

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

**INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS MOLECULARES E METABOLISMO DA
MONOCROTALINA EXTRAÍDA DA *CROTALÁRIA RETUSA* EM CÉLULAS
GLIAS.**

RAVENA PEREIRA DO NASCIMENTO

**SALVADOR/BA
JUNHO - 2013**



**INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS MOLECULARES E METABOLISMO DA
MONOCROTALINA EXTRAÍDA DA *CROTALÁRIA RETUSA* EM CÉLULAS
GLIAS.**

RAVENA PEREIRA DO NASCIMENTO
Médica Veterinária

SALVADOR – BAHIA
JUNHO - 2013

RAVENA PEREIRA DO NASCIMENTO

**INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS MOLECULARES E METABOLISMO
DA MONOCROTALINA EXTRAÍDA DA *CROTALÁRIA RETUSA* EM
CÉLULAS GLIAS.**

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^a. Dra. Silvia Lima Costa

Co-orientador: Prof^o. Dr. Victor Diógenes Amaral da Silva

**SALVADOR
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

NASCIMENTO, Ravena Pereira do

Investigação de novos alvos moleculares e metabolismo da monocrotalina extraída da *Crotalaria retusa* em células glias./ Ravena Pereira do Nascimento
Salvador. 2013.
(60)p.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Silvia Lima Costa.
Dissertação (mestrado) – Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, 2013.

1. *Crotalaria retusa*. 2. Alcaloide monocrotalina. 3. C6. 4. Células glias. 5. P450. I. Costa, Silvia Lima. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título

**INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS MOLECULARES E
METABOLISMO DA MONOCROTALINA EXTRAÍDA DA
CROTALÁRIA RETUSA EM CÉLULAS GLIAS.**

RAVENA PEREIRA DO NASCIMENTO

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

Salvador, 14 de junho de 2013.

Comissão examinadora:

Profa. Dra. Maria José Moreira
Batatinha

Profa. Dra. Mariana Botura

Profa. Dra. Silvia Lima Costa

A todos os que acreditam no fazer Ciência.
Que persistem neste meio. Não é fácil fazer
ciência em um país que ainda engatinha. É
um acreditar infinito. Doação total. Aos que
acreditam e que fazem.

AGRADECIMENTOS

Ao grande Mistério que é a Vida, por ter me concedido a graça de existir.

A Silvia Lima Costa, minha orientadora que me confiou este trabalho. Obrigada por me acolher tão bem no final da minha graduação em meados de 2010 e confiar no meu trabalho, a ponto de apostar em mim e ser minha orientadora no Mestrado. Obrigada por me dar forças quando desanimei com as intempéries ao longo do Mestrado e esperanças quando fraquejei. Obrigada por acreditar em mim, por saber lidar com o meu jeito “bipolar”. Obrigada por ser além de orientadora, uma amiga. Obrigada por toda a preocupação que tivestes comigo. A ti, lhe sou grata.

A minha mãe Miraldina Paixão e ao meu pai Jaime Nascimento. Amo-os incondicionalmente. Obrigada pelos valores que me passaram, pela criação que me deram. Pela honra de ter nascido filha de vocês. São espíritos de luz que eu tenho o prazer e amor de trazer comigo, mesmo longe. A vocês devo a vida.

Ao meu irmão Rafael Nascimento, por ser especial em todos os sentidos. Amo-te muito. Mesmo você não compreendendo este mundo como ele é. Para mim, de nós todos, você é o ser de luz mais iluminado que tenho o prazer de ter junto a mim. E de todas as vezes que me perguntastes: - “Nadjena, ti dia jhocê jhem me ver?” Agora posso lhe responder Fael, eu posso ir te ver sim!

Ao meu irmão Moisés Nascimento, minha cunhada Ariadne Sampaio e minha linda sobrinha Vênus Lazuli. Amo vocês. Obrigada por terem me dado o prazer e o amor de ser tia. Vocês acompanharam essa jornada e sabem o quanto eu aprendi, sorri, sofri. Por vocês acreditarem que eu sou capaz. Moi, obrigada por ser meu irmão. Ari, obrigada por fazer parte da minha família e obrigada por ser a mãe da minha “Pichulenguiha”.

A Rosembergue Valverde, meu bem querer. Obrigada por sempre me apoiar. Compartilhar as alegrias, enxugar tantas vezes minhas lágrimas ao longo dessa jornada. Dar-me forças para terminar. Por todo o suporte em todos os sentidos que me destes. Pelas experiências maravilhosas que me proporcionastes. Obrigada por ser meu companheiro. Amo você.

A Victor Diógenes Amaral da Silva, meu amigo. Sabes que comecei a andar com teu auxílio. Me destes o braço e me colocastes de pé para fazer esta jornada. A ti agradeço por me ouvir mesmo quando estavas no seu Doutorado Sanduíche. Sempre tinha tempo para responder meus emails quando eu entrava em pânico. Em me auxiliar com as análises dos experimentos. Em discutir os resultados comigo. E de volta ao Brasil, em ser meu amigo. És um exemplo de vida. De ser pesquisador. Muito obrigada pelo prazer da amizade e pela adorável convivência.

A Thyago Cardim, pequeno grande gênio! Por tudo meu amigo. Das idéias, as aulas de farmacologia, as mensagens de incentivo via “whatsapp”. Obrigada por tudo.

A William “Western Blott” pelo carinho, amizade e revelações dos Blotts no “quarto escuro”. Obrigada mesmo. Você foi de fundamental importância na confecção deste trabalho

A Catia Suze Ribeiro, pelo carinho, amizade, cuidado e conselhos. Uma amiga para toda a vida.

A Érica Viana, obrigada “Kinha” pelo carinho e atenção que tivestes comigo.

Ao Professor Eudes da Silva Velozo e a equipe do LAPEM, em especial a Rafael e Railda, que me deram suporte técnico para extração dos alcaloides de folhas da *Crotalaria retusa*.

Aos Professores Fátima Dias Costa e Ramon dos Santos El-Bachá, Giselle Faria, por fazerem parte desta equipe LabNq e estarem sempre disponíveis.

Aos queridos colegas e membros do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, em especial Paulo Lucas, Mona das Neves e Érica Patrícia e Rute Lima trago-os comigo. A Noélio Menezes pelo cuidado que tratou as células para me auxiliar nessa etapa final. E aos demais colegas do laboratório pelo prazer da convivência.

Ao Professor Henning Ulrich, por ter me recebido em seu laboratório de Neurociências na USP.

A toda a equipe do Laboratório de Neurociências da USP, em especial a Claudiana Lameu e Michelli Mainardi pela recepção maravilhosa. Pelas análises, por conseguir células para que eu trabalhasse. Enfim, obrigada pelo apoio.

Por fim aos familiares e amigos que me deram apoio durante todo o período, em especial Tia Leide e Joel Matos, Soraya Farias e Dona Rilza Valverde.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

(Cora Coralina)

LISTA DE ABREVIATURAS

CIM: Cimetidina

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

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

MCT: Monocrotalina

OMZ: Omeprazol

PBS: Tampão fosfato salino

SFB: Soro fetal Bovino

SNC: Sistema Nervoso Central

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO DE REVISÃO

Quadro 1 - Plantas que são consideradas tóxicas e neurotóxicos 10

Figura 1 – Vias microssomais de ativação metabólica e de detoxificação do alcaloide pirrolizidínico MCT e outros alcaloides pirrolizidínicos 16

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1: Marcha utilizada para a obtenção da monocrotalina 32

Figura 2: Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina 33

Figura 3: Análise do efeito do alcaloide monocrotalina e do inibidor e ativador de P450 sobre a viabilidade das células gliais da linhagem C6. 34

Figura 4: Quantificação dos vacúolos citoplasmáticos nas culturas de células da linhagem C6, tratadas com o alcaloide MCT e/ou tratamentos associados com OMZ. Dados em percentual em relação ao controle. 42

Figura 4.1: Análise do efeito do alcaloide MCT e do ativador de P450 OME na morfologia celular da linhagem C6 através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld 43

Figura 4.2: Detalhe do efeito do alcaloide MCT em relação ao controle DMSO (0,5%) na morfologia celular da linhagem C6 através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld. 43

Figura 5: Análise do efeito do alcaloide MCT e do ativador OMZ de P450 na morfologia celular de astrócitos através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld 44

Figura 5.2: Detalhe do efeito do alcaloide MCT em relação ao controle DMSO (0,5%) na morfologia celular de astrócitos e tratamento associado (MCT+OME), mostrando predominância de células com morfologia microglial, através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld. 44

Figura 6: Análise da morfologia e expressão da proteína S100 em cultura de

células C6 tratadas com o alcaloide MCT 500 μ M e com o inibidor de P450
CIM: Imunocitoquímica 46

Figura 7: Quantificação da expressão da proteína S100 em cultura de glia da
linhagem C6, em condições controle (0,5% de DMSO) ou tratadas com o
alcaloide MCT 500 μ M e o ativador de P450 OMZ 20 μ M foi determinada por
Western Blott 46

Figura 8: Efeito da MCT em cultura de células de astrócitos na depleção do
glutathion 46

Figura 9: Efeito da MCT em cultura de células de C6 na metabolização via
citocromo P450 1 A 1/ 2 usando os substratos etoxiresorufina e metoxire-
sorufina 47

ANEXOS:

Anexo 1: Estrutura química determinada por difração de raio-x da
monocrotalina 58

Anexo 2: Espectro de massas da monocrotalina 58

Anexo 3: Ressonância Magnética da monocrotalina do estudo 59

Anexo 4: Publicação de Artigo de Revisão 59

INTRODUÇÃO.....	3
CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A <i>CROTALÁRIA RETUSA</i>	3
HIPÓTESE E OBJETIVOS:	5
<i>Objetivo Geral:</i>	5
<i>Objetivos Específicos:</i>	6
CAPÍTULO 1.....	7
ARTIGO DE REVISÃO	7
INTRODUÇÃO.....	9
<i>Plantas neurotóxicas de interesse veterinário e humano</i>	9
<i>Astrócitos: um sistema eficiente para a detoxificação e bioativação no SNC.</i>	11
<i>Aspectos toxicológicos da Crotalária</i>	13
<i>Metabolismo da MCT em astrócitos e sua relação com a neurotoxicidade</i>	15
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 2.....	28
ARTIGO CIENTÍFICO	28
INTRODUÇÃO.....	30
MATERIAIS E MÉTODOS	31
DROGAS E TRATAMENTOS	31
<i>A Monocrotalina</i>	31
<i>A Cimetidina</i>	32
<i>O Omeprazol</i>	32
<i>Grupos de tratamento</i>	32
OS MODELOS DE CULTURAS EMPREGADOS	33
<i>Cultura da linhagem astrocítica de C6</i>	33
<i>Cultura primária de astrócitos</i>	33
ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	34
<i>Redução dos Sais de Tetrazólio (MTT)</i>	34
AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA DO CITOESQUELETO	34
<i>Coloração pancreômica de Rosenfeld e Imunocitoquímica</i>	34
<i>Análise da expressão protéica (S100)</i>	35
<i>Avaliação da atividade catalítica dos citocromos P450</i>	36
<i>Avaliação da depleção de glutatona</i>	37

ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
RESULTADOS.....	38
<i>Avaliação da viabilidade celular.....</i>	38
<i>Efeito da MCT sobre a morfologia das células gliais da linhagem C6 e de astrócitos.....</i>	38
<i>Efeitos da MCT na ativação de células gliais da linhagem C6.....</i>	39
<i>Efeito do tratamento monocrotalina na depleção de GSH em cultura primária de astrócitos.....</i>	40
<i>Avaliação do metabolismo via citocromo P450.....</i>	40
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
REFERÊNCIAS:	52
REFERÊNCIAS GERAIS:	56
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	57
RESUMOS PUBLICADOS E APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTÍFICOS DIRETAMENTE RELACIONADOS À DISSERTAÇÃO....	57
ARTIGOS PUBLICADOS DIRETAMENTE RELACIONADOS À DISSERTAÇÃO.....	58
ANEXOS:	59
ANEXO 1: ESTRUTURA QUÍMICA DETERMINADA POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X DA MONOCROTALINA.....	59
ANEXO 2: ESPECTRO DE MASSAS DA MONOCROTALINA	59
ANEXO 3: RESSONÂNCIA MAGNÉTICA DA MONOCROTALINA DO ESTUDO	60
ANEXO 4: PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO.....	60

INTRODUÇÃO

Considerações gerais sobre a *Crotalária retusa*

Muitas plantas apresentam características de toxicidade que pode ser comum a várias espécies ou restringir-se a apenas poucas espécies. Desta forma, existem plantas com propriedades tóxicas que causam prejuízos a pecuária, a produção de mel, criação de suínos, eqüinos, bovinos e outras espécies (CHEECKE, 1998). Neste universo de plantas tóxicas destacamos a *Crotalária retusa* conhecida popularmente como “guizo de cascavel ou chocalho de cobra”. É uma planta altamente resistente à seca, invasora e facilmente encontrada em pastagens e plantações de grãos.

A maioria das 600 espécies de plantas do gênero *Crotalária* que pertence à família Fabaceae são tóxicas para animais. Estas são encontradas em diversas regiões do mundo e apresentam distribuição geográfica nas zonas tropicais e subtropicais (WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987).

No Brasil, têm sido relatados casos de intoxicação aguda causada por *C. retusa* em ovinos (NOBRE et al., 2005) e intoxicação crônica em ovinos (DANTAS et al., 2004), bovinos (NOBRE et al., 2004a), e eqüídeos (NOBRE et al., 2004b) no semi-árido do Nordeste brasileiro. A intoxicação é mais freqüente em eqüídeos, provavelmente porque a planta é mais palatável para esta espécie (RIET-CORREA e CAVALOS MÉNDEZ, 2007). No entanto, apesar de serem descritos casos de intoxicação em ovinos, o uso desta espécie animal para o controle biológico da *C. retusa* é relatado, havendo sucesso quando o rebanho é previamente exposto à planta (RIET-CORREA et al., 2011).

