

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL NOS TRÓPICOS**

**CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DA RESPOSTA GLIAL NA  
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO ALCALOIDE PIRROLIZIDÍNICO  
MONOCROTALINA**

**JOANA DA LUZ OLIVEIRA**

**SALVADOR-2015**



**CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DA RESPOSTA GLIAL NA  
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO ALCALOIDE PIRROLIZIDÍNICO  
MONOCROTALINA**

**JOANA DA LUZ OLIVEIRA**

**SALVADOR-2015**

**JOANA DA LUZ OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DA RESPOSTA GLIAL NA  
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO ALCALOIDE PIRROLIZIDÍNICO  
MONOCROTALINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Área de Concentração: Saúde Animal e Epidemiologia

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Lima Costa**

**SALVADOR-2015**

**CARACTERIZAÇÃO IN VITRO E IN VIVO DA RESPOSTA GLIAL NA  
NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELO ALCALOIDE PIRROLIZIDÍNICO  
MONOCROTALINA**

**JOANA DA LUZ OLIVEIRA**

Dissertação defendida e aprovada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal nos Trópicos.

Salvador, 12 de Junho de 2015.

Comissão avaliadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda W. Lima

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Botura

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rejane C. Santana

*Com leveza e carinho, dedico ao meu amado  
sobrinho, e agora anjo Rafael.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente...

Ao amor maior que eu tive a oportunidade de conhecer nos dias mais difíceis, o amor de Deus!

Ao segundo amor maior que qualquer um que eu possa encontrar na Terra, minha referência, agradeço a minha compreensiva e guerreira mãe que na sua simplicidade consegue conduzir meus passos e transformar os muitos não da vida em uma vontade enorme de vencer; entre tantas virtudes que você me doou talvez a melhor delas seja a persistência

À família, pela torcida, pelo reconhecimento, pela força!

À prima e cúmplice Jaqueline Luz

Aos “afilhados” Ana e Uelton pela amizade e companheirismo, sem vocês não teria sido possível chegar aqui.

A orientadora, pela compreensão pelas palavras certas, por tratar o diploma de mestrado como meu e seu, um obrigada especial sobretudo por me ajudar na realização desse sonho.

Ao co-orientador mais humano que se pode ter, Victor essa paz em pessoa.

Aos parceiros de laboratório, Paulo Lucas, Alessandra e Monique - que felicidade poder contar encontrar com vocês nas bancadas da vida

À amiga Hélimar Gonçalves por todo apoio e carinho

Aos Amigos Wagno Alcântara, Leilton Carvalho e Yanier Nuñez, trabalhar om vocês foi incrível!

Ao Laboratório de Biologia celular e neuroglia da Universidad de Chile, como eu seria diferente se não tivesse passado por essa experiência...

À CAPES que financiou esse realização profissional e pessoal.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A2B5: poligangliosídeos de membrana

BFGF: Fator básico de crescimento de fibroblastos

CIM: Cimetidina

CYP450: Citocromo 450

CYP1A1: Citocromo 450, família 1, subfamília A1

CYP1A2: Citocromo 450, família 1, subfamília A1

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco.

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DSS- duodecil sulfato de sódio

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

EROD: Etoxiresorufina-O-desetilase

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

MROD: Metoxiresorufina-O-desmetilase

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

MCT: Monocrotalina

OMZ: Omeprazol

PBBS: Tampão fosfato salino

SFB: Soro fetal Bovino

SNC: Sistema Nervoso Central

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crotalaria retusa	Pág. 9
Figura 2: Patologia geral da monocrotalina	Pág.15
Figura 3: Avaliação da atividade catalítica da CYP450	Pág. 32
Figura 4: Cultivo isolado de microglia	Pág. 33
Figura 5: Cultivo isolado de oligodendrócitos	Pág. 35
Figura 6: Cultura organotípica	Pág. 37
Figura 7: Princípio do teste do MTT	Pág. 38
Figura 8: Modelos de avaliação comportamental	Pág. 41
Figura 9: Efeito da MCT em células da linhagem C6	Pág. 45
Figura 10: Ensaio de viabilidade em cultivos isolados de microglia e oligodendrócitos	Pág. 46
Figura 11: Microscopia óptica de cultura organotípica após 1 hora de tratamento com MCT	Pág. 47
Figura 12: Microscopia óptica de cultura organotípica após 1 hora de tratamento com MCT	Pág. 48
Figura 13: Viabilidade celular em cultura organotípica	Pág. 49
Figura 14: Avaliação do efeito de MCT sobre a atividade motora	Pág. 51
Figura 15: Avaliação do efeito ansiolítico de MCT	Pág. 52
Figura 16: Imunohistoquímica em cérebro de animais intoxicados experimentalmente com MCT	Pág. 53
Figura 17: Inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	Pág. 54



## SUMÁRIO

1.0 Introdução.....	09
1.1 Considerações gerais sobre <i>Crotalaria retusa</i> .....	10
1.2 Importância econômica da intoxicação por plantas.....	11
1.3 Uma visão geral sobre o metabolismo de drogas.....	12
1.4 aspectos químicos e metabólicos do alcaloide monocrotalina .....	13
1.5 A toxicidade da monocrotalina .....	14
1.6 Patologia da intoxicação por <i>Crotalaria retusa</i> .....	15
2.0 As células do SNC e suas respectivas funções .....	16
2.1 Astrócitos e sua função no metabolismo no SNC .....	18
2.2 Papel do sistema citocromo P450 atrocitári no metabolismo de xenobióticos no SNC	19
2.2.1 Linhagem C6 como de estudo de metabolismo via P450 astrocitária .....	23

2.3 O papel da microglia na neurogênese .....	24
3.0 Obetivos .....	26
Objetivo geral .....	26
Objetivos específicos.....	26
4.0 Capítulo I: Alcaloide monocrotalina extraído de <i>Crotalaria retusa</i> induz resposta glial, atividade catalítica da CYP1A1 e alterações comportamentais	
Resumo .....	28
Abstract .....	29
4.1 Introdução .....	30
5.0 Material e Métodos .....	30
5.1 Droga e tratamentos .....	31
5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anticolinesterásica .....	31
5.3 Avaliação da atividade catalítica do citocromo P450.....	32
5.4 Modelos de cultivo celular .....	33

<i>Cultivo isolado de microglia</i> .....	33
<i>Cultivo isolado de oligodendrócitos</i> .....	34
<i>Cultura de linhagem celular C6</i> .....	36
<i>Culturas organotípica</i> .....	37
<i>5.5 Teste de viabilidade celular</i> .....	38
<i>5.6 Intoxicação experimental</i> .....	39
<i>Grupos e tratamentos</i> .....	39
<i>Ensaio comportamentais</i> .....	40
<i>Open field (campo aberto)</i> .....	40
<i>Labirinto em cruz</i> .....	41
<i>5.7 Preparo do tecido cerebral</i> .....	42
<i>Obtenção de cortes histológicos</i> .....	42
<i>Marcação imunohistoquímica</i> .....	42
<i>5.8 Análise estatística</i> .....	43
<i>6.0 Resultados</i> .....	44
<i>6.1 Efeito da MCT sobre a atividade catalítica do sistema P450</i> .....	44
<i>6.2 Efeito da MCT sobre a viabilidade em cultivos isolados de microglia e oligodendrócitos</i> .....	46

<i>6.3 Efeito da MCT sobre a viabilidade em culturas organotípica .....</i>	47
<i>6.4 Efeito da intoxicação experimental em parâmetros comportamentais relacionados a danos no SNC</i>	50
<i>6.5 Efeito ansiolítico induzido após administração de MCT .....</i>	52
<i>6.6 Efeito da intoxicação experimental com o alcaloide MCT na expressão de proteínas marcadoras de neurônios e células gliais</i>	53
<i>6.7 Atividade da acetilcolinesterase .....</i>	54
<i>7.0 Discussão .....</i>	55
<i>8.0 Conclusão .....</i>	61
<i>9.0 Referências .....</i>	62

## 1. INTRODUÇÃO

Plantas são verdadeiras fontes de produtos químicos, cuja principal função é sempre produzi-los em seu próprio benefício, chamados metabólitos (MARTINEZ, 2013).

As plantas do gênero *Crotalaria* pertencem a família Fabaceae, típicas de regiões tropicais e subtropicais, já foram identificadas mais de 600 espécies, sendo a maioria tóxica para os animais (WILLIAM e MALYNEUX, 1987). As variedades tóxicas mais conhecidas são: *Crotalaria spectabilis*, *C. crispata*, *C. retusa*, *C. dura* e *C. globifera*, sendo que no Brasil já foram encontradas aproximadamente mais de 40 espécies deste gênero (BARRI e ADAM, 1981; TOKARNIA et al, 1983).

As espécies do gênero *Crotalaria* também são de grande interesse na área da agricultura, como na adubação verde e cobertura vegetal, porém o interesse maior neste gênero deve-se às perdas econômicas causadas por intoxicação do gado e devido à exposição da população humana, que usa muitas dessas plantas na medicina popular (MATTOCKS, 1972). Essas plantas são ricas em alcaloides pirrolizidínicos (AP) que são as principais toxinas derivadas de plantas que podem intoxicar humanos e animais, sendo o principal alcaloide a monocrotalina (MCT) (MATTOCKS, 1972).

A monocrotalina (MCT) é encontrada nas plantas do gênero Crotalária, e, embora seja um alcaloide primariamente hepatotóxicos, efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, fetotóxicos e carcinogênicos também estão relacionados a essa substância (MATTOCKS, 1972; MEDEIROS et al., 2000). Equinos intoxicados com MCT muitas vezes apresentam sinais clínicos nervosos, o que tem sido associado a um quadro de encefalopatia hepática devido à impossibilidade de metabolização da ureia, seguido de hiperamonemia. Por outro lado, metabólitos da MCT já foram encontrados e dosados em cérebros de ratos experimentalmente intoxicados, o que demonstra a capacidade destas moléculas em atravessar a barreira hematoencefálica (YAN e HUXTABLE, 1995). Devido à estreita relação entre a intoxicação por crotalarias e a presença de sinais clínicos neurológicos em espécies sensíveis, tornou-

se importante compreender os efeitos diretos da monocrotalina ou de seus derivados pirrólicos sobre células do SNC.

### **1.1 Considerações gerais sobre *Crotalaria retusa***

A *Crotalaria retusa* pertence à família Fabaceae, tendo esta classificação botânica por produzir frutos do tipo vagem. A planta é originária da África e Índia, popularmente conhecida como “xique-xique”, “guizo-de-cascavel” ou chocalho-de-cascavel devido ao som emitido pelas sementes quando a vagem é chacoalhada. Esta planta apresenta folhas simples, extremidades arredondadas ou pontiagudas e flores amareladas (TOKARNIA, 2000).

Esta planta adapta-se facilmente a diferentes condições ambientais, podendo desenvolver-se próximas a rios, morros litorâneos, restingas, orla de matas, campos e cerrados (JUNIOR, 2010). No Brasil, onde já são foram catalogadas, aproximadamente, quarenta espécies que são consumidas pelos ruminantes e equinos principalmente nos períodos de escassez de alimentos (TOKARNIA et al., 2000). Estas plantas também são de grande interesse devido às perdas econômicas causadas por intoxicação dos animais e devido à exposição da população humana que usa muitas dessas plantas na medicina popular (MATTOCKS, 1972).

Dentre os componentes químicos, demonstrados em análise qualitativa fitoquímica estão incluídos alcaloides, saponinas, taninos, esteroides, flavonoides e glicosídeos cardioativos (DHOLE et al., 2011).

A *C. retusa* apresenta alto teor de alcalóides pirrolizidínicos, principais toxinas derivadas de plantas, que produzem efeitos adversos em humanos e animais. Dentre estes alcalóides, a monocrotalina é o principal composto encontrado nas sementes e em partes aéreas desta planta (MEDEIROS, et al., 2000), abaixo segue a apresentação dos aspectos botânicos da planta.

**Figura 1: *Crotalaria retusa***



*Imagens disponíveis em: [www.google.com.br/crotalariaretusa/imagem](http://www.google.com.br/crotalariaretusa/imagem)*

## **1.2- Importância econômica da intoxicação por plantas**

Os principais fatores epidemiológicos relacionados às intoxicações por plantas incluem palatabilidade, fome, sede, facilitação social, desconhecimento da planta, acesso a plantas tóxicas, dose tóxica, período de ingestão, variações de toxicidade e resistência ou susceptibilidade dos animais às intoxicações (PESSOA et al., 2013).

Prejuízos diretos relacionados aos acidentes toxicológicos por plantas incluem morte de animais, diminuição dos índices reprodutivos (aborto, infertilidade, malformações),

redução da produtividade nos animais sobreviventes e outras alterações devido a doenças transitórias, enfermidades sub-clínicas como diminuição da produção de leite, carne ou lã e aumento da suscetibilidade a outras doenças devido à depressão imunológica (ASSIS et al., 2010).

Embora as perdas econômicas causadas pelas intoxicações por plantas sejam difíceis de estimar devido à escassez de dados, mortes de animais foram contabilizadas considerando os dados dos laboratórios de diagnóstico de diferentes regiões dos quais se presume que de uma população de 221.827.299 bovinos (IBGE 2012) um percentual entre 7,4% e 15,83% dessa população vai a óbito ocasionada por intoxicação por plantas (RIET-CORREA e MEDEIROS 2001). A população de equinos no Brasil é de 5.508.546 cabeças, e estima-se que 14% dos equinos morrem devido intoxicação por plantas, uma redução anual de 38.559 equinos por essa causa. Em relação à espécie ovina, sabe-se que seu efetivo soma um total de 17.662.201 cabeças (IBGE 2012), e deste total sabe-se que 399.800 morrem também devido a intoxicação por plantas, o que expressa uma perda de 13,8% do rebanho anualmente, (ASSIS et al. 2010).

### **1.3- Uma visão geral sobre o metabolismo de drogas**

Os xenobióticos que penetram no organismo são modificados por uma variedade de enzimas. As transformações biológicas efetuadas por essas enzimas podem alterar o composto, tornando-o benéfico, prejudicial ou simplesmente ineficiente. Os processos pelos quais os fármacos são alterados por reações bioquímicas no corpo são designados, em seu conjunto, como metabolismo ou biotransformação de xenobióticos.

A capacidade da droga em atravessar as membranas celulares depende da sua natureza química, quando lipofílicas atingem mais facilmente seu alvo. Esta propriedade química que favorece a biodisponibilidade dos fármacos, no entanto, pode dificultar a sua excreção renal, visto que a depuração pelo rim exige que esses fármacos se tornem mais hidrofílicos, de modo que possam ser dissolvidos na urina



aquosa. Por conseguinte, as reações de biotransformação frequentemente aumentam a hidrofiliabilidade dos compostos para torná-los mais passíveis de excreção renal (CAMARGO, 2012).

#### **1.4- Aspectos químicos e metabólicos do alcaloide Monocrotalina**

Os alcaloides são compostos que contêm nitrogênio em um anel heterocíclico e são geralmente de caráter básicos (tipo alcalino=alcaloide), possuem sabor amargo e funcionam como uma defesa química das plantas contra herbívoros (CHEECK, 1988). Os alcaloide pirrolizidínicos (AP) constituem um grande grupo de alcaloides contendo um núcleo pirrolizidino sendo amplamente disseminados, tanto geograficamente quanto botanicamente (BARBOSA, 2007).

A toxicidade dos alcaloides está diretamente relacionada à sua estrutura química, sendo considerados mais tóxicos os diésteres cíclicos, os diésteres monocíclicos avaliados como tóxicos intermediários e os monoésteres pouco tóxicos, e dentre os distúrbios biológicos que os alcalóides em geral ocasionam estão a redução do metabolismo no fígado e disponibilização plasmática da vitamina A, efeitos pneumotóxicos, hepatotóxicos e carcinogênicos (CHEECK, 1988).

A monocrotalina (MCT), é um alcaloide pirrolizidinico bem reportado como causador de danos hepáticos e cardiopulmonares em animais e em humanos (NOBRE et al., 2004). Esta toxicidade, no entanto, depende da ativação do sistema enzimático citocromo P450 no processo de bioativação o que gera o metabólito potencialmente tóxico, a dehidromonocrotalina (DHM) (SCHULTZE e ROTH, 1998).

