

Estudos histopatológicos dos efeitos do ácido lipóico nas convulsões induzidas pela pilocarpina

Histopathological studies of the lipoic effects in pilocarpine-induced seizures

Ítala Mônica Santos Sales¹, Rivelilson Mendes de Freitas², Adriana da Rocha Tomé³

RESUMO

Objetivo. avaliar os efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores do ácido lipóico (AL) em ratos adultos no modelo de convulsão induzido pela pilocarpina. **Método.** Foram utilizados ratos Wistar adultos, divididos em quatro grupos. O primeiro foi tratado com salina 0,9% (grupo controle), o segundo com pilocarpina (400 mg/kg, grupo P400), o terceiro e o quarto foram tratados com ácido lipóico (10 mg/kg), 30 min depois receberam P400 (grupo AL + P400) ou solução salina 0,9% (grupo AL), respectivamente. Após os tratamentos, todos os grupos foram observados durante 24 h e sacrificados, seus cérebros foram removidos para análise histopatológica. **Resultados.** O grupo P400 apresentou convulsões que progrediram para o estado de mal epiléptico em 75% dos animais. O pré-tratamento com AL produziu uma redução de 65% nesse índice ($p < 0,0001$). Os grupos P400 e AL + P400 apresentaram 83,33 e 25% de animais com lesão cerebral, respectivamente. No grupo P400 houve um comprometimento significativo no hipocampo dos animais. Na região hipocampal dos animais do grupo AL + P400 foi visto uma redução de 80% nesse comprometimento. **Conclusões.** Nossos resultados sugerem que o ácido lipóico exerce efeitos diretos sobre a epileptogênese e promove ações neuroprotetoras contra as convulsões.

Unitermos. Convulsão, Lesão Cerebral, Hipocampo, Pilocarpina, Ácido Lipóico.

Citação. Sales IMS, Freitas RM, Tomé AR. Estudos histopatológicos dos efeitos do ácido lipóico nas convulsões induzidas pela pilocarpina.

Trabalho realizado no Laboratório de Pesquisa Experimental em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí - UFPI, Picos-PI, Brasil.

1. Acadêmica do Curso de Enfermagem, Bolsista IC - CNPq, Laboratório de Pesquisa Experimental em Ciências Biológicas (LPECB) da Universidade Federal do Piauí - UFPI, Picos-PI, Brasil.

2. Farmacêutico, Doutor em Farmacologia, LPECB da UFPI, Picos-PI, Brasil.

3. Médica Veterinária, doutora em Farmacologia, Universidade Estadual do Ceará - UECE, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE, Brasil.

ABSTRACT

Objective. To evaluate the anticonvulsant and neuroprotective effects of lipoic acid (LA) in adult rats in the epilepsy model induced by pilocarpine. **Method.** Healthy Wistar rats were divided in four groups. The first was treated with 0.9% saline (control group), the second with pilocarpine (400 mg/kg, P400 group), the third and fourth were treated with lipoic acid (10 mg/kg), and 30 min before receiving P400 (LA + P400 group) or 0.9% saline (LA group), respectively. After the treatments, all groups were observed for 24 h, sacrificed and dissected out to remove their brains for histopathological analysis. **Results.** The group P400 presented seizures that progressed to status epilepticus in 75% of the animals. Pretreatment with lipoic acid produced a 65% reduction in this index. P400 and LA + P400 groups revealed 83 and 16% of animals with brain injury, respectively. In P400 group was observed a significative lesion in the hippocampus of the animals. In turn, in hippocampal region of animals treated with LA + P400 group, we detected a reduction of 80,23% in the severity degree. **Conclusions.** Our results suggest that lipoic acid exerts direct effects on epileptogenesis, and promotes neuroprotective actions against the seizures.

Keywords. Seizures, Brain Injuries, Hippocampus, Pilocarpine, Lipoic Acid.

Citation. Sales IMS, Freitas RM, Tomé AR. Histopathological studies of the lipoic effects in pilocarpine-induced seizures.