A toxicidade desta planta têm sido atribuída à abundancia que possui em um alcaloide pirrolizidínico (AP), a monocrotalina (MCT) que, uma vez ativada no fígado pela isoforma da enzima do sistema citocromo P450 (CYP 3A)(COUET et al., 1996, KASAHARA et al., 1997), origina produtos que são hepatotóxicos, pneumotóxicos, cardiotóxicos, fetotóxicos, neurotóxicos, mutagênico, carcinogênicos (MATTOCKS, 1986; THOMAS et al., 1996; RIBEIRO et al., 1993; CHEEKE, 1998; MEDEIROS et al., 2000) e genotóxicos (WANG et al., 2005).

Alcaloides pirrolizidínicos como a MCT, podem ser encontrados no leite de vaca e no leite de cabra, bem como em outros produtos alimentares de origem animal (DICKINSON et al., 1976; GOEGER et al., 1982), o que representa um risco à saúde humana, representando também pelo extensivo consumo destes produtos, um problema de saúde pública (ATAL e SAWHNEY, 1973).

As enzimas do sistema citocromo P450 (CYPs) são responsáveis pelo metabolismo de muitos compostos exógenos e endógenos. CYPs são abundantes no fígado e são também expressos em muitos tecidos extra-hepáticos incluindo o cérebro. Embora os níveis totais de CYP no cérebro sejam muito menores do que no fígado, no cérebro estão concentradas em regiões específicas e em certos tipos de células que podem potencialmente ter um impacto considerável sobre o metabolismo local. Diferenças individuais no metabolismo cerebral, devido a indutores, inibidores de CYP ou variação genética, podem influenciar na sensibilidade e na resposta a medicamentos de ação central. CYPs no cérebro podem também desempenhar um papel na modulação da atividade deste órgão, susceptibilidade e alterações de comportamento em doenças do sistema nervoso central (TYNDALE et al, 2011).

Células da linhagem C6 tiveram sua origem na década de 1960 e constitui em um bom modelo para estudos bioquímicos (SANTOS, 2007). Esta linhagem foi obtida após a exposição de ratos a injeções com o agente alquilante N-nitrosometiluréia (BENDA et al., 1968). A linhagem C6 constitui-se como uma linhagem astrocítica, apresentando características de oligodendrócitos, astrócitos e neurônios, a depender do número de passagens (PARKER et al., 1980), (SANTOS, 2007). A expressão de proteínas gliais como a GFAP e S100 atesta o seu caráter astrocitário. Assim, por apresentar características de célula astrocitária, a linhagem C6 é utilizada para investigações bioquímicas e metabólicas que envolvam as funções astrocíticas, dentre elas o envolvimento do sistema P450 na metabolização de xenobióticos (SANTOS, 2007; FURCHAL et al., 2005; STROBEL & GENG, 1997; STROBEL & GENG, 1998).

Yan e Huxtable, 1995, realizaram estudos com os alcaloides tricodesmina e monocrotalina, que possuem estruturas químicas semelhantes, e dosaram metabólitos destes alcaloides em cérebro de ratos experimentalmente intoxicados, o que sugere a capacidade destes alcaloides em atravessar a barreira hematoencefálica.

Essa informação despertou-nos o interesse em investigar a ação do alcaloide monocrotalina (MCT) em células do sistema nervoso central (SNC). Em estudo pioneiro desenvolvido por Barreto et al. (2006) com culturas de astrócitos corticais de ratos,

evidenciou que estas células são sensíveis a ação do alcaloide MCT especialmente ao seu metabólito dehidromonocrotalina (DHMC), molécula gerada após ser metabolizada pelo sistema citocromo P450, obtida no citado estudo pela dehidrogenação *in vitro* da monocrotalina (BARRETO et al., 2008). Ainda, o potencial genotóxico destas moléculas em células de origem glial da linhagem GL-15 foi evidenciado por Pinheiro et al. (2007). Mais recentemente, Pitanga et al. (2011) investigou o efeito da MCT em culturas primárias de neurônios e co-culturas de neurônios e células gliais, e de forma surpreendente demonstraram haver uma sensibilidade maior das células em co-cultura do que em culturas isoladas de neurônios quando tratadas com a MCT. Neste estudo foi sugerido que a maior citotoxicidade demonstrada em co-culturas se daria em função da capacidade dos astrócitos em contato com os neurônios em metabolizar a MCT em metabólitos de maior toxicidade.

Pelo exposto, o presente trabalho teve por objetivo dar continuidade a estudos sobre as propriedades tóxicas da monocrotalina, principal toxina da *C. retusa*, e o envolvimento da metabolização do alcaloide por enzimas astrocíticas e sua relação com neurotoxicidade.

Hipótese e Objetivos:

Baseados em informação literárias sobre a metabolização da monocrotalina à derivados encontrados no cérebro, e que células gliais apresentam o aparato enzimático capaz de realizar a metabolização de fase I e fase II de xenobióticos, como a MCT, e ainda que proteínas de citoesqueleto neurais são alvos moleculares do derivado pirrol da monocrotalina, o nosso trabalho teve como hipótese que a metabolização do alcaloide monocrotalina por enzimas do sistema citocromo P450 de astrócitos à derivados pirroles, que alquilam macromoléculas, é um processo fundamental para a neurotoxicidade do alcaloide monocrotalina.

Objetivo Geral:

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar o envolvimento do citocromo P450 no metabolismo *in vitro* do alcaloide monocrotalina extraído de *Crotalaria retusa* sobre células gliais, visando esclarecer suas propriedades neurotóxicas.

Objetivos Específicos:

- Estudar as propriedades citotóxicas do alcaloide extraído de *Crotalaria retusa* através da análise de atividade mitocondrial *in vitro* em um sistema de cultura de células gliais da linhagem C6;
- Analisar efeito do alcaloide MCT sobre a morfologia de células gliais C6 e em culturas primárias de glia;
- Analisar efeito do alcaloide MCT sobre a expressão da proteína do citoesqueleto S100 de gliais C6 em vista de determinar novos alvos moleculares;
- Elucidar o metabolismo do alcalóide monocrotalina em células gliais e sua relação com neurotoxicidade, através de estudos sobre a atividade catalítica do sistema citocromo P450 e depleção de glutathiona e sua correlação com danos celulares.

CAPÍTULO 1

Artigo de Revisão

O PAPEL DOS ASTRÓCITOS NO METABOLISMO E NA NEUROTOXICIDADE DO ALCALOIDE PIRROLIZIDÍNICO MONOCROTALINA, A PRINCIPAL TOXINA DA *CROTALARIA RETUSA*

Publicado em 03 Agosto 2012 doi: 10.3389/fphar.2012.00144

RESUMO:

As interações metabólicas e de sinalização entre neurônios e células gliais são necessárias para o desenvolvimento e manutenção das funções e estruturas cerebrais e para neuroproteção, o que inclui a proteção contra ataques químicos. Os astrócitos são essenciais para a desintoxicação cerebral e apresentam um eficiente e específico sistema enzimático citocromo P450. Embora plantas do gênero *Crotalaria* (*Fabaceae*, *Leguminosae*) sejam utilizadas na medicina popular, estas plantas são também consideradas tóxicas e podem causar danos a animais domésticos bem como problemas à saúde humana. Estudos em animais mostraram casos de intoxicação por plantas desse gênero, que induziram danos ao sistema nervoso central. Esta descoberta tem sido atribuída aos efeitos tóxicos do alcaloide pirrolizidínico (AP), monocrotalina (MCT). O envolvimento dos sistemas enzimáticos hepáticos P450 no metabolismo e toxicidade pulmonar da MCT foi elucidado, mas pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na bioativação destes sistemas e a sua relação direta sobre a toxicidade no cérebro. Esta revisão apresenta os principais aspectos toxicológicos do gênero *Crotalaria* que são estabelecidos na literatura e os resultados recentes que descrevem os mecanismos envolvidos nos efeitos neurotóxicos da MCT, extraída de *Crotalaria retusa*, e sua interação com os neurônios em astrócitos isolados.

Palavras-chave: *Crotalaria*, pirrolizidínico alcalóide monocrotalina, neurotoxicidade, astrócitos, neurônio, P450, GSH

SUMMARY:

The metabolic interactions and signaling between neurons and glial cells are necessary for the development and maintenance of brain functions and structures and for neuroprotection, which includes protection from chemical attack. Astrocytes are essential for cerebral detoxification and present an efficient and specific cytochrome P450 enzymatic system. Whilst *Crotalaria* (Fabaceae, Leguminosae) plants are used in popular medicine, they are considered toxic and can cause damage to livestock and human health problems. Studies in animals have shown cases of poisoning by plants from the genus *Crotalaria*, which induced damage to the central nervous system. This finding has been attributed to the toxic effects of the pyrrolizidine alkaloid (PA) monocrotaline (MCT). The involvement of P450 enzymatic systems in MCT hepatic and pulmonary metabolism and toxicity has been elucidated, but little is known about the pathways implicated in the bioactivation of these systems and the direct contribution of these systems to brain toxicity. This review will present the main toxicological aspects of the *Crotalaria* genus that are established in the literature and recent findings describing the mechanisms involved in the neurotoxic effects of MCT, which was extracted from *Crotalaria retusa*, and its interaction with neurons in isolated astrocytes.

Keywords: *Crotalaria*, pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, neurotoxicity, astrocyte, neuron, P450, GSH

INTRODUÇÃO

Plantas neurotóxicas de interesse veterinário e humano

Em condições naturais, plantas tóxicas são ingeridas pelo homem ou animais domésticos e são capazes de causar dano, o que se reflete na saúde e vitalidade desses seres e causam um desequilíbrio que resulta em sintomas de intoxicação. O agente tóxico de uma planta consiste em uma substância ou um conjunto de substâncias quimicamente bem definidas, que ao entrarem em contato com o organismo animal, elas podem provocar um quadro de intoxicação. Quando as plantas tóxicas são ingeridas por herbívoros ou ingeridas acidentalmente por seres humanos, pode ocorrer perturbações nervosas no trato digestivo e no coração e em alguns casos, levar à morte. No Brasil, os dados sobre a frequência e as causas de mortalidade em alguns Estados são escassos, o que torna difícil estimar as perdas devido à morte por intoxicação de animais. De acordo com Riet-Correa e Medeiros (2001), nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, a taxa de mortalidade anual de bovinos causada por plantas tóxicas é 10-14%. No que diz respeito às regiões áridas do país, a situação é mais grave durante os períodos em que o alimento é escasso, porque os animais tendem a ingerir o que está disponível. Nessas regiões, a taxa de mortalidade anual é de 7,2%.

No Brasil, o impacto resultante sobre os valores na produção animal está avaliado em milhões de dólares. Outro aspecto importante relacionado com a ingestão de plantas tóxicas pelos animais é o fato das toxinas poderem ser transferidas para os seres humanos através do consumo de carne, leite, ovos ou outros produtos animais. É bem conhecido que nos Estados Unidos, o consumo de leite produzido por vacas que são mantidas em pastagens infestadas por *Eupatorium rugosum* causa uma condição de doença conhecida como "doença do leite", o que pode resultar em morte humana (PANTER E JAMES, 1990). Outras toxinas no leite incluem alcaloides pirrolizidínicos, que estão presentes em plantas dos gêneros *Senecio*, *Heliotropium*, *Echium*, *Amsinckia*, *Symphytum* (confrei), *Cynoglossum* (língua de cão), e *Festuca* (festuca) sendo abundantes em plantas do gênero *Crotalária* (DICKINSON et al., 1976;. PANTER e JAMES, 1990).

Testes realizados no Brasil, demonstraram que o leite de cabras alimentadas com *Crotalária spectabilis* induziu toxicidade para ratos, e ninhadas de ratos alimentados com *C. spectabilis* ou monocrotalina (MCT), o principal alcaloide pirrolizidínico (MEDEIROS et al., 1998; MEDEIROS et al., 1999). As plantas que têm sido consideradas neurotóxicas são

descritas no quadro abaixo e incluem a *Ipomoea*, *Ricinus*, *Phalaris*, *Solanum*, *Prosopis* e *Crotalária*.

Quadro 1 - Plantas que são consideradas tóxicas e neurotóxicas.

ESPÉCIES DE PLANTAS	METABÓLITO NEUROTÓXICO	REFERÊNCIA
<i>Crotalaria</i> <i>C. spectabilis</i> <i>C. crispate</i> <i>C. dura</i> <i>C. mucronata</i> <i>C. retusa</i>	Monocrotalina e Tricodesmina (alcaloides)	Riet e Corrêa et al., 2011
<i>Ipomoea asarifolia</i>	Lectinas ainda não caracterizadas	Salles et al.,2011
<i>Phalaris</i> ssp (Poaceae), <i>P. angusta</i> <i>P. angusta</i> <i>P. aquatica</i> <i>P. arundinacea</i> <i>P. brachystachys</i> <i>P. canariensis</i> <i>P. paradoxa</i> <i>P. caroliniana</i> <i>P. minor</i>	Tryptamina(alcaloide)	Cantón et al., 2010
<i>Prosopis juliflora</i>	Juliprosina e Juliprosopina (alcaloides)	Choudhary et al., 2005
<i>Ricinus communis</i> (folhas)	Ricinina (alcaloide)	Worbs, et al., 2011
<i>Solanum fastigiatum</i>	Alcaloides ainda não caracterizados	Rech et al., 2006

Astrócitos: um sistema eficiente para a detoxificação e bioativação no SNC.

As interações metabólicas e de sinalização entre os neurônios e as células da glia já foram bem descritas. 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; ESKES et al., 2003; ZURICH et al., 2004). As inter-relações entre as células neurais e gliais contribuem para o desenvolvimento, função e capacidade de reparação do cérebro e podem participar de sua deterioração devido ao envelhecimento ou doença (para revisão ver TARDY, 2002 e SOFRONIEW e VINTERS, 2010). No sistema nervoso central (SNC), os astrócitos e microglia são as duas populações de células capazes de responder às injúrias as células neurais. Isto pode alterar a morfologia, alterar os padrões de expressão neurotrófico e / ou fatores neurotóxicos ou afetar a associação entre estes dois fenômenos (STREIT et al., 1999). Astrócitos e microglia respondem a todas as formas de danos neurológicos, incluindo os provocados por substâncias tóxicas. Essas células sofrem ativação em um fenômeno conhecido como gliose. Astrogliose está associada com o fenótipo alterado entre a regulação positiva de um grande número de moléculas (EDDLESTON e MUCKE, 1993; COOKSON e PENTREATH, 1994; LEFRANÇOIS et al., 1997; MEAD e PENTREATH, 1998; COSTA et 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 ácido cáínico, cloreto de mercúrio, cloreto de alumínio, tolueno, etanol, dibutilil-cAMP, alcaloides piperidínicos (RATABOUL et al., 1989; COOKSON e PENTREATH, 1994; MEAD e PENTREATH, 1998; HARRY et al., 2002; HUGHES et al., 2006; SILVA et al, 2007). Embora um aumento na expressão de GFAP possa ser associado à astrogliose, reações aos danos físicos e até mesmo a neuro-degeneração (TARDY, 1991; COYLE e SCHWARCZ, 2000; COSTA et al., 2002), são vistos na expressão de GFAP que pode refletir sinaptogênese e neuro-transmissão anormal (O'CALLAGHAN e JENSEN, 1992; MOISES et al., 2002; RAJKOWSKA et al., 2002).