Este metabólito possui meia-vida curta e age como agente alquilante podendo ligar-se ao DNA e proteína. Estudos em isolados de mitocôndrias de fígado de ratos expostos ao alcaloide para esclarecer o mecanismo pelo qual se dá a toxicidade demonstram que o metabólito deidromonocrotalina é capaz de inibir a atividade da

enzima NADH desidrogenase quando adicionada em concentrações micromolares e alteram a síntese de ATP (MINGATTO et al., 2007).

### **1.5- A toxicidade da Monocrotalina**

As toxinas de plantas em geral, são responsáveis por ocasionar inúmeros problemas de saúde pública e perdas econômicas no mundo. Entre as reconhecidas ações tóxicas do alcaloide pirrolizidínico estão carcinoma hepático, hepatomegalia, e doença veno-oclusiva hepática. Além disso, a toxicidade deste alcaloide pode também ser expresso em condição extra-hepática incluindo o coração, pulmão, rim e sistema nervoso central.

Ratos wistar expostos a monocrotalina em dose única de 60-109 mg/kg leva a danos pneumotóxicos com hipertensão e hipertrofia ventricular direita (MATTOCKS, 1972)

Ainda sabe-se que processo de bioativação microssomal forma agentes alquilantes que ligam-se ao DNA e proteínas (PRAKASH et al., 1998; ASRES et al., 2004).

A presença de sinais clínicos neurológicos em equinos intoxicados foi inicialmente associada a um quadro de encefalopatia hepática devido à impossibilidade de metabolismo da ureia seguida de hiperamonemia (NOBRE et al., 2004).

Ainda, metabólitos como o dehidrotrichodesmina e dehidromonocrotalina, derivados dos alcaloides trichodesmina e monocrotalina, respectivamente, foram encontrados e dosados em cérebros de ratos experimentalmente intoxicados, este achado demonstra a capacidade destas moléculas em atravessar a barreira hematoencefálica (YAN e HUXTABLE, 1995) e sugere que os sinais clínicos neurológicos observados em animais intoxicados podem ser desencadeados pela ação direta de componentes ativos de crotalárias em células do SNC.

## 1.6- Patologia da Intoxicação por *Crotalaria retusa*

Esta espécie vegetal tem sido reportada como a causadora de intoxicação crônica em equinos e intoxicação aguda em ovinos, e em bovinos casos de fibrose hepática associada ao consumo da planta (JUNIOR, 2010)

Caprinos experimentalmente intoxicados com uma dose única de 347 mg/kg de massa corpórea desenvolveram sinais de intoxicação aguda observando-se salivação, letargia e morte em período de 24 a 48 horas após evidências dos sintomas. À Necropsia, o fígado apresentou necrose hemorrágica centro lobular, e vacuolização citoplasmática, ainda foi observada hemorragia focal na superfície com adesão do peritônio ao diafragma (LISANKA, et al., 2013).

A determinação da susceptibilidade de muares ao alcaloide foi avaliada seguindo um protocolo de baixas e altas doses inversamente proporcional ao tempo, desta forma foi comprovada a capacidade de metabolização da toxina por esta espécie animal bem como a susceptibilidade à intoxicações agudas a exposição a altas doses com o comprometimento hepático e pulmonar (PESSOA, et al., 2013), como demonstrado na figura abaixo.

**Figura 2: Patologia geral da monocrotalina**



Fonte: (NOBRE, et. Al 2004; SOUZA, et. Al 1997 e QUEIROZ, et. Al 2013)

## 2.0- As células do SNC e as suas funções

No SNC há duas classes principais de células, os neurônios e as células da glia, ou neuroglia, esta última sendo constituída de três tipos de células, os astrócitos, a microglia e os oligodendrócitos (HATTEN, 1986; SWANSON *et al.*, 1997; LENT, 2010).

A interação neurônio/glia é importante para a homeostasia do sistema nervoso central. Essa complexa relação pode ser observada em ambos os grupos de animais, invertebrados e vertebrados, indicando uma importante característica evolutiva, conservando os papéis dessa interação (MURAI, 2007). Estudos desses diferentes tipos celulares, com as mais diversas técnicas, mostram que as células da glia interagem ativamente com os neurônios e podem modular a sua atividade em muitas regiões do sistema nervoso (TARDY *et al.*, 1991). Estas interações íntimas são necessárias para o desenvolvimento e manutenção das funções e estruturas cerebrais e de neuroproteção, a qual inclui a proteção induzida por ataque químico (TARDY, 2002; ZURICH *et al.*, 2004).

A glia desempenha funções de defesa e modulação da atividade neuronal capturando, processando, reciclando os neurotransmissores e liberando neuromoduladores, razão pela qual nas últimas décadas têm atraído o interesse crescente das pesquisas científicas (MURAI, 2007; FEI HE *et al.*, 2007; MÜLLER, 2010). Estas células respondem a neurotransmissores liberados em terminais sinápticos ativos sob o controle dinâmico da atividade neuronal.

Dentre as células da glia, os oligodendrócitos são importantes para a mielinização dos neurônios presentes no sistema nervoso central (GRAÇA *et al.*, 2001). Inclui-se ainda entre as suas funções a facilitação da eficiente propagação do potencial de ação e suporte trófico para o axônio (LEE *et al.*, 2012).

Estas células derivam das células progenitoras de oligodendrócitos (OPC), esta forma precursora surge a partir do desenvolvimento embrionário para mais tarde se transformar na forma madura mielinizante e migrar por todo SNC. Contudo, parte desta população glial permanece indiferenciada e pode ser encontrada tanto na substância branca quanto na substância cinza do SNC adulto (CRAWFORD et al., 2014).

Recentemente tem sido demonstrado um papel importante na recuperação em diversos insultos neurais (BOULANGER, 2014).

A microglia e os astrócitos por outro lado, são importantes células para a resposta imune inata uma vez que são capazes de produzir uma variedade de mediadores pró-inflamatórios contra diversos estímulos microbianos (GURLEY, 2008). Além dessa função, os astrócitos são importantes por fornecerem suporte nutricional e estrutural para neurônios e por participarem de outras funções, tais como detoxificação (TARDY, 1991), regulação da fenda sináptica através da remoção de neurotransmissores extracelulares, e ainda, direcionar o crescimento dos neuritos, servindo como guia (COSTA et al., 2002).

Os neurônios são distintos da glia pelos seus processos polarizados especializados, os axônios e dendritos, os quais podem propagar potenciais de ação, fazer junções sinápticas com outros neurônios e células formando locais de liberação para neurotransmissores (MOREST e SILVER, 2003), e ainda, são capazes de excretar quimiocinas cuja função é: proliferação e migração astrocitária e microglial, atividade neuroprotetora e mudanças eletrofisiológicas neuronais (HAAS, 2006).

## **2.1- Astrócitos e sua função no metabolismo no SNC**

Os astrócitos são os principais tipos de células neurais responsáveis pela manutenção da homeostase do cérebro, sendo que estão altamente interligados por uma rede, trabalhando em cooperação com os neurônios e desenvolvendo funções que incluem:

transporte e reciclagem de neurotransmissor, a homeostasia de íons, metabolismo e defesa contra o estresse oxidativo, conferindo assim uma atividade neuroprotetora intrínseca a estas células (BÉLANGER e MAGISTRETTI, 2009).

As células astrocíticas são capazes de responder às injúrias que causam danos neurológicos, incluindo os danos causados por substâncias tóxicas (Nascimento, 2013). Sendo que, após o dano gerado, estas células são ativadas em um fenômeno conhecido como gliose, o qual desencadeia um fenótipo alterado entre a regulação positiva de um grande número de moléculas (LEFRANÇOIS et al., 1997; MEAD e PENTREATH, 1998; COSTA e al., 2002; TARDY, 2002), incluindo o acúmulo de filamentos intermediários que contêm a proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Vários estudos têm mostrado que a GFAP é regulada após exposição a substâncias tóxicas e diversos produtos químicos que incluem o tolueno, etanol, e alcaloides piperidínicos (RATABOUL et al., 1989; COOKSON e PENTREATH, 1994; MEAD e PENTREATH, 1998; HARRY et al., 2002; HUGHES et al., 2006).

Diversos produtos químicos que possuem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica são biotransformados pelo sistema P450 cerebral, podendo assim ser ativado e ou gerar toxicidade ao SNC, como no caso dos alcaloides pirrolizidínicos, que segundo estudos mostram que a monocrotalina (MCT) em concentrações variáveis entre 0,1 e 500  $\mu\text{M}$ , não induziram citotoxicidade nessas células (BARRETO et al., 2004). Já, a dehidromonocrotalina (DHMC) que é um derivado do metabolismo da MCT reduziu a viabilidade das células na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , a partir de 24 horas após o tratamento (BARRETO et al., 2008).

Os astrócitos são a primeira linha de defesa contra xenobióticos e expressam níveis elevados de P450, que são cerca de duas vezes mais alto que os níveis encontrados em células neuronais, o que indica que o P450 neuronal não funciona da mesma forma que o P450 astrocitário. Estudos dos sistemas de bioativação cerebral revelaram que monoxigenases de astrócitos específicas dependentes do citocromo P450 desempenham um papel causal para o estabelecimento do cérebro como o órgão alvo de vários agentes tóxicos (MEYER et al., 2001).

## **2.2- Papel do sistema citocromo P450 astrocitário no metabolismo de xenobióticos no SNC.**

A biotransformação de drogas é uma etapa primordial no processo de eliminação e diminuição da toxicidade. Entretanto, ela também é responsável pelo surgimento de metabólitos reativos intermediários, que se ligam às macromoléculas do organismo (FRANCO et al., 2003). A biotransformação de fármacos pode ser dividida em duas fases. A fase I consiste nas reações de oxidação, redução e hidrólise, ocasionando sempre uma modificação estrutural do fármaco, o que na maioria das vezes pode levar a sua inativação, já na fase II, conhecida como fase de conjugação, ocorrem reações de conjugação do fármaco com substâncias endógenas, visando a facilitar sua eliminação (CASARETT e DUOLL, 1996). Deste modo, após o contato com alguma substância estranha para o organismo, a mesma pode ter dois caminhos: ser eliminada ou biotransformada em um composto ativo ou inativo capaz de causar danos ao organismo (ORELLANA, 2004).

As enzimas do citocromo P450 conhecidas como CYPs, são encontradas em todo o reino animal e vegetal, e estão envolvidas no metabolismo oxidativo de uma vasta variedade de compostos, que podem diferir-se tanto estruturalmente quando funcionalmente, incluindo moléculas endógenas, por exemplo, esteroides e ácidos graxos, e substâncias químicas exógenas, como fármacos, drogas de abusos e outros xenobióticos (FERGUSON e TYNDALE, 2011; MIKSYS et al., 2013).

Em seres humanos enzimas CYPs são expressas no fígado, que é o principal órgão metabolizador dos seres humanos e em outros tecidos incluindo o cérebro (HEDLEUND et al., 2001). Estudos têm apontados que o P450, como é conhecido esta família no cérebro, desenvolve diversas funções fisiológicas, além da metabolização (DAHWAN et al., 1999). Segundo MEYER et al., 2007, a depender da região do cérebro onde é expresso, o P450 podem desenvolver diversas atividades,

como, controle da entrada e metabolização de drogas, proteção de neurônios, ação hormonal e sinalização de proteínas inflamatórias.

As primeiras investigações estimaram que CYPs são expressos em níveis quase 100 vezes mais baixa no cérebro do que no fígado (WARNER et al., 1988) e era difícil conceber como essas CYPs no cérebro poderiam ter consequências funcionais. No entanto, a expressão de proteínas CYPs foram mapeadas em todas as regiões do cérebro e nos tipos de células (MIKSYS e TYNDALE, 2011). Algumas isoenzimas, como CYP1A1, CYP2B, CYP2E1 e CYP3A, são predominantemente encontrada em neurônios, enquanto outras se encontram nos neurônios e células da glia, tal como CYP2B que é encontrada nos astrócitos e em áreas com alta densidade de fibra neuronal, CYP2D encontrada em neurônios e células gliais bem como em áreas do cérebro que não são protegidos pela barreira hematoencefálica, tal como os plexus (WANG et al., 1995; HAGEMEYER et al., 2003;), sendo que nos seres humanos a isoenzimas CYP1B1 é uma das principais CYP encontrados no cérebro (DUTHEIL et al., 2010), vide a figura que segue (Quadro 1).



**Quadro 1: Principais isoformas do P450 expressas em células do SNC (MALAPLATE-ARMAND et al., 2004; MEYER, 2007).**

<b>Células</b>	<b>Isoforma CYP</b>	<b>Referências</b>
<b>Astrócitos de rato</b>	CYP2B1, CYP2B2	(ROSENBROCK et al., 2001)
	CYP2E1	(TINDBERG et al., 1996)
	CYP4A	(ALEXANDER et al., 1998)
	CYP2C11	(ALKAYED et al., 1996)
<b>Astrócitos Humanos</b>	CYP1A1	(FARIN ET OMIECINSKI, 1993)
	CYP2C29	(VAIROL et al., 2000)
	CYP2B6	(VOLK et al., 1996)
	CYP2D6	(SIEGLE et al., 2001)
<b>Neurônios Humanos</b>	CYP1B1	(RAVINDRANATH, et al., 2006)
	CYP1A1	(RIEDER et al., 2000)
	CYP2D6	(SIEGLE et al., 2001)
	CYP3A4	

Algumas drogas tem demonstrado um potencial em induzir isoformas de P450 específicas, podendo assim, alterar o metabolismo e disponibilidade de outras drogas, de esteroides e de si mesmas (HAINING e HAINING, 2007). De acordo com WARNER (1986), o etanol tem potencial de induzir a expressão das famílias 2C, 2D e 4A do P450 em cérebro de rato. MEYER et al., 2001, demonstrou que o uso do anticonvulsivante fenitoína aumenta a expressão de CYP2C29 num estudo usando modelo murínico *in vitro* de cultura primaria de astrócitos, sendo que o teste foi confirmado por western blotting.

Outros estudos demonstram que a família do P450 no cérebro, é capaz de catalisar hidrocarbonetos aromáticos hidroxilase (HAH) e etoxicumarina-O-desmetilase (ECOD), porém não parecem diferenciar de forma adequada entre as isoenzimas P450 (PARMAR et al., 1998). Em um outro estudo no qual, frações microssomais de cérebros de ratos foram tratados com fenobarbital e 3-metilcolantreno, obsevou-se que as isoformas CYP2B1/2B2 e CYP1A1/1A2 foram induzidas, e que estas isoenzimas catalisaram a O-desalquilação do 7-pentoxiresorufina (PR) e etoxiresorufina (EROD), respectivamente (DHAWAN et al.,1990).

Como os níveis de citocromo P450 expressos no cérebro são muito baixos, o que dificulta distinguir qual isoforma está envolvida na metabolização dos fármacos, vários modelos tem sido propostos para estudos de metablolismo de xenobióticos no SNC, baseados em estudos do modelo com substratos para destinguir as isoenzimas P450 induzidas no fígado (PARMAR et al., 1998). DHAWAN et al. (1999) estudaram a O-desalquilação do alquilresorufina selecionou derivados, tais como 7-pentoxiresorufina (PR), 7-benziloxiresorufina (BR) e 7-etoxiresorufina (ER) para distinguir e caracterizar a atividade catalítica das isoenzimas 2B1/2B2 e 1A1/1A2 em cérebro de rato. Os autores demonstraram que as isoformas são capazes de catalisar a o-desalquilação dos substratos, podendo assim ser usado como modelo de investigação para pesquisa de família CYP no cérebro, tal como pode ser observado com enzimas hepáticas por outros grupos (LOWRY, 1951; RUTTEN, 1992).

De acordo, com o que já foi investigado sobre o P450, podemos concluir que o SNC, possui significativa capacidade de metabolizar um amplo espectro de xenobióticos e pode ajudar a delinear o papel das isoenzimas P450 cerebrais em processos de neurotoxicidade e neurodegeneração.