Endereço para correspondência:

Rivelilson M Freitas
Universidade Federal do Piauí
Laboratório de Fisiologia e Farmacologia
R Cícero Eduardo, s/n, Junco
CEP 64600-000, Picos-PI, Brasil.
E-mail: rivelilson@pq.cnpq.br

Artigo Original
Recebido em: 02/12/09
Aceito em: 23/04/10
Conflito de interesses: não

INTRODUÇÃO

O α -ácido lipóico (AL) é um co-fator essencial para a atividade de vários complexos enzimáticos envolvidos no metabolismo energético. Esses complexos incluem as enzimas piruvato desidrogenase e a α -cetoglutarato, e ainda, um sistema de clivagem da glicina. O AL está presente em células eucarióticas, sendo sintetizado pela enzima ácido lipóico sintetase, a partir do ácido octanóico e do enxofre¹. O AL é um dos mais potentes compostos antioxidantes naturais, e atualmente tem recebido considerável atenção como um suplemento dietético².

Muitos estudos têm demonstrado que o AL e a sua forma reduzida, o ácido dihidrolipóico (DHAL), tem atividade antioxidante multifuncional com as seguintes características: Primeiro, o AL e o DHAL, são anfífilos e facilmente atravessam a barreira hematoencefálica e as membranas celulares; Em segundo lugar, ambos possuem atividade quelante para metais; E terceiro, o AL é reduzido para o DHAL por várias enzimas antioxidantes que são expressas constitutivamente na maioria dos tecidos. Além disso, devido ao seu forte potencial redox, o DHAL pode reciclar outros antioxidantes, a saber: vitamina C, vitamina E, glutatona e ubiquinona^{3,4}.

Um grande número de evidências científicas demonstra que o estresse oxidativo é um dos elementos patogênicos relacionados de forma importante em várias patologias, incluindo a epilepsia, a aterosclerose e o diabetes⁵⁻⁸. Estudos anteriores sugerem que o AL pode reduzir o estresse oxidativo e é particularmente adequado para a prevenção e/ou tratamento dessas complicações patológicas⁹⁻¹¹. No entanto, o tratamento com AL, em doses que produzem uma redução significativa do estresse oxidativo cerebral ainda não foi claramente demonstrado. Além disso, precisa ser esclarecido o mecanismo sobre a síntese endógena de AL durante essas condições, bem como determinado como as alterações genéticas podem modificar essa síntese, e por fim, como essas mudanças podem contribuir para o estabelecimento de doenças neurodegenerativas.

O AL atualmente é utilizado no tratamento da neuropatia diabética, reduzindo seus sintomas, possivelmente através da diminuição do estresse oxidativo¹². A atividade antioxidante do AL e do DHAL pode ser devido à capacidade de um ou de ambos, desempenharem um importante papel na remoção de espécies reativas derivadas de oxigênio (EROS)¹³. Estudos indicam que o AL promove uma diminuição na concentração do óxido nítrico, provavelmente por meio da redução do estresse oxidativo^{14,15}. Apesar dos potenciais bene-

fícios do AL, ainda não foi investigado o seu efeito agudo sobre o dano neuronal observado no modelo de convulsão. O primeiro objetivo do presente estudo foi examinar o efeito agudo de AL (10 mg/kg) sobre as alterações comportamentais observadas durante as convulsões induzidas pela pilocarpina em ratos adultos. Em segundo lugar, fazendo uso desse modelo tem-se estudado a severidade e as áreas cerebrais afetadas durante o desenvolvimento das lesões cerebrais observadas nesse modelo. Dessa forma, por meio desse modelo de convulsão nós decidimos investigar se o AL pode exercer efeitos neuroprotetores sobre as alterações histopatológicas observadas no hipocampo de ratos durante as convulsões, uma vez que, essa área tem sido sugerida como responsável pela instalação da atividade convulsiva induzida pela pilocarpina.

MÉTODO

Foram utilizados ratos Wistar adultos (2 meses de idade; machos; $n=80$), com peso variando entre 250 e 280g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Universidade Federal do Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 x 17 cm³ onde foram observados diretamente durante 24 h com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas (07:00 a.m.), recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA).

