



**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS DE VIGABATRINA E SUA
CAPACIDADE DE INDUZIR DANO AO DNA NAS CÉLULAS CEREBRAIS APÓS O
TRATAMENTO AGUDO EM RATOS**

Thienne Rocha Pires¹

Karen Sousa²

Natália Decker³

Debora K. M Papke⁴

Vanessa R. Coelho⁵

Pricila Pflüger⁶

Patricia Pereira⁷

Jaqueline Nascimento Picada⁸

Resumo

Vigabatrina (VGB) é um medicamento indicado principalmente para o tratamento de espasmos infantis e da síndrome de West. Vigabatrina inibe irreversivelmente a enzima GABA-transaminase (GABA-T), levando ao aumento das concentrações de GABA, o que aumenta a neurotransmissão GABAérgica cerebral, conhecida por induzir alterações comportamentais. Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da VGB na memória de curto prazo e memória de longo prazo, observar efeitos sobre a motivação, locomoção e exploração e detectar as atividades genotóxicas e antígenotóxicas em diferentes tecidos. Métodos: Ratos Wistar machos foram tratados com uma dose única de VGB (100 mg / kg, 250 mg / kg, ou 500 mg / kg) ou solução salina antes da esQUIVA inibitória e tarefas de campo aberto. Para avaliar danos ao DNA foi utilizado o ensaio cometa alcalino no sangue periférico, córtex cerebral e hipocampo 24 h após o teste comportamental. Para avaliar o efeito antígenotóxico, as células foram tratadas *ex vivo* com peróxido de hidrogênio. Resultados: Não houve diferença significativa na tarefa de esQUIVA inibitória entre os grupos tratados e o grupo da solução salina. Em todas as doses testadas, VGB reduziu o número de “rearings” em campo aberto. Além disso, VGB 500 mg / kg afetou a locomoção, embora não tenha sido capaz de induzir qualquer dano ao DNA. Nenhum efeito antígenotóxico foi observado, ou seja, VGB não mostrou efeito protetor contra danos oxidativos ao DNA. Conclusões: VGB não prejudicou a memória de longo prazo e memória de curto prazo, mas o fármaco prejudica a exploração e locomoção provavelmente associada ao seu efeito sedativo. Além disso, VGB não induziu danos ao DNA de tecidos cerebrais, sugerindo falta de efeitos neurotóxicos.

Palavras-chave: ensaio cometa, campo aberto, esQUIVA inibitória.

1 Aluna do curso de Biomedicina- Bolsista PROBIC/FAPERGS – thiennerocha@hotmail.com

2 Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde -karensousa1@yahoo.com.br

3 Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde -youngdecker@hotmail.com

4 Aluna do curso de Farmácia – Bolsista PROBIC/FAPERGS -deborapapke@ymail.com

5 Aluna de doutorado da UFRGS -vane.r.coelho@terra.com.br

6 Aluna de mestrado da UFRGS - pricilafp@yahoo.com.br

7 Professora do Departamento de Farmacologia da UFRGS – patipere@yahoo.com.br

8 Professora dos cursos de pós-graduação PPGBioSaúde e PPGGTA.MP- jnpicada@gmail.com

INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neuronal caracterizada por episódios de convulsões, provocadas por descargas elétricas irregulares de neurônios. As convulsões podem causar a morte neuronal no hipocampo, neuroinflamação, neurogênese, neurodegeneração, lesão axonal, danos na barreira hemato-encefálica (LIU et al., 2014).

A vigabatrina (VGB) é um análogo estrutural de GABA, prescrito principalmente para o tratamento de espasmos infantis e de síndrome de West. Este fármaco inibe irreversivelmente a enzima GABA-transaminase de forma dependente da dose. A enzima degrada o GABA, aumentando os níveis deste neurotransmissor (BOLTON et al., 1989).

Os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos da VGB na memória de curto prazo (STM), memória de longo prazo (LTM), motivação, locomoção e testes de comportamento exploratório e detectar os efeitos deletérios ou protetores ao DNA em tecidos alvo do fármaco.

METODOLOGIA

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos. A vigabatrina foi administrada 4 horas antes dos testes comportamentais; os animais receberam uma dose única de VGB (100, 250 ou 500 mg / kg) ou solução salina por gavagem, num volume de 10 mL / kg (peso corporal).

Esquiva inibitória: Foi dividida em duas etapas (treino e teste), a primeira foi a etapa do treino, em que os animais levaram choque de 0,5-mA por 2-s nas patas no momento da descida na plataforma para a grade do aparelho, e a segunda etapa (etapa de teste), foi realizada 4 horas após a administração do fármaco, para avaliar memória de curto prazo e 24h para avaliar a memória de longo prazo. Na segunda etapa, os animais foram colocados na mesma plataforma da esquiva inibitória, mas não levaram choque na grade. Nas duas etapas foi contado o tempo em que os animais levaram para descer com as quatro placas na grade do aparato.

