

ESTUDOS EXPERIMENTAIS

A ativação autofágica atenua a neurotoxicidade dos anestésicos locais ao diminuir a atividade da caspase-3 em ratos



Xing Xue^a, Ying Lv^b, Yufang Leng^{a,*} e Yan Zhang^a

^a The First Hospital of Lanzhou University, Department of Anaesthesiology, Lanzhou, China

^b Gansu Agricultural University, College of Resources and Environmental Sciences, Lanzhou, China

Recebido em 23 de outubro de 2018; aceito em 18 de abril de 2020

Disponível na Internet em 18 de novembro de 2020

PALAVRAS-CHAVE

Neurotoxicidade;
Autofagia;
Anestésicos locais;
Apoptose

Resumo

Introdução e objetivos: Os mecanismos de neurotoxicidade dos anestésicos locais são complexos. A apoptose e a autofagia são mecanismos altamente organizados que mantêm a homeostase celular durante o estresse. Estudos revelam que a ativação da autofagia atua como mecanismo de proteção *in vitro*. Não está claro se a autofagia também desempenha essa função *in vivo*. O objetivo deste estudo foi analisar o papel da autofagia na neurotoxicidade induzida por anestésico local e esclarecer o mecanismo dessa neurotoxicidade utilizando um modelo de injeção intratecal em ratos.

Métodos: Dezoito ratos Sprague-Dawley machos adultos saudáveis foram divididos aleatoriamente em três grupos. Antes de receber a injeção intratecal de bupivacaína a 1%, cada rato recebeu injeção intraperitoneal de veículo ou rapamicina ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) uma vez ao dia durante 3 dias. As alterações patológicas foram examinadas por coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). A apoptose foi analisada por coloração com o método dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) mediado por TdT. A expressão de caspase-3, Beclin1 e LC3 foram examinadas por coloração Imunohistoquímica (IHQ). A expressão de Beclin1 e LC3 e a razão LC3-II/LC3-I foram detectadas por análise de *western blot*.

Resultados: Após a injeção intratecal de bupivacaína, ocorreu lesão patológica nos neurônios da medula espinhal e os níveis de apoptose e caspase-3 aumentaram. A ativação da autofagia causada pela rapamicina mitigou de forma expressiva as alterações patológicas e diminuiu os níveis de apoptose e caspase-3, aumentando a expressão de LC3 e Beclin1 e a razão LC3-II/LC3-I.

* Autor para correspondência.

E-mail: lengyf@lzu.edu.cn (Y. Leng).

KEYWORDS

Neurotoxicity;
Autophagy;
Local anesthetics;
Apoptosis

Conclusões: O aumento da autofagia diminui a apoptose dependente da caspase-3 e melhora a sobrevivência neuronal *in vivo*. A ativação da autofagia pode ser uma estratégia terapêutica potencial para a neurotoxicidade induzida por anestésicos locais.

© 2020 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Sociedade Brasileira de Anestesiologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Autophagy activation attenuates the neurotoxicity of local anaesthetics by decreasing caspase-3 activity in rats

Abstract

Background and objectives: The mechanisms by which local anaesthetics cause neurotoxicity are very complicated. Apoptosis and autophagy are highly coordinated mechanisms that maintain cellular homeostasis against stress. Studies have shown that autophagy activation serves as a protective mechanism *in vitro*. However, whether it also plays the same role *in vivo* is unclear. The aim of this study was to explore the role of autophagy in local anaesthetic-induced neurotoxicity and to elucidate the mechanism of neurotoxicity in an intrathecally injected rat model.

Methods: Eighteen healthy adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups. Before receiving an intrathecal injection of 1% bupivacaine, each rat received an intraperitoneal injection of vehicle or rapamycin (1 mg.kg⁻¹) once a day for 3 days. The pathological changes were examined by Haematoxylin and Eosin (HE) staining. Apoptosis was analysed by TdT-mediated dUTP Nick-End Labelling (TUNEL) staining. Caspase-3, Beclin1 and LC3 expression was examined by Immunohistochemical (IHC) staining. Beclin1 and LC3 expression and the LC3-II/LC3-I ratio were detected by western blot analysis.

Results: After bupivacaine was injected intrathecally, pathological damage occurred in spinal cord neurons, and the levels of apoptosis and caspase-3 increased. Enhancement of autophagy with rapamycin markedly alleviated the pathological changes and decreased the levels of apoptosis and caspase-3 while increasing the expression of LC3 and Beclin1 and the ratio of LC3-II to LC3-I.

Conclusions: Enhancement of autophagy decreases caspase-3-dependent apoptosis and improves neuronal survival *in vivo*. Activation of autophagy may be a potential therapeutic strategy for local anaesthetic-induced neurotoxicity.