Os animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo foi tratado com solução salina 0,9% (i.p., $n=20$, grupo controle). O segundo grupo foi tratado com pilocarpina na dose de 400 mg/kg (i.p., $n=20$; P400). Já o terceiro e quarto grupo foram tratados com ácido lipóico na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, e 30 min depois, receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p., $n=20$, grupo AL + P400) ou solução salina 0,9% (i.p., $n=20$, grupo AL), respectivamente. Após os tratamentos os grupos foram colocados em gaiolas para observação dos seguintes parâmetros: sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados (ME), latência para instalação da primeira convulsão (LIPC), convulsões, latência para o desenvolvimento do estado de mal epilético (LDEP), estado de mal epilético e a taxa de mortalidade. O grupo P400 foi constituído pelos animais que apresentaram convulsão, estado de mal epilético e que sobreviveram

ao período de 24 h observação ($n=12$). Os grupos controle ($n=6$) e AL ($n=6$) foram constituídos pelos animais de cada grupo que não apresentaram convulsão, estado de mal epiléptico e que sobreviveram ao período de 24 h observação. Por sua vez, o grupo AL + P400, foi constituído pelos animais que apresentaram convulsão, estado de mal epiléptico e que sobreviveram ao período de 24 h observação ($n=4$).

Após o período de observação de 24 h, todos os grupos descritos acima foram sacrificados por decapitação. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos dois cortes dorsais em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10 μm foram feitas, e coradas pelo método de coloração HE (hematoxilina - eosina), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico. As regiões CA1 e CA3 hipocampal foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos & Watson¹⁶. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo analisado de acordo com o método descrito anteriormente^{17,18}. A lesão cerebral foi definida pela presença de pelo menos 50% de alteração histopatológica em uma das regiões hipocampais analisadas.

Os resultados que obedeciam a uma distribuição paramétrica foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) com teste de *Student Newman Keuls (post hoc)* pelo programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad software. Os dados não paramétricos (percentagens) foram analisados pelo mesmo programa utilizando o teste do qui-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de $p<0,05$.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra que todos os animais tratados com pilocarpina (grupo P400, $n=20$), apresentaram SCP, ME e tremores. As convulsões ocorreram em 75% (15) dos animais, que progrediram para o estado de mal epiléptico também em 75% (15) dos animais. A taxa de mortalidade desse grupo corresponde a 60% (12).

Os dados apresentados na Tabela 1 sugerem que os efeitos produzidos pela estimulação colinérgica periférica não são bloqueados pelo ácido lipóico. O pré-tratamento com AL (grupo AL + P400) não interfere nos SCP, ME e tremores induzidos pela pilocarpina. No entanto, produz um aumento na latência de instalação da primeira convulsão (LIPC) e na latência do desenvolvimento do estado de mal epiléptico (LDEP) de 158% ($p<0,0001$) e 152% ($p<0,0001$), respectivamente (Tabela 1). No mesmo grupo, foi vista uma diminuição de 65% no número de animais que convulsionam e que evoluem para o estado de mal epiléptico ($p<0,0001$). Foi verificada também uma redução na taxa de mortalidade de 60% ($p<0,0001$). Os grupos tratados somente com solução salina 0,9% (grupo controle) ou com ácido lipóico (grupo AL) não apresentaram nenhuma alteração comportamental (Tabela 1).

A Figura 1 mostra uma alta percentagem de animais com lesão cerebral no grupo P400. Por sua vez, nos animais que foram pré-tratados com AL 30 minutos antes da administração de pilocarpina, houve uma redução de 58,33% no número de animais com lesão cerebral, e daqueles que apresentaram convulsão e estado de mal epiléptico, foi detectado alteração histopatológica no hipocampo em apenas um animal ($p<0,0001$) (Tabela 2). Também foi detectada uma redução de 80% no grau de severidade da lesão hipocampal no grupo AL + P400, quando comparado ao grupo P400 ($p<0,0001$) (Tabela 2). Os grupos tratados

Tabela 1. Efeito de pré-tratamento com ácido lipóico em ratos após convulsões induzidas pela pilocarpina.

Grupos	SCP (%)	ME (%)	Tremores (%)	Convulsões (%)	Estado de mal epiléptico (%)	Taxa de mortalidade (%)
P400	100	100	100	75	75	60
AL + P400	100	100	100	20*	20*	20*
AL	00	00	00	00	00	00

O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p., $n=20$). O grupo AL + P400 foi pré-tratado com ácido lipóico (10 mg/kg, i.p.), e 30 min após recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p., $n=20$). O grupo AL foi tratado com ácido lipóico (10 mg/kg, i.p., $n=20$). Após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h para a determinação dos sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), tremores, convulsões, estado de mal epiléptico e a taxa de mortalidade. Os resultados dos estudos comportamentais foram expressos em percentagem. $p<0,05$, quando comparado ao grupo P400. Teste do Qui-quadrado.

somente com solução salina 0,9% (grupo controle) ou ácido lipóico (grupo AL) não apresentaram nenhuma mudança histopatológica (Figura 1).