### **2.2.1- Linhagem C6 como modelo de estudo de metabolismo via P450 astrocitária**

A linhagem C6 teve sua origem na década dos anos 1960. Constituiu-se como uma linhagem neural, apresentando características de oligodendrócitos, astrócitos e neurônios (PARKER et al, 1980) a depender do número de passagens, ou seja, quantas vezes uma população de células foram tripsinizadas e semeadas novamente após o primeiro cultivo. Esta linhagem é morfológicamente similar a glioblastomas e foi obtida a partir da administração repetitiva do agente alquilante N-nitrosometiluréia em ratos da linhagem Wistar. Quando os animais desenvolveram sinais neurológicos foram sacrificados, os tumores foram excisados, suas células dissociadas e cultivadas, e entre os clones gerados, o clone 6 foi aquele que mostrou eficiência para produzir a proteína S-100, marcador de células astrocitária (BENDA et al., 1968).

Embora apresente características de outras linhagens neurais, a expressão de GFAP e S100 atesta suas características astrocíticas (BENDA et al., 1968). A linhagem C6 é utilizada para investigações bioquímicas e metabólicas que envolvam funções astrocíticas (FENG et al, 2004; FUNCHAL et al, 2005), além de serem usadas largamente em estudos sobre vias de transduções de sinais e regulação de fatores de crescimento (KIM et al., 2006), assim como para prospecção e drogas antiglioma.

No tocante à adoção da linhagem C6 como modelo de estudo de metabolismo e toxicidade de xenobióticos relacionado a P450, esta baseia-se em estudos que mostraram uma eficiente expressão destas enzimas nesta linhagem (STROBEL et al., 1995).

### **2.3- O papel da Microglia na neurogênese**

A micróglia é reconhecida como as células do sistema imunológico residentes no cérebro e têm um papel importante no sistema nervoso central saudável. Análoga aos macrófagos, a micróglia tem como função primária fagocitar células lesadas e debris celulares silenciosamente (sem a produção de inflamação). No entanto, após um insulto patológico, como infecção ou lesão cerebral, a microglia pode responder rapidamente. Parte dessa resposta reativa inclui uma mudança morfológica na aparência. No SNC saudável, microglia têm morfologia altamente ramificada com processos finos, que se movem de forma dinâmica no parênquima cerebral no que tem sido chamado de um estado de vigilância (NIMMERJAHN et al., 2005).

Uma evidência crescente sugere que microglias ramificadas são um componente essencial da neurogênese na zona subgranular de hipocampo em ratos adultos. Um dos papéis críticos da microglia na modulação da neurogênese é o controle de células recém-nascidas durante o primeiro período crítico de sobrevivência. LOANE e BYRNES, (2010) demonstraram que a microglia ramificada tem uma função importante na fagocitose de células apoptóticas durante os primeiros dias de vida. As células apoptóticas são posteriormente removidas por microglia num processo imunologicamente silencioso ou seja, sem inflamação. Em resposta a danos no tecido, como uma lesão cerebral traumática, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) são liberados para ativar a microglia e levar a um estado pró-inflamatório.

No contexto da neurogênese, as células morrem por um processo de morte celular programada, e não há liberação de DAMPs. Em oposição à fagocitose por microglia ameboides observada durante o trauma ou neurodegeneração, a fagocitose de células apoptóticas durante neurogênese é realizada por microglias ramificadas.

Estudos apontaram a toxicidade da MCT em um sistema de interação neurônio/glia, com indução de alterações na expressão de componentes do citoesqueleto neuronal ( $\beta$ III-tubulina) e glial (GFAP), modificações que aparentemente estão relacionadas

com o metabolismo astrócitário da MCT a compostos ativos, que por sua vez induzem danos tóxicos nas duas populações de células do SNC (PITANGA et al., 2011). Por outro lado, análise da conjugação com glutathione, revelou que houve depleção da GSH para tratamentos com MCT, e esta foi revertida parcialmente por pré-tratamento com o inibidor de P450 (Cimetidina 100 $\mu$ M), reforçando a hipótese da importância da interação glia/neurônios e do metabolismo astrocitário na neurotoxicidade induzida pela MCT. No entanto, permite perceber a necessidade de continuidade dos estudos, para melhor conhecermos seus mecanismos de ação desta droga no SNC.

### 3- OBJETIVOS

#### Objetivo geral

Compreender, através de análises *in vitro* e *in vivo*, o papel da resposta glial na neurotoxicidade induzida pelo alcaloide monocrotalina extraído de *Crotalaria retusa*.

#### Objetivos específicos

- Analisar o efeito da MCT na atividade da enzima Acetil-colinesterase.
- Investigar *in vitro* o efeito da monocrotalina sobre a atividade catalítica do sistema P450 expressa através da atividade sobre os substratos EROD e MROD, em modelo *in vitro* utilizando células gliais da linhagem C6.
- Determinar novas populações de células do SNC alvo do alcaloide MCT em culturas isoladas de microglia e oligodendrócitos.
- Determinar a toxicidade da MCT durante a interação de células gliais e neurais em culturas organotípicas de córtex cerebral.
- Determinar *in vivo* o efeito do alcaloide MCT em ratos experimentalmente intoxicados através de análise de alterações comportamentais e alterações na expressão de proteínas marcadoras de neurônios e células gliais.
- Correlacionar os achados com fenômenos de neurotoxicidade já observados em células gliais e neurais.

**ALCALOIDE MONOCROTALINA EXTRAÍDO DE CROTALARIA *RETUSA* INDUZ  
RESPOSTA GLIAL, ATIVIDADE CATALÍTICA DA CYP1A1 E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS EM RATOS WISTAR**

#### **4- ALCALOIDE MONOCROTALINA EXTRAÍDO DE CROTALARIA *RETUSA* INDUZ RESPOSTA GLIAL, ATIVIDADE CATALÍTICA DA CYP1A1 E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM RATOS WISTAR**

##### **Resumo**

*Crotalaria retusa* (Leguminosae) é uma planta encontrada no Nordeste do Brasil. Estas plantas são usados na medicina popular, mas têm sido induzidos a toxicidade em animais e seres humanos, também comprometer o sistema nervoso central (SNC). É bem sabido que o alcalóide pirrolizidina monocrotalina (MCT), a principal toxina de *C. retusa*, é ativamente metabolizada pelos sistemas do citocromo P450 hepáticas e pulmonares para formar intermediários altamente reativos, no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos sobre células do sistema nervoso central e toxicidade. Nós demonstramos que os neurônios são alvo de MCT e toxicidade é dependente da interação entre astrócitos e neurônios através do metabolismo astrocitário. Neste estudo, foi investigado a toxicidade do MCT no conjunto de células gliais e isolado microglia e oligodendrócitos, alterações comportamentis e atividade das isoformas do CYP450 no metabolismo do alcalóide no CNS. Para estudos de metabolismo as células foram tratadas com as concentrações de 100-500 molar por um período 24 ou 72 h. Para avaliação do comportamento os animais foram tratados com 109 mg do alacaloide/pv e foram analisados em campo aberto e labirinto Pluz. À imunohistoquímica iinvestigou-se alterações estruturais em oligodendrócitos, astrócitos e neurônios através dos respectivos gangliosídeo A2B5 e proteínas estruturais GFAP e  $\beta$ -III-tubulina respectivamente. Ainda foram realizados testes de toxicidade em modelo de cultura organotípica.

Observou-se que à 500  $\mu$ M no MCT foi tóxico para os cultivos isolados oligodendrócitos após 24h e microglia após 72 h. O tratamento de 200  $\mu$ M MCT também induziu redução na viabilidade em cultura organotípica após 24h. Os testes in vivo demonstraram que a monocrotalina diminuiu a atividade motora normal e induziu efeitos ansiolítico. Neste estudo verificou-se que o tratamento com MCT promoveu a ativação da CYP1A , o que pode ser associado com a geração de metabolitos ativos e neurotoxicidade.



## Abstract

*Crotalaria retusa* (Leguminosae) is a plant found in the Northeast Brazil. These plants are used in folk medicine but have been induced toxicity in animals and humans, also compromising the central nervous system (CNS). It is well known that the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline (MCT), the main toxin of *C. retusa*, is actively metabolized by hepatic and pulmonary cytochrome P450 systems to form highly reactive intermediates, however little is known about effects on CNS cells and toxicity. We demonstrated that neurons are target for MCT and toxicity is dependent on astrocytes/neurons interactions and astrocyte metabolism. In this study, we investigated the toxicity of MCT in the ensemble of glial cells and isolated microglia and oligodendrocytes, changes behaviors and environment of the CYP450 isoforms on alkaloid metabolism in CNS. Cells were treated with concentrations of 100-500  $\mu\text{M}$  for 24 or 72 h. The behaviour of animals treated with 109 mg/bw were analyzed by open field and plus maze. Immunohistochemistry investigated changes on oligodendrocytes, astrocytes and neurons morphology for ganglioside A2B5 and structural proteins GFAP and  $\beta$ -III-tubulin respectively. We observed that MCT at 500  $\mu\text{M}$  was toxic for oligodendrocytes and microglia isolated, inducing significant decrease on viability at the first 24 or 72 h after treatment. Treatment from 200  $\mu\text{M}$  MCT also induced reduction on viability in organotypic culture after 24h. However, it induced astrogliosis and proliferation of oligodendrocytes in tissue of the animals. In vivo tests demonstrated with alkaloid decreased drive in normal motor activity and induced anxiolytic-like effects. In this study found already found that treatment with MCT induces activation CYP1A, which may be associated with the generation of active metabolites and neurotoxicity.

#### **4.1- Introdução**

*Crotalaria retusa* é uma planta usada na medicina popular que tem sido relacionada a indução de toxicidade em animais e seres humanos por comprometer o sistema nervoso central (SNC).

Em abordagens anteriores, estudos desenvolvidos pelo nosso grupo determinaram que a MCT e a DHMC apresentaram como alvos moleculares o DNA e proteínas do citoesqueleto neurais específicas como a GFAP e  $\beta$ III-tubulina, MAP e Vimentina e que astrócitos desempenham função no metabolismo e toxicidade ao neurônio (BARRETO et al., 2006, BARRETO et al., 2008, PITANGA et al., 2011).

Neste estudo buscamos compreender, através de análises in vitro e in vivo, o papel da resposta glial na neurotoxicidade induzida pelo alcaloide monocrotalina extraído de *Crotalaria retusa*.

#### **5.0- MATERIAL E MÉTODOS**

Os estudos com animais, provenientes do Centro de Criação de Animais Experimentais da Universidade Federal da Bahia (Salvador, BA, Brasil), foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências da Saúde com protocolo nº027/2012.

## 5.1- Droga e tratamentos

A monocrotalina foi extraída e purificada a partir de um extrato aquoso obtidos de sementes de *C. retusa* através do método de Culvenor e Smith (1957), tal como descrito anteriormente (BARRETO et al., 2006).

Para os tratamentos em cultivo celular, a MCT foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO) para a composição de soluções de estoque à 100 mM e armazenada à -20 ° C. Para o ensaio de intoxicação experimental utilizou-se a monocrolina isolada e diluída em salina e Tween à 2% para o volume fixo de 1 mL.

## 5.2- Avaliação *in vitro* da atividade anticolinesterásica

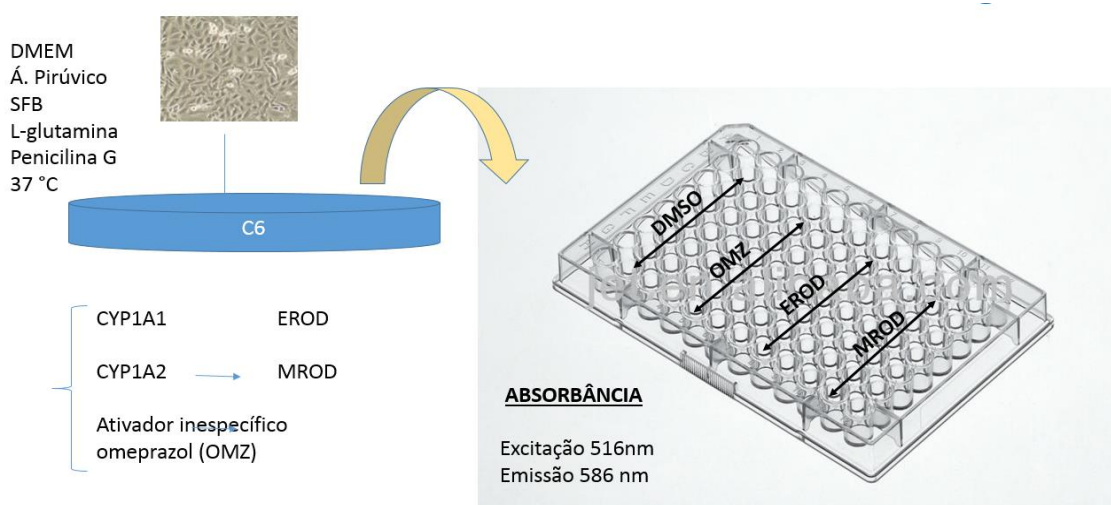
A atividade da acetilcolinesterase foi avaliada de acordo com o método de Ellman (1961) modificado por Atta-ur-Rahman et al. (2001). O método de Ellman baseia-se na conversão da acetiltiocolina em tiocolina, a qual é catalisada pelas colinesterases. O produto da reação (tiocolina) interage com o DTNB, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), formando um ânion amarelo cuja absorbância é medida em espectrofotômetro em 405 nm.

Em cada poço das microplacas (96 poços) foram adicionados 140 µL de tampão Tris-HCl 100 mM, contendo 0,1% de BSA (Albumina do Soro Bovino), 20 µL do alcaloide e controles, e 20 µL da acetilcolinesterase de *Electrophorus electricus* tipo VI (Sigma®) previamente diluída. As placas foram homogeneizadas e incubadas à 37° por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de iodeto de acetilcolina 75 mM e 10 µL de DTNB (10 mM). A absorbância foi medida a 405 nm em leitor de microplaca nos tempos 0 e 30 minutos. A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao controle, conforme utilizado por SANTOS et al., 2012.

### 5.3- Avaliação da atividade catalítica do citocromo P450

Para avaliarmos se as células da linhagem C6 usam a via de metabolização do sistema enzimático citocromo P450 da família 1A, fizemos uma análise utilizando substratos específicos do sistema enzimático citocromo P450. Foram escolhidos substratos específicos das isoformas da CYP450, como a EROD que foi escolhida por ser marcador e substrato específico para CYP1A1 e MROD que é o substrato específico da isoforma CYP1A2 como apresentado na figura 3. Este substrato parece ser metabolizado preferencialmente pela subfamília A1 (PARKINSON, 2001; NIMS e LUBET, 1996; NERURKAR et al., 1993). A atividade do sistema enzimático CYP1A foi determinada medindo a formação da taxa de resorufina pelo substrato ethoxyresorufina, utilizando uma modificação do procedimento descrito por Burke et al., 1974. No momento do tratamento com MCT ou omeprazol, as células foram incubadas com 1 $\mu$ M de etoxyresorufina por 2 horas, a 37°C. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos de cada poço da placa de cultivo e transferidos para placa negra (TPP) e a fluorescência medida no equipamento (Flex Station 3 Benchtop Multi Mode 37 Microplate Reader), com ( $\lambda_{ex}$  = 510nm e  $\lambda_{em}$  = 586nm). A atividade de CYP1A foi expressa em percentual de absorbância em relação ao controle, considerado como 100%.