© 2020 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Anestesiologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introdução

Os anestésicos locais produzem perda reversível da sensibilidade regional e são usados para aliviar a dor aguda e crônica. Em geral, são considerados medicamentos seguros. No entanto, estudos revelam que os anestésicos locais administrados por via intratecal podem induzir ingurgitamento celular, atrofia, edema, degeneração axonal, aparecimento de ovoides de mielina e infiltração de macrófagos.¹ Além disso, o uso contínuo de anestésicos locais não apenas em altas concentrações, mas também em doses clínicas normais² pode causar neurotoxicidade.³⁻⁵ Embora a neurotoxicidade potencial dos anestésicos locais tenha sido estudada por muitos anos, os mecanismos pelos quais os anestésicos locais induzem a lesão neuronal não foram completamente esclarecidos. Portanto, é necessário identificar esses mecanismos para estabelecer estratégias clínicas eficazes que previnam eventos adversos relacionados à administração de anestésico local.

Estudos demonstraram que a bupivacaína pode induzir neurotoxicidade principalmente por apoptose e autofagia.⁶ A apoptose foi indicada como um dos principais contribuintes para a lesão neuronal em diversos modelos de

doenças neurodegenerativas.⁷ Observaram-se, por exemplo, evidências robustas de apoptose neuronal em vários modelos animais.⁸ Nos últimos anos, a autofagia foi proposta como um importante sistema de degradação intracelular que, ao oferecer material citoplasmático ao lisossomo, ajuda a manter o equilíbrio entre a síntese e a degradação.⁹⁻¹¹ Aumento no número de autofagossomos foi observado em diversas condições fisiológicas e patológicas no sistema nervoso.^{12,13} Embora na maior parte das situações a via da autofagia seja uma via adaptativa ao estresse que promove a sobrevivência celular, um número crescente de estudos tem demonstrado que ela pode desencadear lesão celular.⁶ No entanto, muitos estudos indicaram que a apoptose e autofagia mantêm uma relação complexa; por exemplo, a autofagia pode preceder a apoptose e desempenhar um papel protetor.¹⁴ Também pode promover a apoptose em algumas circunstâncias.¹⁵ Desta forma, a contribuição da autofagia para a sobrevivência celular permanece controversa.

Estudos têm mostrado que a ativação da autofagia funciona como um mecanismo de proteção *in vitro*.¹⁶ Entretanto, não é claro se desempenha a mesma função *in vivo*. O presente estudo foi desenhado para pesquisar o papel da autofagia e sua relação com a apoptose *in vivo*.

A bupivacaína, um anestésico local do tipo amida, é amplamente usado na clínica e, em modelos animais e celulares, foi considerada potencialmente neurotóxica quando aplicada a tecidos neurais em concentrações clínicas.¹⁷ O antibiótico macrolídeo lipofílico Rapamicina (RAP) aumenta a autofagia por inibir, em mamíferos, o alvo da RAP (mTOR), ajuda a manter o metabolismo celular normal e exibe propriedades neuroprotetoras.¹⁸ No estudo atual, empregamos um modelo de rato submetido a injeção intratecal para examinar a neurotoxicidade induzida por bupivacaína. O objetivo principal foi investigar a apoptose e autofagia induzidas pela bupivacaína *in vivo* e elucidar o mecanismo subjacente.

Métodos

Este estudo *in vivo* foi aprovado pelo Comitê de Ética do First Hospital of Lanzhou University, e os procedimentos realizados seguiram as diretrizes de rotina de cuidados com animais. Ratos Sprague-Dawley machos adultos saudáveis (180–220 g) foram fornecidos pelo *Centre of Experimental Animals of Lanzhou University*. Os ratos foram acomodados em gaiolas separadas no interior de salas com temperatura controlada (20–24 °C, umidade relativa 50–60%), ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuridão (luz das 6 h às 18 h) e com ração e água *ad libidum* até o momento do teste.

Grupos e tratamentos

Dezoito ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos: o grupo de tratamento com veículo (Grupo A, n = 6), o grupo de tratamento com bupivacaína (Grupo B, n = 6) e o grupo de tratamento com RAP (Grupo C, n = 6). No Grupo A, todos os ratos experimentais receberam o mesmo volume de veículo. No Grupo B, os ratos receberam injeção intratecal de bupivacaína a 1%. No Grupo C, os ratos receberam injeção intraperitoneal de RAP na dose de 1 mg.kg⁻¹ (Sigma, St. Louis, MO, EUA, diluído com DMSO) uma vez ao dia por 3 dias e então receberam injeção intratecal de bupivacaína a 1%.

