rats - *status epilepticus* (SE), starts a chain of neurochemical events such as the production of free radicals, among others, that may worsen or perpetuate the subsequent seizures. The use of antioxidant agents acting on the central nervous system can alternatively mean a co-adjuvant in secondary prevention of epilepsy, laboratory animals and possibly humans. In our study we evaluated the antioxidative action and chlorogenic acid (CA) neuroprotective using Litio-Pilocarpine in vivo, in rats. It compared the effects of CA in addition to the effect of an antioxidant, ascorbic acid.

By treating the animals with CA (30 mg / kg), a significant decrease in [F (7, 40) = 14.42; P <0.0001], the production of MDA, important product of lipid peroxidation; as well as a significant decrease in [F (7,40) = 11.26; P <0.0001] (50%), the activity of SOD, an enzyme that acts as an endogenous antioxidant. The action of CA, decreasing the concentration of MDA (49%), which is one of the SOD substrates, would lead to a lower rate of SOD (72%). Thinking about what happens to a drug that inhibits this peroxidation cascade, these results are consistent with the literature, in which it points out that the action of SOD can be directly related to the presence of MDA. Furthermore, it was found that the CA (30 mg / kg) protected the hippocampus cells, or significantly decreased cell loss in CA3 [F (4,25) = 15.55; P <0.0001] (59%), and *hilus* regions of the hippocampus [F (4,25) = 6.276, P <0.0001] (48%). Likewise, a significant reduction in neuronal degeneration (Fluoro Jade C +) in the CA3 [F (2,15) = 40.90; P <0.0001] (75%). We conclude that the CA is an effective inhibitor of the proliferation of oxidizing agents, leading to cell death when compared to the ascorbic acid in the hippocampus of Wistar rats when induced SE with Li-Pilo. However, CA was neuroprotector in this model.

Keywords: Oxidative stress, Lithium-Pilo model, Chlorogenic Acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula química estrutural do Ácido Clorogênico.....	9
Figura 2. Esquema geral para determinação do EO.....	15
Figura 3. Esquema geral da histologia	18
Figura 4. Gráfico da concentração do MDA	21
Figura 5. Gráfico da atividade da SOD	26
Figura 6. Imagens representativas de secções coronais da CA1	23
Figura 7. Imagens representativas de secções coronais da CA3.....	29
Figura 8. Imagens representativas de secções coronais do hilus	25
Figura 9. Gráfico da quantificação dos neurônios na CA1	29
Figura 10. Gráfico da quantificação dos neurônios na CA3.....	30
Figura 11. Gráfico da quantificação dos neurônios no hilus.....	31
Figura 12. Gráfico da quantificação dos neurônios FJC+.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das crises convulsivas segundo Racine (1972).....	12
Tabela 2. Tratamentos.....	12

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Ascórbico
AC	Ácido Clorogênico
ANOVA	Análise de variância
CA1	Área 1 do Corno de Ammon
CA3	Área 3 do Corno de Ammon
EEG	Electroencefalograma
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FAE	Fármacos anti-epilépticos
FJC	Fluoro Jade C
FJC+	Fluoro Jade C positivo
i.p	Intraperitonal
Li	Lítio
Li-Es	Lítio – Metil-escopolamina
Li-Pilo	Lítio - Pilocarpina
MDA	Malonildialdeído
PBS	Tampão fosfato de sódio
PFA	Paraformaldeído
Pilo	Pilocarpina
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superoxido Dismutase

LISTA DE SÍMBOLOS

Kg	Quilograma
g	Gramas
mg	Miligramas
mg/Kg	Miligrama de droga por quilograma de animal
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mm ²	Milímetros quadrados
min	Minutos
M	Concentração molar
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogênioônico
xg	Número de vezes a força da gravidade

Sumário

1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Epilepsia	1
1.2 O Status epilepticus (SE).....	1
1.3 Origem e desenvolvimento das crises	2
1.4 A epilepsia do lobo temporal (ELT)	2
1.5 Pilocarpina (Pilo)	3
1.6 Estresse Oxidativo (EO)	5
1.7 Tratamentos da epilepsia.....	8
1.8 O Ácido Clorogênico (AC)	9
2.OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
2.2.1 Avaliar os efeitos antioxidativos no hipocampo de quatro concentrações do AC (curva dose resposta), dosando MDA e SOD	11
2.2.2 Analisar o efeito das concentrações de AC na morte celular, usando como marcadores celulares Nissl e Fluoro Jade C	11
2.2.3 Balizar o efeito do Ácido Clorogênico com o Ácido Ascórbico, pelas suas características antioxidativas	11
3.MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Animais.....	11
3.2 Drogas	12
3.3 Indução do SE	12
3.4 Tratamento.....	13
3.5 Ensaios para determinação do estresse oxidativo.....	13
3.6 Histologia.....	15
3.6.1 Secção dos encéfalos em criostato	16
3.6.2 Análise histológica.....	16
3.6.2.1 Técnica de Nissl-Cresil violeta	17
3.6.2.2 Técnica de Fluoro Jade C.....	17
3.6.3 Histopatologia	17
3.7 Análise estatística.....	19
4.RESULTADOS	20
4.1 Determinação do estresse oxidativo.....	20

4.1.1 Detecção do Malonildialdeído (MDA)	20
4.1.2 Detecção da atividade da Superoxido Dismutase (SOD)	20
4.2 Análise histopatológica	22
4.2.1 Análise histopatológica qualitativa	22
4.2.2 Análise histológica quantitativa: Nissl e Fluoro Jade C	29
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÕES	52
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma enfermidade, caracterizada por eventos cerebrais paroxísticos auto-sustentados e recorrentes. Representa uma constelação clinicamente distinta, com base em lesões específicas ou outras, as quais podem ter implicações para o tratamento clínico, particularmente a cirurgia (Berg *et al.*, Relatório de Comissão –ILAE, 2005-2009). Afeta cerca de 50 milhões de pessoas no mundo (World Health organization - Atualização de maio de 2015). Os eventos paroxísticos motores, como as crises epiléticas são originadas por diversas causas que culminam com a sincronização focal ou disseminada dos disparos dos neurônios (Tierney *et al.*, 1996).

1.2 O *Status Epilepticus* (SE)

O SE é definido como uma crise com suficiente duração para produzir uma condição epilética perdurável, que pode variar de um indivíduo para outro, de 10 a 30 minutos. Em alguns casos somente para quando o paciente recebe medicação (Berg *et al.*, 2001).

A indução do SE em ratos, pode ser feita mediante a administração sistêmica ou intra-hipocampal do agonista muscarínico, Pilocarpina. Os animais apresentam uma série de comportamentos e mudanças eletrográficas, as quais podem ser divididas em três períodos: 1) um período agudo que aumenta progressivamente para SE límbico e dura aproximadamente 24 horas; 2) seguido por um período silencioso com uma normalização progressiva do EEG e comportamento que varia de 4 a 44 dias, 3) e finalmente um período crônico com crises espontâneas e recorrentes (Cavalheiro, 1995).

1.3 Origem e desenvolvimento das crises

Após o término do SE, os ratos entram em uma fase onde não é observada a ocorrência de crises convulsivas, que é denominada como período latente ou silencioso. Nesta fase, ocorre morte celular (neurônios e astrócitos), ativação da micróglia e reorganização sináptica, assim como alterações na composição das subunidades de receptores glutamatérgicos e gabaérgicos, e transportadores, sobretudo no hipocampo (Turskiet *al.*, 1983; Kanget *al.*, 2006). O final da fase silenciosa é variável, sendo marcada pela ocorrência de crises espontâneas e recorrentes, cuja resposta a fármacos é diferente do SE inicial (Rice & DeLorenzo, 1998).