Muitos produtos químicos tóxicos têm características indesejáveis, porque se tornam produtos altamente reativos após metabolismo dentro de órgãos alvos. Geralmente a bioativação química ocorre no fígado e os produtos tóxicos são posteriormente transportados para o órgão alvo via circulação. Em algumas espécies, o tecido do cérebro contém os

sistemas enzimáticos, os quais são únicos para aumentar a ativação metabólica neste órgão, quando comparado com outros tecidos.

Citocromo P450 assim denominado por Omura e Sato (1964) apresenta importante função na detoxificação de xenobióticos para posterior eliminação do corpo (DUTHEIL, 2007). Deste modo, após o contato com alguma substância estranha para o organismo, a mesma pode ter dois caminhos: ser eliminada ou biotransformada em composto ativo capaz de causar danos ao organismo (ORELLANA, 2004).

Uma grande variedade de tecidos apresenta o sistema P450, a saber, fígado, rins, pulmão, pele, intestino, córtex adrenal, testículo, placenta e cérebro, importante na bioativação de compostos que atravessam à barreira hemato-encefálica (BHE) (DUTHEIL, 2007; ORELLANA, 2004). Deste modo, além dos alvos primários, como fígado e pulmões, compostos inicialmente inertes ou poucos reativos como APs, podem ser convertidos em outros compostos com grande reatividade química que por sua vez induzem toxicidade no SNC.

Além de proporcionar nutrição e suporte estrutural aos neurônios no SNC, uma das funções mais importantes dos astrócitos é controlar a presença de neurotoxinas no interior do SNC. O cérebro é o alvo de numerosos compostos tóxicos, tais como solventes lipofílicos orgânicos e psico-fármacos, os quais incluem as anfetaminas, benzo-diazepinas, e alcaloides, tais como a cocaína. Estes podem atravessar a BHE e exercer sua ação a nível central. O metabolismo *in situ* destas substâncias conduz à modulação farmacológica local e a transformação de psicotrópicos para compostos hidrofílicos via citocromo P450 no cérebro, o que resulta na eliminação mais lenta (RAVINDRANATH, 1998). Uma variedade de sistemas enzimáticos também possui esta capacidade, incluindo o sistema CYP450 ativo (COYLE e SCHWARCZ, 2000, TARDY, 2002).

Os astrócitos são a primeira linha de defesa contra xenobióticos e expressam níveis elevados de P450, que são cerca de dois pontos acima dos 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 astrócitos específicos dependentes do citocromo P450 monoxigenases desempenham um papel causal para o estabelecimento do cérebro como o órgão alvo de vários agentes tóxicos (MEYER et al., 2001). As isoformas do citocromo P450 CYP1A, CYP1A1 / 2, CYP2B1, CYP2B6, CYP2C11, CYP2C, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A foram determinados em ratos e em

astrócitos humanos e são consideradas funcionalmente ativas (para revisão, ver MALAPLATE-ARMAND et al., 2004; MEYER et al, 2007)

Aspectos toxicológicos da Crotalária

Plantas do gênero *Crotalária* crescem abundantemente em zonas tropicais e subtropicais, e são adotadas na medicina popular (ATAL e SAWHNEY, 1973; MATTOCKS, 1986). Por serem plantas invasoras, as *Crotalárias* são comumente encontrados em plantações de grãos e pastagens (CHEEKE, 1988), e podem ser acidentalmente ingeridas por seres humanos e animais. No Brasil, cerca de 40 espécies foram encontradas e muitas destas são ingeridas por animais, especialmente durante escassez de alimentos (TOKARNIA et al., 2000). Estas plantas são ricas em alcaloides pirrolizidínicos (APs), que são as principais toxinas derivadas de plantas que são transferidos para os seres humanos e animais (MATTOCKS, 1986; HUXTABLE, 1990). Casos de animais intoxicados por plantas desse gênero foram descritos em muitos países (BOGHOSSIAN et al., 2007), incluindo o Brasil nos estados de Mato Grosso do Sul (LEMONS e BARROS, 1998), Minas Gerais (NOBRE et al., 1994) e da Paraíba (NOBRE et al., 2004a, b, 2005). Intoxicações em equinos (GIBBONS et al., 1953; GARDINER et al, 1965), bovinos (BARRI e ADAM, 1981), suínos (PECKHAM et al, 1974; SOUZA et al, 1997), aves (NORTON e O'ROURKE, 1979), e caprinos (BARRI et al., 1984), tem sido descritos. No entanto, bovinos e equinos são 30 a 40 vezes mais suscetíveis a estes alcaloides do que os ovinos e caprinos (RIET-CORREA et al., 2006). Na Austrália, *Crotalaria retusa* e *C. crispata* foram responsáveis pela doença conhecida como “Kimberly horse disease” ou “Walkabout disease” (ROSE et al., 1957). Na região semi-árida do Estado da Paraíba no Nordeste do Brasil, os casos de intoxicação aguda em equinos por sementes de *C. retusa* ocorreram durante a estação seca (NOBRE et al., 2004a). Em humanos, a intoxicação por plantas do gênero pode ocorrer devido ao consumo de grãos contaminados com sementes dessas plantas (HUXTABLE, 1989) e a sua utilização na medicina popular (ATAL e SAWHNEY, 1973).

Na Índia, por exemplo, espécies de *Crotalaria* são usadas para o tratamento da sarna e impertigo (doença que acomete a pele devido à presença de *Staphylococcus* e *Streptococcus*, DAMRON e JACOB, 2001). Além disso, os animais que se alimentam de grandes quantidades de *Crotalária* podem eliminar metabólitos secundários através do leite, o que é potencialmente perigoso para lactentes e indivíduos que ingerem este leite contaminado

(PANTER e JAMES, 1990). No entanto é bem sabido que, para exercer o seu efeito tóxico, os APs precisam ser metabolizados pelo sistema hepático e pulmonar enzimático do citocromo P450, o qual gera os metabólitos ativos, como os dehidroalcaloides e pirróis (MATTOCKS, 1986; COUET et al., 1996; KASAHARA et al., 1997). Estes metabólitos podem afetar macromoléculas celulares, tais como o DNA e as proteínas, e formar adutos que podem iniciar uma toxicidade aguda ou crônica (CULVENOR et al., 1962). Monocrotalina é o principal AP de *C. retusa* e é responsável pelos efeitos nocivos observados em diferentes espécies animais (CHEECKE, 1998). São principalmente hepatotóxico e pneumotóxico, mas também nefrotóxico, cardiotoxico, fetotóxico, neurotóxico, e carcinogênicos sendo estes efeitos relacionados com a intoxicação por MCT (MATTOCKS, 1986; RIBEIRO et al., 1993; THOMAS et al., 1996; CHEECKE, 1998; MEDEIROS et al., 2000; LIN et al., 2001; WANG et al., 2005). Espécies animais que são particularmente vulneráveis, tais como equídeos, apresentaram fibrose hepática clássica e sintomas neurológicos (Kimberly Disease) que estão associados com a exposição crônica a MCT (ROSE et al., 1957; NOBRE et al., 2004a). Estudos sobre o metabolismo da MCT no fígado e pulmões de ratos intoxicados com o AP mostram que após estes serem metabolizados pelo sistema do citocromo P450, a MCT sofre desidrogenação e alterações na estrutura da necina originando a dehidromonocrotalina (DHMC), que é considerada um composto altamente tóxico (LIN et al., 2001, WANG et al., 2005). Em humanos, tanto a reação de ativação, quanto a rota de detoxificação, são catalisadas pelo citocromo CYP 3A4 (MIRANDA et al., 1991). A DHMC, no entanto, é muito instável, e pode prosseguir por vários caminhos metabólicos, a saber: hidrólise a 6,7-dihidro-7-hidroxi-1-hidroximetil-5H-pirrolizina (DHP), um dos principais metabólitos ativos; conjugação com a glutatona (GSH) no fígado para formar os enantiômeros 7-glutationil-6,7-dihidro-1-hidroximetil-5H-pirrolizina (7-GS-DHP) e 7,9-diGSH-DP; alquilação de macromoléculas celulares nucleofílicas, o que demonstra sua atividade tóxica; ser liberado na circulação (WANG et al., 2005). A monocrotalina pode também ser biotransformada pelo sistema P450 gerando N-óxidos que podem, por sua vez, serem hidrolisados a 6,7-dihidro-7-hidroxi-1-hidroximetil-5H-pirrolizina (DHP), um dos principais metabólitos reativos, ou serem convertidos a dehidroalcaloides.

No modelo de hipertensão induzida pulmonar progressiva por MCT (MCT-PH), alguns alvos moleculares foram identificados. Na MCT-PH, os níveis da proteína angiotensina 1 (Ang 1), Ang 2, óxido nítrico endotelial sintase (eNOS), NOS induzível (iNOS), heme-oxigenases 1 (HO1), e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foram

aumentados (CHO et al. , 2009). A MCT-PH foi também associada com a expressão aumentada das metalo-proteases de matriz, as proteases MMP-2 e MMP-9 e a proteína pSMAD2, que está envolvida na transformação do fator de crescimento-b (TGF-b) e de sinalização (ZAIMAN et al., 2008). A expressão da proteína e a atividade da hidrolase pulmonar solúvel (SEH), que está envolvida no metabolismo dos ácidos eicosatrienóico epoxi (EETs), e a atividade do citocromo P450 epoxigenase pulmonar foi prejudicada durante MCT-Ph em ratos (REVERMANN et al., 2009). A presença de sinais clínicos neurológicos em animais intoxicados com *Crotalária* foi inicialmente associada com encefalopatia hepática, devido à incapacidade de realização do metabolismo da uréia seguido por hiperamonemia (CHEEKE, 1988; NOBRE et al., 2004b). Além disso, os metabólitos resultantes dos alcaloides tricodesmina e a MCT, dehidrotricodesmina e DHMC, respectivamente, foram encontrados e dosados em cérebros de ratos que foram experimentalmente intoxicados. Estes resultados demonstraram a capacidade destas moléculas em atravessar a BHE (YAN e HUXTABLE, 1995) e sugerem que os sinais neurológicos observados em animais intoxicados é resultado do metabolismo eficiente do AP da *Crotalária* em componentes ativos nas células do SNC. Os sistemas enzimáticos hepáticos P450 que estão envolvidos no metabolismo da MCT, estão relacionados com a toxicidade hepática e pulmonar e já foram esclarecidos. No entanto, pouco se sabe sobre os percursos que atuam na bioativação destes sistemas ou sobre a sua contribuição para a toxicidade direta no cérebro.

Metabolismo da MCT em astrócitos e sua relação com a neurotoxicidade

As culturas primárias de astrócitos, neurônios e as co-culturas de células neuronais / gliais, que são derivadas a partir do córtex de ratos ou ratos neonatos ou embrionários são modelos de estudo in vitro viáveis para o estudo bioquímico e atividade biológica das células do SNC em condições normais ou patológicas. Estes modelos têm sido usados há décadas e também foram adotados como modelos para o estudo de substâncias neurotóxicas (BOOHER e SENSENBRENNER, 1972; LESUISSE, 2001). Na perspectiva de esclarecer os efeitos neurotóxicos da MCT, que foi extraída de *C. retusa* e seu derivado pirrol DHMC, realizamos estudos in vitro em culturas primárias de astrócitos e neurônios, e em co-culturas de astrócitos / neurônios obtidos a partir do córtex cerebral de ratos Wistar neonatos.

Utilizando um ensaio de MTT que mede a função mitocondrial, primeiramente observamos que a MCT, em concentrações variáveis entre 0,1 e 500 μM , não induziram a citotoxicidade nessas células (BARRETO et al., 2006). Por outro, a DHMC reduziu a viabilidade das células na concentração de 1 μM , a partir de 24 horas após o tratamento, e amplificando o efeito, essa redução foi mais significativa após 72 horas de tratamento (BARRETO et al., 2008). Os metabólitos tais como dehidroalcaloides e pirróis, podem alquilar macromoléculas celulares, tais como proteínas e DNA, para formar adutos que podem iniciar uma toxicidade aguda ou crônica (CULVENOR et al., 1962). Observou-se também que tanto a MCT como a DHMC induziram mudanças nos níveis de expressão de GFAP (proteína glial fibrilar ácida), uma proteína presente no citoesqueleto de astrócitos. Este fenômeno foi acompanhado por alterações fenotípicas graves e pela presença de astrócitos hipertróficos que caracteriza células reativas a estes alcaloides (BARRETO et al., 2008). Além disso, em outro estudo, investigamos a ação da MCT em células gliais da linhagem GL-15, e foi demonstrado que, MCT e DHMC além de interferirem no crescimento celular induziram megalocitose. A regulação de proteínas associadas aos microtúbulos (MAPs) foi significativa bem como apresentou uma extensa propriedade genotóxica (SILVA-NETO et al., 2010).

As interações entre os neurônios e células gliais, tais como astrócitos, são essenciais para as propriedades sinápticas (VOLTERRA e MELDOLESI, 2005), o desenvolvimento, a homeostase e detoxicação do sistema nervoso central (LETOURNEL-BOULLAND et al., 1994), enquanto, em contraste, neurônios contribuem para a proliferação e sobrevivência das células da glia (GOMES et al., 2001).