Injeção intratecal de bupivacaína

Após inalação de isoflurano a 2%, os ratos foram colocados em posição prona para atingir a flexão ideal da coluna lombar. Uma agulha 27G conectada a uma seringa de 100 µL (KL-34, Hamilton Medical, Inc., Reno, NV, EUA) foi inserida na linha média do espaço intervertebral lombar 4–5 (L4–5) e bupivacaína a 1% (0,25 µL.g⁻¹) foi injetada. Um movimento da cauda indicou a entrada da seringa no espaço intratecal. Os ratos foram então observados quanto à paralisia dos membros posteriores, o que era indicativo de bloqueio espinhal.

Amostras de secção da medula espinhal

Os ratos de cada grupo foram sacrificados 6 horas após a anestesia mencionada, e a medula espinhal foi rapidamente coletada. Uma secção do tecido de cada rato foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -70 °C até uso posterior.

Exame histológico

O tecido espinhal foi corado usando a técnica padrão de Hematoxilina e Eosina (HE). Um patologista cego para o procedimento experimental analisou as lâminas com microscópio de luz (400×). A extensão do apoptose foi determinada usando o método *dUTP Nick-End Labeling* (TUNEL) mediado por TdT conforme indicado nas instruções do kit (Xiang Sheng Biotech Co., Ltd., Shanghai, China). Após serem submetidos a coloração, os tecidos foram lavados três vezes e analisados com microscópio de luz (400×). A densidade óptica foi quantificada usando Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD).

Coloração imunohistoquímica (IHQ)

A expressão de caspase-3, Cadeia leve 3 (LC3) e Beclin1 foram medidas por coloração IHQ. Primeiro, as amostras foram lavadas em solução PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*) (pH 7,4) três vezes por 5 minutos cada e fervidas em citrato trissódico a 0,1% por 15 minutos para recuperação do antígeno. Em seguida, as secções foram incubadas com reagente de bloqueio (leite a 3% e soro fetal bovino a 5%; Absin Bioscience Inc., Shanghai, China) por 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente incubadas com anti-caspase-3 (diluição 1:500; Abcam, Cambridge, UK), anticorpos anti-LC3 (diluição 1:200, Sigma, EUA) e anti-Beclin1 (diluição 1:500, Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 4 °C durante a noite. Finalmente, após a lavagem com PBS (pH 7,4), os tecidos foram expostos a um anticorpo biotilado anti-imunoglobulina G de coelho (IgG) (diluição 1:1000; Beyotime, Fuzhou, China) e um complexo de estreptavidina – peroxidase (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Depois de seladas as lâminas, as secções foram fotografadas com um microscópio confocal. A densidade óptica foi quantificada usando Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD).

Análise de Western Blot

Empregou-se a análise de Western Blot para estabelecer os níveis de proteína de LC3 e Beclin1 e a proporção de LC3-II para LC3-I. Quantidades iguais de proteína (aproximadamente 30 µg) foram colocadas nas pistas de gel de dodecil sulfato de sódio–poliacrilamida a 10% e submetidas a eletroforese em gel. As proteínas separadas foram, então, transferidas para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite em pó desnatado diluído em solução salina tamponada de Tris com Tween 20 (137 mM de cloreto de sódio, 20 mM de Tris; 0,1% de Tween 20; Absin Bioscience Inc., Shanghai, China) por 1 hora em temperatura ambiente seguido de incubação, realizada durante a noite a 4 °C, com anticorpos primários específicos para LC3 (diluição 1:1000; Biosynthesis Biotechnology Co., Ltd., Beijing, China), Beclin I (diluição 1:200; Biosynthesis Biotechnology Co., Ltd., Beijing, China) e β-actina (Diluição 1:1000; Beijing Biosynthesis Biotechnology Co., Ltd., Beijing, China) diluída em solução salina tamponada de Tris com Tween 20. Então, membranas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com anticorpos secundários de cabra anti-IgG de camundongo conjugados

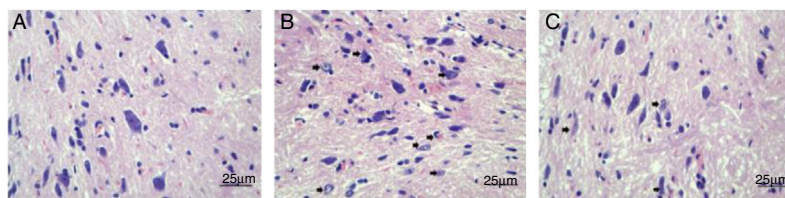


Figura 1 Alterações patológicas nos neurônios da medula espinhal dos ratos foram examinadas após coloração HE (aumento, 400 \times). (A) Mostra as estruturas normais dos neurônios da medula espinhal. No Grupo B (B), o número de neurônios da medula espinhal diminuiu, os neurônios encolheram e assumiram coloração escura, e os núcleos apresentavam-se condensados (seta preta). Além disso, os tecidos pareciam desordenados e dispostos irregularmente. No Grupo C (C), as alterações patológicas foram atenuadas.

a fosfatase alcalina (diluição 1:1000; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA), e as bandas reativas foram detectadas após incubação por 5 minutos com nitroblue tetrazolium e 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA). As densidades das bandas foram escaneadas usando um densitômetro de imagem (GS-800, Bio-Rad, EUA), e a densidade óptica foi quantificada usando Image-Pro Plus versão 7.0 (Media Cybernetics, Rockville, MD) com normalização para β -actina.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o software SPSS 20.0 (IBM SPSS, Armonk, NY). Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. A significância das diferenças (valor- p) foi avaliada por ANOVA unidirecional, e testes de Dunnett foram utilizados para realizar as comparações entre vários grupos; $p < 0,05$ foi considerado para indicar significância estatística.