Campo aberto: Os animais estudados no campo aberto tinham sido submetidos a esquiva inibitória uma semana antes. Os ratos foram colocados no quadrante posterior esquerdo e deixados livres por 5 min para explorar a caixa do campo aberto. Foram avaliados cruzamentos das linhas pretas, levantamentos realizados e latência para iniciar a locomoção.

Ensaio cometa: Os animais foram eutanasiados 24 horas após os procedimentos de campo aberto e foram coletados sangue, córtex cerebral e hipocampo. O procedimento foi realizado em quadruplicata por amostra. Após a solidificação, as lâminas foram transferidas para PBS ou solução de 0,25 mM de H₂O₂ (tratamento *ex vivo*) durante 5 minutos, a 4°C. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS e, em seguida, colocados em tampão de lise por 48h a 4°C. As lâminas foram incubadas em tampão de eletroforese pH 13 durante 20 min a 4 ° C e a eletroforese foi conduzida utilizando corrente de 300 mA e 25V (0,90 V / cm), durante 15 min. As lâminas foram então neutralizadas, coradas com prata, e analisadas ao microscópio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar efeitos de VGB sobre a memória, foi utilizada a tarefa de esquiva inibitória, que envolve um aprendizado aversivo, a qual o animal aprende a inibir uma resposta, por exemplo, um choque elétrico nas patas (PICADA et al., 2005). Os resultados mostraram que VGB não prejudica ambas as memórias de curta e longa duração medida através da referida tarefa, sugerindo que este fármaco não afeta a aquisição da memória (Fig. 1). No entanto, pesquisas anteriores mostraram que agonistas GABAérgicos prejudicam a aquisição e a consolidação da memória durante o aprendizado aversivo (MAKKAR et al., 2010). Além disso, evidências sugerem que a administração aguda com doses inferiores a 1000 mg/kg e administrações subcrônicas com doses inferiores a 300 mg/kg de VGB,

aparentemente têm uma boa eficácia anti-epiléptica e não afetam acentuadamente as funções cognitivas em animais experimentais (MAZURKIEWICZ et al., 1993). Kim et al. (2006) relataram que a administração pré-treino de agonistas GABAérgicos normalmente leva à uma diminuição da resposta condicionada durante o treino, sugerindo que a transmissão GABAérgica normalmente inibe a aquisição inicial de memórias aversivas e, possivelmente, a sua consolidação. Luszczki et al. (2005) relataram em seu trabalho que VGB não prejudica a consolidação da memória de camundongos através do aprendizado aversivo e sugeriram que VGB possui efeitos antinociceptivos que impediram o adequado aprendizado da tarefa. Sabe-se que quando a reação a um estímulo aversivo (dor) é atenuado por um efeito antinociceptivo de um fármaco, os animais não podem aprender adequadamente e, conseqüentemente, associar o aprendizado e, finalmente, formar uma memória para este evento (LUSZCZKI et al., 2003).

Evidências sugerem que alterações no sistema GABAérgico podem afetar a atividade locomotora e exploratória de roedores medida através do campo aberto (SANGER, 1985; SHREVE, 1991). No presente trabalho, foi observado através do teste do campo aberto, que VGB na dose de 500 mg/kg foi capaz de reduzir o número de cruzamentos (“crossings”) e em todas as doses reduziu estatisticamente o número de respostas de orientação (“rearings”) dos animais (Fig 2). No entanto, em relação à latência para o primeiro cruzamento nenhum resultado significativo foi observado (Fig 2).

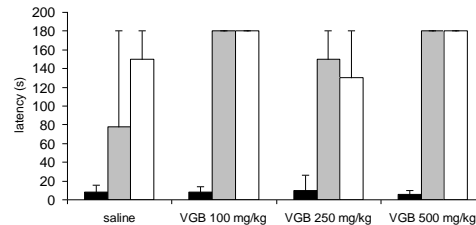


Figura 1: Efeito da administração pré-treino de vigabatrina (VGB) (100, 250 ou 500 mg / kg) sobre a memória de curto prazo (STM) (4 h após o treino) e memória de longo prazo (LTM) (24 h após o treino) na tarefa de esQUIVA INIBITÓRIA. Colunas pretas: treino; colunas cinzas: STM; colunas brancas: LTM. Os dados foram expressos como medianas e analisados utilizando o teste de Kruskal -Wallis; N = 15 animais por grupo