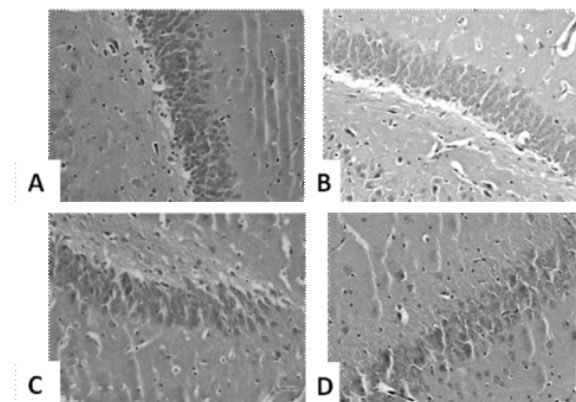


Figura 1. Efeitos do pré-tratamento com ácido lipóico no dano hipocampal induzido pelas convulsões.

A - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos adultos observados por 24 h após administração de salina (NaCl 0,9%, i.p.; n=4, controle) (Hematoxilina – Eosina (HE) - X40);

B - Perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração no hipocampo de ratos adultos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (400 mg/kg, i.p., n=4) (HE X40);

C - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos adultos observados por 24 h após administração de ácido lipóico (10 mg/kg, i.p.; n=4, AL) (HE X40);

D - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos adultos pré-tratados com ácido lipóico (10 mg/kg, i.p.), que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (n=4, AL + P400) (HE X40).

Todos os grupos foram observados durante 24 h, em seguida sacrificados para remoção dos cérebros para realização dos estudos histopatológicos. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo examinado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no hipocampo.

DISCUSSÃO

O estresse oxidativo cerebral pode ser produzido pelo desequilíbrio entre a produção de EROS e a atividade antioxidante neuronal^{19,20}. Estudos demonstram que o estresse oxidativo está frequentemente associado com a etiologia multifatorial das crises convulsivas, caracterizada por alterações nos sistemas monoaminérgicos e antioxidantes cerebrais, principalmente no hipocampo^{11,21}. Esse estresse oxidativo associado às lesões histopatológicas no hipocampo, provavelmente, ocorre por causa das mudanças neuroquímicas que comprometem a remoção das EROS¹⁹.

O estresse oxidativo e as lesões cerebrais estão associados a vários outros fatores epileptogênicos, incluindo peroxidação lipídica e produção de nitrito¹¹,

bem como pelo aumento ou redução da síntese e/ou liberação das monoaminas e aminoácidos^{11,22}. O aspecto mais crítico da presente investigação é a identificação de uma neuroproteção mediada pelo ácido lipóico contra as lesões hipocampais causadas pelas convulsões no modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina.

Os efeitos individuais da administração aguda de AL em ratos convulsivos são consistentes com os nossos resultados de estudos anteriores^{11,15}, que demonstram uma redução dos níveis de peroxidação lipídica e da produção de nitrito, bem como um aumento na atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) após o pré-tratamento com ácido lipóico. Nesse estudo o pré-tratamento com AL resultou em reduções substanciais, comparadas com as do grupo tratado com pilocarpina (grupo P400), nas alterações comportamentais observadas durante as crises convulsivas, como também aumentou significativamente as latências para instalação da primeira convulsão e para o desenvolvimento do estado de mal epiléptico. Da mesma, este pré-tratamento reduziu de forma significativa o número de animais que apresentaram lesão hipocampal. Esses dados sugerem que AL reduz a produção de EROS, por meio da estimulação das defesas antioxidantes, bem como aumenta os mecanismos de neuroproteção contra o dano neuronal, provavelmente, devido à sua capacidade de reciclar outros antioxidantes (vitamina C, vitamina E, glutatona e ubiquinona) cerebrais.