Resultados

Alterações patológicas

Sob microscopia de luz, os neurônios da medula espinhal dos ratos do grupo A estavam uniformemente distribuídos com morfologia normal, corpúsculos de Nissl claros e membranas celulares intactas; além disso, as fibras neurais da substância branca estavam dispostas de maneira ordenada e a matriz intercelular era uniforme (fig. 1A). No entanto, após a injeção de bupivacaína, o número de neurônios da medula espinhal foi reduzido, os neurônios encolheram, apresentavam coloração escura e núcleos com aspecto condensado. Além disso, os tecidos pareciam desorganizados e dispostos irregularmente (fig. 1B). Após a administração de RAP, as alterações patológicas diminuíram significativamente (fig. 1C). Esses achados indicaram que os modelos de ratos foram desenvolvidos com sucesso.

Mudanças apoptóticas

Os resultados mostraram que a apoptose neuronal na medula espinhal diferiu entre os grupos. A taxa de apoptose foi maior no Grupo B do que no Grupo A ($p < 0,05$) e menor no Grupo C do que no Grupo B ($p < 0,05$) (fig. 2).

Mudanças na caspase-3

A expressão da caspase-3 foi observada por coloração IHQ e microscopia óptica comum; os neurônios positivos para caspase-3 assumiram a cor marrom. Os resultados mostraram que a expressão da caspase-3 foi maior no Grupo B do que no Grupo A ($p < 0,05$) e menor no Grupo C do que no Grupo B ($p < 0,05$) (fig. 3).

Mudanças em LC3 e Beclin1

A coloração IHQ foi realizada para investigar as alterações de LC3 e Beclin1. À microscopia óptica comum, os neurônios positivos para essas proteínas apresentavam coloração marrom. Os níveis de LC3 e Beclin1 foram maiores no Grupo B do que no Grupo A ($p < 0,05$) e acentuadamente menores no Grupo C em relação ao Grupo B ($p < 0,05$) (figs. 4 e 5).

Para poder determinar de forma adicional os níveis de autofagia, realizamos análise de Western Blot para avaliar os níveis de Beclin1 e a razão LC3-II/LC3-I, e os resultados indicaram que esses parâmetros foram alterados pela injeção de bupivacaína. Os níveis de Beclin1 e a razão LC3-II/LC3-I aumentaram visivelmente no Grupo B comparados com os valores do Grupo A ($p < 0,05$). Ademais, os níveis de Beclin1 e a razão LC3-II/LC3-I aumentaram ainda mais no Grupo C em comparação com os valores do Grupo B ($p < 0,05$). Esses resultados foram consistentes com os resultados da imunohistoquímica (fig. 6).

Discussão

Neste estudo, observamos que a bupivacaína induziu a apoptose neuronal mediada por caspase-3 e a autofagia ativada. Além disso, a RAP regulou a apoptose e autofagia induzidas pela bupivacaína. Esses resultados sugerem que a autofagia inibe a apoptose induzida pela bupivacaína e que o aumento da autofagia é neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida pela bupivacaína. Assim, a manipulação da autofagia pode ser um meio alternativo para prevenir lesão neuronal induzida pela bupivacaína.

A apoptose caracteriza-se por alterações morfológicas celulares¹⁹ e é uma via crítica nos processos morfológicos e patológicos.²⁰ A coloração por HE é um método básico de exame histológico comumente empregado em pesquisas biológicas e médicas. Os diagnósticos anátomo-patológicos feitos com o auxílio da coloração HE são muito valiosos e podem fundamentar diagnósticos clínicos.²¹ No