1.4 A epilepsia do lobo temporal (ELT)

A prevalência da epilepsia em países desenvolvidos está por volta dos 4 a 10 casos por cada 1000 habitantes (Bell *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos em países em desenvolvimento e tropicais tem sido reportado uma alta prevalência desta doença, chegando aos 57 casos por 1000 habitantes (Burneo *et al.*, 2005; Carpio *et al.*, 2009). A incidência média da epilepsia em países desenvolvidos vai de 25 a 50 por 100.000 pessoas por ano, já nos países em desenvolvimento é aproximadamente de 30 a 115 por cada 100.000 pessoas por ano (Kotsopoulos *et al.*, 2002). Quanto à ELT, não há dúvida que seja o tipo de epilepsia mais freqüente, a qual é a mais referida nos centros cirúrgicos.

A maioria dos relatos cirúrgicos refere-se à ELT, o que representa de 50 a 73% de todos os casos avaliados. A alta prevalência dos pacientes com ELT em centros cirúrgicos, pode estar relacionada com os riscos associados às

cirurgias nestes pacientes, comparado com os casos extra-temporais. Além disso, há estudos demonstrando que a ELT é altamente refratária ao tratamento farmacológico (Tellez-Zenteno *et al.*, 2012).

A ELT caracteriza-se por apresentar crises focais límbicas, geradas principalmente na formação hipocampal, córtex entorrinal e na amígdala (Bartolomei *et al.*, 2005). Como acontece em outras epilepsias, na ELT, geralmente ocorre um evento desencadeante que precede o desenvolvimento das crises recorrentes (Mathern *et al.*, 2002). O evento desencadeante é chamado de “injúria precipitante inicial” (IPI), se ocorrer, os pacientes passam por um período conhecido como latente, sem apresentar crises. Na adolescência, na maioria dos casos as crises voltam e se tornam freqüentes.

Histopatologicamente a ELT tipicamente tem uma incidência alta de esclerose unilateral do hipocampo, normalmente conduz a atrofia por perda celular na CA1, constituindo uns dos critérios mais importantes a serem considerados dentre as conseqüências das crises (Mathern *et al.*, 1996).

1.5 Pilocarpina (Pilo)

Os modelos animais podem prover a oportunidade de estudar os padrões da ocorrência das epilepsias intratáveis. Desde que foi definida a epilepsia humana, como uma condição patológica caracterizada pela recorrência de crises epiléticas, buscam-se reproduzir as características clínicas da epilepsia humana em animais, que apresentam crises recorrentes. Para este propósito o modelo da Pilocarpina, um agonista muscarínico colinérgico em cérebros de ratos, é apropriado, pois se assemelha à condição humana desde o ponto de vista comportamental, celular e EEG (Scorza *et al.*, 2009).

A Pilo tem como principal ação a ativação dos sub-tipos de receptores para acetilcolina muscarínicos do tipo M1 e M2. A ativação do receptor M2 inibe a adenilato ciclase e diminui a liberação de acetilcolina. Enquanto a ativação dos receptores do tipo M1 leva a ativação da fosfolipase C e a produção de diacilglicerol e inositol trifosfato, resultando em uma alteração do fluxo de íons de cálcio e íons de potássio, com conseqüente aumento da excitabilidade de neurônios encefálicos (Scorza *et al.*, 2009).

O aumento da concentração de íons de cálcio promove a liberação de L-Glu, o que induz o SE, o qual é mantido pela ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA (Curia *et al.*, 2008).

O modelo foi descrito em 1983, quando Turski e colaboradores mostraram sua ação como potente pro-convulsivante. A injeção sistêmica de Pilo (380 mg/kg) é capaz de produzir uma sequência de alterações comportamentais, como olhares fixos, automatismos faciais e crises motoras límbicas, desenvolvidas por volta de uma ou duas horas, construindo progressivamente um SE límbico. Os autores também descrevem a ocorrência de crises límbicas espontâneas em ratos que sobreviveram ao SE, após serem tratados com Pilo sistêmica.

Alguns estudos posteriores sugerem que o intervalo para o surgimento das seqüências comportamentais e alterações eletroencefalográficas encontram-se entre 10 e 18 dias (Hoexter *et al.*, 2005). Contudo, Goffine e colaboradores em 2007, disseram que este intervalo é ainda menor, 7 dias, quando analisado o vídeo-EEG. Estes autores enfatizam o uso contínuo de vídeo-EEG, quando o objetivo é definir a duração do período da latência.

Outro fato importante que deve ser considerado, é que nem sempre uma única dose alta de Pilo intraperitoneal induz o SE, e que uma única dose alta do mesmo fármaco está associada com uma alta mortalidade dos animais (Gliem et al., 2001).

A administração de Pilo intra-hipocampal é tão eficiente quanto à administração intraperitoneal. Porém, os animais que recebem a Pilo por esta via apresentam não só o mesmo comportamento, senão alterações eletrográficas e neuropatológicas similares às exibidas por aqueles que foram tratados sistemicamente. Além disso, tem a importante vantagem de ter uma redução drástica da mortalidade (Furtado., 2002).

Quando os animais são submetidos ao SE durante um par de horas (sem ser parada pela ação de um fármaco) apresentam alterações histopatológicas localizadas no córtex olfatório, amígdala, tálamo, formação hipocampal e neocórtex. Muitas áreas aparecem edematosas, as células são escuras e encolhidas (Turski et al., 1983). Tem sido detectada perda celular no subiculum (Knopp *et al.*, 2005), amígdala (Turski *et al.*, 1983) e a camada III do córtex entorrinal medial (Du *et al.*, 1995), assim como dano celular, principalmente em interneurônios, encontrados principalmente no hipocampo (CA1 e CA3), amígdala e córtex piriforme (Mello & Covolán, 1996).

1.6 Estresse Oxidativo (EO)

O estresse oxidativo (EO) é a condição que ocorre quando o equilíbrio de pró-oxidantes e anti-oxidantes é quebrado e o dano orgânico é mais provável. Os pró-oxidantes são radicais livres por definição, átomos ou grupos de átomos com um único elétron não pareado (Stamler *et al.*, 1992). Inicialmente, o EO foi descrito como um desequilíbrio entre a geração e a

eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN).

As espécies reativas foram consideradas originalmente exclusivas de células danificadas, mas agora considera-se que a regulação redox das ERO é essencial para a modulação de funções celulares críticas (principalmente em astrócitos e micróglia), como transporte de íons, mobilização de cálcio e apoptose (Emerit *et al.*, 2004).

O EO é induzido por respostas inflamatórias e processos metabólicos subsequentes, gerando moléculas de radicais livres altamente reativos. Em condições de uma produção excessiva, ou se as defesas do corpo estiverem comprometidas as ERO podem interagir com os ácidos graxos, proteínas e DNA, causando dano nesses substratos (Maes *et al.*, 2011).

A oxidação de proteínas leva a mudanças funcionais ou desativação de algumas enzimas (Stadtman, 2001). A peroxidação lipídica, uma das manifestações mais freqüentes do EO, causa alterações que afetam a fluidez, a permeabilidade e a atividade das proteínas de membrana. Por sua vez o MDA é um dos mais comuns e estudados metabolitos, na longa cadeia de peroxidação, constituindo um marcador de EO, de uma maneira geral (Wong-Ekkabut *et al.*, 2007).

Também tem sido observado que o EO está envolvido na patogênese de algumas doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer, Parkinson, esclerose amiotrófica lateral e epilepsia (Perry *et al.*, 2002; Migliore *et al.*, 2005; Ashrafi *et al.*, 2007).