No presente estudo, nós demonstramos que o AL também aumentou o índice de sobrevivência dos animais e reduziu o grau de severidade da lesão observada no hipocampo dos ratos convulsivos. O AL pode ter a capacidade de reparar a lesão neuronal, juntamente com outras enzimas antioxidantes (glutatona peroxidase e glutatona redutase), sugerindo assim, um papel neuroprotetor para este antioxidante^{3,23}. Nossos resultados corroboram com os dados anteriormente descritos na literatura sobre o papel neuroprotetor do AL durante as convulsões induzidas pela pilocarpina^{11,14}.

O interesse pelo papel deste antioxidante decorre da constatação de que as adaptações metabólicas verificadas no estresse oxidativo observado durante a fase aguda das convulsões conduzem a um aumento da taxa metabólica basal, no consumo de oxigênio e na formação de EROS⁶. O AL é um importante antioxidante em seres humanos e vários estudos sugerem uma possível redução na sua concentração durante o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, entretanto, o

Tabela 2. Efeito de pré-tratamento com ácido lipóico nas alterações histopatológicas hipocâmpais observadas em ratos adultos após convulsões induzidas pela pilocarpina.

Grupos	Alterações histopatológicas			
	Ratos com lesão hipocâmpal (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com dano hipocâmpal	Número total de animais por grupo
P400	83,33	61,89 ± 0,23	11	12
AL + P400	25 ^a	12,23 ± 0,67 ^b	1	4
AL	00	00	0	6

O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p., n=20). O grupo AL + P400 foi pré-tratado com ácido lipóico (10 mg/kg, i.p.), e 30 min após recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p., n=20). O grupo AL foi tratado com ácido lipóico (10 mg/kg, i.p., n=20). Após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. O grau de comprometimento hipocâmpal (severidade da lesão) foi expresso como a média ± S.E.M. dos escores do dano cerebral do número de animais inseridos entre parêntesis. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de comprometimento no hipocampo. ap<0,05, quando comparado ao grupo P400 (Teste do Qui-quadrado); bp<0,05, quando comparado ao grupo P400 (ANOVA e teste t-Student post hoc).

significado destas alterações durante o estabelecimento das convulsões ainda não está completamente esclarecido.

Dessa forma, decidimos investigar o papel desse antioxidante nas mudanças histopatológicas observadas no modelo de convulsão induzido pela pilocarpina. As alterações observadas no hipocampo reproduzem muitas destas alterações observadas em pacientes epiléticos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do SNC²⁴⁻²⁶. A literatura registra danos morfológicos em diversas estruturas cerebrais após convulsão¹⁷. As principais alterações são o alargamento dos ventrículos, a deformação do giro dentado com moderada dispersão das células granulares e a perda neuronal em diversas áreas (hipocampo, córtex cerebral, corpo estriado, córtex piriforme, amígdala, tálamo, núcleo subtalâmico, corpo caloso, córtex motor e área septal).

Esses danos neuronais, também foram observados no hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocórtex e substância negra de ratos convulsivos^{17,27}. Neste trabalho, vários animais foram distribuídos para o estudo histopatológico, sendo detectada lesão cerebral, vacuolização e gliose no grupo P400. Esses dados sugerem uma interação entre o sistema colinérgico e as EROS no desenvolvimento das lesões hipocâmpais. Em nosso estudo, a estrutura cerebral mais comprometida com a administração de pilocarpina foi o hipocampo.

Nosso estudo mostrou uma alta percentagem de animais com lesão cerebral após administração de P400. Por sua vez, o grupo pré-tratado com AL, 30 minutos antes da administração de P400 apresentou um

menor número de animais com lesão cerebral. Além disso, naqueles animais que apresentaram convulsão foi detectada alteração histopatológica no hipocampo em apenas um animal, sugerindo, assim, que as lesões decorrentes do processo convulsivo, podem ocorrer devido ao aumento na produção de EROS. O hipocampo foi descrito como sendo responsável pela instalação da atividade convulsiva induzida pela pilocarpina¹⁸. Portanto, a remoção de EROS pelo AL nessa região pode ser essencial para suprimir as alterações comportamentais e prevenir as lesões hipocâmpais causadas pelas convulsões.