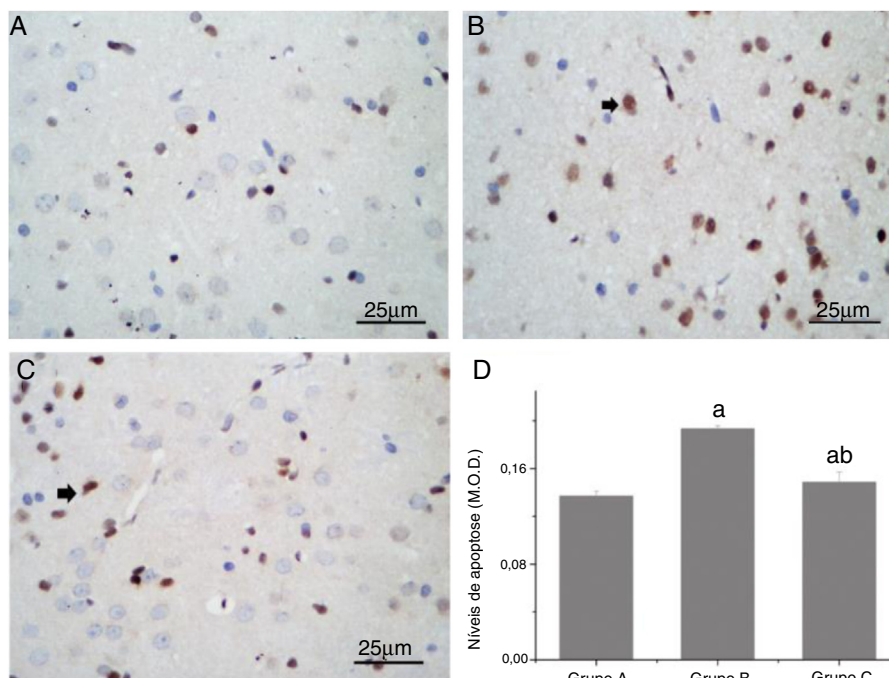


Figura 2 Comparação dos níveis de apoptose nos neurônios da medula espinal de ratos. (A, B e C) mostram alterações apoptóticas (seta preta) nos neurônios da medula espinal dos ratos, conforme medido por coloração TUNEL (ampliação, 400×). (D) mostra a comparação quantitativa dos níveis de apoptose. M.O.D. (do inglês *Mean Optical Density*), Densidade Óptica Média; a, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo A; b, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo B.

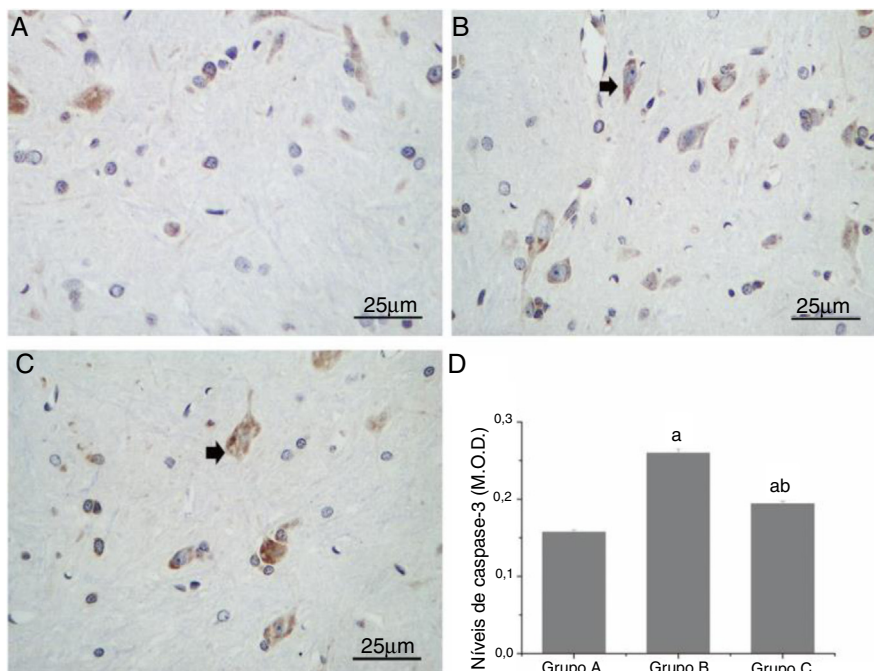


Figura 3 Comparação da expressão da caspase-3 nos neurônios da medula espinal de ratos. (A, B e C) mostram a expressão da caspase-3 (seta preta), conforme observado pela coloração com IHQ (ampliação, 400×). (D) mostra a comparação quantitativa da expressão da caspase-3. M.O.D., Densidade Óptica Média; a, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo A; b, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo B.

presente estudo, alterações morfológicas ocorreram nos neurônios da medula espinal de ratos 6 horas após a injeção intratecal de bupivacaína. A injeção de bupivacaína também reduziu o número de neurônios da medula

espinal. No entanto, a administração de RAP mitigou significativamente as alterações patológicas. Os achados sugerem que a administração prévia de RAP melhora significativamente os escores neurológicos e aumenta a