As crises induzidas pela Pilo produzem enormes mudanças relacionadas à geração de ERO, e conseqüente ativação dos sistemas de compensação

enzimáticos como a SOD e alguns compostos seqüestradores de íons, que dependendo da intensidade e a quantidade desses agentes podem fazer com que o equilíbrio redox da célula se mantenha. Por outro lado, este equilíbrio pode ser quebrado pelo aumento prolongado na produção de ERO ou pela diminuição dos sistemas celulares antioxidativos (a atividade da SOD, por exemplo), e como sabemos as crises induzidas pela Pilo acarretam varias mudanças relacionadas à geração e eliminação de radicais livres em ratos adultos (Pazdernik *et al.*, 2001).

Pequenas quantidades de superóxido e H_2O_2 estão sempre presentes como produto do metabolismo normal. A SOD e a catalase são responsáveis pela degradação do superóxido e do H_2O_2 , respectivamente, e o equilíbrio entre estas enzimas antioxidantes é relevante para as funções neuronais (Pazdernik *et al.*, 2001).

Tejada e colaboradores observaram que há um aumento da atividade seqüestradora de enzimas antioxidantes (catalase e SOD), em animais que haviam sido tratados com Pilo. Isso poderia indicar que os neurônios reagem a alta produção de ERO desencadeada pela Pilo (Tejada *et al.*, 2007).

O encéfalo tem uma suscetibilidade importante aos EOs devido ao alto consumo de oxigênio. O encéfalo também contém grandes concentrações de ácidos graxos, que estão a mercê da peroxidação. Ainda, possui grandes quantidades de ferro, o qual pode catalisar a formação do radical hidroxilo, além de ter uma baixa atividade da catalase (Halliwell, 1999; Jellinger, 2003; Marianini *et al.*, 2005).

Dados de pesquisas realizadas em pacientes epiléticos e controles normais (Sudha *et al.*, 2001), onde foram estudados parâmetros de EO como

peroxidação lipídica, SOD, peróxido, glutathione e catalase entre outras, níveis de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E, vitamina A) e atividade da ceruloplasmina, indicaram que os pacientes com epilepsia apresentam uma peroxidação lipídica mais alta e seus níveis plasmáticos de vitamina C e E mais baixos, quando comparada com indivíduos controle. Nesse estudo, a quantidade de antioxidantes no sangue de pacientes epiléticos, que se apresentava baixo comparado com os controles, foi melhorado depois do tratamento com drogas anti-epilépticas, sugerindo que os radicais livres podem estar implicados na epilepsia.

Até relativamente pouco tempo acreditava-se que havia pelo menos três fatores bioquímicos que contribuíam para a propagação das crises convulsivas provocadas pela Pilo em ratos, a concentração de glutathione, a peroxidação lipídica e o conteúdo de nitrato, toda vez que a atividade da SOD não estava alterada (Freitas *et al.*, 2005). Razão pela qual a atividade da SOD estaria alterada só nas primeiras etapas das crises, pois 24 horas após as crises haveria diminuição da sua ação (Hussain *et al.*, 1995).

Recentemente, alguns autores têm demonstrado que a atividade da SOD é muito mais complexa e não é totalmente certo afirmar que a atividade desta encontra-se restringida às primeiras etapas das crises convulsivas, e que aparentemente sua atividade aumenta dependendo da concentração de MDA. Tem sido descrito também, que ocorre uma diminuição da sua ação 24 horas depois, e uma reativação de 6 ou 7 dias após as crises (Liu *et al.*, 2010).

1.7 Tratamentos da epilepsia

Recentemente têm sido feitas inúmeras tentativas na busca de novos compostos efetivos na inibição da epileptogênese secundária, que ocorre após

um dano neuronal potencialmente lesivo, em humanos e animais. No entanto, até o momento nenhuma droga tem conseguido evitar crises recorrentes de ratos submetidos a crises convulsivas ou em testes clínicos (Pitkänen & Sutula., 2002). É por isso, que a utilização de agentes antioxidantes e anti-inflamatórios com ação no SNC pode significar uma alternativa co-adjuvante na prevenção das epilepsias secundárias, diminuindo o dano após as crises primárias, de animais de laboratório (Taleb-Contini et al., 2008).

Por outro lado, sabemos que o uso de fármacos antiepilépticos (FA) é limitado, devido aos vastos efeitos adversos tais como, o prejuízo cognitivo e doenças afetivas (Gupta & Malhotra, 2000; Schmitz, 2006), já que o cérebro animal é particularmente sensível ao dano oxidativo. Este dano pode ser atribuído ao seu alto consumo de oxigênio, o grande número de lipídios e metais oxidáveis, assim como seus comparativamente poucos mecanismos de antioxidação (Drôge & Schipper, 2007; Korkmaz et al., 2008).

Por causa disto, há uma necessidade de desenvolver e implementar novos FA, com poucos efeitos adversos e alta eficácia.

1.8 O Ácido Clorogênico (AC)

O AC é um polifenol com uma ampla distribuição em muitas plantas, e recentemente tem chamado a atenção por diversos laboratórios devido aos enormes benefícios à saúde. Pertence a uma família de ésteres formados por ácidos trans-cinâmicos e ácido quínico. Está disponível no mercado sob a forma de ácido 5-O-cafeoilquínico (figura 1), pode atravessar a barreira hematoencefálica, como metabólito ou em sua forma pura e agir diretamente sobre o SNC.

O AC encontra-se presente em uma ampla variedade de alimentos habitualmente consumidos pelo ser humano, como algumas frutas, azeite, vinho e café.

Figura 1. Fórmula química estrutural do Ácido Clorogênico (retirado de Heitman & Ingram, 2014).

Em um trabalho prévio, realizado no nosso laboratório, evidenciou-se que a proteção do AC (2.5, 5.0 e 10.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) nas áreas CA1, CA3 e giro denteado foi semelhante à apresentada pelo riluzole (23,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As três concentrações apresentaram uma tendência, não significativa, de proteção superior em todas as áreas analisadas.

Nesse mesmo trabalho foi demonstrada a proteção do AC, em retinas de ratos submetidos ao modelo experimental de glaucoma agudo. Evidenciando-se que o AC (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), protegeu de maneira significativa às células da camada ganglionar e da nuclear interna da retina.

Além disso, avaliou-se a morte celular com auxílio de Fluoro-Jade C após a isquemia da retina, evidenciando-se uma considerável proteção pelo AC, onde o grupo de ratos tratados apresentou menos morte celular, comparado com aqueles que não receberam tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar a ação antioxidativa e neuroprotetora do AC em ratos, com indução de SE por injeção intraperitoneal de Li-Pilo.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar os efeitos antioxidativos no hipocampo de quatro concentrações do AC (curva dose resposta), dosando MDA e SOD.

2.2.2 Analisar o efeito destas concentrações de AC na morte celular, usando como marcadores celulares Nissl e Fluoro Jade C.

2.2.3 Balizar o efeito do AC com o Ácido Ascórbico, pelas suas características antioxidativas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratos Wistar machos (± 250 g), foram utilizados do Biotério Central da USP, Campus de Ribeirão Preto, distribuídos em grupos de três por gaiola e mantidos no Biotério de Manutenção do Departamento de Biologia, com ciclo claro/escuro de 12/12hs (luzes às 7:00 horas), temperatura (25 °C) e umidade (55%) controladas; com água e ração *ad libitum*. No fim do experimento foram analisados os cerebros de 96 ratos, sendo que não foram considerados 42 por não atingirem o SE e 15 ao padronizar a dose adequada, para isto preliminarmente foram testadas as doses de 30 e 35 mg/kg de pilo.