Visando clarificar a complexidade dos fenômenos neurotóxicos induzidos pela MCT em diferentes populações de células do SNC, mais recentemente, foi desenvolvido no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabnQ), outro estudo em co-culturas de neurônios/astrócitos e em culturas primárias de neurônios isolados. Utilizando o teste de MTT, foi observada uma redução da viabilidade celular após 72 horas de tratamento com 100 μM de MCT. Sob estas condições, a toxicidade da MCT também foi demonstrada através da determinação dos níveis de atividade das desidrogenases lácticas (LDH) nos sobrenadantes das co-culturas, indicando que o dano à membrana plasmática tinha ocorrido. Entretanto, alterações na viabilidade das células não foram observadas em culturas primárias de neurônios isolados. Uma das características principais da astrogliose é um aumento da expressão de GFAP (TARDY, 2002). No nosso sistema de co-cultura, quando ambos, os astrócitos e neurônios foram cultivados em contato, observamos uma vacuolização e um

aumento no corpo da célula dos astrócitos, com um aumento na expressão de GFAP, após 72 horas de tratamento com 100 μM de MCT indicando astrogliose. A resistência dos astrócitos isolados a toxicidade da MCT a partir de culturas primárias, observados por Barreto et al. (2006), pode ser entendida como o resultado de sua capacidade limitada em metabolizar xenobióticos, que deve ser restaurada quando os neurônios e células gliais estão interagindo. Recentemente, Mingato et al. (2007) trabalhou com mitocôndrias isoladas de fígado de rato e observaram um decréscimo na atividade de oxidação de NADH do complexo I da cadeia respiratória, após o tratamento com DHMC. Assim a interferência da MCT na função mitocondrial e toxicidade pode ser devida a produção de metabólitos ativos, tais como, em astrócitos, produção de DHMC quando estas células estão interagindo com os neurônios. Além disso, é sabido que quando grandes quantidades de alguns compostos tóxicos entram na circulação, enzimas de desintoxicação, como os citocromo P450 (citoplasmáticos do retículo endoplasmático liso), são produzidos, o que faz com que a área da superfície da organela se dobre (ALBERTS et al., 2002). Uma vez que a toxina desaparece, o excesso da membrana do retículo endoplasmático liso é removido por um processo dependente de lisossomas, chamado autofagocitose. Vacúolos citoplasmáticos foram evidentes em co-culturas de astrócitos / neurônios (Pitanga et al., 2011), mas não em a culturas primárias de astrócitos tratados com MCT (Barreto et al., 2006), o que confirma a hipótese de que propriedades metabólicas da MCT são dependentes de interações entre neurônios e células gliais.

Em associação com proteínas Maps, n-Neuronal, a β -tubulina III, que é considerada a principal proteína estrutural dos neurônios (LESUISSE e MARTIN, 2001), integra uma rede muito dinâmica e desempenha um papel fundamental nos processos biológicos fundamentais, tais como a divisão celular e o transporte intracelular (GUZIK e GOLDSTEIN, 2004). Através da aplicação de um método de imunocitoquímica em co-culturas expostas a 10-100 μM de MCT, foi observado que a MCT causa interrupções na expressão de β -tubulina III, sugerindo uma falha na polimerização desta, nos neurônios. Além disso, por meio de análise Western blot, foi observado um forte decréscimo na expressão das bandas de β III-tubulina, oriundos dos extratos proteicos (PITANGA et al., 2011). Estes resultados suportam a hipótese de que a proteína do citoesqueleto β -tubulina III é um alvo molecular da MCT ou de seus metabólitos, o que pode interferir com a dinâmica de estabilização de proteínas microtubulares.

Como anteriormente discutido, a citotoxicidade de MCT em hepatócitos é devido à geração de dehidrocromonocrotalina (DHMC) através do complexo enzimático citocromo

P450 e a DHMC resultante, por sua vez, é capaz de se ligar a glutathione (GSH) sendo esta depletada (WANG et al., de 2005, LIN et al., 2002). Estudos indicam que a GSH protege as células da glia contra o estresse oxidativo, e sua depleção provoca várias alterações bioquímicas e moleculares que podem estar relacionados a distúrbios neurológicos (LEE et al., 2010). Observou-se também que o tratamento com 100 μ M de MCT, causou um empobrecimento de GSH em co-culturas de astrócitos/neurônios e que a depleção de GSH foi revertida quando o sistema enzimático citocromo P450 foi inibido pela cimetidina, um inibidor potente do citocromo P450 (CHANG et al., 1992). Estes resultados indicam que a depleção de GSH é dependente do metabolismo e da síntese de metabólitos ativos gerados através do sistema citocromo P450 e que este fenômeno está envolvido com a neurotoxicidade induzida por MCT (PITANGA et al., 2011). Em conjunto, estes estudos in vitro, realizados em culturas primárias de astrócitos de rato ou neurônios e co-cultura de neurônio/glia, nos fornecem novas informações sobre os mecanismos de toxicidade da MCT em diferentes populações de células no sistema nervoso central e as suas relações com os fenômenos neurológicos observados em animais intoxicados.

Para induzir a hepatotoxicidade e pneumotoxicidade, conforme anteriormente citado, alcaloides como a MCT precisam ser metabolizados em metabólitos ativos pelo sistema citocromo P450 no fígado ou no sistema P450 do pulmão e assim induzir hepatotoxicidade e pneumotoxicidade (LIN et al, 2001, WANG et al., 2005). Devido a essas características e nossos resultados, propomos um mecanismo metabólico para a MCT em astrócitos isolados e em interação com os neurônios. Propomos que a MCT atua através do sistema P450 eficiente para produzir maiores quantidades de metabólitos ativos, incluindo DHMC, N-óxido-monocrotalina e seus derivados, tais como DHP. Estes metabólitos ativos então induzem toxicidade celular ou são desintoxicados pela sua conjugação com GSH (Fig.1). O metabólito DHMC pirrólico é altamente instável, e o metabólito intermediário reativo pode: (i) submeter-se a hidrólise para formar DHP e posteriormente formar os adutos de DNA derivadas de DHP por uma reação com DNA, (ii) se ligam ao DNA celular e, subsequentemente, são hidrolisados para formar os adutos de DNA-DHP derivados ou (iii) são conjugados com macromoléculas biológicas nucleofílicas, tais como as proteínas celulares e com GSH. Prevemos que a reversão da toxicidade celular nas culturas primárias de astrócitos/neurônios após a exposição ao potente inibidor de CYP, a cimetidina, indica que o metabolismo de citocromo P450 e DHMC, DHP e /ou formação de N-óxido são essenciais para a toxicidade da MCT em células do SNC. Finalmente, devido a MCT e a DHMC terem proteínas do

citoesqueleto neurais específicos como alvos moleculares, como a GFAP e β -tubulina III, e devido aos perfis biológicos dos APs, principalmente da MCT e seus derivados, estes produtos naturais devem ser considerados em potencial para o desenvolvimento de drogas capazes de tratar desordens do SNC, tais como o câncer.

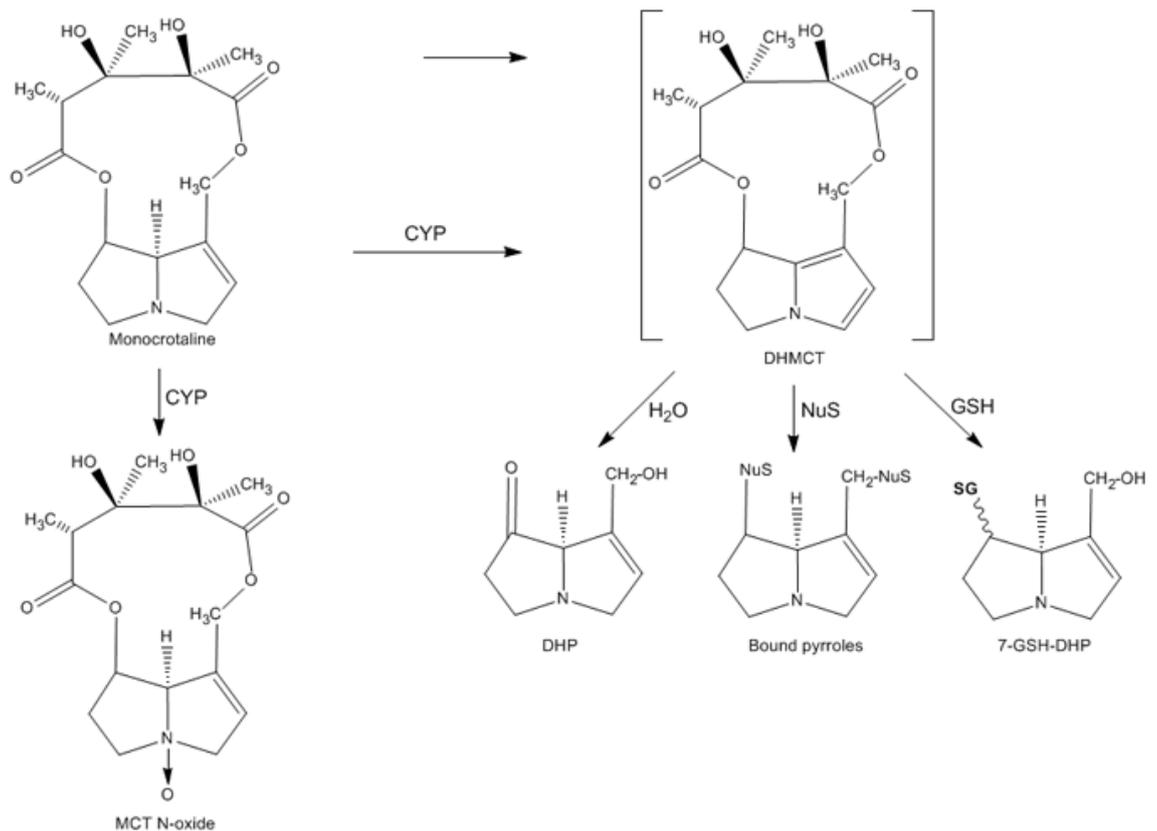


Figura 1: Vias microssomais de ativação metabólica e de detoxificação do alcalóide pirrolizidínico MCT e outros APs segundo WANG *et al* (2005) e LIN *et al.*, (2002), adaptado. CYP3A: Enzima do complexo citocromos P450 família 3A (CYP3A); GSH: glutatião; DHP: 6,7-dihidro-7-hidroxil-1-hidroximetil-5H-pirrolizina; 7-GSH-DHP: 7-glutationil-6,7-dihidro-1-hidroximetil-5H-pirrolizina; 7,9-diGSH-DHP 7,9-diglutationil-6,7-dihidro-1-hidroximetil-5H-pirrolizina; NuS: macromoléculas biológicas nucleofílicas.

Referências

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; and WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. New York: Garland Science Publishing (2002).
- ATAL, C. K; and SAWHNEY, R.S. The pyrrolizidine alkaloids from Indian *Crotalaria*s. **Indian J Pharm.** v. 35, p. 1-12, 1973.
- 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.; COSTA, S. L. O alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. **Rev Bras Saúde Prod Anim.** v. 7 (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.; COSTA, S. L. Monocrotaline pyrrol is cytotoxic and alters the patterns of GFAP expression on astrocyte primary cultures. **Toxicology in Vitro.** v. 22 (5), p. 1191–1197, 2008.
- BARRI, M. E. S., and ADAM, S. E. I. The toxicity of *Crotalaria saltiana* to calves. **J Comp Path.** v. 91, p. 621-627, 2008.
- BOGHOSSIAN, M. R.; PEIXOTO, P. V.; BRITO, M. F.; TOKARNIA, C. H. Aspectos clínico patológicos da intoxicação experimental pelas sementes de *Crotalaria mucronata* (Fabaceae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.** v. 27(4), p. 149-156, 2007.
- BOOHER, J., and SENSENBRENNER, M. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. **Neurobiology.** v. 2, p. 97, 1972.
- CANTÓN, G., CAMPARO, C., VILLA, M., and ODRIOZOLA, E. Acute and chronic nervous signs in cattle associated with *Phalaris angusta* poisoning in Argentina. **Pesq Vet Bras.** v. 30, p. 63-66, 2010.
- CHANG, T., LEVINE, M., BANDIERA, S.M., and BELLWARD, G.D. Selective inhibition of rat hepatic microsomal cytochrome P450. Effect of the in vivo administration of cimetidina. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 260, p.1441-1449, 1992.
- CHEECKE, P. R. **Natural toxicants in feeds, forages and poisonous plants**. Danville: Interstate Publishers, 1998.
- CHEECKE, P. R. Toxicity and metabolism of pyrrolizidine alkaloids. **J Anim Sci.** v. 66 (9), p. 2343-2350, 1988.
- CHO, Y.J.; HAN, J.Y.; LEE, S.G.; JEON, B.J.; CHOI, W.S.; WANG, Y.S.; ROH, G.S.; LEE, J.D. Temporal Changes of Angiopoietins and Tie Expression in Rat Lungs after Monocrotaline Induced Pulmonary Hypertension. **Comp Med.** v. 59(4), p. 350–356, 2009.
- CHOUDHARY, M. I.; NAWAZ, S. A.; ZAHEER-UL-HAQ, AZIM. M. K.; GHAYUR, M. N.; LODHI, M. A.; JALIL, S.; KHALID, A.; AHMED, A.; RODE, B. M., ATTA-UR-

RAHMAN, GILANI, A.; AHMAD, V. U. Juliflorine: A potent natural peripheral anionic-site-binding inhibitor of acetylcholinesterase with calcium-channel blocking potential, a leading candidate for Alzheimer's disease therapy. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 332, p. 1171-1179, 2005.

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.** v. 8 (3), p. 351-359, 1994.

COSTA, S. L.; PLANCHENAULT, T.; CHARRIÈRE-BERTRAND, C.; MOUCHEL, Y.; FAGES, C.; JULIANO, S.; ET AL. Astroglial Permissivity for Neurotic Outgrowth in Neuron-Astrocyte Co Cultures Depends on Regulation of Laminin Bioavailability. **Glia.** v. 37, p. 105-113, 2002.

COUET, C. E.; CREWS, C.; and HANLEY, A. B. Analysis, separation, and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from comfrey (*Symphytumofficinale*). **Natural Toxins.** v. 4(4), p. 163-7, 1996.

COYLE, J. T.; and SCHWARCZ, R. Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. **Arch Gen Psychiatry.** v. 57 (1), p. 90-93, 2000.

CULVENOR, C. C. J.; DANN, A. T.; and DICK, A. T. Alkylation as the mechanism by which the hetatotoxicpyrrolizidine alkaloids act on cell nuclei. **Nature.** v. 195 (4841), p. 570 – 573, 1962.