**Figura 3: Atividade catalítica do CYP450**

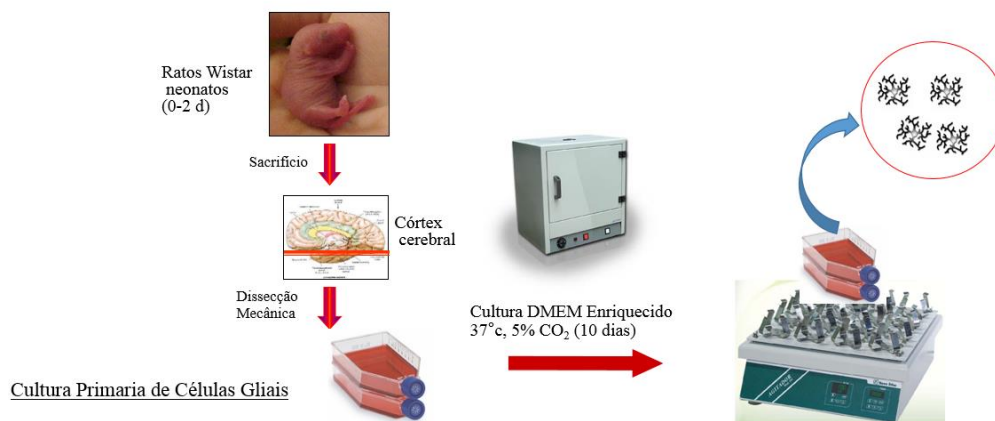


## 5.4- Modelos de Cultivo Celular

### Cultivo Isolado de Microglia

Células da microglia foram obtidas a partir de ratos Wistar com até dois dias de idade segundo protocolo estabelecido por MECHA et al., 2011 demonstrado os procedimentos na figura 4. Os córtex foram dissociados mecanicamente e as células dispostas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> em meio DMEM suplementado com 6,25 µg/ml gentamicina, 2 mM L-glutamina, 0,011 g/L piruvato, 3,6g/L de Hepes, 12 ml/L de glicose, 100 ml/L soro fetal equino e 100 ml/L soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY). As células foram mantidas em cultura mista glial durante 7 ou 10 dias. As células microgliciais foram removidas a partir da cultura mista glial por meio de um agitador rotativo a 400g durante 3 horas a 37°C, e semeadas em placas de cultura de 96 poços. As células foram contadas numa câmara de Neubauer e plaqueadas com densidade de  $2 \times 10^5$ .

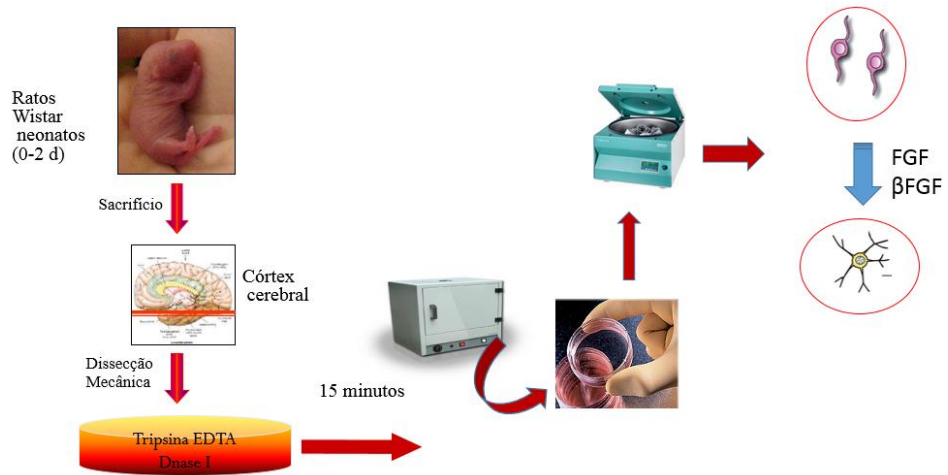
**Figura 4: Cultivo isolado de microglia**



## **Cultivo Isolado de Oligodendrócitos**

Culturas de oligodendrócitos foram obtidas a partir do córtex de ratos Wistar com 0 ou 1 dia de idade, (protocolo disponibilizado pelo Laboratório de Biologia celular e Neuroglia, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidad de Chile conforme citado por LIAZOGHLI, 2012). Os córtex foram dissecados em meio L15 gelado, e a desagregação mecânica foi realizada com bisturi em pequenos cubos e posteriormente dissociação na presença de 500µl de Tripsina EDTA e 5000 UI de DNase I com incubação por 15 minutos em estufa de cultivo a 37° C. Decorrido o tempo foi feito o bloqueio da tripsina com Meio DMEM-HEPES suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e completou-se a desagregação com auxílio de micropipeta automática utilizando ponteiras com filtro. Em seguida, o conteúdo foi transferido para um tubo cônico e submetido a centrifugação de 1.000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em meio de cultivo, do qual se fez a contagem celular para posterior semeadura em frascos de cultivo de 250 ml (TPP Switzerland), conforme demonstrado na figura 5, com a densidade de 3 milhões de células por cada frasco, em 25 ml de meio DMEM-HEPES suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, e mantidos sob as mesmas condições da cultura glial já mencionada. Após 7 dias de cultivo, a monocamada glial foi submetida a agitação para remoção da micróglia, e após 24 horas foi realizada outra agitação a 400 g, a 37°C por 18 horas para obtenção de células progenitoras de Oligodendrócitos. Estas células foram replaqueadas e cultivadas na presença dos fatores de diferenciação e crescimento  $\beta$ FGF e FGF por 48 horas para então se obter os oligodendrócitos maduros.

**Figura 5: Cultivo isolado de oligodendrócitos**



## **Cultivo da linhagem celular C6**

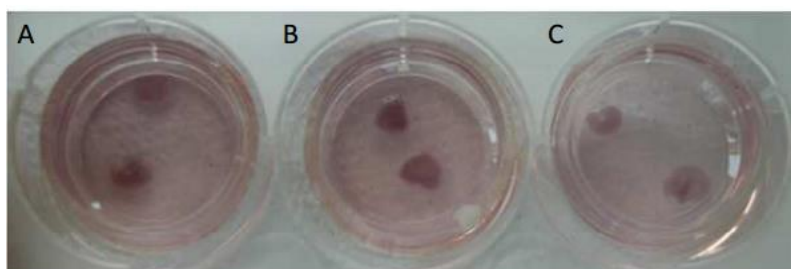
As células da linhagem C6 foram conservadas em uma solução de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10% dimetilsulfóxido (DMSO) à razão de 15.000 células/poço e estocadas em criotubos no nitrogênio líquido a -70°C. Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem de células. As células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM, Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,011 g/L de ácido pirúvico, 2 mM de L-glutamina, 100UI/mL de penicilina G e 7 mM de glicose, e incubadas a 37°C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO<sub>2</sub>, segundo protocolo já bem estabelecido por (COSTA et al., 2001). Quando atingiram a confluência as células foram descoladas das placas de cultura por uma solução contendo 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA, logo após foram lavadas com tampão fosfato (PBS) com pH 7,4. Para os experimentos, as células foram replaqueadas em placas poliestireno de 96 poços (TPP), a uma densidade inicial de  $7,5 \times 10^3$  células/poço. Vinte e quatro horas após a distribuição das células nas placas, estas foram usadas nos experimentos.



## Cultura organotípica

Culturas organotípicas das fatias de tecido cerebral de ratos Wistar foram preparadas de acordo com STOPPINI et al. (1991). As fatias foram obtidas de córtex de ratos Wistar de 6 a 8 dias de idade. O córtex foi dissecado e foram feitos cortes transversais de 600  $\mu\text{m}$  usando o "McIlwain Tissue Chopper®". As dissociações das fatias foram feitas em solução de PBS-glicose e em seguida fez-se o plaqueamento. O cultivo foi feito em membranas Millicell (Millipore), distribuindo-se 2 fatias em cada membrana como se vê na figura 6. As membranas foram colocadas em placas de 6 poços (Millipore) com 1 mL de meio DMEM-F12 e foram mantidas em estufa de  $\text{CO}_2$  (temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$ ) e após horas de cultivo procedeu-se o tratamento.

**Figura:6 Cultura organotípica.**



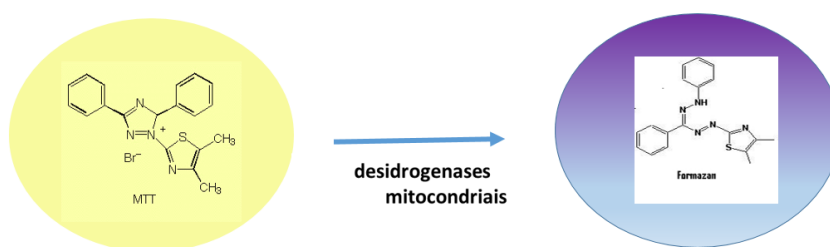
(Arquivo pessoal, LabNq)

### 5.5- Teste de viabilidade celular pelo MTT

O teste do MTT, (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, baseia-se no princípio da conversão do substrato de cor amarelo (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas, em cristais de formazan, de cor violácea (HANSEN et al., 1989) como evidenciado na figura 7. As células gliais e C6 foram cultivadas em placas de cultura

de 96 poços, e expostas à MCT nas concentrações entre 100, 200 e 500  $\mu\text{M}$ , o teste do MTT foi realizado após 24 h. Três horas antes do término do tempo de exposição, o meio de cultura contendo as drogas foi removido e substituído pela solução de MTT (100 $\mu\text{l}$ /poço) a uma concentração final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  diluído em DMEM ou DMEM F12 (Sigma, St Louis, MO). Para completa dissolução dos cristais de formazan, após as três horas de contato com o MTT, foi acrescido um volume de 100  $\mu\text{L}$ /poço de um tampão contendo 20% de duodecil sulfato de sódio (SDS), 50% de dimetilformamida (DMF), pH 4,7, mantendo-se as placas por 12 horas a 37°C. A absorbância óptica de cada amostra foi medida usando um espectrofotômetro (Theratio Plate) em comprimento 21 de onda de 492 nm. Os experimentos foram realizados no mínimo em octuplicata em três experimentos independentes e os resultados apresentados como a porcentagem da viabilidade (media e desvio padrão) em relação ao controle

**Figura 7: Princípio do teste do MTT**



(Adptado de: <http://www.dojindo.com/store/p/309-1-Methoxy-PMS.html>)

## **5.6- Intoxicação experimental com MCT**

### **Grupos e tratamentos**

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais (n = 8 animais do grupo de solução salina e 12 animais no grupo MCT). A administração foi feita por gavagem oral, o volume de dosagem foi estabelecido através do ajuste para assegurar um volume constante (1 ml / kg). A faixa de dose foi selecionada com base na experiência anterior com esse composto para elucidação de efeitos tóxicos experimentais (MATTOCKS 1972). As avaliações comportamentais foram realizadas 72 horas após o tratamento com MCT na dose de 109 mg/kg de peso corpóreo.

Vinte ratos machos Wistar com 60 dias de idade, pesando entre 250 e 300g, foram obtidos a partir do centro de criação de animais para experimentação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, mantidos em ciclo claro / escuro 12 horas (luz acesa às 7:00 am) a uma temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C. Os animais foram alojados em gaiolas-padrão (5 por gaiola) com comida e água comercial ad libitum e foram aclimatados nos laboratórios de pesquisa animal por pelo menos 2 semanas antes dos experimentos. Os animais foram manipulados no mesmo ambiente durante os 6 dias que antecederam o experimento. Procedimentos comportamentais foram conduzidos 10:00 - 17:00 No dia do teste comportamental, os animais foram aclimatados à sala experimental durante pelo menos 60 minutos antes das sessões. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o National Institutes of Health (NIH) Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento recomendações para cuidados com os animais e também foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

## Ensaio Comportamentais

### Open Field (campo aberto)

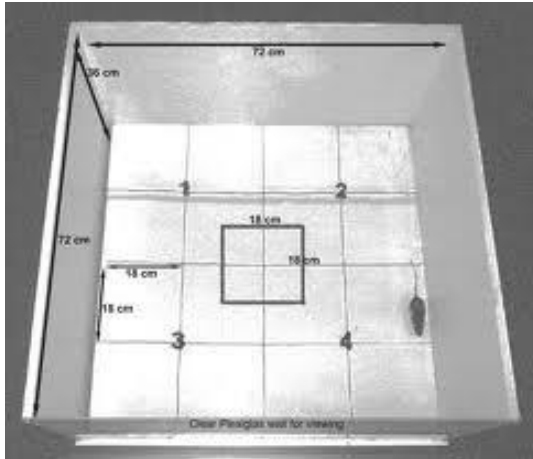
Atividade exploratória, locomotora e comportamento de ansiedade em ratos foram avaliados durante uma sessão de 15 minutos no teste do *Open Field* (Campo Aberto). O teste foi realizado colocando-se suavemente cada animal sem habituação anterior na arena quadrada (50 x 50 x 50 cm de comprimento x largura x altura). Todas as sessões foram gravadas por uma câmera de vídeo (posicionada a cerca de 90° da arena) conectado a um monitor. A análise comportamental foi realizada em um computador laptop usando o software Any-Maze® (Stoelting CO, EUA). Os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados através deste teste: distância total percorrida no aparelho; distância total percorrida na zona centro, o número de entradas de zona centro, o tempo na zona centro e a visita mais longa em zona centro; tempo total de imobilidade e número de episódios de imobilidade (o episódio imobilidade foi considerado através da detecção do software 5 segundos de imobilidade dos animais); e velocidade (este parâmetro foi calculado usando a seguinte fórmula: distância percorrida / (tempo total de teste total - tempo imóvel total)). Para uma análise mais refinada, avaliou-se o minuto em função da distância percorrida minuto, o que permitiu uma avaliação detalhada da atividade exploratória. A atividade dos ratos foram avaliadas durante duas fases do ensaio: nos primeiros minutos, foi possível medir o comportamento exploratório relacionado com a novidade, e nos últimos minutos, a atividade locomotora dos animais após o período de habituação, quando houve uma diminuição na estatística.

## **Labirinto em cruz elevado**

O teste de labirinto foi realizado no mesmo dia do teste de campo aberto. O procedimento foi realizado como previamente descrito (PELLOW et al., 1985). O aparelho foi inteiramente construído em madeira na forma mais utilizada, composta por dois braços abertos (50 x 10 cm, comprimento x largura) perpendiculares entre si e dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm; comprimento x largura x altura) com uma plataforma central (5 x 5 cm; comprimento x largura). A altura do labirinto foi de 70 cm e os experimentos foram conduzidos sob luz vermelha dim (25lux) em uma sala silenciosa. Os animais foram colocados individualmente sobre a plataforma central do labirinto de frente para um braço aberto, e gravados individualmente durante 5 minutos para análise pelo software AnyMaze®. A avaliação dos parâmetros etológicos foram realizados manualmente por um pesquisador através de tratamento cego para análise dos arquivos de vídeo. Os parâmetros analisados foram os seguintes: a porcentagem de tempo nos braços abertos, a porcentagem de entradas nos braços abertos, o tempo total de transições entre os braços abertos e fechados e o número de comportamentos defensivos. Quando houve um aumento estatístico nos dois primeiros itens citados acima, sem qualquer alteração nas transições no total, o tratamento foi considerado ansiolítico. Após cada sessão, o aparelho foi higienizado com álcool a 70% e seco antes da próxima sessão experimental.

A figura 8, exposta a baixo ilustra os equipamentos utilizados para avaliação comportamental.

**Figura 8: Modelos de avaliação comportamental**



**Campo aberto**



**Labirinto em cruz**

### **5.7- Preparo de tecido cerebral**

Os animais foram profundamente anestesiados, via intramuscular com a combinação anestésica de cloridrato de quetamina e cloridrato de xilazina, em seguida realizou-se a perfusão intracardíaca com PBS, sendo este procedimento feito por um período de 15 a 20 minutos ou até serem perfundidos 250 mL da solução. Posteriormente procedeu-se a administração de paraformaldeído à 4% em tampão fosfato. Após perfusão, o tecido encefálico foi removido os quais foram imersos em solução fixadora de formol a 10% em tampão fosfato com pH neutro.

### **Obtenção de cortes histológicos**

Os tecidos foram mantidos em paraformaldeído, e os cortes foram realizados em criostato em secções com espessura de 40  $\mu\text{m}$  e colhidos em tampão fosfato.