3.2 Drogas

Para a indução das crises foi administrada a Pilo (38mg/Kg), para os tratamentos o AC (3, 10, 30 e 100 mg/Kg, sigma-Aldrich, EUA), cloreto de lítio (128 mg/Kg, Sigma, EUA) como controle positivo da ação antioxidante empregou-se o *L*-Ácido Ascórbico (AA;500 mg/Kg) injetados por via i.p, além da Metil- Escopolamina (1 mg/Kg; Tocris Bioscience, EUA) para diminuir os efeitos colinérgicos periféricos da pilo.

3.3 Indução do SE

Os animais foram levados para a sala de experimentação onde permaneceram um período de 5 dias para permitir sua ambientação. 18 h antes da indução receberam de cloreto de lítio i.p. (128 mg/Kg, Sigma, EUA). Os animais receberam uma injeção subcutânea de metil-escopolamina (1 mg/Kg; Tocris Bioscience, EUA). Após uma hora e meia o *status* foi interrompido por uma injeção de tiopental sódico i.p. (120 mg/Kg; Cristalia, Brasil). Como início do SE foi considerada a presença de crises de classe 3, de Racine (1972; tabela 1), sem que se apresente a recuperação (Rigoulot et al., 2004).

Tabela I. Classificação das crises convulsivas, segundo Racine (1972).

Classe	Comportamento
1.	Movimentos orofaciais e piscar de olhos
2.	Mioclonia de cabeça e/ou movimentos clônicos faciais severos
3.	Mioclonia dos membros anteriores
4.	Convulsões clônicas dos membros anteriores com elevação
5.	Convulsões tônico-clônicas generalizadas associadas à perda do controle postural

Quando as crises comportamentais não pararam, o animal recebeu doses adicionais do anestésico. Os animais que não apresentaram SE foram descartados do estudo. O protocolo da Tabela II foi considerado no estudo.

3.4 Tratamento

Segundo Fujikawa (1996), a maior quantidade de dano e comprometimento de estruturas cerebrais, produto de uma crise de 3 horas ocorre de 24 a 72 horas pós-crise, por esta razão considerou-se crucial a janela de três dias para o tratamento.

Uma hora e meia depois de ter parado a crise com a injeção de tiopental, foi administrado o respectivo tratamento, sendo este o primeiro dia de tratamento. No dia seguinte foi administrada a segunda dose e no terceiro dia uma hora e meia após, a terceira dose. O animal foi sacrificado e o encéfalo foi retirado rapidamente (Liu *et al.*, 2012).

3.5 Ensaios para determinação do estresse oxidativo

Após a extração do encéfalo, o hipocampo (bilateral) foi retirado e processado com um homogeneizador do tipo potter, em solução tampão fria (usando gelo em volta do recipiente). O tampão empregado foi uma solução de PBSa 4%.

As amostras foram diluídas em dois volumes de PBS e preservada a 4 °C até o momento da reação. Preparou-se uma solução de *N-metilindol* como padrão de MDA. Tanto as amostras como o padrão de MDA foram incubadas durante uma hora a 45°C, logo depois se centrifugou durante 15 min a 3000 rpm.min⁻¹, o sobrenadante foi coletado e a absorbância foi lida a 586nm, em placas de cultura de *Elisa* (Vega *et al.*, 2015), usando um espectrofotômetro Shimadzu modelo 1800 (Japão).

Para determinar a atividade da SOD, foram adicionados 30 µL metanol e 50 µL de clorofórmio a cada amostra (hipocampo bilateral macerado em PBS a

4%), agitou-se e centrifugou-se, durante 15 min a 6000 rpm.min⁻¹, o sobrenadante foi coletado e preservado a 4°C, até o momento da reação. Uma solução de pyrogallol e EDTA (98%) foi adicionada como marcador cromóforo, sendo que o ensaio negativo ou branco ao invés de amostra, continha água destilada, e conseqüentemente não apresentaria valores altos de absorbância (Segundo *et al.*, 2006), a qual foi lida em placas de *Elisa*, com ajuda de um espectrofotometro Shimadzu modelo 1800 (Japão) a 420 nm.

A quantificação de proteínas, contidas no tecido hipocampal, foi feita mediante o teste de Bradford (1976), um método simples, para quantificar proteínas solubilizadas em meios sem detergentes. O principal componente é o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldich, Brasil) em solução ácida, que ao ligar-se às proteínas, tem a sua absorbância alterada de 465nm para 595nm. A interação entre o corante Coomassie com a proteína estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente castanha para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro Shimadzu modelo 1800 (Japão), a 595 nm. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão dos valores de concentrações conhecidas de albumina do soro bovino (Sigma-Aldich, Brasil).

O calculo da quantidade de MDA, presente nas amostras, foi calculada com a fórmula:

$$\frac{D.O.A}{D.O.P} \times 10$$

Onde D.O A, é a densidade óptica da amostra e D.O P, é a densidade óptica do padrão de MDAe, é expressa em µmol/g. Os valores de densidade

óptica obtidos foram divididos pelos valores de proteína obtidos da reação de Bradford (1976) para cada amostra.

O cálculo da atividade da SOD presente nas amostras foi feito calculando o grau de inibição da reação mediante a fórmula:

$$AE = \left[\left(\frac{\Delta D.O.A \times 100}{\Delta D.O.B} \right) - 100 \right] \times 0,6$$

Onde D.O A, representa a densidade óptica no tempo da amostra e D.O B representa a densidade óptica do branco, sem amostra, expressa em U, que representa unidade por miligrama de proteína (MannheimB., 1987).

Figura 2. Esquema geral para determinação do EO. SE, *status epilepticus*. Tratamento correspondente a cada grupo experimental. Reação, após a decapitação do animal, o cérebro foi macerado e diluído em PBS para seguir os protocolos de determinação de MDA com o método do Indol e a atividade da SOD com o método de pirogallol. Leitura da reação em espectrofotômetro e análise de dados mediante ANOVA.

3.6 Histologia

Da mesma forma que foi feito no caso da determinação do EO, foi induzido o SE nos ratos, seguidamente foram tratados por três dias, em seguida, os animais foram perfundidos, sendo que 30 animais (6/grupo) receberam uma dose de cloridrato de ketamina (200 mg/kg; i.p.), com perfusão através do ventrículo esquerdo à uma pressão de 50 mmHg, utilizando uma bomba peristáltica de infusão (BP-600, Milan Equipamentos Científicos, Brasil). Foram usados 40 mL de solução tampão fosfato de sódio (PBS 0,05 M; diluído em

água deionizada, pH 7,4), seguidos por 200 mL de solução fixadora de paraformaldeído(PFA) a 4%, diluído em PBS (0,05M, pH 7,4, à 4°C; Synth, Brasil) por 15 min. Para fixar, os encéfalos foram desconectados dos cerebelos e bulbos olfatórios, pós-fixados em PFA, por 24 horas e colocados numa solução de sacarose a 30%, até permanecerem no fundo do recipiente.

3.6.1 Secção dos encéfalos em criostato

Após o período de incubação na solução de sacarose, os encéfalos eram colocados em um suporte e recobertos por OCT (Tissue-Tek; Jung, Alemanha). Com auxílio de um criostato (Leica CM 1850; Leica Microsystems, Alemanha), o tecido cerebral congelado foi seccionado transversalmente em cortes de 20 µm de espessura, distendidos em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Foram confeccionadas 10 lâminas, com três secções da formação hipocampal, entre as coordenadas -3,3 e -4,5 mm a partir do Bregma, segundo Paxinos & Watson (1986).