DAMRON, B. L.; and JACOB, J. P. **Toxicity to poultry of common weed seeds.** University of Florida, Cooperative Extension Service. 2001.http://edis.ifas.ufl.edu/BODY_PS052. 7p.

DICKINSON, J. O.; COOKE, M. P.; and MOHAMED, P. A. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. **J Am Vet Med Assoc.** v. 169(2), p. 1192-1196, 1976.

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.** v. 90 (3), p. 426-436, 2007.

EDDLESTON, M.; and MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes: implication for their role in neurological disease. **Neuroscience.** v. 54, p. 15-36, 1993.

ESKES, C.; JUILLERAT-JEANNERET, L.; LEUBA, G.; HONEGGER, P.; and MONNET-TSCHUDI, F. Involvement of microglia-neuron interactions in the tumor necrosis factor-alpha release, microglial activation, and neurodegeneration induced by trimethyltin. **J Neurosc. Res.** v. 71, p. 583–590, 2003.

GARDINER, M. R.; ROYCE, R. and BOKOR, A. Studies on *Crotalaria crispata*, a newly recognised cause of Kimberley horse disease. **J Comp Path Bact.** v. 89, p. 43-53, 1965.

GIBBONS, W. J.; DURR, E. H. and COX, S. A. An outbreak of cirrosis of the liver in horses. **North AmVet.** v. 34, p. 556-558, 1953.

GOMES, F. C. A.; SPOHR, T. C. L. S.; MARTINEZ, R., MOURA-NETO, V. Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. **Braz J Med Biol Res.** v. 34(5), p. 611-620, 2001.

GUZIK, B. W., and GOLDSTEIN, L. S. Microtubule-dependent transport in neurons: steps towards an understanding of regulation, function and dysfunction. **Curr Opin Cell Biol.** v. 16 (4), p. 443-50, 2004.

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

HUGHES, J. B.; SILVA, V. D. A.; SILVA, A. R.; SOUZA, C. S.; SILVA, A. M. M., VELOSO, E. S.; BATATINHA, M. J. M.; COSTA, M. F. D., TARDY, M.; EL-BACHÁ, R. S., and COSTA, S. L. Cytotoxicity effect of alkaloidal extract from *Prosopis juliflora* Sw. D.C. (Algaroba) pods on glial cells. **Braz J Vet Res Anim Sci.** v. 43, p. 50-58, 2006.

HUXTABLE, R. J. (1989). "Human health implications of pyrrolizidine alkaloids and herbs containing them", in **Toxicants of Plant Origin**, ed. P. R. Cheecke (Boca Raton, FL: CRC Press), 41-86.

HUXTABLE, R. J. Activation and pulmonary toxicity of pirrolizidine alkaloids. **Pharmac The.** v. 47, p. 371, 1990.

KASAHARA, Y.; KIYATAKE, K.; TATSUMI, K.; SUGITO, K.; KAKUSAKA, I.; YAMAGATA, S.; OHMORI, S.; KITADA, M., and KURIYAMA, T. Bioactivation of monocrotaline by P-450 3A in rat liver. **J.Cardiovasc. Pharmacol.** v. 30, p. 124-129, 1997.

LEE, M.; CHO, T.; JANTARATNOTAI, N.; WANG, Y. T.; MCGEER, E., and MCGEER, P. L. Depletion of GSH in glial cells induces neurotoxicity: relevance to aging and degenerative neurological diseases. **FASEB J** . v. 24(7), p. 2533-45, 2010.

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.** v. 17 (11), p. 4121-8, 1997.

LEMOS, R. A. A. and BARROS, C. S. L. "**Intoxicação por *Crotalaria* sp.**" in Principais Enfermidade de Bovinos de Corte do Mato Grosso do Sul, *Ed .R. A. A. Lemos* (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande), p. 322-325, 1998.

LESUISSE, C., AND MARTIN, L. (2001). Long-Term Culture of Mouse Cortical Neurons as a Model for Neuronal Development, Aging, and Death. **Inc J Neurobiol** 51(1), 9-23.

LETOURNEL-BOULLAND, M. L.; FAGES, C.; ROLLAND, B., and TARDY, M. Lipopolysaccharides (LPS) up-regulate the IL-1-mRNA and down regulate the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and glutamine synthetase (GS)-mRNAs in astroglial primary culture. **Euro.Cytokine Network.** v. 5(1), p. 51-6, 1994.

LIN, G.; CUI, Y. Y.; LIU, X. Q., and WANG, T. Species Differences in the in Vitro Metabolic Activation of the Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloid Clivorine. **Chem Res Toxicol.** v. 15, p. 1421-1428, 2002.

LIN, Y. S.; DOWLING, A. L.; QUIGLEY, S. D.; FARIN, F. M.; ZHANG, J.; LAMBA, J. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. **Mol Pharmacol.** v. 62, p. 162-172, 2002.

MALAPLATE-ARMAND, C.; LEININGER-MULLER, B., and BATT A.-M. Astrocytic cytochromes p450: an enzyme subfamily critical for brain metabolism and neuroprotection. **Rev Neurol.** v. 160: 6-7, p. 651-658, 2004.

MATTOCKS, A. R. "Toxicology of pyrrolizidine alkaloids in animal." in Chemistry and Toxicology of pyrrolizidine alkaloids, ed. A. R. Mattocks. (New York, Academic Press), (1986).

MEAD, C., and PENTREATH, V. W. Hypertrophy and increased glial fibrillary acidic protein are coupled to increased protection against cytotoxicity in glioma cell lines. **Toxicology in vitro.** v. 12, p. 141-52, 1998.

MEDEIROS, R. M. T.; BARBOSA, R. C.; RIET-CORREA, F.; LIMA, E. F.; TABOSA, I. M., BARROS, S. S.; GARDNER, D. R., and MOLYNEUX, R. J. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia*. in Northeastern Brazil. **Toxicon.** v. 41, p. 933-935, 2003.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIAK, S. L. and GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Braz J Vet Res Anim Sci.** v. 36(2), 1998.

MEDEIROS, R. M. T., GÓRNIAK, S. L., and GUERRA, J. L. (1998). "Comparative effects of prenatal and postnatal monocrotaline effects in rats", in Toxic Plants and Other Natural Toxicants, ed T. Garland and A. C. Barr (New York, CAB International), 312-16.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIAK, S. L., and GUERRA, J. L. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. **J Ethnopharmacol.** v. 69, p. 181-188, 2000.

MEDEIROS, R. M. T.; GÓRNIAK, S. L.; GUERRA, J. L. Effects of milk from goat fed *Crotalaria spectabilis* seeds on growing rats. **Braz J Vet Re. Anim Sc.** v. 36 (2), p. 97-100, 1999.

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

MEYER, R. P.; KNOTH, R.; SCHILTZ, E., and 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.** v. 167(2), p. 376-84, 2001.

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

- MIRANDA, C.L.; REED, R.L.; GUENGERICH, F.P.; BUHLER, D.R. Role of cytochrome P450III A4 in the metabolism of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in human liver. **Carcinogenesis**. v. 12(3), p. 515-9, 1991.
- MOISES, H.W.; ZOEGA, T., and GOTTESMAN, I. I. The glial growth factors deficiency and synaptic destabilization hypothesis of schizophrenia. **BMC Psychiatry**. v. 2(1), p. 8, 2002.
- NOBRE, D.; DAGLI, M. L. Z.; HARAGUCHI, M. *Crotalaria juncea* intoxication in horses. **Vet Hum Toxicol** . v. 36, p. 445-448, 1994.
- NOBRE, V. M. T.; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F.; BARBOSA FILHO, J. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS, J. S. Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. **Toxicol**. v. 45, p. 347-352, 2005.
- NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; BARBOSA FILHO, J. M.; TABOSA, I. M., and VASCONCELOS, J. S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em eqüídeos no semiárido da Paraíba. Poisoning by *Crotalaria retusa* (Fabaceae) in Equidae in the semi arid region of Paraíba. **Pesq Vet Bras**. v. 24(3), p. 132-143, 2004a.
- NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; TABOSA, I. M.; MEDEIROS, R. M. T. and BARBOSA FILHO, J. M. **Intoxication by *Crotalaria retusa* in ruminants and eqüidae in the state of Paraíba, Northeast Brazil**. In: Acamovich T., Stewart C.S. & Pennycott T.W. (ed.) Plant Poisoning and Related Toxins. CAB International, Glasgow. p. 275-279, 2004b.
- NORTON, J. H., and O'ROURKE, P. K. Toxicity of *Crotalaria goreensis* for chickens. **Aust Vet J**. v. 55, p. 173-174, 1979.
- O'CALLAGHAN, J. P., and JENSEN, K. F. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. **Neurotoxicology**. v. 13(1), p. 113-22, 1992.
- OLIVEIRA, C. A.; BARBOSA, J. D.; DUARTE, M. D.; CERQUEIRA, V. D.; RIET-CORREA, F.; TORTELLI F. P.; RIET-CORREA, G. Intoxicação por *Ipomoea cárnea* sub sp. *fistulosa* (Convolvulaceae) em caprinos na Ilha de Marajó, Pará. **Pesq Vet Bras**. v. 29, p. 583-588, 2009.
- ORELLANA, B., and GUAJARDO, T. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. **Rev Méd Chile**. v. 132 (1), p. 85-94, 2004.
- PANTER, K. E., and JAMES, L. F. Natural plant toxicants in milk: a review. **J Anim Sci**. v. 68, p. 892-904, 1990.
- PECKHAM, J. C.; SANGSTER, L. T., and JONES, J. R. O. H. (1974). *Crotalaria spectabilis* poisoning in swine. **J Am Vet Med Assoc**. v. 165, p. 633-638, 1990.
- PITANGA, B. P; SILVA, V. D.; SOUZA, C. S.; JUNQUEIRA, H. A.; FRAGOMENI, B. O.; NASCIMENTO, R. P.; SILVA, A. R.; COSTA, M. F.; EL-BACHÁ, R. S., and COSTA, S. L. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte / neuronco-culture system. **Neurotoxicology**. v. 32(6), p. 776-784, 2011.

RAJKOWSKA, G.; MIGUEL-HIDALGO, J. J.; MAKKOS, Z.; MELTZER, H.; OVERHOLSER, J., and STOCKMEIER, C. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. **Schizophr Re.** v. 57, p. 2-3, 127-138, 2002.

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.** v. 174, p. 283-308, 1989.

RAVINDRANATH V. Metabolism of xenobiotics in the central nervous system: implications and challenges. **Biochem Pharmacol.** v. 56, p. 547-551, 1998.

RECH, R. R.; RISSI, D. R.; RODRIGUES, A.; PIERZAN, F.; PIAZER, I. V. M.; KOMMERS, G. D., and BARROS, C. S. L. Intoxicação por *Solanum fastigiatum* (Solanaceae) em bovinos: epidemiologia, sinais clínicos e morfometria das lesões cerebelares. **Pesq Vet Bras.** v. 26, p. 183-189, 2006.

REVERMANN, M.; BARBOSA-SICARD, E.; DONY, E.; SCHERMULY, R.T.; MORISSEAU, C.; GEISSLINGER, G.; FLEMING, I.; HAMMOCK B.D., and BRANDES, R.P. Inhibition of the soluble epoxide hydrolase attenuates monocrotalina induced pulmonary hypertension in rats. **J Hypertens.** v. 27(2), p. 322–331, 2009.

RIBEIRO, L. R.; SILVA, A. R.; BAUTISTA, A. R.; COSTA, S. L.; SALES, L. A.; RIOS, A. C., and SALVADORI, D. M. Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. **Mutat Res.** v. 300, p. 253-258, 1993.

RIET-CORREA, F.; CARVALHO, K. S.; DANTAS, A. F. M., and MEDEIROS, R. M. T. Spontaneous acute poisoning by *Crotalaria retusa* in sheep and biological control of this plant with sheep. **Toxicon.** v. 58, p. 606-609, 2011.

RIET-CORREA, F. and 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.** v. 21(1), p. 38-42, 2001.

ROSE, A. L.; GARDNER, C. A.; MCCONNELL, J. D., and BULL, L. B. Field and experimental investigation of "walk about" disease of horses (Kimberley horse disease) in Northern Australia: *Crotalaria* poisoning in horses. **Aust Vet J.** v. 33, p. 25-33, 1957.

SALLES, H. O.; VASCONCELOS, I. M.; SANTOS, L. F. L.; OLIVEIRA, H. D.; COSTA, P.P.C.; NASCIMENTO, N. R. F.; SANTOS, C. F.; SOUSA, D. F.; JORGE, A. R. C.; MENEZES, D. B.; MONTEIRO, H. S. A.; GONDIM, D. M. F.; OLIVEIRA, J. T. A. Towards a better understanding of *Ipomoea asarifolia* toxicity: evidence of the involvement of a leaf lectin. **Toxicon.** v. 1, p. 1–7.

SILVA, A. M. M.; SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; FREITAS, S. R. V. B.; SILVA, V. D. A.; SOUZA, C. S.; HUGHES, J. B.; EL-BACHÁ, R. S.; COSTA, M. F. D.; VELOZO, E. S.; TARDY, M., and COSTA, S. L. Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. **Toxicon.** v. 49, p. 601–614, 2007.

SILVA-NETO, J. P.; BARRETO, R. A.; PITANGA, B. P.; SOUZA, C. S.; SILVA, V. D.; SILVA, A. R.; VELOZO, E. S.; CUNHA, E. S.; CUNHA, S. D.; BATATINHA, M. J.; TARDY, M.; RIBEIRO, C. S.; COSTA, M. F.; EL-BACHÁ, R. S., and COSTA, S. L. Genotoxicity and morphological changes induced by the alkaloid monocrotaline, extracted from *Crotalaria retusa*, in a model of glial cells. **Toxicol.** v. 55(1), p. 105-117, 2010.

SOFRONIEW, M. V., and VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol.** v. 119, p.7–35, 2010.

SOUZA, R. S., and IRIGOYEN, L. F. Intoxicação experimental por *Phalaris angusta* (Gramineae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** v. 19, p.116-122, 1999.

SOUZA, A. C.; HATAYDE, M. R., and BECHARA, G. H. Aspectos patológicos da intoxicação de suínos por sementes de *Crotalaria spectabilis* (Fabaceae). **Pesq. Vet. Bras.** v. 17, p. 12-18, 1997.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L., and PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária.** (São Paulo, Manolo), p. 449, 2008.