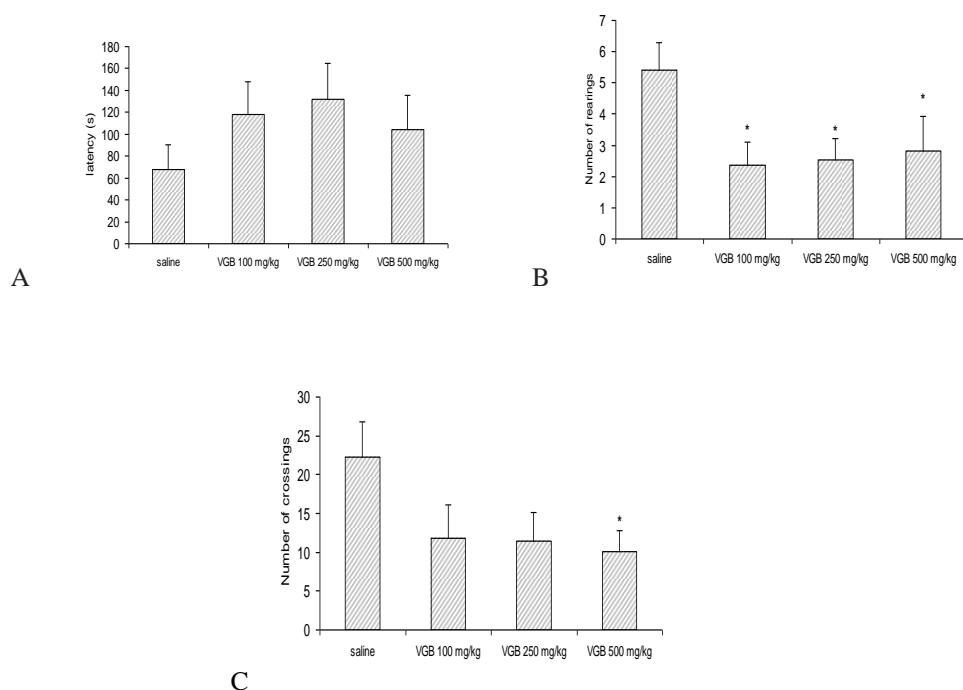


Figura 2: Efeito da administração de vigabatrina (VGB) (100, 250, ou 500 mg / kg) em campo aberto: (A) latência para iniciar a locomoção; (B) número de levantamentos realizados e (C) número de cruzamentos realizados durante um período de exploração de 5 minutos de um campo aberto. Os animais receberam solução salina ou VGB 4 h antes de serem expostos ao campo aberto. Os dados são expressos como média \pm SEM . N = 15 animais por grupo . * $p \leq 0,05$ em comparação com o grupo salina (ANOVA, Teste de Duncan).

Estudos têm mostrado que a capacidade de um fármaco para induzir efeitos genotóxico/antigenotóxicos detectados através do teste cometa depende do tecido ou órgão analisado (PEREIRA et al., 2006). No presente estudo, diferentes tecidos dos roedores em tratamento agudo foram coletados, a fim de avaliar possíveis danos ao DNA. VGB não foi capaz de induzir danos ao DNA nos tecidos sanguíneo e cerebral, coletados 24 horas após o teste do campo aberto, indicando que o fármaco não apresenta atividade genotóxica no tratamento agudo (Tabela 1).

O teste cometa pode ser considerado um método sensível e útil para investigar neurotoxicidade e neuroproteção (PEREIRA et al., 2005; GHAFARI et al., 2014). No presente trabalho utilizando peróxido de hidrogênio na avaliação da atividade antigenotóxica, foi observado que VGB apresentou uma tendência à proteção dos tecidos cerebrais e sanguíneos, uma vez que os valores de DI a DF diminuíram no sangue, hipocampo e córtex dos animais que receberam 500 mg/kg (Tabela 1), sugerindo possível efeito protetor.

Tabela 1: Ensaio cometa em sangue periférico, córtex cerebral e hipocampo de ratos tratados com solução salina ou vigabatrina