### **Marcação imunohistoquímica**

A imunohistoquímica para GFAP e  $\beta$ -3-tubulina foi realizadas pelo método free-floating. Primeiramente as secções foram lavadas 5 vezes (5 min cada lavagem) com PBS 0,01 M para remover a solução preservadora. Após isso foi feito o bloqueio por 30 minutos através de uma solução bloqueadora contendo 0,5% soro equino (Sigma), 1% soro de albumina bovina (Sigma), 0,1% Triton X-100 em PBS 0,01 M e na temperatura ambiente. As secções foram então transferidas para uma solução de anticorpo primário contendo anticorpos IgG de coelho anti-GFAP Dako ou anticorpos IgG de camundongos anti-  $\beta$ -III- tubulina Santa-Cruz, em uma diluição de 1: 200, contendo 0,1% de Triton X-100, 1% albumina sérica bovina, em PBS 0,01 M. As secções foram incubadas 18 h nesta solução, à 4 °C, em câmara úmida. A seguir elas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,01 M durante 10 minutos cada lavagem. Posteriormente, foram então incubadas por 2 h, em temperatura ambiente com anticorpo secundário Alexa fluor 594 fluorescente anti-IgG de camundongo ou Alexa fluor 594 anti-IgG de coelho, diluídos em 1:1000 em PBS.

## 5.8- Análise Estatística

Para determinar a diferença estatística entre os grupos foi realizada uma análise de variância seguida pelo teste One Way ANOVA com pós-teste de Student-Newmann-Keuls (Graph Pad Prisma 5.0 - California, EUA). A viabilidade celular foi calculada em percentagem em relação ao controle negativo que foi considerado como 100%. Valores de  $p^* < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significantes.

Para os testes in vivo a análise estatística foi realizada através da análise GraphPad Prism 6. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão da média (SEM). O limite de significância estatística foi estabelecido em  $p^* < 0,05$ .



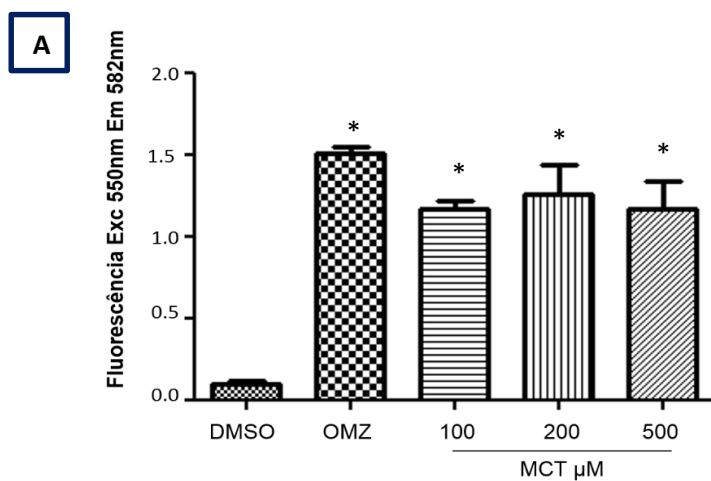
## **6.0- RESULTADOS**

### **6.1- Efeito da monocrotalina sobre a atividade catalítica do sistema P450**

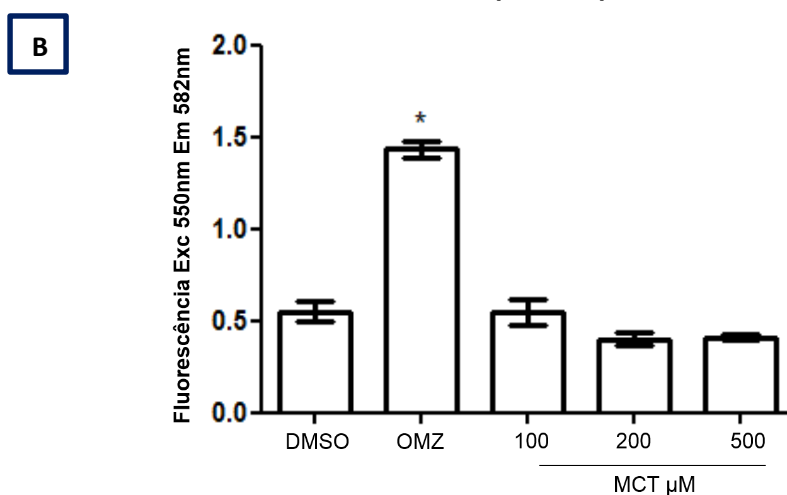
O envolvimento do sistema enzimático CYP1A1 e CYP1A2 na citotoxicidade da MCT foi investigado medindo-se a taxa de formação de resorufina, a partir dos substratos EROD e MROD, respectivamente em culturas de células astrocíticas da linhagem C6. O tratamento com OMZ (20 mM), indutor inespecífico de enzimas CYP450, induziu aumento significativo em cerca de 10 vezes na atividade CYP1A1, 2 h após o tratamento, quando comparado ao controle negativo (DMSO 0,5%). De maneira similar a atividade EROD foi induzida com o tratamento com MCT nas concentrações de 100, 200 e 500  $\mu$ M (Fig. 1 A), sugerindo neste tempo, que a isoforma CYP1A1 de P450 estava ativa ou envolvida no metabolismo da MCT. O tratamento com OMP (20 mM), induziu igualmente aumento significativo em cerca de 3 vezes na atividade CYP1A2, 2 h após o tratamento, quando comparado ao controle negativo (DMSO 0,5%). No entanto, não foi observada alteração significativa da atividade de CYP1A2 após tratamento com MCT (100, 200 e 500  $\mu$ M) (Fig. 9B).

**Figura 9 - Efeito da MCT em cultura de células C6 na atividade de isoformas de citocromo P450 1A.** A atividade das isoforma CYP1A1 e CYP1A2, foi determinada pela decomposição dos substratos específicos etoxiresorufina (EROD), e metoxiresorufina (MROD), respectivamente, e formação de produto fluorescente resorurfina, 2 h após tratamento com OMP (20 mM), indutor inespecífico de enzimas CYP450, MCT (100, 200 e 500  $\mu$ M) ou com veículos DMSO (0.5%).

### CYP1A1 (EROD)



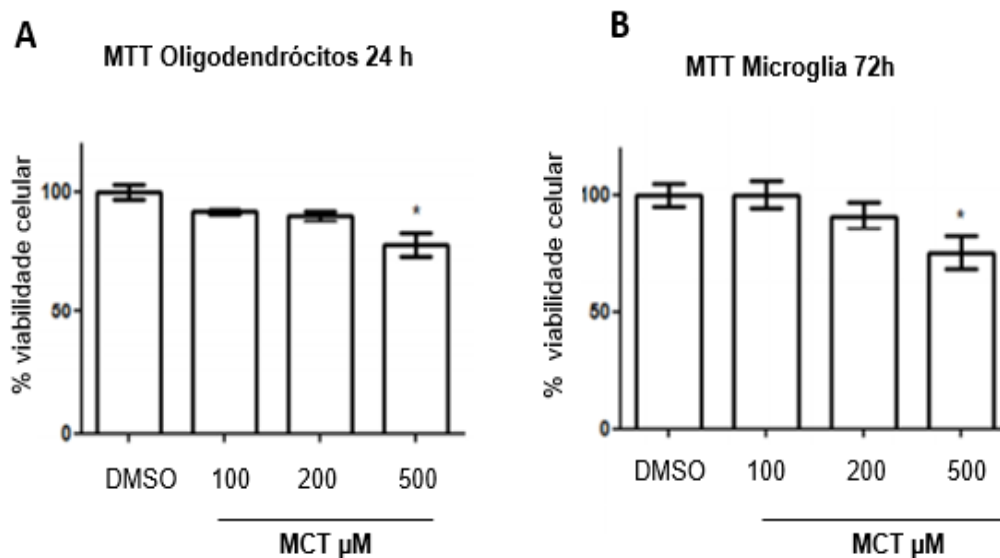
### CYP1A2 (MROD)



## 6.2- Efeito de MCT sobre a viabilidade em cultivos isolados de Microglia e Oligodendrócitos

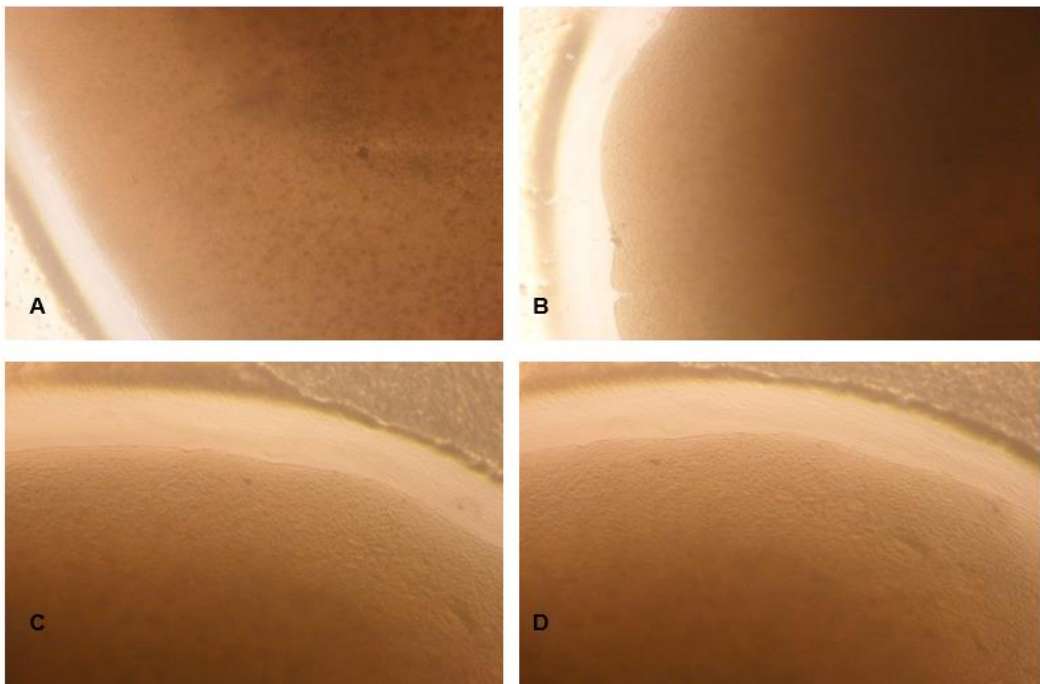
Visando determinar populações de células do SNC alvo do alcaloide MCT (100-500  $\mu\text{M}$ ) investigamos o efeito sobre a função mitocondrial de Microglia e Oligodendrócitos em cultivos isolados através do teste do MTT. Foi observado que o alcaloide na concentração de 500  $\mu\text{M}$  foi citotóxico para oligodendrócitos desde 24 h após tratamento (Fig. 2 A). Por outro lado efeito citotóxico para microglia somente foi observado após 72 h de tratamento com MCT a 500  $\mu\text{M}$  (Fig 2 B).

**Figura 10- Ensaio de viabilidade em cultivos isolados de Microglia e Oligodendrócitos, através do teste do MTT. Análise de dados por ANOVA One Way \*P<0.5.**



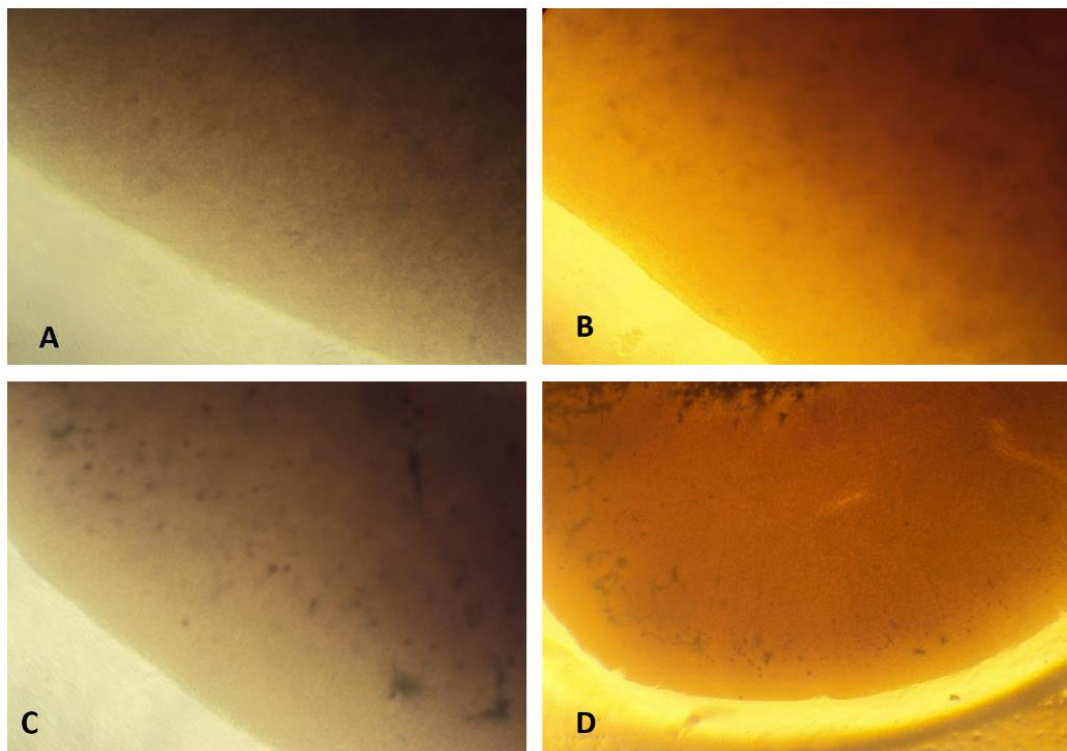
### 6.3- Efeito de MCT sobre a viabilidade celular em culturas organotípicas

Figura 11- Microscopia óptica de cultura organotípica 1 hora após tratamentos e análise da viabilidade celular pelo testes do MTT. A= Controle (DMEM-F12+DMSO); B= 100 $\mu$ M MCT; C=200  $\mu$ M; D=500  $\mu$ M.



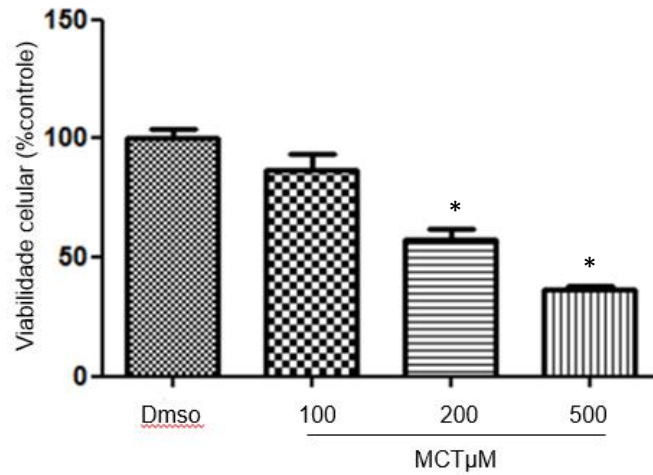
Para verificar o efeito tóxico da MCT em culturas organotípica expostas ao alcalóide MCT foi avaliada a função das desidrogenases mitocondriais através do teste MTT. Uma hora após a exposição à droga, as culturas foram observadas, e verificou-se formação de cristais de formazam em todos os tratamentos.

**Figura 12: Microscopia óptica de cultura organotípica 24 horas após tratamentos e análise da viabilidade celular pelo testes do MTT. A= Controle (DMEM-F12+DMSO); B= 100 $\mu$ M MCT; C=200  $\mu$ M; D=500  $\mu$ M.**



À microscopia foi possível verificar que procedido o tratamento em 24 horas após exposição a MCT as fatias exibiram diminuição da coloração violácea comparativamente, o que indica perda da viabilidade celular.