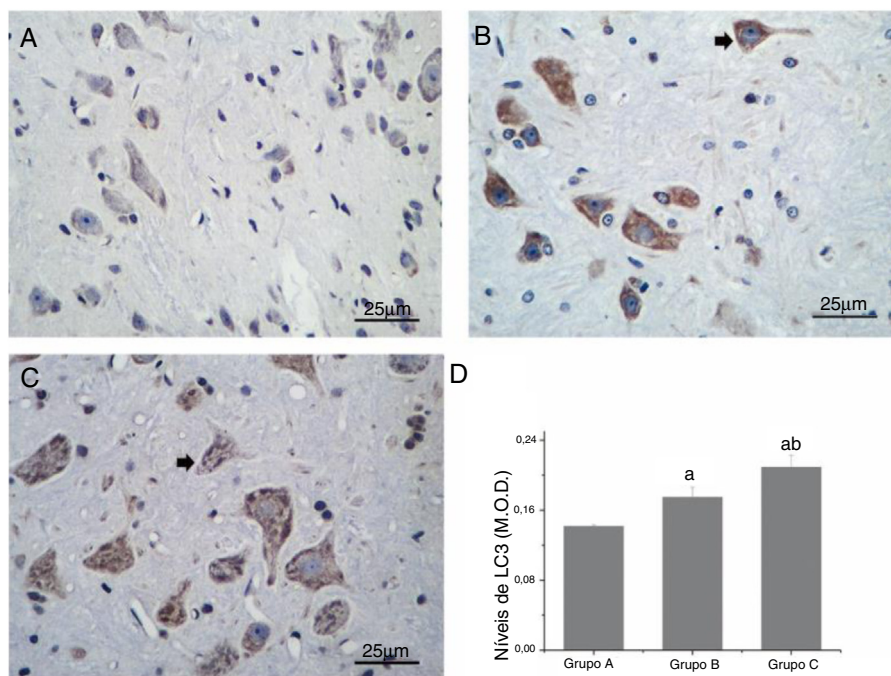


Figura 4 Comparação dos níveis de LC3 nos neurônios da medula espinal de ratos. (A, B e C) mostram mudanças em LC3 (seta preta) conforme observado pela coloração com IHQ (ampliação, 400 \times). (D) mostra a comparação quantitativa dos níveis de LC3. M.O.D., Densidade Óptica Média; a, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo A; b, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo B.

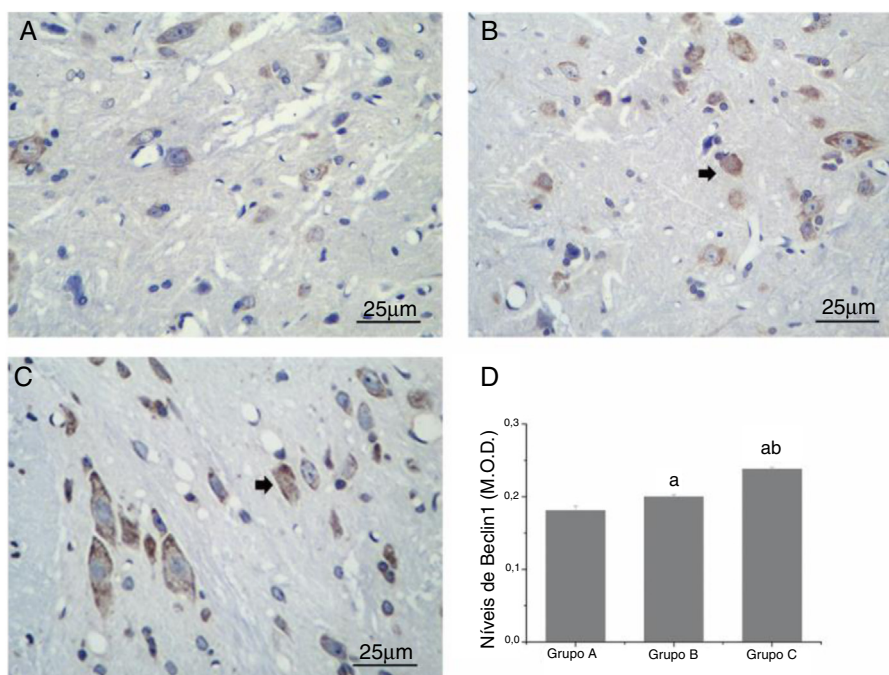


Figura 5 Comparação dos níveis de Beclin1 nos neurônios da medula espinal de ratos. (A, B e C) mostram mudanças em Beclin1 (seta preta) observadas pela coloração com IHQ (ampliação, 400 \times). (D) mostra a comparação quantitativa dos níveis de Beclin1. M.O.D., Densidade Óptica Média; a, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo A; b, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo B.

sobrevida neuronal em ratos submetidos ao tratamento com bupivacaína.