3.6.2 Análise histológica

3.6.2.1 Técnica de Nissl-Cresil violeta

Esta técnica permite evidenciar a substancia de Nissl, em um roxo intenso produto da ação da anilina presente na técnica, acúmulos de reticulo endoplasmático rugoso, que sob condições patológicas tendem a desaparecer. As lâminas com os cortes de tecido encefálico foram colocadas em uma cuba de vidro e banhadas com soluções de etanol. A seguir, as lâminas foram banhadas com uma solução de Cresil Violeta (0,5 %), lavadas na seqüência com água destilada e imersas em álcool. Em seguida, os cortes foram

banhados em concentrações diversas de etanol e xilol. Finalmente os cortes foram recobertos com uma lamínula e Permount® usado como meio de montagem.

3.6.2.2 Técnica de Fluoro Jade C

Descrito como um fluorocromo, útil como marcador de neurônios em degeneração, é amplamente usado em modelos de ELT. No presente estudo foi empregado o protocolo de Schumed e Hopkins (Schmued & Hopkins, 2000).

As lâminas foram lavadas e cobertas com lamínulas, empregando como meio de montagem o *Fluoromount* (Millipore, EUA). A análise das lâminas foi feita com auxílio de um microscópio de fluorescência (DM 5000 B, Leica Microsystems, Alemanha).

3.6.3 Histopatologia

Na análise histopatológica qualitativa avaliou-se a integridade das camadas das regiões CA1 e CA3, assim como do *hilus*, além de verificar alterações morfológicas, como células vacuolizadas, gliose, desorganização das camadas e núcleos picnóticos.

Na análise quantitativa do dano neuronal, foram selecionadas três lâminas para cada animal de cada grupo, e de cada uma dessas escolhidas três cortes da formação hipocampal. Em cada um dos cortes selecionados foram capturadas imagens de toda a extensão da camada de células piramidais das regiões CA1, CA3 e *hilus*. Para isso, o procedimento de captura de imagem foi realizado por um sistema constituído por uma câmera digital colorida da Leica (DFC300 FX; Leica Microsystems, Alemanha) conectada a

um microscópio (DM 5000 B; Leica Microsystems, Alemanha) e a um computador (configuração: Dual Core 2 Duo). As imagens obtidas foram visualizadas com aumento de 40x.

As células viáveis foram contadas manualmente por meio de seleção feita com ou auxílio do software Q-Win (Leica Microsystems, Alemanha), assim como a medição das áreas analisadas. O número estimado de células viáveis (n), determinado pela média dos valores de três secções adjacentes. O número real de células é calculado utilizando-se o método de correção de Abercrombie:

$$N \text{ (por mm}^2\text{)} = n [T/(T + D)] / A$$

Onde N é o número real de células, T é a espessura da secção (20 µm), D é o diâmetro médio de cada núcleo na população da amostra, o qual foi medido em uma ampliação de 1000X; e A é área medida (em mm²) de cada região hipocampal. Os valores obtidos foram expressos como a média das densidades (neurônios/mm ± E.P.M) (Kwak *et al.*, 2005).

No caso da imunofluorescência com Fluoro-Jade C realizou-se uma contagem das células imunorreativas, dividida pela área medida (mm²) de cada região hipocampal.

Figura 3. Esquema geral da histologia. SE, *status epilepticus*. Tratamento correspondente a cada grupo experimental. Perfusão, os animais foram anestesiados e perfundidos por via intracardiaca. Corte, foram cortados os cérebros, previamente crio-protegidos com sacarose, com o auxílio de um criostato. Histologia, Nissl e Fluoro Jade C. Contagem, contabilização das células viáveis no caso do Nissl e degeneradas no caso do Fluoro Jade, e análise de dados mediante ANOVA.

3.7 Análise estatística

Tanto na determinação do EO, como na análise histológica foi usada a ANOVA de uma via, com pós-teste de *Newman-Keuls* para as comparações entre os grupos, sendo consideradas estatisticamente significantes os valores de $p < 0,0001$. Todas as análises foram efetuadas com o auxílio do programa GraphPAD, Prisma para Windows versão 5.0 (2002,EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação do estresse oxidativo

4.1.1 Detecção do Malonildialdeído (MDA)

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre os grupos avaliados ($F(7, 40) = 14,42$ com $P < 0,0001$). Evidenciou-se que há uma concentração significativamente menor de MDA nos hipocampus dos ratos tratados com AC, para as concentrações de 30 e 100 mg/Kg, 50% e 48% respectivamente, quando comparados com os que receberam SS, após o SE. Por outro lado, não foi observado redução significativa na concentração de MDA, nos hipocampus dos ratos que receberam 3 e 10 mg/kg de AC, quando comparados com os valores dos animais que receberam SS.

Figura 4. Gráfico representativo da concentração de Malondialdeído (MDA) em nmoles/g de proteína e desvio padrão, no hipocampo de ratos submetidos ao SE, após 3,10, 30 e 100 mg/kg de AC, solução salina (SS) e ácido ascórbico (AA); sem tratamento (Naïve); 128 mg/kg de cloreto de Lítio e Metilescopolamina 500 mg/kg, um dia depois (Sham). ***Diferenças significativas com relação ao grupo SS.

4.1.2 Detecção da atividade da SuperoxidoDismutase (SOD)

O teste de ANOVA mostrou que houve diferenças significativas na atividade da SOD nos grupos estudados, $F(7,40) = 11,26$ com $P < 0,0001$. O pós-teste indicou que o grupo de ratos tratados com 30 mg/Kg de AC apresentou uma atividade significativamente menor (72%), quando comparado com o grupo de ratos que receberam SS, após o SE (Figura 5) e aqueles tratados com AA. Além disso, detectou-se uma diferença significativa entre os grupos tratados com 30 e 100 mg/Kg de AC.

Figura 5. Gráfico representativo da atividade da SOD no hipocampo de ratos submetidos a SE, que receberam o ácido clorogênico (3,10,30 e 100 mg/kg), solução salina (SS), 500 mg/Kg de ácido ascórbico (AAA), cloreto de lítio e Metilescopolamina (Sham), sem tratamento e sem SE, Naive. ***Diferenças significativas com relação ao grupo SS, **Diferenças significativas com respeito ao grupo 100 mg/kg.

4.2 Análise histopatológica

4.2.1 Análise histopatológica qualitativa

As imagens representativas (Figuras 6 à 8) das secções hipocampus dos animais submetidos ao SE, que receberam SS apresentam desorganização das camadas celulares, além disso, foi observado núcleos picnóticos e vacuolização.

Também, observou-se que o AC preservou as camadas hipocampus, além de reduzir o número de núcleos picnóticos e células com vacuolização.

Por outro lado, quando foi realizada a marcação com o Fluoro Jade C, o grupo controle Naive (animais sem tratamento) e o grupo controle Sham (animais tratados com Lítio e Metilescopolamina) não apresentaram células imunorreativas nas camadas hipocampus. O grupo de animais que receberam SS foram os que apresentaram maior quantidade de células FJC+. A marcação

mais intensa foi observada nos hipocampus dos ratos tratados, o que pode indicar neurônios em degeneração.

Figura 6. Imagens representativas de secções coronais da CA1, do hipocampo de ratos Wistar submetidos ao SE. Coloração de Nissl (Esquerda). Fluoro Jade C (Direita). (A, A'), animais injetados com solução salina. (B, B') 30 mg/Kg de Ácido clorogênico. (C, C') sem tratamento (Naïve). (D, D') 128 mg/kg de Lítio e Metilescopolamina (Sham). (E, E') 500 mg/Kg de Ácido ascórbico. Aumento de 400x. Seta indica neurônio viável. Cabeça de seta Núcleo picnótico. Seta larga vacuolização.

Continuação

Continuação

Figura 7. Imagens representativas de secções coronais da CA3, do hipocampo de ratos Wistar submetidos ao SE. Coloração de Nissl (Esquerda). Fluoro Jade C (Direita). A, animais injetados com solução salina. B, 30 mg/Kg de Ácido clorogênico. C, sem tratamento (Naïve) D, 128 mg/kg de Lítio e Metilescopolamina (Sham) E, 500 mg/Kg de Ácido ascórbico. Aumento de 400x. Seta indica neurônio viável. Cabeça de seta Nucleo picnótico. Seta larga vacuolização.