**Figura 13 - Ensaio de viabilidade em cultura organotípica, através do teste do MTT. Análise de dados por ANOVA One Way \*P<0.5.**



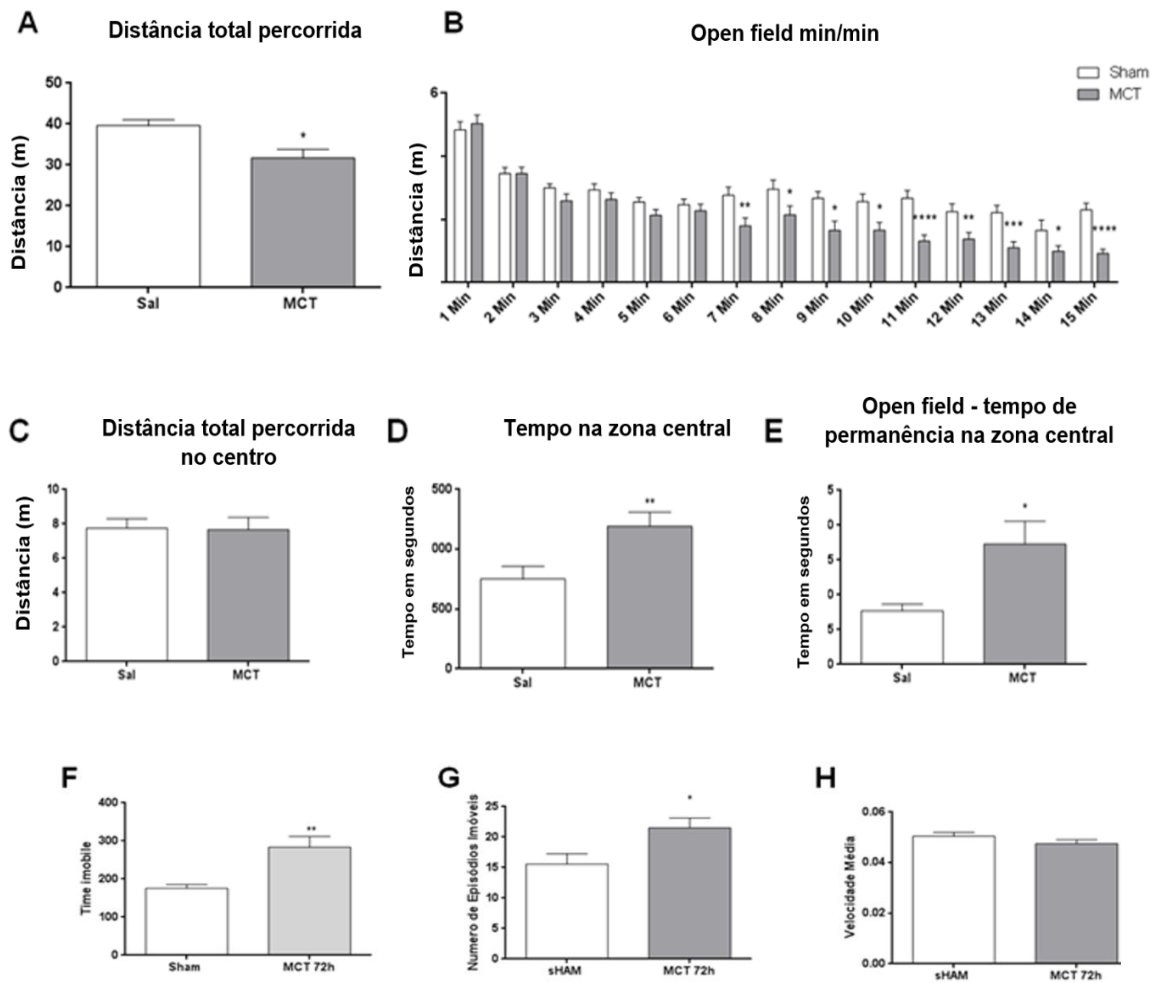
Ao teste do MTT demonstrando redução da metabolização do sal de tetrazólio para a formação em formazam o que expressa a atividade mitocondrial do tecido não havendo danos as bordas teciduais (Fig. 4). As fatias tratadas à concentração de 500μl demonstraram menor conversão evidente pela redução da intensidade de coloração.

#### **6.4- Efeito da intoxicação experimental com o alcaloide MCT em parâmetros comportamentais relacionados a danos no SNC**

A MCT promoveu uma diminuição da atividade motora normal, após o período de habituação ou novidade em ratos submetidos ao desafio do open field.

A análise de campo aberto mostra que o grupo MCT exibiu uma diminuição da distância total percorrida (\*  $p < 0,05$ ; Fig. 14 A). Na análise ao longo do tempo foi possível observar que não houve diferença no perfil do período de habituação representado nos primeiros minutos do teste, em comparação com o MCT grupo tratado com salina. No entanto, a partir do sétimo minuto do teste, foi possível detectar claramente uma significativa diminuição na distância total percorrida entre os últimos minutos no grupo tratado com MCT (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; Fig.14 B). Além disso, em parâmetros medidos na zona central houve um aumento significativo no tempo total na zona central (\*\*  $p < 0,01$ ; Fig. 14 D), bem como sobre a visita mais longa nesta zona (\*  $p < 0,05$ ; Fig. 14 E) no grupo tratado com MCT, sem qualquer diferença na distância percorrida entre os grupos analisados (Fig. 14 C). Finalmente, houve um aumento significativo no tempo total de imobilidade (\*\*  $p < 0,05$ ; Fig. 14 F) e no número de episódios de imobilidade (\*  $p < 0,05$ ; Fig 14 G) (analisar o andamento de imobilidade OE número de Episódios imóveis com Relação ao Tempo) no grupo tratado com MCT, sem qualquer diferença de velocidade média (Fig. 14 H).

**Figura 14: Avaliação do efeito de MCT sobre a atividade motora, dados reportados como Média  $\pm$  Desvio padrão, análise de dados por Student's test considerando  $p^* p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$  comparado ao grupo tratado com salina.**



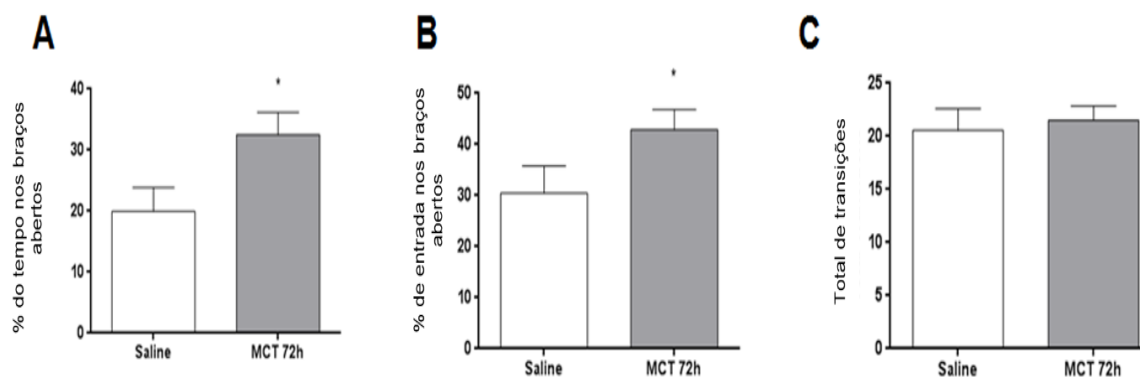
**Figura 7. Total da distância percorrida (A), Distância percorrida em função do tempo (B), distância percorrida na zona do centro (C), tempo na zona do centro (D), Longa visita a zona do centro (E), tempo de imobilidade (F), número de episódios de imobilidade (G) e velocidade media (H).**



## 6.5- Efeito ansiolítico induzido após administração de MCT

Os animais tratados por gavagem oral com dose 109 mg/kg de MCT após 72 h apresentaram comportamento do tipo ansiolítico, causando melhoria significativa da percentagem de tempo despendido nos braços abertos (Fig. 15A, \*  $p < 0,05$ ) e no número de entradas nos braços abertos (Fig. 15B, \*  $p < 0,05$ ). Em contraste, não houve alteração significativa nas transições dadas para qualquer tratamento (Fig. 15C)

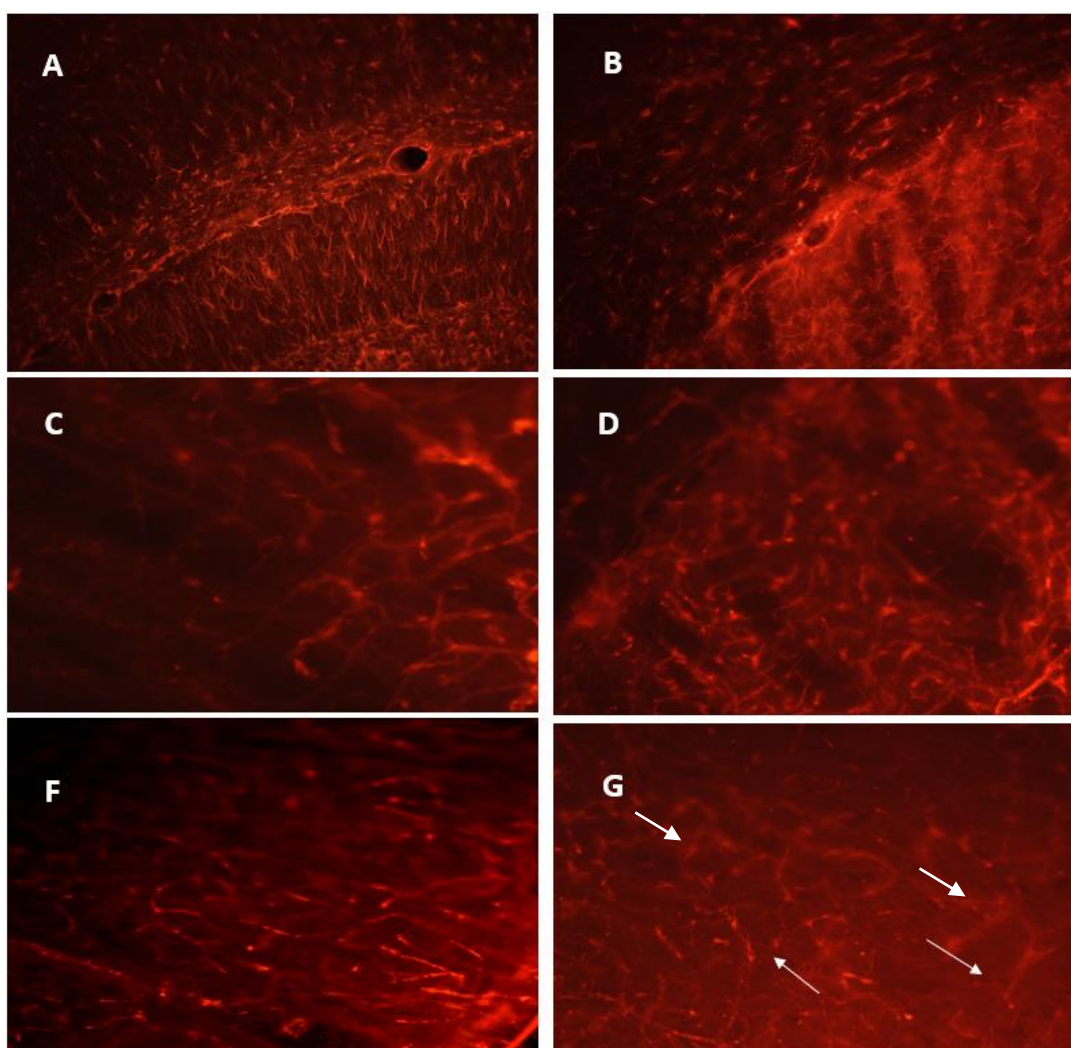
**Figura 15: Avaliação do efeito ansiolítico da MCT, dados reportados como Média  $\pm$  Desvio padrão, análise de dados por Student's test considerando  $p^* < 0.05$  comparado ao grupo tratado com salina.**



## 6.6- Efeito da intoxicação experimental com o alcaloide MCT na expressão de proteínas marcadores de neurônios e células gliais

**Figura 16: Imunohistoquímica (IHQ) em cérebros de animais intoxicados experimentalmente com MCT (B, D e F) ou controles com Salina 0,9% (A, C e E).**

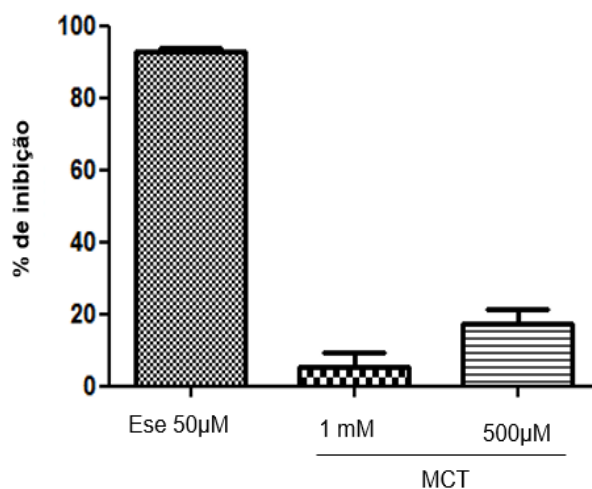
A e B=proteína ácida glial fibrilar (GFAP). C e D= marcador de gangliosídeos presentes em oligodendrócitos jovens (A2B5). E e F = proteína do citoesqueleto  $\beta$ -III-tubulina neuronal.



A figura representa a mudança fenotípica de GFAP (16B) em relação ao seu controle (16A). A marcação do gangliosídeo A2B5 mostra marcação mais evidente para o grupo tratado expresso (16D) quando comparado a condição controle (16C). Na marcação dos túbulos neuronais observa-se encurtamento dos prolongamentos expresso no grupo tratado (16F), destacando-se o detalhe, em comparação ao seu controle (16E).

### 6.7- Atividade da acetilcolinesterase (Ache)

**Figura 17: Inibição da atividade da AChE por MCT. Análise de dados por ANOVA One Way \*P<0.5.**



A figura apresenta os percentuais de inibição da atividade da AChE por MCT e pelo controle positivo Eserina. Nas concentrações testados para a avaliação da inibição da AChE a MCT não apresentou atividade inibitória sobre a acetilcolinesterase.

## 7.0- Discussão

Para a identificação de populações celulares alvo submetemos cultivos isolados de oligodendrócitos e microglia a exposição à monocrotalina, sendo observada sensibilidade destes dois tipos celulares.

A função estruturante dos oligodendrócitos de compor a bainha de mielina tem sido amplamente descrita sendo fundamentais para a condução rápida dos impulsos nervosos (SCHREINER,2015). Ainda, entre as funções descritas dos oligodendrócitos podemos correlacionar ao presente estudo a capacidade de reagir frente à danos inflamatórios (SUNDARAM et al., 2014). O aumento da expressão do marcador de gangliosídeo presente na membrana celular de oligodendrócitos jovens, o A2B5 tem sido relacionado à estudos de proliferação destas células. O papel destas células frente a inflamação decorrentes de neuropatologias são investigadas e foi demonstrado influencia na expressão de citocinas pró-inflamatórias no microambiente neuronal (RAHMOUNE et al 2012). Mecanismos pelos quais os oligodendrócitos podem tornar-se sensíveis à efeitos tóxicos foram demonstrados em estudos os quais indicaram que os oligodendrócitos possuem uma importante rota para o catabolismo do triptofano, a via da quineurina que resulta em diversos metabólitos neuroativos com importância em doenças neurodegenerativas (SUNDARAM et al., 2014). Lesões inflamatórias crônicas ou agudas podem ativar exaustivamente a via da quineurina e torná-la potencialmente tóxica as diversas células componentes do sistema nervoso central.

Ensaio de toxicidade em modelos de cultivos isolados de oligodendrócitos ou micróglia expostos à monocrotalina a 500  $\mu$ M por 72 h demonstraram sensibilidade direta destas células ao alcaloide. Este achado reforça a importância de se investigar mecanismos do metabolismo de drogas in loco no SNC.

Alterações astrocitárias são sinais das patologias neurais e lesões cerebrais caracterizadas por alterações morfológicas, fisiológicas e moleculares nos astrócitos (GOMES et al., 2013).

A proteína ácida do filamento do esqueleto astrogial GFAP é encontrada na substância branca e cinzenta do sistema nervoso central e é considerada específica do cérebro. A GFAP é liberada rapidamente para fora do cérebro danificado e é regulada através astrogiose. Alterações na expressão da proteína ocorrem frente a danos tóxicos, inflamatórios e traumáticos constituindo um marcador de ativação astrocitária (TARDY, et al., 2002).