A apoptose é um mecanismo de morte celular que se conservou durante o processo de evolução, e é crucial para o desenvolvimento e manutenção da homeostase tecidual. A

desregulação do apoptose é implicada em várias condições patológicas, incluindo distúrbios neurodegenerativos.²² A apoptose também é uma característica anátomo-patológica da esclerose lateral amiotrófica, lesão cerebral isquêmica, certas doenças inflamatórias cerebrais e infecções do Sis-

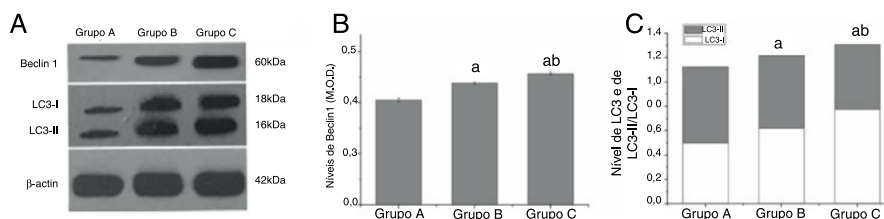


Figura 6 Comparação dos níveis de LC3 e Beclin1 e as razões LC3-I/LC3-II nos neurônios da medula espinal de ratos. (A) mostra a comparação dos níveis de LC3 e Beclin1 detectados por Western Blot. (B) mostra a comparação quantitativa dos níveis de Beclin1. (C) mostra a comparação quantitativa das razões LC3-I/LC3-II. M.O.D., Densidade Óptica Média; a, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo A; b, $p < 0,05$ em comparação com o Grupo B.

tema Nervoso Central (SNC).^{23,24} Neste estudo, os resultados revelaram que a injeção intratecal de bupivacaína aumentou a taxa de apoptose nos neurônios da medula espinal, enquanto a administração de RAP diminuiu significativamente a taxa de apoptose. Os resultados sugerem que RAP previne a morte neuronal apoptótica em ratos.

A apoptose pode ocorrer por uma via independente da caspase ou uma via com ativação da caspase. Foi demonstrado que as caspases são essenciais para a execução do processo de apoptose.²⁵ Especificamente, a caspase-3 é uma protease frequentemente ativada no processo de morte celular e que exerce um papel fundamental na fase terminal ou de execução da apoptose.²⁶ No presente estudo, a injeção da bupivacaína aumentou significativamente a expressão da caspase-3, enquanto a expressão da caspase-3 diminuiu significativamente com o tratamento com RAP. Os resultados sugerem que a bupivacaína induz apoptose neuronal mediada pela caspase-3. Além disso, a administração prévia de RAP foi capaz de regular a apoptose neuronal através de mecanismo dependente de caspase-3, consistente com os resultados obtidos com a coloração TUNEL. Analisados em conjunto, esses resultados apontam que a RAP tem efeito neuroprotetor em ratos tratados com bupivacaína ao inibir a apoptose neuronal.

A autofagia é a principal via envolvida na degradação de proteínas e organelas de longa duração, na remodelação celular e na sobrevivência celular durante a ausência de nutrientes.²⁷ A autofagia também é um mecanismo fisiológico normal que ocorre em níveis basais na maior parte das células. Estudos anteriores revelaram que diversas condições neurológicas, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e epilepsia, estão relacionados a modificações no processo autofágico.⁹ Além disso, mostrou-se que LC3 e Beclin1 são dois marcadores na cascata autofágica. A LC3 nos mamíferos equivale à Atg8 nas leveduras. As duas formas de LC3, LC3-I e seu derivado proteolítico LC3-II (18 e 16 kDa, respectivamente), estão localizadas no citosol e nas membranas autofagossômicas, respectivamente. LC3-II pode, portanto, ser usado para estimar a proliferação de autofagossomos antes da sua destruição por meio da fusão com lisossomos. A ativação da autofagia em resposta a vários estressores estimula a conversão de LC3-I em LC3-II e regula positivamente a expressão de LC3. Nos mamíferos a Beclin1 é ortóloga à Atg6 das leveduras e desempenha um papel crítico na formação do autofagossomo.¹⁹ No presente estudo, os resultados revelaram que a bupivacaína aumentou os níveis das proteínas LC3 e Beclin1; entretanto, a administração de RAP mitigou

essas alterações, indicando que a autofagia foi desencadeada pela bupivacaína. A análise de Western Blot dos níveis de Beclin1 e LC3 confirmou ainda a indução de autofagia. Os resultados mostraram que a bupivacaína aumentou a razão LC3II/LC3I e os níveis de Beclin1, enquanto a RAP atenuou as modificações induzidas pela bupivacaína. Esses resultados sugerem que o aumento da autofagia possa funcionar como mecanismo protetor para a sobrevivência neuronal. O achado é consistente com os resultados de estudo anterior que mostrou que a autofagia é um mecanismo que protege as células dos efeitos da necrose e apoptose.²⁸