Continuação

Figura 8. Imagens representativas de secções coronais do *hilus*, do hipocampo de ratos Wistar submetidos ao SE. Coloração de Nissl (Esquerda). Fluoro Jade C (Direita). A, animais injetados com solução salina. B, 30 mg/Kg de Ácido clorogênico. C, semtratamento (Naïve). D, 128 mg/kg de Lítio e Metilescopolamina (Sham). E, 500 mg/Kg de Ácido ascórbico. Aumento de 100x. Seta indica neurônio viável. Cabeça de seta Nucleopícnótico. Seta larga vacuolização.

4.2.2 Análise histológica quantitativa: Nissl e Fluoro Jade C

Para a marcação com Nissl, não houve diferenças nas densidades celulares da camada CA1, do hipocampo de ratos tratados com AC (30 mg/Kg), comparados com os que receberam SS.

Figura 9. Gráfico representativo da densidade de neurônios na CA1 dos hipocampus de ratos Wistar, e desvio padrão, marcados com Nissl, nos diferentes grupos. SS, injetados com solução salina após o SE; AA, Ácido ascórbico; Naive, sem tratamento; A, 30 mg/Kg após o SE; Sham, com 128 mg/kg de Lítio e Metilescopolamina. *** Diferenças respeito ao grupo SS.

Na análise estatística da região CA3, constatou-se diferenças significativas nos grupos estudados, $F_{(4,25)} = 15,55$, $P < 0,0001$. O AC (30 mg/Kg) preservou de maneira significativa, quando comparado com o grupo tratado com SS. Portanto, protegeu as células hipocâmpais em X%. Não houve diferenças significativas entre AC e o AA.

Figura 10. Gráfico representativo da densidade de células viáveis na CA3 do hipocampo de ratos Wistar, e desvio padrão, marcados com Nissl, nos diferentes grupos. SS, injetados com solução salina após o SE; AA, Ácido ascórbico; Naïve, sem tratamento; AC, 30 mg/Kg, após o SE; Sham, 128 mg/kg de Lítio e Metilescopolamina 500 mg/Kg.*** Diferenças respeito ao grupo SS.

No *hilus*, a análise estatística mostrou diferenças significativas entre os grupos, $F(4,25) = 6,276$, $P < 0,0001$, o AC protegeu 75% da células hipocampais, quando comparada com as dos ratos que receberam SS após o SE. Não houve diferenças significativas entre o AC e o AA.

Figura 11. Gráfico da quantificação dos neurônios no hilus, do hipocampo de ratos Wistar, marcados com Nissl, dos diferentes grupos. SS, tratados com solução salina após o SE; Acido AA, animais tratados com Ácido ascórbico; Naïve, animais que não foram submetidos a tratamento, AC, animais tratados com 30 mg/Kg de AC; Sham, animais tratados com 128 mg/kg. Lítio e Metilescopolamina. *** Diferenças respeito ao grupo SS.

Para a marcação com FJC na região CA1, constatou-se que não houve uma diferença nos grupos comparados [$F(2,15) = 0,037$, $P = 0,963$]. Indicando que a

neurodegeneração nas condições analisadas não foram alteradas para esta região pelo AC.

Figura 12. Gráfico da quantificação dos neurônios FJC+. A: CA1, B: CA3 e C: hilus. SS, injetados com solução salina após o SE; AA, animais tratados com 30 mg/Kg de Ácido ascórbico; AC, animais tratados com 30 mg/Kg de Ácido Clorogênico. *** Diferenças em relação ao grupo SS. ** Diferenças em relação ao AA.

Na região CA3, por outro lado, apresentaram-se diferenças significativas [$F(2,15) = 40,90$, $P < 0,0001$]. Os grupos de ratos tratados com AA apresentaram uma redução de

neurônios FJC+, quando comparado com o grupo de ratos que receberam SS após o SE, mostrando que houve neuroproteção. Não houve diferença significativa entre o AA e o AC.

Na região do *hilus*, apresentou-se também diferenças significativas nos grupos analisados, ($F_{(2,15)} = 9,515$, $P = 0,0021$), e ao realizar o pós verificou-se que também houve uma diminuição significativa de neurônios FJC+, mostrando que houve proteção. Não teve diferenças significativas entre o AC e o AA.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo sugerimos que o efeito protetor do AC possa ser devido à sua ação antioxidante, pois protegeu as áreas CA3 e *hilus*, do hipocampo de ratos Wistar submetidos ao SE, diminuindo de maneira significativa a perda celular observada pela coloração de Nissl e de células em degeneração FJC+.

Ainda foi observada uma diminuição significativa da quantidade de MDA no hipocampo de ratos tratados com AC após SE, indicando que houve uma redução da peroxidação lipídica, mesmo depois de uma crise de uma hora e meia. A diminuição da atividade da SOD, no entanto, deve ser interpretada à luz de varias considerações.

Há cinco grupos de isoformas da enzima SOD dessas, duas são principais. Uma tem como sítio ativo o íon Mn^{2+} . A sua função é reduzir o O_2 a H_2O_2 ($2 O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$), e é a primeira enzima de defesa antioxidante localizada na matriz mitocondrial. Outra dependente de íons de Cu^{2+}/Zn^{2+} , está presente no citoplasma com a mesma ação, ou seja, sequestrando íons. Apresentam por sua vez diferentes tempos de ação, a SOD dependente de íons de Mn^{2+} necessita da ativação de genes como o *sod1* e o *sod2*, cuja estimulação leva até 5 horas. Entretanto, a

segunda isoforma não precisa da ativação desses genes e pode ser detectada uma hora e meia depois do início da reação (Andrejev *et al.*, 2005).

Acreditamos que dosamos a segunda isoforma devido ao método de obtenção da SOD, já que o maceramento não permite obter a primeira isoforma dependente de Mn^{2+}/Zn^{2+} .

Por outro lado, encontramos na literatura que o pico de ação de todas isoformas de SOD é durante as primeiras 24 h após o estímulo estressante. Depois disso pode continuar até 9 dias, apresentando aumentos de atividade, mas com uma constante tendência decrescente e uma rápida saturação (Chen *et al.*, 2015).

No presente estudo foi observada uma redução significativa do MDA quando os ratos foram tratados como AC, assim como a atividade da SOD. Em outros estudos, usando diferentes paradigmas, também tem sido demonstrada uma diminuição da atividade da SOD, bem como uma diminuição dos níveis de MDA (Peluffo *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015).

Peluffo e colaboradores (2006) mencionam as contradições referentes ao papel da SOD Cu^{2+}/Zn^{2+} no SNC de pacientes neonatos com hipóxia-isquemia, isto é, em algumas ocasiões sua atividade aumentava, mas por outro lado, em muitos casos diminuía. Avaliaram então, a atividade da estimulação exógena do gene da enzima (gCu/Zn), em cérebros de ratos com o modelo de vetor recombinante da proteína NLSCt. Mesmo estimulando a produção da enzima, sua atividade não aumentava como se esperava, mas era extremamente neuroprotetora, sugerindo que o efeito neuroprotetor desta isoforma poderia ser superior à isoforma dependente de Mn^{2+} .

No estudo de Chen e colaboradores (2015) empregou-se o modelo de

isquemia da OxyHb em ratos, e se avaliou separadamente a atividade da SOD dependente de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ e a dependente de Mn^{2+} , que foram isoladas por maceramento com microesferas. Apesar de ter um aumento importante na atividade da isoforma dependente de Mn^{2+} , a isoforma de $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ está diminuída. Entretanto, os autores não descrevem e nem sugerem um provável mecanismo de ação de qualquer das isoformas (Chen et al., 2015).