BARRETO et al. (2006), descreve efeitos da monocrotalina sobre GFAP em cultura primária glial relatando que a droga produziu modificações fenotípicas deste fundamental componente do citoesqueleto, no entanto não promoveu diferenças significativas na viabilidade dos astrócitos corticais.

Os achados biomoleculares deste estudo sugerem que a MCT pode ser potencialmente tóxica em cultivos isolados na ausência das células astrocíticas devido a capacidade depurativa destas células, e ainda a importante função dos oligodendrócitos na resposta frente à intoxicação em modelos com interações celulares mais complexas.

PITANGA et al. (2011), observou em co-cultivos com neurônios e astrócitos tratados com MCT alterações na distribuição de GFAP e polimerização da proteína  $\beta$ 3-tubulina, um marcador de microtúbulos específicos de neurônios. Ainda neste estudo foi descrito que a toxicidade da MCT em co-culturas é revertida quando da adição do inibidor inespecífico do citocromo P450 (CYP450) indicando envolvimento desta via de detoxificação no metabolismo e toxicidade da MCT em células do SNC.

No presente estudo observamos por meio de imunohistoquímica evidentes modificações fenotípicas no padrão de GFAP em animais tratados com monocrotalina, outro aspecto analisado foi o encurtamento dos axônios e aumento do corpo celular neuronal vistas através da marcação de  $\beta$ -III-tubulina.

Os microtúbulos são longos filamentos construídos a partir de polímeros de tubulina e são essenciais em todas as células eucarióticas, cruciais para o desenvolvimento e manutenção da morfologia celular, para o transporte de vesículas na sinalização celular, divisão celular e mitose (SÉVE e DUMONTET, 2008). Por tanto, divergências na expressão do seu padrão constituem um indício importante de injúria e podem inclusive comprometer as sinapses.

Os axônios são essenciais para o funcionamento do sistema nervoso central e periférico, eles são vulneráveis e muitas vezes insubstituíveis. Neste sentido, associações entre perdas axonais e desordens degenerativas do SNC em modelos biológicos constituem-se recentemente em um método de vanguarda para estudos (COLEMAN e RIBCHESTER, 2004).

Visando elucidar este mecanismo realizamos experimentos em cultivos da linhagem astrocítica C6. Observamos ativação da subfamília CYP2A1 através do substrato etoxiresorufina (EROD), semelhante àquela do indutor inespecífico omeprazol.

A expressão do citocromo P450 é regulável pela presença de seus substratos no fígado e outros tecidos, e algumas substâncias podem servir como indutores (MATHEWS e HOLDE, 1990). Desta forma o citocromo P450 tem importante participação nas reações de biotransformação nos vários tecidos onde são expressos, sendo assim, responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos lipossolúveis (MANAHAN, 2000). Os níveis totais de CYP no cérebro são baixos, aproximadamente 0,5-2% daqueles no fígado, o que é pouco provável que o metabolismo mediado pelo CYP no cérebro influencie substancialmente os níveis de metabólitos sistêmicos (HEDLUND et al., 2001). Em nosso estudo, utilizamos o substrato etoxiresorufina, específicos das famílias CYP 1A1 nas culturas tratadas com o MCT ou omeprazol.

Estes substratos, quando em contato com maquinaria celular são convertidos em produto fluorescente, resorufina, mostrando o envolvimento destas famílias na metabolização da MCT. Investigamos o envolvimento de CYP1A1 pelo fato de células astrocíticas expressarem muitas isoformas de CYP 1A (FERGUSON e TYNDALE, 2011) e pelo fato desta isoformas ser expressa em nosso modelo in vitro de cultura de células astrocíticas da linhagem C6. Nossos resultados mostraram aumento na conversão de etoxiresorufina a resorufina nas culturas tratadas com ambos MCT e OMZ, indicando que ocorreu ativação da CYP1A, reforçando o papel do metabolismo astrocitário na neurotoxicidade da MCT e de outros compostos xenobióticos.

Visando compreender a toxicidade da MCT em sistemas mais complexos de interação entre células gliais e neurônios, realizamos estudo de toxicidade em culturas organotípicas de córtex cerebral de rato foi verificada toxicidade corroborando com os achados in vitro de co-culturas glia/neurônios destacando o papel das interação celulares na neurotoxicidade da MCT.

Outro mecanismo de neurotoxicidade investigado foi a capacidade de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase enzima responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima cuja ação é crucial na propagação do impulso nervoso. A AChE inativa a ação do neurotransmissor acetilcolina hidrolisando-o em acetato e colina. A acetilcolina é sintetizada e armazenada em vesículas no neurônio pré sináptico, sendo que a liberação depende de alterações iônica e elétrica da membrana plasmática. A despolarização da membrana plasmática do neurônio pré sináptico promove o influxo de  $Ca^{2+}$  seguida de fusão de vesículas sinápticas com a membrana plasmática. Essa fusão promove a liberação de acetilcolina na fenda sináptica e difusão até o receptor localizado na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico. Antes que ocorra nova liberação de acetilcolina, a molécula previamente liberada deve ser hidrolisada pela AChE (MOTA et al., 2012). Danos funcionais, associados ao sistema motor ou ao estado de alerta já foram descritos quando há inibição deste neurotransmissor (VINUTHA et al., 2007). Observamos que a MCT não alterou atividade da enzima sugerindo que não há

envolvimento desta via de depuração de neurotransmissor na neurotoxicidade e alterações no comportamento. Ainda neste estudo, sobre a inibição da AChE por extratos de plantas medicinais indianas, propõe-se a classificação dos extratos analisados em: inibidores potentes (>50% de inibição), inibidores moderados (30-50% de inibição) e inibidores fracos (<30% de inibição). A partir deste dado, podemos considerar a MCT como um inibidor fraco.

Análises histopatológicas realizada nos animais intoxicados experimentalmente com MCT evidenciaram lesões vasculares como hemorragia e teleangiectasia no neocortex, troco encefálico e terceiro ventrículo, sugerindo ocorrência de hipertensão cerebral com consequente dano isquêmico (dado não mostrado).

A MCT é amplamente utilizada em modelo de hipertensão pulmonar (POLÔNIO et al., 2012), e já tendo sido demonstrado que o desafio biológico da hipertensão vascular espontânea é suficientemente capaz de promover o aumento da expressão e biossíntese de GFAP semelhante a condições de doenças neurodegenerativas (TOMASSONI et al., 2004), apontamos que a modificação fenotípica encontrada pelo marcador GFAP pode estar relacionada ao efeito hipertensivo e hemorrágico deste alcaloide. Estes efeitos hipertensivos associados a neuroinflamação torna susceptível a neurodegeneração como descrito na literatura (GOEL et al., 2015)

Na avaliação comportamental foram observadas redução da distância percorrida, redução da exploração da periferia e maior permanência no centro. Estes resultados evidenciaram que a administração de MCT 109 mg/ kg de peso corpóreo, foi capaz de induzir o efeito ansiolítico. Além disso, é importante ressaltar que o principal objetivo que nos levou a investigar este efeito na exposição ao alcaloide foi o comportamento à campo dos animais intoxicados, bem como as alterações vistas a nível celular em modelos experimentais, contudo não podemos confirmar o mecanismo pelo qual a MCT induz comportamento ansiolítico. No entanto, a MCT parece ter um papel neuromodulador no sistema nervoso central, isto é atribuído ao efeito neurotóxico e comportamental após a administração oral em roedores.



No teste do campo aberto foram avaliados alguns parâmetros como distância total percorrida no aparelho; distância total percorrida na zona centro, o número de entradas de zona centro, o tempo na zona centro e a visita mais longa em zona centro para inferir a atividade exploratória do animal, que pode ser afetada por fármacos com ação no SNC; tempo total de imobilidade e número de episódios de imobilidade e a velocidade, que avaliam o grau de sedação ou medo (ansiedade) e podem ser alterados por fármacos com atividade ansiolítica/ansiogênica (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946). O grupo tratado com MCT promoveu uma diminuição da atividade motora normal, sem qualquer alteração no perfil de habituação à novidade. Nas doses utilizada houve redução no número total de cruzamentos, evidenciando uma ação do alcaloide na atividade locomotora dos animais. O tempo de imobilidade também foi diminuído, o que é sugestivo de uma atividade depressora no SNC, sugerindo uma ação ansiolítica com comprometimento motor.

O efeito ansiolítico demonstrado neste trabalho através do teste do labirinto em cruz pode estar associado a modificações na excitabilidade neuronal promovida pela interação com o agente tóxico com os receptores ionotrópicos de glutamato atuando como antagonista ou ainda, em segunda hipótese atuar promovendo aumento de captação astrocítica do neurotransmissor, efeito este que pode contribuir para a toxicidade neuronal (CAROBREZ, 2003).

## 8.0- Conclusão

As interações celulares no SNC tem relevante importância na resposta resposta ao dano tóxico induzido pela MCT

Microglia e oligodendrócitos, podem constituir-se alvos da ação do alcaloide em modelos de cultivos isolados.

O alcaloide demonstrou efeito direto sobre a atividade motora e ansiolítica

Elucidamos o envolvimento da subfamília CYP1A1 no metabolismo deste alcaloide em células gliais

Apontamos a linhagem C6 como modelo biológico efetivo para o esclarecimento de metabolismo de monocrotalina no SNC

Demais estudos se fazem necessários para aplicação do alcaloide em modelo de estudo de hipertensão vascular cerebral

Assim, os resultados apresentados neste trabalho contribuem para ampliar a ação da monocrotalina, que além de apresentar potentes efeitos neurotóxicos, está se mostrando também como moduladora de atividades comportamentais.

## 9.0- REFERÊNCIAS

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, vol.21, p.205-235, 1973.

ASRES, K.; SPORER, F.; WINK, M. Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, p. 915-930, 2004.

ASSIS T.S., MEDEIROS R.M.T., RIET-CORREA F., GALIZA G.J.N., DANTAS A.F.M. E OLIVEIRA D.M. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.* Vol.30, p13-20, 2010.

BARBOSA, R. R., FILHO, M. R. R., SILVA, I. P. Poisonous plants to livestock: importance and methods for study. Universidade Federal Rural do Semi-árido. *Acta Veterinaria Brasília*. v.1, n.1, p.1-7, 2007.

BARRETO, R.A.; HUGHES, J.B.; SOUZA, C.S.; SILVA, V.D.A.; SILVA, A.R.; VELOZO, E.S.; BATATINHA, M.J.M.; COSTA, M.F.D.; EL-BACHÁ, R.S.; COSTA, S.L. O alcaloide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 7, n. 2, p. 112-127, 2006.

BARRETO, R. A; SOUSA, C. S; SILVA, V. D. A; SILVA, A. R; VELOSO, E. S; CUNHA, S. D; COSTA, M. F. D; EL-BACHÁ, R. S., and COSTA, S. L. Monocrotaline pyrrolis alters the patterns of GFAP expression on astrocyte primary cultures. *Toxicology in Vitro*. v. 22, p. 1191–1197, 2008.

BARRETO, R. A; HUGHES, J. B; SOUSA, C. S; SILVA, V. D. A; SILVA, A. R; VELOSO, E. S; BATATINHA, M. J. M; COSTA, M. F. D; EL-BACHÁ, R. S., and COSTA, S. L. (2006). O alcaloide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. **Ver.Bras. Saúde Prod. Anim.** v. 7, p. 112-127, 2004.

BARRI MES, ADAM SEI 1981. The toxicity of *Crotalaria saltiana* to calves. **Journal of Comparative Pathology**. 91: 621-627.

BENDA, P.; LIGHTBODY, J.; SATO, G.; LEVINE, L.;SWEET, W. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. **Science**. vol. 161. p.370-371, 1968.

BELANGER, P.J. MAGISTRETTI. The role of astroglia in neuroprotection. **Dialogues Clin. Neuroscience**, vol.11, p281–295, 2009.

BOULANGER, J.J, MESSIER, C. From precursors to myelinating oligodendrocytes: Contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain. **Neuroscience**, Vol. 269, , P343–366, 2014.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal Odealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. **Drug metabolism and Disposition**. vol. 2, p 583-588, 1974.

CAMARGO, M. A. Coleção perito criminal federal: farmacologia – São Paulo: Saraiva 2012.

CAROBREZ, A.P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. **Rev Bra Psiquiat**. Vol.8, p52-59,2003.

CASARETT, L. J., KLAASSEN, C. D., AMDUR, M. O., & DOULL, J. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. New York, McGraw-Hill, Health Professions Division, 1996.

CHEEKE, P. R. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 9, p. 2343-2350, 1988.

COLEMAN, M.P. AND RIBCHESTER, R.R. Programmed Axon Death, Synaptic Dysfunction and the Ubiquitin Proteasome System. **Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders**, vol.3, p227-238, 2004.

COOKSON, M. R.; and PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicology in Vitro**. vol. 8, p. 351-359, 1994.

COSTA, S.L. et al. Astroglial permissivity for neurotic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability. **Glia**, vol.37, p105–113, 2002.

COSTA, S.L.; PAILLAUD, E.; FAGES, C.; ROCHETTE-EGLY, C.; JOUAULT, H.; PERZELOVA, A.; TARDY, M. Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. **Eu. J Cancer**, vol.37 p.520-530. 2001

CRAWFORD, A.H.; STOCKLEY, J.H.; TRIPATHI, R.B.; RICHARDSON, W.D.; FRANKLIN, R.J. Oligodendrocyte progenitors: adult stem cells of the central nervous system?. **Experimental Neurology**, Vol. 260, P50–55, 2014.

COOKSON, M. R.; and PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicology in Vitro**. vol. 8, p. 351-359, 1994.

LIAZOGHLI, D; ROTH A. D; THOSTRUP,P.; COLMAN, D. R.: Substrate Micropatterning as a New in Vitro Cell Culture System to Study Myelination. **ACS Chem. Neurosci**. Vol.3, p.90–95, 2012.

DHAWAN, A.; PARMAR, D.; DAYAL M.; SETH P.K.: Cytochrome P450 (P450) isoenzyme specific dealkylation of alkoxyresorufins in rat brain microsomes. **Mol Cell Biochem**. vol.;200, p169-76, 1999.

DHAWAN, A; PARMAR, D, D, M; SETH P,K: 7-Ethoxyresorufin-Odeethylase: A cytochrome P448 dependent enzyme in mammalian brain. **Eur J Pharmacol** (Brief Communication) vol.183: p1509–1510, 1990.

DHOLE, J.A.; DHOLE, N.A.; LONE, K.D.; BODKE, S.S. Preliminary phytochemical analysis and antimicrobial activity of some weeds collected from Marathwada Region. **Journal of Research in Biology**, v. 1, n. 2, 2011.

DUTHEIL, F.; BEAUNE, P.; and MARIE-ANNE, L. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain. **Biochimie**. vol. 90, p. 426-436, 2010.

FEI HE; YI E SUN. Glial cells more than support cells?:**The international journal of biochemistry & cell biology**, v.39, p.661-5, 2007.

FENG, Z.; ZHANG, J.T. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma C6 cells and its mechanism. **Free Radic Biol Med**, vol.3, p1790-1801, 2004.

FERGUSON, C. S.; TYNDALE, R. F. Cytochromes P450 in the brain: emerging evidence for biological significance. **NIH Public Access**. Vol.32, p.708–714. 2011.

GOMES, F. C. A.; TORTELLI, V. P.; DINIZ, L. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estud. av.**, v. 27, p. 61-84, 2013

FRANCO, Y. O.; FRANCO, M. L. Biotransformation: importance and Toxicity. **SAÚDE REV. Piracicaba**, vol.5, p.69-76, 2003.

FUNCHAL C, SANTOS, A.Q.; JACQUES-SILVA M.C.; ZAMONER, A.; GOTTFRIED, C.; WAJNER, M.; PESSOA-PUREUR, R. Branched-chain alpha-keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in C6-glioma cells. **Metab Brain Dis**. Vol.20, p205-207, 2005.