Autofagia e apoptose são dois tipos de morte celular que ocorrem por diferentes mecanismos, mas estão funcionalmente ligados. Evidências acumuladas revelam que autofagia e apoptose podem cooperar, antagonizar ou auxiliar uma à outra, e assim, influenciando diferencialmente o futuro das células.⁷ A autofagia e a apoptose podem, às vezes, agir visando o mesmo resultado, embora, em condições diferentes, possam apresentar relação diferente. O estudo dessa relação pode influenciar de modo significativo a prevenção e o tratamento de diversas doenças.²⁹

Resumo

Os resultados deste estudo revelam que a autofagia e a apoptose estão envolvidas em interações de inibição cruzada. Além disso, os resultados globais sugerem que a sobrevivência neuronal melhorada devido a reduções significativas no apoptose neuronal é mediada pela caspase-3 e a ativação da autofagia. O aumento da autofagia é um processo protetor que pode promover a sobrevivência celular contra a apoptose neuronal *in vivo*. No entanto, os mecanismos que levam à hiperativação da autofagia ainda não foram esclarecidos; portanto, mais estudos são necessários no futuro.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse potenciais com relação à pesquisa, autoria e/ou publicação deste artigo.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo *Gansu Province Health Industry Plan* (China, número do projeto: GWSKY2017-18).

Referências

1. Sakura S, Kirihara Y, Muguruma T, et al. The comparative neurotoxicity of intrathecal lidocaine and bupivacaine in rats. *Anesth Analg*. 2005;101:541–7.
2. Kato J, Konishi J, Yoshida H, et al. Cauda equina syndrome following combined spinal and epidural anesthesia: a case report. *Can J Anaesth*. 2011;58:638–41.
3. Komatsu T, Takenami T, Nara Y, et al. Epinephrine administered with lidocaine solution does not worsen intrathecal lidocaine neurotoxicity in rats. *Region Anesth Pain M*. 2013;38:140–4.
4. Wen X, Xu S, Liu H, et al. Neurotoxicity induced by bupivacaine via T-type calcium channels in SH-SY5Y cells. *Plos One*. 2013;8:e62942.
5. Hampl KF, Schneider MC, Drasner K. Toxicity of spinal local anesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol*. 1999;12:559–64.
6. Jing CH, Wang L, Liu PP, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection against apoptosis via a mitochondrial pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience*. 2012;213:144–53.
7. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2013;1833:3448–59.
8. Carloni S, Girelli S, Scopa C, et al. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy*. 2010;6:366–77.
9. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451:1069.
10. Nishida K, Taneike M, Otsu K. The role of autophagic degradation in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:73–9.
11. Kochergin IA, Zakharova MN. The role of autophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochemical Journal*. 2016;10:7–18.
12. Jung KT, Lim KJ. Autophagy: can it be a new experimental research method of neuropathic pain? *Korean J Pain*. 2015;28:229.
13. Wu HJ, Pu JL, Krafft PR, et al. The molecular mechanisms between autophagy and apoptosis: potential role in central nervous system disorders. *Cell Mol Neurobiol*. 2015;35:85–99.
14. Boya P, Gonzálezpolo RA, Casares N, et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;25:1025–40.
15. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 2005;12:1509–18.
16. Xiong J, Kong Q, Dai L, et al. Autophagy activated by tuberin/mTOR/p70S6K suppression is a protective mechanism against local anaesthetics neurotoxicity. *J Cell Mol Med*. 2017;21:579–87.
17. Li R, Ma H, Zhang X, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to local anesthetic bupivacaine-induced myotoxicity in mouse myoblasts. *Anesthesiology*. 2015;122:595–605.
18. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000;290:1717–21.
19. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004;117:2805–12.
20. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, et al. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:9357–60.
21. Liu H, Zhu R, Liu C, et al. Evaluation of decalcification techniques for rat femurs using he and immunohistochemical staining. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1–6.
22. Formichi P, Battisti C, Bianchi S, et al. Evidence of apoptosis via TUNEL staining in muscle biopsy from patients with mitochondrial encephalomyopathies. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2003;35:29–34.
23. Hu S, Sheng WS, Lokensgard JR, et al. Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons. *Neuropharmacology*. 2002;42:829–36.
24. Park CJ, Park SA, Yoon TG, et al. Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. *J Dent Res*. 2005;84:852–7.
25. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999;6:99–104.
26. Hartmann A, Hunot S, Michel PP, et al. Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:2875–80.
27. Liu C, Gao Y, Barrett J, et al. Autophagy and protein aggregation after brain ischemia. *J Neurochem*. 2010;115:68–78.
28. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science*. 2004;306:990–5.
29. Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, et al. To die or not to die: that is the autophagy question. *Curr Mol Med*. 2008;8:78–91.