Por outro lado, existem estudos também com diferentes constructos que mostram uma redução da MDA e consequente aumento da SOD (Pu et al., 2014; Wo e Mao, 2015).

Pu et al (2014), usando o modelo de tetracloreto de carbono em camundongos, demonstraram que quando tratados com polissacárideos extraídos das plantas, *Astragalus* e *Angelica*, apresentou uma diminuição na hepatotoxicidade, via redução do MDA e aumentos da atividade do SOD. Os autores não propõem um provável sitio de ação, limitando-se a mencionar o papel crucial desta enzima endógena na degradação do íon O_2^- .

Wo e Mao (2015), ao analisar pacientes que sofreram um acidente vascular encefálico (AVE) e que receberam como tratamento o *Buyang Huanwu Decoction* (BYHWD), infusão preparada com as raízes da *Angelica* e do *Astragalus* (como principais ingredientes), mostraram resultados semelhantes aos já referidos, diminuindo a quantidade de MDA e aumentando a atividade da SOD. Além de um aumento da produção de ON e ativação de varias proteases. Tampouco se menciona ou sugere um mecanismo de ação para esta enzima.

Por outro lado, além dos aspectos relacionados aos tempos de ativação das enzimas e modo de obtenção das isoformas, podemos ressaltar ainda a

complexidade do EO e da atividade da SOD. Portanto, é pertinente lembrar que o EO não está restrito ao que acontece com as enzimas endógenas e a integridade das membranas. O EO está interconectado com outros processos e é progressivo, prova disto é que tem se demonstrado que o EO dispara mecanismos apoptóticos, tais como os da via do gene p58 (Li et al., 2010; Hasegawa et al., 2011). Entretanto, em nosso estudo não sabemos se essa via está sendo ativada pelo fato de não termos usado metodologia para detecção de apoptose. A marcação de Nissl que marca neurônios viáveis foi usada. Outra marcação usada foi o FJC, que marca neurônios em degeneração. Entretanto, Schumed (2005), o primeiro a empregar essa técnica, não descreve o mecanismo de ação dessa marcação.

Recentemente Mikami e colaboradores, usando células embrionárias de camundongo da cepa C57BL6/NCr, mostraram que o AC inibe parcialmente a morte neuronal induzida pelo *L*-glutamato, inibindo a entrada do Ca^{2+} nos receptores ionotrópicos de *L*-glutamato (RiGlu). Os autores sugerem ainda, que o AC poderia exercer uma ação neuroprotetora diminuindo a exotoxicidade mediada pelo RiGlu, assim como a toxicidade oxidativa do sistema O_2 / N_2 (íons de oxigênio e nitrogênio) (Mikami et al., 2015).

Não obstante ao estudo anteriormente mencionado ter sido *in vitro*, o efeito neuroprotetor evidenciado na histologia, nos leva a sugerir que talvez o efeito do AC em nosso estudo possa ter sido inibindo canais de cálcio, específicos ou não.

Mesmo não tendo diferenças significativas nos valores de neuroproteção entre o AC e o AA, a concentração de AC (30mg/Kg) foi menor que a do AA (150 mg/Kg), para ter o mesmo efeito.

Destarte, acreditamos que o efeito do AC no abaixamento da atividade da SOD,

que causa a neuroproteção possa ser decorrente da diminuição do substrato da enzima, como alguns íons de O_2^- .

6 CONCLUSÕES

O AC foi neuroprotetor, inibindo a peroxidação lipídica, evitando desta maneira o avanço da cascata degenerativa desencadeada pela Pilo no SE, em ratos Wistar. Isso foi observado pela diminuição da MDA, SOD e marcações com Nissl e FJC.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Futuros estudos poderiam avaliar a expressão de algumas caspases como a I e a III, assim como as vias dos genes p53 e p58, importantes marcadores do processo apoptótico, já que a alteração da atividade enzimática poderia alterar por sua vez este importante mecanismo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andreyev AY, Kushnareva, YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 70, 200–214. 2005

Ashrafi MR, Shams S, Nouri M, Mohseni M, Shabanian R, Yekaninejad MS, Chegini N, Khodadad A, Safaralizadeh R. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia.*; 48:1750–1755. 2007

Bartolomei, F. Khalil, M. Wendling, F. Sontheimer, A. Régis, J. Ranjeva, JP. Guye, M. Chauvel, P. Entorhinal Cortex Involvement in Human Mesial Temporal Lobe Epilepsy: An Electrophysiologic and Volumetric Study. *Epilepsia.* 46(5):677–687, 2005.

Berg, AT.Shinnar, S. Levy, SR.Testa, FM. Smith-raraport, S. Beckerman, B. Early development of intractable epilepsy in children: a prospective study. *Neurology*; 56: 1445-1452. 2001.

Bradford, M.M. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal.Biochem.* 72: 248–254,1976.

Burneo, J. G, Tellez-Zenteno, J and Wiebe, S. "Understanding the burden of epilepsy in Latin America: a systematic review of its prevalence and incidence," *Epilepsy Research*, vol. 66, no.1–3, pp. 63–74, 2005.

Carpio, A. Hauser, W.A. "Epilepsy in the developing world," *Current Neurology and Neuroscience Reports*, vol. 9, no. 4, pp. 319–326, 2009.

Cavalheiro, EA. The Pilocarpine model of epilepsy.*Ital J NeurolSci*;16: 33–37, 1995.

Chavko M, Auker CR, McCarron RM. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures.*Nitric Oxide*;9: 18–23. 2003.

Chen Y, Sun H, Huang L, Li J, Zhou W, Chang J. Neuroprotective Effect of Radix Trichosanthis Saponins on Subarachnoid Hemorrhage. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 313657. 2015.

Curia, G. Longo, D. Biagini, G. Jones, RS.Avoli, M.The Pilocarpine model of temporal lobe epilepsy.*JNeurosci Methods.* Jul 30;172(2):143-57, 2008.

Dhar, S. K., Xu, Y, Chen, Y., St.Clair, D. K. Specificityprotein 1-dependent p53-mediated suppression of human manganese superoxide dismutase gene expression. *TheJournal of Biological Chemistry*, vol. 281, no. 31, pp. 21698–21709, 2006.

Drane, P., Bravard, A., Bouvard, V., May, E. Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene*, vol. 20, no. 4, pp. 430–439, 2001.

Dröge, W. Schipper, HM. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. *Aging Cell* 6:361–370, 2007.

Du F. Eid T. Lothman E.W. Köhler C. Schwarcz R. Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*;15:6301–6313.1995.

Emerit, J. Mand E. Bricaire, F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, vol. 58, no. 1, pp. 39–46, 2004.

Freitas RM, Vasconcelos SM, Souza FC, Viana GS, Fonteles MM. Oxidative stress in the hippocampus after Pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *FEBS J*; 272:1307– 1312.2005

Freitas RM. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by Pilocarpina. *Neurosci.Lett.* . 462, 225-229.2009.

Fujikawa, D.G. The temporal evolution of neuronal damage from Pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 725: 11-22, 1996.

Furtado, M. de A. Braga, G.K. Oliveira, J.A. Del Vecchio, F. GarciaCairasco, N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of Pilocarpine. *Epilepsia.* 43 Suppl 5:37-9, 2002.

Glien, M. Brandt, C. Potschka, H. Voigt, H. Ebert, U. Repeated low-dose treatment of rats with Pilocarpine: low mortality but high proportion of rats developing epilepsy. *Epilepsy Res.* Aug;46(2):111-9, 2001.