STREIT, M.; IOANNIDES, A.; LIU, L., WOLWER, W.; DAMMERS, J.; GROSS, J.; GAEBEL, W., and MULLER-GARTNER, H. Neurophysiological correlates of the recognition of facial expression of emotion as revealed by magnetoencephalography. **Brain Res.** v. 7, p. 481-491, 1999.

TABOSA, I. M.; RIET-CORREA, F.; BARROS, S. S.; SUMMERS, B. A.; SIMÕES, S. V. D.; MEDEIROS, R. M. T., and NOBRE, V. M. T. Neurohistologic and ultrastructural lesions in cattle experimentally intoxicated with the Plant *Prosopis juliflora*. **Vet Pathol.** v. 43, p. 695–701, 2006.

TARDY, M. Role of laminin bioavailability in the astroglialpermissivity for neuritic outgrowth. **An Acad Bras.** v. 74 (4), p. 683-690, 2002.

TARDY, M. Astrocyte et homeostasie. **Méd Sci.** v. 8(7), p. 799-804, 1991.

THOMAS, H. C.; LAME, M. W.; WILSON, D. W., and SEGALL, H. J. Cell cycle alterations associated with covalent binding of monocrotalina pyrrole to pulmonary artery endothelial cell DNA. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 141(1), p. 319-329, 1996.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J., and PEIXOTO, P. V. “**Plantas experimentalmente tóxicas para bovinos, porém incerto se de interesse pecuário**” in *Plantas Tóxicas do Brasil*, ed C. H. Tokarnia, J. Döbereiner, and P. V. Peixoto (Rio de Janeiro, Helianthus), p. 240-242, 2000.

VOLTERRA, A., and MELDOLESI, J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. **Nat Rev Neurosci.** v. 6(8), p. 626-640, 2005.

WANG, Y. P.; YAN, J.; BEGER, R. D.; FU, P. P., and CHOU, M. W. Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, leading to DNA adduct formation in vivo. **Cancer Letters.** v. 226(1), p. 27–35, 2005.

WORBS, S.; KÖHLER, K.; PAULY, D.; AVONDET, M. A.; SCHAER, M.; DORNER, M. B., and DORNER, B. G. *Ricinus communis* Intoxications in Human and Veterinary Medicine- A Summary of Real Cases. **Toxins (Basel)**. v. 3(10), p. 1332–1372, 2011.

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

ZAIMAN, A.L.; PODOWSKI M.; MEDICHERLA, S.; GORDY, K.; XU, F.; ZHEN, L.; SHIMODA, L.A.; HIGGINS, L.; MURPHY, A.; CHAKRAVARTY S.; PROTTER, A.; SEHGAL, P.B.; CHAMPION, H.C.; TUDER, R.M. Role of the TGF- β /Alk5 Signaling Pathway in Monocrotaline-induced Pulmonary Hypertension. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 177(8), p. 896–905, 2008.

ZURICH, M. G.; MONNET-TSCHUDI, F.; COSTA, P. L.G. Honegger Aggregating brain cell cultures for neurotoxicological studies E. Tiffany-Castiglioni (Ed.), **Methods in Pharmacology and Toxicology: In vitro Neurotoxicology: Principles and Challenges**, Humana Press, Inc, Totowa, NJ. P. 243–266, 2004.

CAPÍTULO 2

Artigo Científico

INVESTIGAÇÃO DE NOVOS ALVOS MOLECULARES E METABOLISMO DA MONOCROTALINA EXTRAÍDA DA *CROTALÁRIA RETUSA* EM CÉLULAS GLIAS.

RESUMO:

A monocrotalina tem sido estudada na literatura como uma molécula capaz de causar hipertensão arterial e pulmonar induzida. Por ser oriundo de uma planta com ampla distribuição geográfica, este alcaloide pode ser ingerido por homens e animais gerando casos de toxicidade, que representam grandes perdas econômicas. Nas intoxicações associadas à ingestão do alcaloide, os animais acometidos apresentam uma sintomatologia nervosa que inicialmente está associada a quadros de encefalopatia hepática. Em estudos recentes desenvolvidos pelo nosso grupo, observamos que tanto a monocrotalina quanto seu derivado pirrol dehidromonocrotalina tem como alvos moleculares em células do sistema nervoso central (SNC), algumas macromoléculas como o DNA e proteínas do citoesqueleto, como a GFAP e β -tubulina III. Devido aos perfis biológicos da monocrotalina e seu derivado, dehidromonocrotalina, que demonstrou maior toxicidade em células do SNC, vê-se a necessidade de investigar o metabolismo da monocrotalina como etapa fundamental para a toxicidade deste alcaloide. Neste sentido, este trabalho busca compreender o envolvimento do metabolismo com a toxicidade da MCT em células astrocíticas, investigando em especial a via metabólica do complexo enzimático CYP P450 e conjugação com glutathiona. Assim, desenvolvemos o presente estudo usando um inibidor deste sistema enzimático, a cimetidina e um indutor, o omeprazol no modelo in vitro de células C6. Através de testes de citotoxicidade por MTT visualizamos que a MCT (500 μ M) não altera a viabilidade das células C6, no entanto, quando associada com omeprazol (20 μ M), induz perda de viabilidade celular. Através da coloração com Rosenfeld visualizamos que alterações morfológicas caracterizadas por vacuolização e emissão de prolongamentos foram induzidas por tratamento com a MCT, sendo este efeito inibido pela presença do ativador de P450 nas C6. Já em astrócitos, observamos proliferação de células com fenótipo microglial no quando usamos o OMZ como ativador de P450 associado a MCT. Análise da conjugação com glutathiona, relevou que houve depleção da GSH para tratamentos com MCT, e esta foi revertida parcialmente por pré-tratamento com o inibidor de P450 (Cimetidina 100 μ M). Também, ensaio in vitro da atividade da etoxiresorufina, sugere o envolvimento da isoforma 1 A do CYP P450 no metabolismo da monocrotalina e demonstrou que este alcaloide e não só o seu metabólito, pode promover depleção da GSH. Estes resultados sugerem que a monocrotalina é metabolizada por enzimas do citocromo P450 e GSH astrocíticas e ainda, que mudanças na atividade das enzimas do P450 interferem nos efeitos citotóxicos induzidos pela monocrotalina.

Palavras-chave: Monocrotalina, neurotoxicidade, C6, astrócitos, P450, GS

SUMMARY:

The monocrotaline has been studied in the literature as a molecule capable of causing hypertension and induced lung. Because it comes from a plant with broad geographic distribution, this alkaloid can be ingested by humans and animals causing cases of toxicity, which represent large economic losses. In poisoning associated with ingestion of the alkaloid, affected animals have a nervous symptom that is initially associated with frames of hepatic encephalopathy. In recent studies conducted by our group, we found that both the monocrotaline pyrrole derivative thereof as dehidromonocrotalina has as molecular targets in cells of the central nervous system (CNS), some macromolecules such as DNA and cytoskeletal proteins such as GFAP and β -tubulin III. Due to the biological profiles of monocrotaline and its derivative, dehidromonocrotalina, which showed higher CNS toxicity in cells, we see the need to investigate the metabolism of monocrotaline as critical step of this alkaloid toxicity. In this sense, this paper seeks to understand the involvement of metabolism to the toxicity of MCT in astrocytic cells, investigating in particular metabolic pathway enzyme complex CYP P450 and conjugation with glutathione. Thus, this study developed using an inhibitor of the enzyme system and an inductor cimetidine, omeprazole in vitro model of cell C6. By testing the cytotoxicity by MTT visualize the association of MCT with a 500 μ M activator P450 (omeprazole 20 μ M) induces loss of cell viability in C6 cell line. By staining with Rosenfeld to visualize morphological changes characterized by vacuolization and issuing extensions were induced by treatment with MCT, and the extensions emission was inhibited by the presence of the activator P450. Analysis of conjugation with glutathione, there was related depletion of GSH for the MCT treatments, and this was partially reversed by pretreatment with an inhibitor of P450 (Cimetidine 100 μ M). Also, in vitro activity of the etoxiresorufin, suggest the involvement of this isoform 1 A of CYP P450 in the metabolism of monocrotaline and demonstrated that this alkaloid and not only its metabolite may deplete GSH. These results suggest that monocrotaline is metabolized by cytochrome P450 and GSH astrocytic and also that changes in the activity of P450 enzymes interfere with the cytotoxic effects induced by monocrotalina.

Keywords: Monocrotaline, neurotoxicity, C6, astrocytes, P450, GSH

Introdução

A monocrotalina é um alcaloide pirrolizidínico encontrado em plantas do gênero *Crotalaria sp.* É metabolizada no fígado via sistema microsomal citocromo P450 (KASAHARA et al., 1997) gerando três metabólitos: o ácido monocrotóico, a retronecina e a dehidromonocrotalina, também conhecida como pirrol da monocrotalina sendo este o metabólito tóxico deste alcaloide. A dehidromonocrotalina parece ser neutralizada pela conjugação com a glutathione (GSH). Na literatura a monocrotalina é vastamente estudada como modelo de indução de hipertensão arterial e pulmonar (MATHEW et al, 1997), (GUPTA et al., 2013), No entanto, o alcaloide ou mesmo seu metabólito pode atingir demais órgãos como exemplo o cérebro, o que já foi mostrado por Yan e Huxtable (1995).

Em estudos anteriores, determinamos que a MCT e a DHMC apresentaram como alvos moleculares o DNA e proteínas do citoesqueleto neurais específicas como a GFAP e β -tubulina III, 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). Ainda, considerando estes efeitos, estas moléculas devem ser consideradas como agentes genotóxicos e potenciais indutores de câncer.

Assim, visando melhor compreender os mecanismos de envolvimento no metabolismo e toxicidade da MCT do sistema de biotransformação de xenobióticos de células astrocíticas, em especial o complexo enzimático CYP P450 e conjugação com glutathione, desenvolvemos o presente estudo usando um inibidor deste sistema enzimático, a cimetidina, e um indutor, o omeprazol, no modelo in vitro de células gliais da linhagem C6 (LIN e LU, 1994, YU et al, 2001; ANGIOLILLO et al, 2011; FUNCK-BRENTANO et al., 1997; SOONS et al, 1991), bem como o envolvimento do sistema P450 glial no metabolismo e toxicidade da droga. Além disso, buscamos investigar alterações na morfologia e determinar se a proteína do citoesqueleto S100 também constitui um alvo molecular do alcaloide.

Materiais e métodos

Drogas e Tratamentos

A Monocrotalina

A MCT foi isolada a partir do extrato aquoso liofilizado de sementes de *Crotalária retusa* segundo método de Culvenor e Smith (1957) modificado, metodologia empregada no Laboratório de Pesquisa em Matéria Médica na Universidade Federal da Bahia - LAPEM/UFBA, onde o hexano foi utilizado no lugar do éter de petróleo e as possíveis formas N-óxido não foram convertidas à sua base livre. A caracterização da MCT foi realizada por ressonância magnética nuclear do ^{13}C e ^1H , além de espectro infravermelho. Os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com os dados da literatura (MARTINEZ, 2009) e o espectro de massas encontra-se nos anexos.

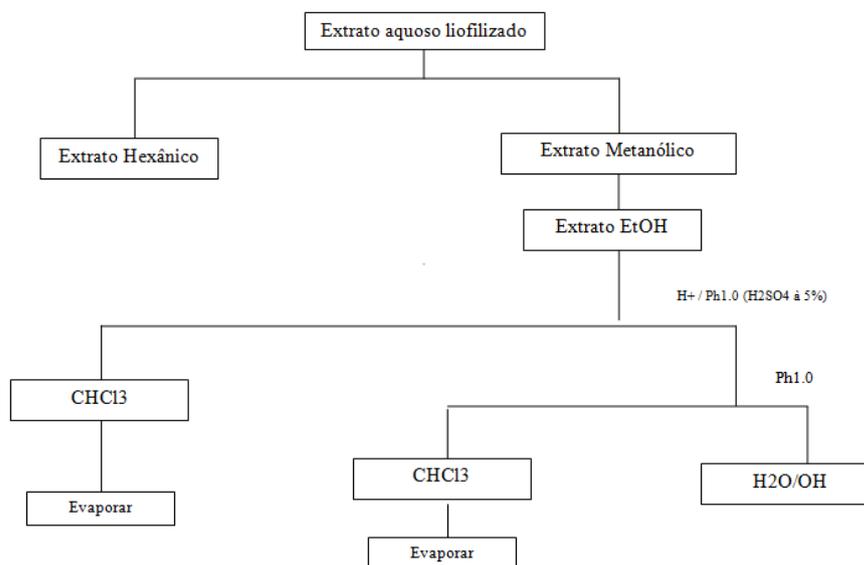


Figura 1: Marcha utilizada para a obtenção da monocrotalina. O fracionamento ácido-base do extrato etanólico obtido a partir de extrato liofilizado de *C. retusa* forneceu o alcaloide monocrotalina em 5 % de rendimento.

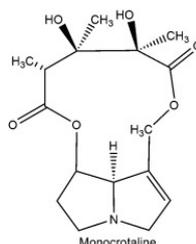


Figura 2: Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (PEREIRA et al., 1998 modificado)

A Cimetidina

A cimetidina (Sigma C4522) é um conhecido antagonista de receptores H₂, da histamina, que também exerce efeito como inibidor potente do complexo CYP (SHAIK e MEHVAR, 2010; CHANG et al., 1992), atuando sobre várias isoformas deste complexo enzimático (MESSIAS, 2004). Este é mantido em solução estoque 100x concentrada a uma temperatura de -20°C. Foi utilizada nos tratamentos das culturas na concentração de 100µM, 40 minutos antes da modulação com o alcaloide.

O Omeprazol

O omeprazol (Medley) é considerado um indutor / inibidor de CYP, de isoformas específicas, age como indutor nas famílias CYP 1A e 2C19 (ANGIOLILLO et al, 2011, DRUG DATABASE, 2013). Foi utilizado no momento da modulação com o alcaloide. Assim, foi feita uma diluição mãe na concentração de 500µM armazenada a - 20°C e protegida da luz . Nos dias das modulações, foram realizadas as diluições de uso de 20µM para os tratamentos das culturas de células.

Grupos de tratamento

Para todas as análises com culturas de células foram realizadas associações entre o alcaloide monocrotalina e os indutores ou inibidores de P450. Assim, foram gerados os seguintes grupos controle: DMSO, DMSO + cimetidina, DMSO + omeprazol, e os grupos teste: MCT, MCT + cimetidina, MCT + omeprazol.