	Índice de danos (R%)	Frequência de danos
Sangue periférico		
Salina	63.8 ± 10.5	42.0 ± 5.3
VGB 100 mg/kg	65.5 ± 31.0	23.6 ± 12.8
VGB 250 mg/kg	63.0 ± 44.0	34.3 ± 23.0
VGB 500 mg/kg	50.6 ± 25.9	37.3 ± 12.6
Salina + H ₂ O ₂	169.5 ± 34.1	79.2 ± 10.9*
VGB 100 mg/kg + H ₂ O ₂	194.6 ± 55.3	88.4 ± 10.0
VGB 250 mg/kg + H ₂ O ₂	174.0 ± 34.6	82.8 ± 14.4
VGB 500 mg/kg + H ₂ O ₂	130.0 ± 55.9 (53.5%) ^b	68.7 ± 16.8
Córtex cerebral		
Salina	167.0 ± 75.3	68.0 ± 18.9
VGB 100 mg/kg	138.7 ± 77.3	59.3 ± 22.6
VGB 250 mg/kg	132.8 ± 59.9	64.7 ± 21.0
VGB 500 mg/kg	120.8 ± 78.4	53.3 ± 24.7
Salina + H ₂ O ₂	293.3 ± 68.8	94.6 ± 5.7
VGB 100 mg/kg + H ₂ O ₂	282.2 ± 75.6 (8.8%)	91.2 ± 8.5
VGB 250 mg/kg + H ₂ O ₂	286.8 ± 65.7 (5.1 %)	92.8 ± 11.0
VGB 500 mg/kg + H ₂ O ₂	258.4 ± 26.7(27.6%)	91.0 ± 7.2
Hipocampo		
Salina	190.5 ± 77.2	74.8 ± 21.1
VGB 100 mg/kg	198.3 ± 85.6	69.8 ± 21.0
VGB 250 mg/kg	206.8 ± 64.6	78.2 ± 17.3
VGB 500 mg/kg	229.0 ± 68.5	82.0 ± 14.7
Salina + H ₂ O ₂	264.0 ± 34.9	90.7 ± 6.8
VGB 100 mg/kg + H ₂ O ₂	257.5 ± 30.0 (8.8 %)	93.8 ± 5.0
VGB 250 mg/kg + H ₂ O ₂	257.0 ± 41.5(9.5 %)	92.5 ± 6.0
VGB 500 mg/kg + H ₂ O ₂	234.8 ± 55.2 (39.7 %)	88.6 ± 8.7

N = 6-7 animais por grupo.

Índice de Danos: pode variar de 0 (completamente intactas, 100 células × 0) a 400 (com dano máximo, 100 × 4).

Frequência de Danos: foi calculada com base no número de células com cauda versus aquelas sem a cauda .

Controle positivo: peróxido de hidrogénio (H₂O₂ a 0,25 mM) foi utilizado na condição *ex vivo*.

p ≤ 0,05 em comparação com a solução salina (ANOVA , teste de Dunnett) .

R % (% de redução ID) = [ID Salina + H₂O₂ - ID VGB + H₂O₂] / [ID Salina + H₂O₂ - ID Salina] x 100 .

CONCLUSÕES

Vigabatrina não prejudicou memória de curto prazo e a memória de longo prazo, mas o fármaco prejudicou a exploração e a locomoção provavelmente devido ao seu efeito sedativo. Além disso, VGB não induziu danos ao DNA nos tecidos sanguíneo e cerebral. Em relação a atividade antigenotóxica, VGB não foi capaz de proteger de forma significativa os tecidos estudados, contra danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio, sugerindo que VGB não possui efeito antigenotóxico quando administrada em dose única.

REFERÊNCIAS

- BOLTON, J.B.; RIMMER, E.; WILLIAMS, J.; RICHENS, A. The effect of vigabatrin on brain and platelet GABA-transaminase activities. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 1, Suppl 27, p. 35S-42S, 1989.
- GHAFFARI, H. et. al. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. **Life Sciences**, v. 113, n. 1-2, p. 7-13, 2014.
- KIM, J.H; MCNALLY, G.; RICHARDSON, R. Recovery of fear memories in rats: role of GABA in infantile amnesia. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, p. 40-48, 2006.
- LIU, Y.Q. et. al. Dysfunction of hippocampal interneurons in epilepsy. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 985-998, 2014.
- LUSZCZKI, J.J. Pharmacological and behavioral characteristics of interactions between vigabatrin and conventional antiepileptic drugs in pentylenetetrazole-induced seizures in mice: anisobolographic analysis. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, n. 5, p. 958-973, 2005.
- MAKKAR, S.R.; ZHANG, S.Q.; CRANNEY, J. Behavioral and neural analysis of GABA in the acquisition, consolidation, reconsolidation, and extinction of fear memory. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 8, p. 1625-1652, 2010.
- MAZURKIEWICZ, M.; SIRVIÖ, J.; RIEKKINEN, P. Effects of single and repeated administration of vigabatrin on the performance of non-epileptic rats in a delayed non-matching to position task. **Epilepsy Research**, v. 15, n. 3, p. 221-227, 1993.
- PEREIRA, P. et. al Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 99, n. 5, p. 374-378, 2006.
- PICADA, J.N.; ROESLER, R.; HENRIQUES, J.A.P. Genotoxic, neurotoxic and neuroprotective activities of apomorphine and its oxidized derivative 8-oxo-apomorphine. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v. 38, p. 477-486, 2005.
- SANGER, D.J. GABA and the behavioral effects of anxiolytic drugs. **Life Sciences**, v. 36, p. 1503-1513, 1985
- SHREVE, P.E. GABA and glutamate interact in substantia innominata/ lateral preoptic area to modulate locomotor activity. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 38, p. 385-388, 1991.