Goffin, K. Nissinen, J. Van Laere, K. Pitkänen, A. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *ExpNeurol*;205-2:501-5.2007.

Gupta, YK. Malhotra, J. Antiepileptic drug therapy in the twenty first century. *Ind J PhysiolPharmacol*:8–23, 2000.

Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic. Res.*; 31:261–272.1999.

Hasegawa, Y., Suzuki, H., Sozen, T., Altay, O., Zhang, J. H. Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochirurgica, Supplementum*, no. 110, pp. 43–48, 2011.

Hussain S, Slikker W Jr. Ali SF. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13:811–817.1995.

Jellinger KA. General aspects of neurodegeneration. *J. Neurol. Transm*; 65:101–144.2003.

Kang, T. C. Kim, D. S. Kwak, S.E. Kim, J.E. Won, M.H. Kim, D.W. Choi, S.Y. Kwon, O.S. Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia*. 54: 258-271, 2006.

Knopp A. Kivi A. Wozny C. Heinemann U. Behr J. Cellular and network properties of the subiculum in the Pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol*;483:476–488.2005.

Korkmaz, A. Oter, S. Sadir, S. Exposure time related oxidative action of hyperbaric oxygen in rat brain. *Neurochem Res* 33:160–166, 2008.

Kotsopoulos, I.A.W. vanMerode, T.Kessels, F. G. H. M, De Krom, C. T. F. M. Knottnerus, J. A. Systematic review and meta-analysis of incidence studies of epilepsy and unprovoked seizures, *Epilepsia*, vol. 43, no. 11, pp. 1402–1409. 2002.

Kwak, S.-E., Kim, J.E., Kim, D.S., Jung, J.Y., Won, M. H., Kwon, O.S., Choi, S.Y., et al. Effects of GABAergic transmissions on the immunoreactivities of calcium binding proteins in the gerbil hippocampus. *The Journal of comparative neurology*, 485(2), 153–64.2005.

Li, Y., Tang, J., Khatibi, N. H. Ginsenoside RB1 reduces neurologic damage, is anti-apoptotic, and down-regulates p53 and BAX in subarachnoid hemorrhage. *Current Neurovascular Research*, vol. 7, no. 2, pp. 85–94, 2010.

Liu, YF. Gao, F.Li , XW. Jia, RH. Meng, XD. Zhao, R. Jing, YY. Wang, Y. Jiang, W. The Anticonvulsant and Neuroprotective Effects of Baicalin on Pilocarpine-Induced Epileptic Model in Rats.*Neurochem Res*37:1670–1680. 2012.

Liu J, Wanga A, Li L, Huang Y,Xue P, Hao A. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium–Pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure* 19 165–172. 2010.

Maes, M. Galecki, P. Chang, Y. S. Berk, M. A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the neuro-degenerative processes in that illness.*Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 35, no. 3, pp. 676–692, 2011.

Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular disease: an overview. *J. Chromatogr. B*; 827:65–75.2005.

Mathern GW, Babb T L, Leite J P. Pretorius, J K. Yeoman, K M. Kuhlman, P A. The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampalepilepsy. *Epilepsy Research*, 26, 15, 1996.

Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res*.135: 237–251, 2002.

Mello LE, Covolan L. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the Pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res*;26:123–129.1996.

Migliore L, Fontana I, Colognato R, Coppedè F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol.Aging*; 26:587–595.2005.

Mlkami Y, Yamazawa T. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sci*. 139:69-74.2015.08.005. 2015.

Mitchell JW, Seri S, Cavanna AE. Pharmacotherapeutic and Non-Pharmacological Options for Refractory and Difficult-to-Treat Seizures. *Journal of Central Nervous System Disease*;4 105–115. 2012.

Pazdernik TL, Emerson MR, Cross R, Nelson SR, Samson FE. Soman-induced seizures: limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins. *J. Appl. Toxicol*; 21:S87–94. 2001.

Peluffo H, Acarin L, Arís A, González P, Villaverde A, Castellano B, González B. Neuroprotection from NMDA excitotoxic lesion by Cu/Zn superoxide dismutase gene delivery to the postnatal rat brain by a modular protein vector. *Neuroscience*,7:35. 2006.

Perry G, Nunomura A, Hirai K, Zhu X, Perez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev G, Sayre LM, Takeda A, Smith MA. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative disease?

FreeRadic. Biol. Med; 33:1475–1479.2002.

Pitkänen, A.Sutula, TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy.*The Lancet Neurol.* 1: 173–81, 2002.

Pu X, Fan W, Yu S, Li Y, Ma X, Liu L, Ren J, Zhang W. Polysaccharides from Angelica and Astragalus exert hepatoprotective effects against carbon-tetrachloride-induced intoxication in mice. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 92: 1–5. 2014.

Rice AC, DeLorenzo RJ. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. *Brain Res* ,26;782 :240-7. 1998.

Schmitz, B. Effects of antiepileptic drugs on mood and behavior.*Epilepsia* 47:28s–33s, 2006.

Schmued LC, Hopkins KJ.Fluoro-Jade: Novel Fluorochromes for Detecting Toxicant-Induced Neuronal Degeneration. *ToxicolPathol.* 28: 91. 2000.

Scorza, FA. Arida, RM. Naffah-Mazzacoratti, MG. Scernil, DA.Calderazzol, L. Cavalheiro, EA.The Pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An. Acad. Bras. Ciênc.*vol.81 no.3 Rio de Janeiro Sept, 2009.

Segundo SS, Rossana BM, Salim MB. Antioxidantes en poblaciones adultas del nivel del mar y de grandes alturas: Actividad de la superóxido dismutasa. *Rev Med Hered* v. 2006. 17 n.1.

Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases.*Ann. N.Y. Acad. Sci*; 928:22–38. 2001.

Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*;258 (5090) :1898-902.1992.

Sudha, K. Rao, A. V e Rao, A.Oxidative stress and antioxidants in epilepsy.*ClinicaChimicaActa*, vol. 303, no. 1-2, pp. 19–24, 2001.

Taleb-Contini, S.H. Santos, W.F. Mortari, M.R. Lopes, N.P. Lopes, J.L.C. Neuropharmacological Effects in Mice of *Lychnophora* Species (Vernonieae, Asteraceae) and Anticonvulsant Activity of 4,5-di-O-[E]-caffeoylquinic Acid Isolated From the Stem of *L. rupestris* and *L. staavioides*. *Basic & Clin Pharmacol & Toxicol*.10, 281–286, 2008.

Tejada S, Sureda A, Roca C, Gamundi A, Esteban S. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of Pilocarpine. *Brain Res. Bull.*; 71:372–375. 2007.

Tellez-Zenteno, J.F. e Hernandez-Ronquillo, L.A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy.*Epilepsy Research and Treatment Volume*, 2012.

Tierney, Jr. M. Mc.Phee, J. Papadakis, M.A. Current – Medical Diagnosis and Treatment. 35: 863-868, 1996.

Turski, WA. Cavaleiro, EA. Schwarz, M. Czuczwar, SJ. Kleinrok, Z. Turski, L. Limbic seizures produced by Pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*. Sep;9(3):315-35, 1983.

Vega MJR, Martínez JHS, Dulcey AJC. N-methyl-2-phenylindole Colorimetric Method as Biomarker for Lipid Peroxidation in *Pisum sativum*. *Inter Jour of Phytocos and Nat Ingrid.*, 2:10. 2015.

Wo D, Mao H. Free Radicals, the Natural Antioxidant Buyang Huanwu Decoction and Ischemic Stroke. *Intern Jour of Neurol Research*. Vol 1, No 4. 2015.

Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation of lipid bilayers: A molecular dynamic study. *Biophys. J.*; 93:4225–4236, 2007.