Os modelos de culturas empregados

Cultura da linhagem astrocítica de 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 $1,5-2 \times 10^6$ células/mL e estocadas em criotubos no nitrogênio líquido a -70°C . Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem de células e quando atingiam a confluência foram descoladas das placas de cultura por uma solução contendo 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS. Culturas de células confluentes, cultivadas em placas de 100 mm ϕ foram dissociadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS, e replaqueadas em placas poliestireno de 4 cm de diâmetro ou de 96 poços (TPP), a uma densidade inicial de 2×10^5 células/cm² 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 CO₂. Segundo protocolo já bem estabelecido por (COSTA et al., 2001). Vinte e quatro horas após a distribuição das células nas placas, estas foram tratadas com o alcaloide, diluído diretamente no meio de cultura suplementado, na concentração de 500 μM , por um período de até 72 horas. Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem das células.

Cultura primária de astrócitos

Culturas primárias das células da glia foram preparadas de acordo com método descrito por Cookson e Pentreath (1994). Resumidamente, os hemisférios cerebrais de crias de ratos Wistar de um dia de idade pós-natal foram isolados assepticamente e as meninges foram removidas com auxílio de lupa para posterior dissecação do tecido cortical. Em seguida, as células foram suspensas em meio DMEM/HAM-F12 (Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 100 UI/mL de penicilina G, estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$, 2 mM de L-glutamina, 0,011 g/L de piruvato, 10% de SFB, 3,6 mg/L HEPES e 33 mM de glicose (Cultilab, SP, Brasil) e cultivadas em placas de 100 milímetros ϕ em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C . O meio de cultura foi mudado a cada dois dias, e as células foram cultivadas durante 15 dias, para serem então tripsinizadas (tripsina-EDTA) e plaqueadas a uma densidade de 670

células/mm² e mantidos por 48 h em uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37° C para estabilização da cultura.

Análise da viabilidade celular

Redução dos Sais de Tetrazólio (MTT)

O teste de redução dos sais de tetrazólio é realizado por uma dosagem colorimétrica sensível, quantitativa e confiável, utilizada para medir a viabilidade, proliferação e a atividade celular (HANSEN et al., 1989). Seu princípio baseia-se na capacidade das desidrogenases mitocondriais de células vivas em converter o brometo de 3-(dimetil-tiazolil-2)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), um substrato amarelo, em cristais de formazan de cor violácea (produto). As células cultivadas em placas de 96 poços foram expostas ao alcaloide monocrotalina por 72 h. Depois de decorrido o tempo de exposição, o meio de cultura foi desprezado e foi adicionado a cada poço da placa de 96 poços, 100 µL de uma solução de MTT (Sigma, M2128) em meio DMEM (Cultilab) a uma concentração final de 1mg/mL. As células foram incubadas em estufa controlada a 37°C, 5% de CO₂ por 2 h. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de um tampão de lise, contendo 20% de SDS e 50% de DMF, pH 4,7 sendo, a placa incubada em seguida por 12 h a 37 °C, para a dissolução completa dos cristais de formazan. A absorção óptica de cada amostra em octuplicata foi feita a um comprimento de onda de 490 nm, utilizando o leitor de microplaca THERMO PLATE modelo TP-reader. O tamanho da amostra (n) para cada grupo foi de oito (8) e os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata. Os resultados foram apresentados como a porcentagem da viabilidade (média e desvio padrão) em relação ao controle negativo com DMSO (0,5%), considerado como 100%, após análise comparativa deste, com o controle negativo contendo apenas meio de cultura.

Avaliação de alterações morfológicas e expressão de proteína do citoesqueleto

Coloração pancreômica de Rosenfeld e Imunocitoquímica

Modificações morfológicas foram observadas analisando as células através da coloração de Rosenfeld e através da marcação imunocitoquímica para a proteína S100, do

citoesqueleto das células da linhagem C6. Todas as células, controle e tratadas foram lavadas três vezes com PBS, fixadas e permeabilizadas com metanol gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 20 minutos. As células fixadas foram coradas segundo protocolo estabelecido por Rosenfeld (1947). O corante foi adicionado às placas previamente fixadas com metanol gelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em volume suficiente para cobrir completamente o tapete celular. Decorridos 3 minutos, adicionou-se 20 gotas de água destilada à solução corante, deixando agir por mais 20 minutos em temperatura ambiente. As placas foram então lavadas com água destilada, secas e analisadas por microscopia óptica. A quantificação de células em processo de vacuolização foi realizada após captura de imagens considerando aquelas com mais de dez vacúolos citoplasmáticos.

Para análise imunocitoquímica, as células fixadas foram incubadas por 1 hora com anticorpo policlonal de coelho anti-S100 (1/500 em PBS, Boehinger, Mannheim, Alemanha). E posteriormente, incubadas com anticorpo de caprino conjugado com isotiocianato de tetrametilrodamina anti-IgG de coelho, por 2 horas à temperatura ambiente, ambos os procedimentos sob agitação lenta e mantidos no escuro. A integridade da cromatina nuclear foi analisada corando-a com o corante fluorescente intercalante do DNA, Hoechst 33258 (Sigma, St Louis, MO). Uma solução de Hoechst 33258 foi preparada em PBS, a uma concentração final de $5\mu\text{g/mL}$, e deixada em contato com as células por 10 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura. Em seguida, as células foram analisadas por microscopia fluorescente (Olympus AX70).

Análise da expressão protéica (S100)

Os efeitos da MCT em C6 foram também avaliados pela técnica de western blotting. Extratos de células foram obtidos para a determinação e quantificação de proteínas totais após a exposição ao alcaloide. As células foram lavadas duas vezes com PBS e extraídas a frio, utilizando um tampão de lise contendo 2% (p/v) SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2 mM EGTA, 4 M uréia, 0,5% (v/v) Triton X-100, suplementado com $1\ \mu\text{L/mL}$ de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma, St. Louis, MO). A suspensão protéica foi homogeneizada com um poterizador do tipo Pellet Pestle Motor (Kontes, Vineland, New Jersey). A quantificação das proteínas totais em cada amostra foi obtida utilizando um kit DC para dosagem de proteínas totais (Kit DC Bio-Rad, Hercules, CA, USA), segundo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) modificado.

Para análise da S100, 50 µg de proteínas totais foram separadas por eletroforese (200 V, por 45 minutos) por método descontínuo utilizando-se um gel de empilhamento a 4% e um gel de migração a 10% de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinila (PVDF, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por duas horas a 100 V. O bloqueio de sítios inespecíficos das membranas foi realizado com uma solução de TRIS-salina (TRIS-NaCl) 20 mM em pH 7,5 contendo 0,05% de Tween 20 (TBS-T) com 5% de leite desnatado, por uma hora à temperatura ambiente. Após ligeira lavagem com TBS-T para retirar o excesso de solução de bloqueio, as membranas foram incubadas overnight, à temperatura ambiente, com anticorpo policlonal S100 conjugado com HRP (1: 5.000, Boehringer, Mannheim), sob lenta agitação. As membranas foram lavadas três vezes em TBS-T por 10 minutos cada, seguidas de uma lavagem com TBS, visando retirar o excesso de Tween 20 das membranas. As bandas imunorreativas foram visualizadas usando o kit de luminescência (Bio-Rad, Hercules, CA), de acordo com as instruções do fabricante. A determinação quantitativa das bandas reativas foi realizada através de análise densitométrica da imagem digitalizada, obtida através do sistema de aquisição de imagem (ScanJet 4C – HP), e utilizando-se o software ImageJ 1.4.6 u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA).

Avaliação da atividade catalítica dos citocromos 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. A etoxiresorufina e a metoxiresorufina foram escolhidas por serem marcadores e substratos específicos para CYP1A1/2. Estes substratos parecem ser metabolizados preferencialmente pelas subfamílias 1A (PARKINSON, 2001; NIMS & LUBET, 1996; NERURKAR et al., 1993). A atividade do sistema enzimático CYP1A foi determinada medindo a formação da taxa de resorufina pelos substratos etoxiresorufina e metoxiresorufina, utilizando uma modificação do procedimento descrito por Burke et al., 1977. As células foram incubadas com 0,6µM de etoxiresorufina ou metoxiresorufina durante 2 horas, a 37,8°C. Em seguida, o sobrenadante foi removido de cada placa e a fluorescência medida no equipamento (Flex Station 3 Benchtop Multi Mode

Microplate Reader), com ($A_{ex} = 510\text{nm}$ e $A_{em} = 586\text{nm}$). A atividade de CYP1A foi expressa como a quantidade em pmol de resorufina.

Avaliação da depleção de glutathiona

Para a avaliação da depleção de glutathiona foi utilizado como modelo de estudo culturas primárias de astrócitos. O Monochlorobimano (MCB) foi utilizado para avaliar a depleção da glutathiona reduzida (GSH). Uma solução de estoque de MCB foi preparada em 100mM em metanol absoluto e guardada a -20°C no escuro. ADL-butionina-SR-sulfoximina (BSO) foi utilizada na concentração de 1mM, para inibir a síntese de GSH sendo adotada como controle positivo. Além disso, 40 minutos antes do tratamento com a MCT, a cimetidina (100mM), um inibidor do citocromo P450 foi adicionada às culturas. Após 72 h de tratamento com 500 μM de MCT, as culturas foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 1 μM de MCB em 400mL de meio de cultura durante 40 min. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas novamente com PBS. A detecção da glutathiona na forma livre é realizada por microscópio de fluorescência (Olympus BX51URA2) na faixa de excitação entre 330 e 385nm e de emissão de 420nm. As fotografias foram tiradas com um tempo de exposição de 60ms para todas as amostras com o uso de uma câmera OlympusBX-2 ligado ao microscópio.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para determinar a diferença estatística entre dois grupos foi realizada uma análise de Variância seguida pelo pós-teste Student-Newmann-Keuls. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

Resultados

Avaliação da viabilidade celular

O efeito da MCT e desta associada ao inibidor de P450 (cimetidina) ou indutor (omeprazol) sobre a viabilidade celular nas culturas da linhagem C6 foi determinado através da medida da função das desidrogenases mitocondriais (teste do MTT) após 72 h de experimento. O uso do omeprazol como indutor de metabolismo em células da linhagem C6 foi realizado de forma inédita neste experimento desenvolvido pelo grupo LabNq. Quando comparadas com células em condições controle do solvente (0,5% DMSO), do ativador de CYP450 (0,5% DMSO + OMZ 20 μ M) e do inibidor de CYP450 (0,5% DMSO + CIM 100 μ M), com as células tratadas com MCT (500 μ M) ou MCT (500 μ M) associada ao inibidor do CYP450 (CIM 100 μ M), não houve alteração na viabilidade (Fig 3). No entanto, este teste revelou que a exposição à MCT associada com o ativador omeprazol, sugere que (OMZ 20 μ M) a atividade das desidrogenases mitocondriais foi reduzida em 19%.

Efeito da MCT sobre a morfologia das células gliais da linhagem C6 e de astrócitos

Para investigar alterações morfológicas em células da linhagem C6 em resposta à exposição ao alcaloide MCT e desta associada ao inibidor ou indutor de P450, realizamos coloração das células com o corante pancrônico Rosenfeld (Fig.4.1). Foi visualizado que células expostas a 0,5% DMSO apresentam uma morfologia bipolar, com corpo celular arredondado e emissão de curtos e finos prolongamentos. No entanto, após 72h de tratamento com o alcaloide MCT 500 μ M, OMZ 20 μ M ou a associação destes (OMZ 20 μ M + MCT 500 μ M) as células apresentaram intensa vacuolização (Fig 4.2) e alongamento e/ou espessamento dos prolongamentos. A quantificação de células apresentando mais de dez vacúolos citoplasmáticos, revelou que a monocrotalina a 500 μ M, por 72h, induz um aumento na quantidade de células em processo de vacuolização de 10 e 8 (Fig 4) vezes maior que na condição controle (DMSO 0,5%), em tratamentos com o alcaloide isolado ou em associação com o omeprazol, respectivamente.

Mudanças na morfologia após tratamento com MCT e/ou moduladores da atividade P450 foram também evidenciadas em culturas primária de glia após 72 de experimento. Em condições controle foi verificada predominância de astrócitos poligonais (Fig 5) e algumas poucas células com citoplasma contraído, núcleo mais eletroelectrodenso e várias ramificações, caracterizando fenótipo microglial. Um aumento de células com este fenótipo microglial foi evidenciado nas culturas primárias de glia após tratamento com MCT, o que foi drasticamente intensificado nas culturas com associação de MCT e o estimulante de P450 OMZ. Ainda, nestas condições os astrócitos adquiriram fenótipo bipolar gerando zonas restritas a células com fenótipo microglial (Fig 5.1), que se apresentaram bastante ramificadas, realizando interação através de seus prologamentos celulares.

Efeitos da MCT na ativação de células gliais da linhagem C6.

Para investigar se a MCT induz ativação de células gliais da linhagem C6, assim como se o inibidor ou o indutor de P450 modulam esta ativação, analisamos o padrão de expressão de S100, um marcador estrutural de gliose reativa, expresso em células desta linhagem, através da marcação imunocitoquímica (ICQ) e co-marcação da cromatina nuclear pelo agente Hoechst-33258, e os níveis da proteína determinado por western blotting. A marcação imunocitoquímica da proteína S100 nestas células, tanto em exposição ao DMSO 0,5% como em exposição ao controle DMSO mais Cimetidina revelou uma predominância de células S100 positivas, com expressão heterogênea e de pouca intensidade (Fig.6, A e B). Por outro lado, após exposição à condição de tratamento, 500 μ M de MCT, ou 500 μ M de MCT + cimetidina e controle de omeprazol (Fig 6, C, D,E) foi verificado que houve uma alteração do padrão de expressão da S100 para homogênea e aumento da intensidade da fluorescência em células S100 positivas. Já, as células expostas à associação de MCT 500 μ M com OMZ revelaram-se com baixa intensidade e padrão heterogêneo de expressão da proteína S100. (Fig.6, F).