GOEL, R., BHAT, S.A., RAJASEKAR, N., HANIF, K., NATH, C., SHUKLA, R. Hypertension exacerbates predisposition to neurodegeneration and memory impairment in the presence of a neuroinflammatory stimulus: Protection by angiotensin converting enzyme inhibition. **Pharmacol Biochem Behav**. 2015

GRAÇA, D. L. E. F., PEREIRA, L. A. V. D., FERNANDES, C. G., e MAIORKA, P. C. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 59, n. 2B, p. 358-361, 2001.

HAAS, J. S.; NOWOTNY T. N.; ABARBANEL, H. D. I. Spike-timing-dependent plasticity of inhibitory synapses in the entorhinalcortex.J. **Neurophysiol**. v.96, p.3305-3313. 2006.

HAGEMeyer, C.E.; ROSENBROCK, H.; DITTER, M.; KNOTH, R. and VOLK, B. Predominantly neuronal expression of cytochrome P450 isoforms cyp3a11 and cyp3a13 in mouse brain. **Neuroscience**, vol.117, p.521-529, 2003.

HAINING, R, L; HAINING, M, N. Cytochrome P450-catalyzed pathways in human brain: Metabolism meets pharmacology or old drugs with new mechanism of action? **Pharmacology eTherapeutics**. Vol.113, p537–545, 2007.

HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; Berg K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol Methods**. vol.119, p.203–10, 1989.

HARRY, G. J.; TYLER, K.; D'HELLENCOURT, C. L.; TILSON, H. A.; MAIER, W. E. Morphological alterations and elevations in tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\alpha$ , and IL-6 in mixed glia cultures following exposure to trimethyltin: modulation by proinflammatory cytokine recombinant proteins and neutralizing antibodies. **Toxic and Applied Pharmacol**. vol. 180, p. 205-218, 2002.

HATTEN, M. E.; LIEM, R. K.; MASON, C. A. Weaver mouse cerebellar granule neurons fail to migrate on wild-type astroglial processes in vitro. **Journal of Neuroscience**. v.6, p.2676-2683, 1986.

HEDLUND, E.; GUSTAFSSON, J.Å. e WARNER, M. Cytochrome P450 in the Brain; A Review. **Current Drug Metabolism**, vol.2, p245-263, 2001.

HUGHES, J. B.; SILVA, V. D. A.; SILVA, A. R.; SOUZA, C. S.; SILVA, A. M. M., HUXTABLE, R. J. Activation and pulmonary toxicity of pirrolizidine alkaloids. **PharmacTher**. V.47, p.371. 2006.



HUXTABLE, R. J. Activation and pulmonary toxicity of pirrolizidine alkaloids. **PharmacTher.** Vol.47, p.371. 1990.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2009. Acesso em: 29 mar. 2012.  
Disponível em:  
[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_impresao.php?](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impresao.php?)

JÚNIOR, J.E.R H. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 453-458, 2010.

KIM Y.A.; LIM S.Y.; RHEE S.H.; PARK K.Y.; KIM C.H.; CHOI B.T.; LEE, S.J.; PARK, Y.M.; CHOI, Y.H. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6glioma cells. **Int. J Mol. Med.** Vol.17, p1069-1075, 2006.

LEE, Y., B.; MORRISON, M.LI, Y; LENGACHER,S.“Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration”, **Nature**, vol. 487, 443-450, 2012.

LEFRANCOIS, T.; FAGES, C.; PESCHANSKI, M., and TARDY, M. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. **J Neurosci.** vol. 17, p.4121-8, 1997.

LENT, Roberto. A neurociência e a lei. **Instituto Ciência Hoje. Publicado em**, vol. 26, 2010.

LISANKA, M. A. et al. Natural and experimental poisoning of goats with the pyrrolizidine alkaloid-producing plant *Crotalaria retusa* L. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, 2013.

LOANE D. J. E BYRNES, K. R. Role of Microglia in Neurotrauma. **Neurotherapeutics**, vol.7, p366-377, 2010.

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J BiolChem**. Vol.193, p265–275, 1951.

MALAPLATE-ARMAND, C., LEININGER-MULLER, B., E BATT, A.-M. Astrocytic cytochromes p450: an enzyme subfamily critical for brain metabolism and neuroprotection. **Rev. Neurol**. vol.60, p651–658, 2004.

MANAHAN, S. E. **Environ Chem**. 7.ed. Boca Raton : LEWIS, 2000.

MARTINEZ, S. T.; SANTOS, A. P.; PINTO, A. C.A Determinação Estrutural do Alcaloide Pirrolizidínico Monocrotalina: Exemplo dos Desafios da química de Produtos Naturais Até os Anos Sessenta do Século XX.**Rev. Virtual Quim**. v5, p. 300-311, 2013.

MATHEWS, C. K.; HOLDE, K. E. van. **Biochem**. Redwood City : Benjamin/Cummings, 1990.

MATTOCKS, A. R. Acute hepatotoxicity and pyrrolic metabolites in rats dosed with pyrrolizidine alkaloids. **Chem.Biol. Interactions**, vol.5, p.227-242, 1972.

MATTOCKS, A. R. Toxicology of pyrrolizidine alkaloids in animal. In: Mattocks A R. **Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids**. New York: Academic Press, p.

191-219, 1986. MEDEIROS R. M. T., GÓRNIAC S. L.; GUERRA J.L. Comparative effects of prenatal and postnatal monocrotaline effects in rats. **Toxic Plants and their Natural Toxicants**. p.312-16,1998.

MATTOCKS, A. R. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Nature**, vol.217, p723-728, 1968. MEAD, C.; PENTREATH, V. W. Hypertrophy and increased glial fibrillary acidic protein are coupled to increased protection against cytotoxicity in glioma cell lines. **Toxicology in vitro**. vol. 12, p. 141-52, 1998.

MECHA, M., IÑIGO, P. M., MESTRE, L., HERNANGÓMEZ, M., BORRELL, J., & GUAZA, C. An easy and fast way to obtain a high number of glial cells from rat cerebral tissue: a beginners approach. **Protocol Exchange**, p.218. 2011.

MEDEIROS, R.M.T.; GÓRNIAC, S.L.; GUERRA, J.L. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 69, p. 181-188, 2000.

MEYER, R. P., GEHLHAUS, M., KNOTH, R. and VOLK B..**Expression and Function of Cytochrome P450 in Brain Drug Metabolism**. **Current Drug Metabolism**, v.8, p.297-306. 2007.

MEYER, R.P.; KNOTH, R.; SCHILTZ, E.; VOLK, B. Possible function of astrocyte cytochrome P450 in control of xenobiotic phenytoin in the brain: in vitro studies on murine astrocyte primary cultures. **Exp Neurol**,. vol.167,p.376-84, 2001.

MIKSYS, S., et al. Cytochrome P450–mediated drug metabolism in the brain. **J Psychiatry Neurosci**. Vol.38, 2013.

MINGATTO, F.E.; DORTA, D.J.; SANTOS, A.B.; CARVALHO, I.; SILVA, C.H.T.P.; SILVA, V.B.; UYEMURA, S.A.; SANTOS, A.C.; CURTI, C. Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. **Toxicol**, vol. 50, p.724-730, 2007.

MOTA, W.M.; BARROS, M.L.; CUNHA, P.E.L.; SANTANA, M.V.A.; STEVAM, C.S.; LEOPOLDO, P.T.G., FERNANDES, R.P.M. Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, vol.14, p.624-628, 2012.

MOREST, D. K.; SILVER, J. The precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: What are they? Where are they from? How do they get where they are going? **Glia**, vol.43, p6-18, 2003.

MURAI, K. K.; HABER, H.; LEI Z. Cooperative Astrocyte and Dendritic Spine Dynamics at Hippocampal Excitatory Synapses. **The Journal of Neuroscience**. vol.26, p.8881–8891, 2007.

MÜLLER, H. L. CHILDHOOD CRANIOPHARYNGIOMA – current concepts in diagnosis, therapy and follow-up. **Nat. Rev. Endocrinol.** vol.6, p.609–618. 2010.

NERURKAR, P. V.; PARK, S. S.; THOMAS, P. E.; NIMS, R. W and LUBET, R. A. Methoxyresorufin and benziloxoresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. **Biochemical Pharmacology**. v. 46 (5), p. 933-943, 1993.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F E HELMCHEN, F. resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **science**, vol. 308, p. 1314-1318, 2005.

NIMS, R. W. E LUBET, R. A. **CYP2B Subfamily. In: Cytochrome P450: Metabolic and Toxicological Aspects**, (C., IOANNIDES), p. 136 – 151, 1st edition, New York, Boca Raton, CRC Press, 1996.

NOBRE, V. M. D. T., RIET-CORREA, F., BARBOSA FILHO, J. M.; DANTAS; A. F. M.; TABOSA; I. M., e VASCONCELOS, J. S. Poisoning by *Crotalaria retusa* (Fabaceae) in Equidae in the semiarid region of Paraíba. ***Pesquisa veterinária brasileira***, vol.24, 132-143, 2004.

ORELLANA, B.; GUAJARDO, T. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. ***Rev Méd Chile***; vol.132, p. 85-94, 2004.

PARMAR D, DHAWAN A, DAYAL M, SETH PK: Immunochemical and biochemical evidences for expression of phenobarbital (PB) and 3-methylcholanthrene (MC) inducible isoenzymes of cytochrome P450 in rat brain. ***Int J Toxicol***. Vol.17, p619–630, 1998.

PARMAR, D; DHAWAN, A, DAYAL, M; SETH, P, K. Evidence for O-dealkylation of 7-pentoxyresorufin by cytochrome P450 2B1/2B2 isoenzymes in brain ***Mol Cell Biochem***. Vol.189, p201–205, 1998.

PARKER, K.K; NORENBERG M.D.; VERNADAKIS, A. "Transdifferentiation" of C6 glial cells in culture. ***Science***, vol. 11, p-179-181, 1980.

PARKINSON, A. **Biotransformation of xenobiotics**. In: Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 9th edition, New York, McGraw\_Hill, Inc. p.113-186, 2001.

PELLOW, S., CHOPIN, P., FILE, S. E., & BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. ***Journal of neuroscience methods***, vol14, p149-167, 1985.

PESSOA, C.R.M.; MEDEIROS, R.M.T.; RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesq. Vet. Bras**, vol.33, p.752-758, 2013.

PITANGA, B. P., SILVA, V. D. A., SOUZA, C. S., JUNQUEIRA, H. A., FRAGOMENI, B. O., NASCIMENTO, R. P., E COSTA, S. L. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. **NeuroToxicology**, 32, p.776-784, 2011.

PITANGA, B. P.S. Avaliação da neurotoxicidade do alcalóide monocrotalina extraído de *Crotalaria retusa* L. (fabaceae) em co-cultura neurônio/glia. **Dissertação de Mestrado**. UFBA, 2008.

POLÔNIO, I. B., ACENECIO, M. M.P., PAZETTI, R., ALMEIDA, F. M., CANZIAN, M., SILVA, B. S. Comparação de dois modelos experimentais de hipertensão pulmonar. *J Bras Pneumol*. Vol.38, P452-460, 2012.

PRAKASH, A. S.PEREIRA, T. N.; WEBB, R.I.; REILLY, P.E.B.; SEAWRIGHT, A. A. Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks, **Nucleic Acids Research**. vol. 26 , p. 5441–5447, 1998.

RATABOUL, P. ; VERNIER, P. ; FAUCON-BIGUET, N. ; MALLET, J. ; POULAT, P. ; PRIVAT, A. Modulation of GFAP mRNA levels following toxic lesions in the basal ganglia of the rat. **Brain Res**. vol. 174, p. 283-308,1989.

RAHMOUNE H.; LAURA, W. H.; PAUL, C. G.;SABINE,B. Targeting the inflammatory component of schizophrenia. **Revista clínica de psiquiatria**, vol.40, p28-34, 2012.

RHEE, I.K. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography**, vol.915, p.217-23, 2001.

RIET-CORREA F. E MEDEIROS R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesq. Vet. Bras.** Vol.21, p.38-42. 2001.

RUTTEN A, A, J, J, L. Interlaboratory comparison of microsomal ethoxyresorufin and pentoxyresorufin-O-dealkylation terminations: standardization of assay conditions. **Arch Toxicol.** vol66, p237–244, 1992.

SANTOS, André Luiz dos. Desenvolvimento de sistema biomimético para análise de 3, 5, 6-Tricloro-2-piridinol, o principal metabólito do clorpirifós. 2012.

SCHREINER B, INGOLD-HEPPNER, B.; PEHL, D.; LOCATELLI, G.; BERRITSCHÖNTHALER, H. Deletion of Jun Proteins in Adult Oligodendrocytes Does Not Perturb Cell Survival, or Myelin Maintenance *In Vivo*. **PLoS ONE**, vol.10, p1-7, 2015.

SCHULTZE, A. E., e ROTH, R. A. Chronic pulmonary hypertension—the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. **J. Toxicol. Environ. Health B. Crit.** Vol.1, p271–346, 1998.

SÈVE; P.; DUMONTET, C.; Is class III  $\beta$ -tubulin a predictive factor in patients receiving tubulin-binding agents?. **Lancet Oncol**, vol.9, p168–175, 2008.

SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol.**, vol.21, p.227-236, 1946.

STOPPINI, L., BUCHS, P. A., & MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **Journal of neuroscience methods**, vol.37, 173-182, 1991.

STROBEL H.W.; KAWASHIMA, H.; GENG, J.; SEQUEIRA, D.; BERGH, A.; HODGSON, A.V.; WANG, H.; SHEN, S.; Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. **Toxicol Lett.** 1995, vol.82-83, p639- 643, 1995.

SUNDARAM, G.; BRUCE, J. B.; SIMON, P. J.; SERAY A.; CHAI K. L. AND GILLES, J. G. Quinolinic acid toxicity on oligodendroglial cells: relevance for multiple sclerosis and therapeutic strategies. **Journal of Neuroinflammation**, vol.11, p1-11, 2014.

SWANSON, R. A.; FARRELL, K.; STEIN, B. A. Astrocyte energetics, function, and death under conditions of incomplete ischemia: a mechanism of glial death in the penumbra. **Glia**, vol. 21, n. 1, p. 142-153, 1997.

TARDY, M. Astrocyte et Homeostasie. **Médecine Science**; vol.8, p.799-804. 1991.

TARDY, M. Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic role of astrocytes in metabolism and neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid outgrowth. **An Acad Bras.** vol. 74 (4), p. 683-690, 2002.

TOKARNIA, C. H. e DÖBEREINER J. Intoxicação experimental por *Crotalaria anagyroides* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** 3: 115-123, 1983.

TOKARNIA, C. H. et al. Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário. **Plantas tóxicas do Brasil**, p. 240-242, 2000.

TOMASSONI, D., Avola R, Di Tullio MA, Sabbatini M, Vitaioli L, Amenta F. Increased expression of glial fibrillary acidic protein in the brain of spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Hypertens.** Vol.26, p335-50, 2004.



VINUTHA, B., PRASHANTH, D., SALMA, K., SREEJA, S. L., PRATITI, D., PADMAJA, R., and DEEPAK, M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of ethnopharmacology**, vol.109, p359-363, 2007.

WANG, H. H. W.; STROBEL, H.; KAWASHIMA, J. G.; SEQUEIRA, D.; BERGH, A.; HODGSON, A. V. Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. **Toxicology Letters**. vol. 82, p. 639-643, 1995.

WARNER, M; KOHLER, C; HANSSON, T; GUSTAFSSON, J, A. Regional distribution of cytochrome P450 in the rat brain: Spectral quantitation and contribution of P450 b, e and P450 c,d.. **J Neurochem**. Vol.50, p1057–1065, 1986.

WILLIAMS, M.; MOLYNEUX, R.J. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Science**, v.35, p.476-81, 1987.

ZURICH, M.-G. et al. Involvement of glial cells in the neurotoxicity of parathion and chlorpyrifos. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 201, n. 2, p. 97-104, 2004.

YAN, C. C.; HUXTABLE, R. J. The effect of the pyrrolizidine alkaloids monocrotaline and tricothecium on tissue pyrrole binding glutathione metabolism in the rat. **Toxicol**; v.33, p.627 – 634, 1995.