CONCLUSÃO

Em suma, nossos dados concordam com os anteriormente descritos, uma vez que observamos degeneração neuronal, gliose, atrofia e vacuolização no hipocampo dos ratos convulsivos. As drogas antioxidantes podem apresentar um potencial terapêutico para pacientes epiléticos na proteção contra as lesões cerebrais durante a atividade epilética, provavelmente, por meio da remoção e/ou diminuição da produção de EROS, e ainda pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes hipocâmpais. Nossos dados sugerem que o AL pode influenciar a epileptogênese e promover ações anticonvulsivantes e neuroprotetoras durante as convulsões. Entretanto, novos estudos devem ser realizados no intuito de esclarecer o papel nos mecanismos epileptogênicos deste antioxidante.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq). R.M.F é bolsista de produtividade do CNPq. Gostaríamos de agradecer a Stênio Gardel Maia pela assistência técnica.

REFERÊNCIAS

1. Bast A, Haenen GR. Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta* 1988;963:558-61.
2. Evans JL, Goldfine ID. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technol. Ther.* 2000;2:401-13.
3. Ferreira PMP, Militão GCG, Freitas RM. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 2009;464:131-4.
4. Fujiwara K, Okamura K, Motokawa Y. Hydrogen carrier protein from chicken liver: purification, characterization, and role of its prosthetic group, lipoic acid, in the glycine cleavage reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979;197:454-62.
5. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Brasil* 1997;4:61-8.
6. Devi PU, Manocha A, Vohora D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. *Expert Opin Pharmacother* 2008;9:3169-77.
7. Gotz ME, Dirr A, Burger R, Janetzky B, Weinmüller M, Chan WW, et al. Effect of lipoic acid on redox state of coenzyme Q in mice treated with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and diethylthiocarbamate. *Eur. J. Pharmacol.* 1994;266:291-300.
8. Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, et al. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* 1997;6:321-38.
9. Heitzer T, Finckh B, Albers S, Krohn K, Kohlschütter A, Meinertz T. Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent, nitric oxide mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2001;31:53-61.
10. Kozlov AV, Gille L, Staniek K, Nohl H. Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999;363:148-4.
11. Freitas RM. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett* 2009;455:140-4.
12. Melhem MF, Craven PA, Liachenko J, DeRubertis FR. Alpha-lipoic acid attenuates hyperglycemia and prevents glomerular mesangial matrix expansion in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2002;13:108-16.
13. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Biol. Med.* 1995;19:227-50.
14. Souza GF, Saldanha GB, Freitas RM. Lipoic acid increases glutathione peroxidase, Na⁺, K⁺-ATPase and acetylcholinesterase activities in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures? *Arq Neuro-Psiqu* 2010;68:586-91.
15. Santos IMS, Tomé AR, Feitosa CM, Souza GF, Feng D, Freitas RM, et al. Lipoic acid blocks seizures induced by pilocarpine via increases in δ -aminolevulinic dehydratase and Na⁺, K⁺-ATPase activity in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 2010;95:88-91.
16. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1986, 456p.
17. Marinho MMF, Sousa FCF, Bruin VMS, Aguiar LMV, Pinho RSN, Viana GSB. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. *Neurosci Lett* 1997;235:13-6.
18. Bureau YRJ, Peredery O, Persinger MA. Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380mg/kg) or lithium (3mEq/kg)/pilocarpine (30mg/kg) induced seizures. *Brain Res* 1994;648:265-9.
19. Freitas RM, Souza FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. *FEBS J.* 2005;272:1307-12.
20. Barros DO, Xavier SML, Barbosa CO, Silva RF, Freitas RL, Maia FD, et al. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett* 2007;416:227-30.
21. Freitas RM, Viana GSB, Fonteles MMF. Níveis dos neurotransmissores estriatais durante o estado epiléptico. *Rev. Psiq. Clín.* 2003;30:76-9.
22. Turski WA, Cavalheiro EA, Schwartz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 1983;9:315-35.
23. Scholich H, Murphy ME, Sies H. Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on alpha-tocopherol. *Biochim. Biophys. Acta* 1989;1001:256-61.
24. Mello LEAM, Del Bel EA, Gomes ELT, Oliveira JAC, Wakamatsu H, Cairasco NG. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizures susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res* 1996;26:177-92.
25. Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 1983;220:323-5.
26. Holmes GL, Cha BH, Akman C, Silveira DC, Liu X. Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. *Brain Dev* 2004;26:394-7.
27. Clifford DB, Olney JW, Maniatis A, Collins RC, Zorumski CF. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 1987;23:953-8.