O aumento da expressão de S100 em exposição a 500 μ M MCT e redução desta expressão em exposições à associação de MCT 500 μ M + omeprazol foram confirmados através da técnica de western blotting e imunodeteção de S100, que demonstrou uma faixa imunorreativa de proteína com 10 kDa nas culturas na condições controle (0,5% DMSO e OMZ iguais), bem como um aumento nos níveis de expressão dessa proteína após 72 h de

tratamento com 500 μ M MCT. Por outro lado, uma sutil redução na expressão desta proteína foi detectada após 72 h de tratamento associado da MCT com o OMZ nas culturas (Fig 7).

Efeito do tratamento monocrotalina na depleção de GSH em cultura primária de astrócitos

O uso do Monoclorobimano (MCB) para avaliar a depleção da GSH mostrou que ambas as exposições de 72 h à MCT 500 μ M e ao BSO (controle positivo) depletam GSH em cultura primária de astrócitos, registrado por uma ausência de fluorescência. Porém, vale ressaltar que a depleção da GSH pela MCT apresentou-se de forma parcial. De forma interessante, a inibição do sistema enzimático citocromo P450 por pré-tratamento com 100 μ M de cimetidina, inibiu a depleção de GSH, observada pela presença de fluorescência (Figura 8).

Avaliação do metabolismo via citocromo P450

Experimentos visando avaliar o metabolismo da MCT via citocromos P450 da família 1A foram realizados usando os substratos enzimáticos etoxiresorufina e metoxiresorufina, substratos das isoformas 1A1 e 1A2, respectivamente, 12 horas após tratamento das células C6. As culturas com o substrato etoxiresorufina tratadas tanto com MCT, CIM, OMZ, ou com associação MCT + CIM não apresentaram qualquer alteração na quantificação do produto fluorescente, resorufina, sugerindo neste tempo, após tratamentos, a isoforma 1A1 de P450 não estavam ativas ou envolvidas no metabolismo da MCT. No entanto, um aumento significativo na produção da resorufina foi verificado nas culturas tratadas com ambos MCT e OMP, indicando que a ativação do CYP 1A 1 nesta condição. Por outro lado, modificações no metabolismo da metoxiresorufina somente foram evidenciadas após adição do inibidor CIM, mostrando-se efetivo na inibição ds isoforma 1A2 de P450 (Fig. 9).

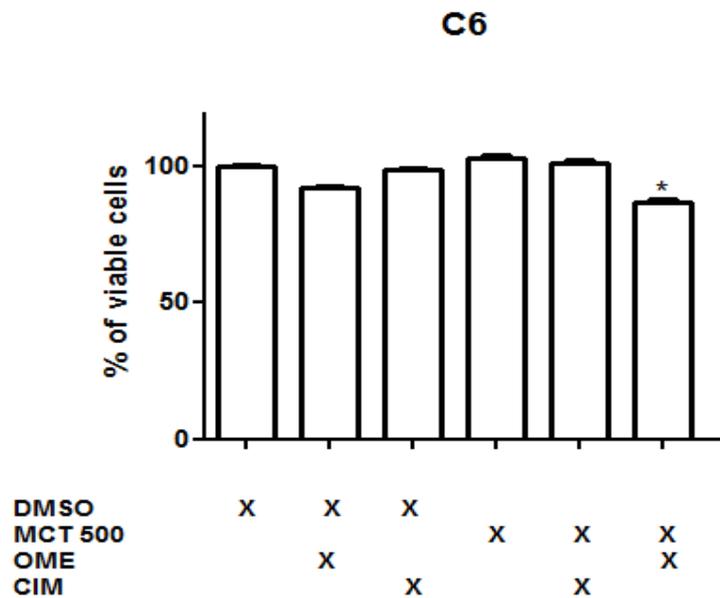


Fig 3: Análise do efeito do alcaloide monocrotalina e do inibidor e ativador de P450 respectivamente cimetidina e omeprazol sobre a viabilidade das células gliais da linhagem C6 através do teste de MTT. As células foram incubadas em condições controle (0,5% de DMSO) ou na presença de MCT, OMZ, CIM ou tratamentos associados. Resultados expressos em percentagem da absorbância em relação ao controle considerado como 100%. * $p \leq 0,05\%$.

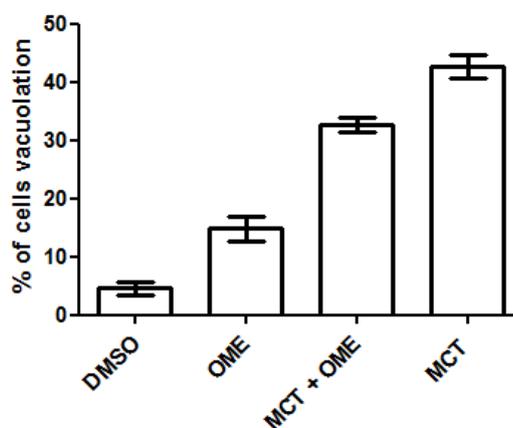


Fig 4: Quantificação dos vacúolos citoplasmáticos nas culturas de células da linhagem C6, tratadas com o alcaloide MCT e/ou tratamentos associados com OMZ. Dados em percentual em relação ao controle.

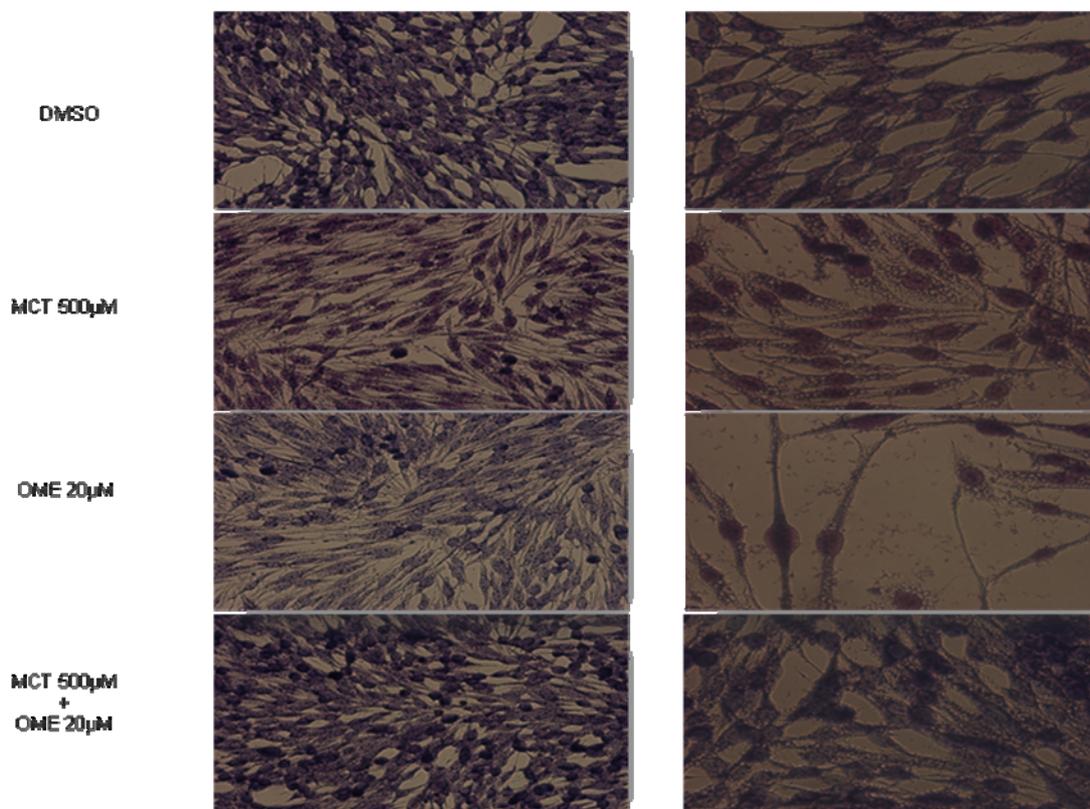


Fig 4:1. Análise do efeito do alcaloide MCT e do ativador de P450 OME na morfologia celular da linhagem C6 através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld. Culturas em condições de controle ou após 72 horas de tratamento com o alcaloide MCT 500µM ou com o ativador OMZ 20µM e tratamento associado MCT 500µM/OMZ 20µM. Foto micrografias em objetivas de 10 e 20x 0,70.

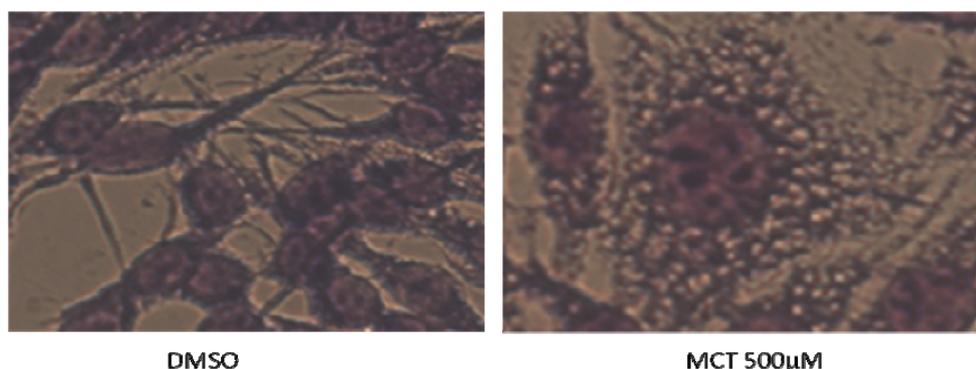


Fig 4.2 Detalhe do efeito do alcaloide MCT em relação ao controle DMSO (0,5%) na morfologia celular da linhagem C6 através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld. Notar a intensa vacuolização nas células. após 72 horas de tratamento com o alcaloide MCT 500µM. Foto micrografias em objetivas de 40x 0,70

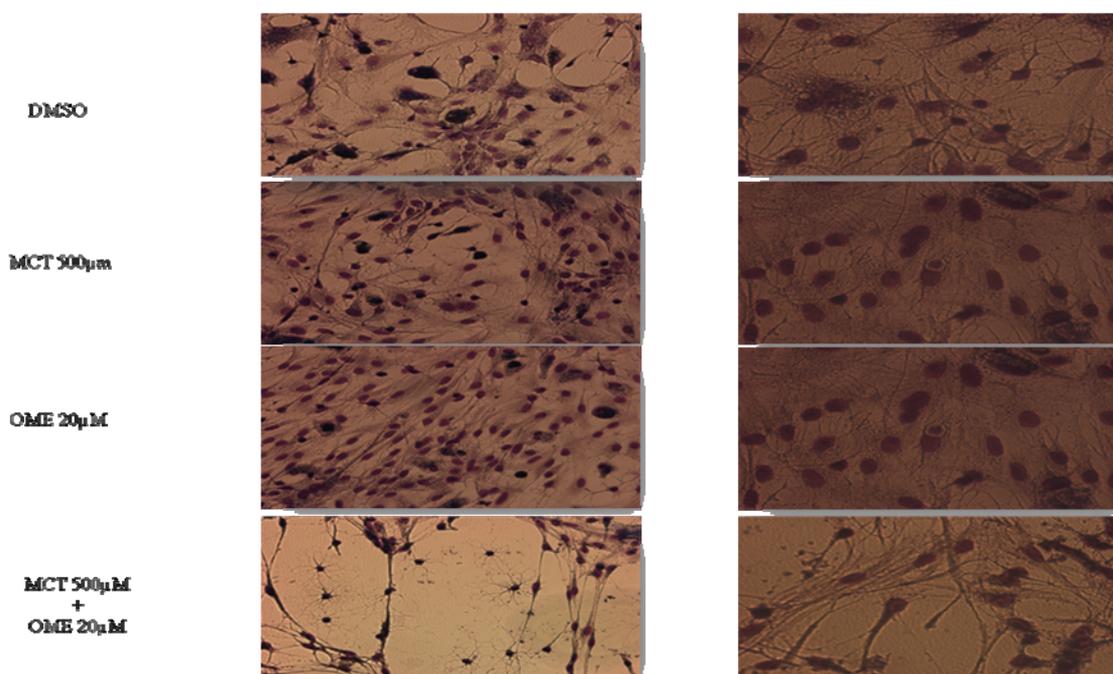


Fig 5: Análise do efeito do alcaloide MCT e do ativador OMZ de P450 na morfologia celular de astrócitos através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld. (A) Culturas em condições de controle ou após 72 horas de tratamento com o alcaloide MCT 500µM ou com o ativador OMZ 20µM e tratamento associado MCT 500µM/ OMZ 20µM. Foto micrografias em objetivas de 10 e 20x 0,70.

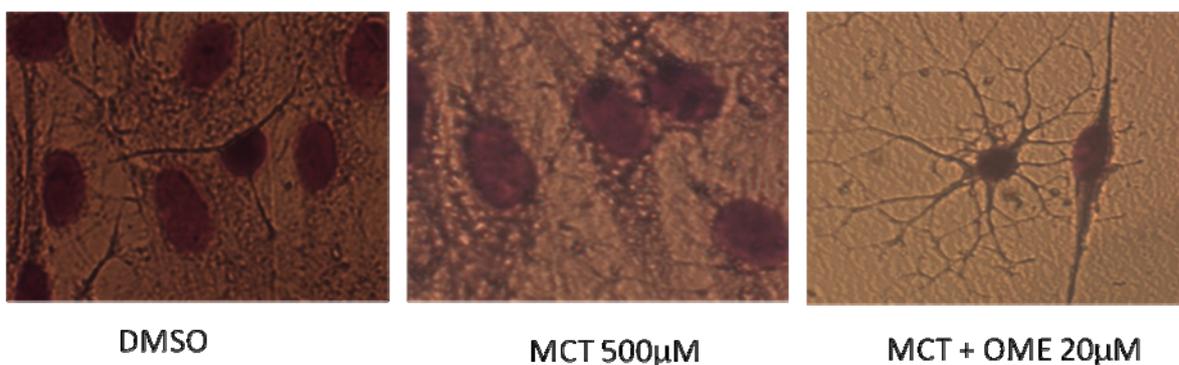


Fig 5.2 Detalhe do efeito do alcaloide MCT em relação ao controle DMSO (0,5%) na morfologia celular de astrócitos e tratamento associado (MCT+OME), mostrando predominância de células com morfologia microglial, através da coloração com o agente pancrômico de Rosenfeld. Notar a intensa vacuolização nas células após 72 horas de tratamento com o alcaloide MCT 500µM. Foto micrografias em objetivas de 40 x 0,70 ampliada.

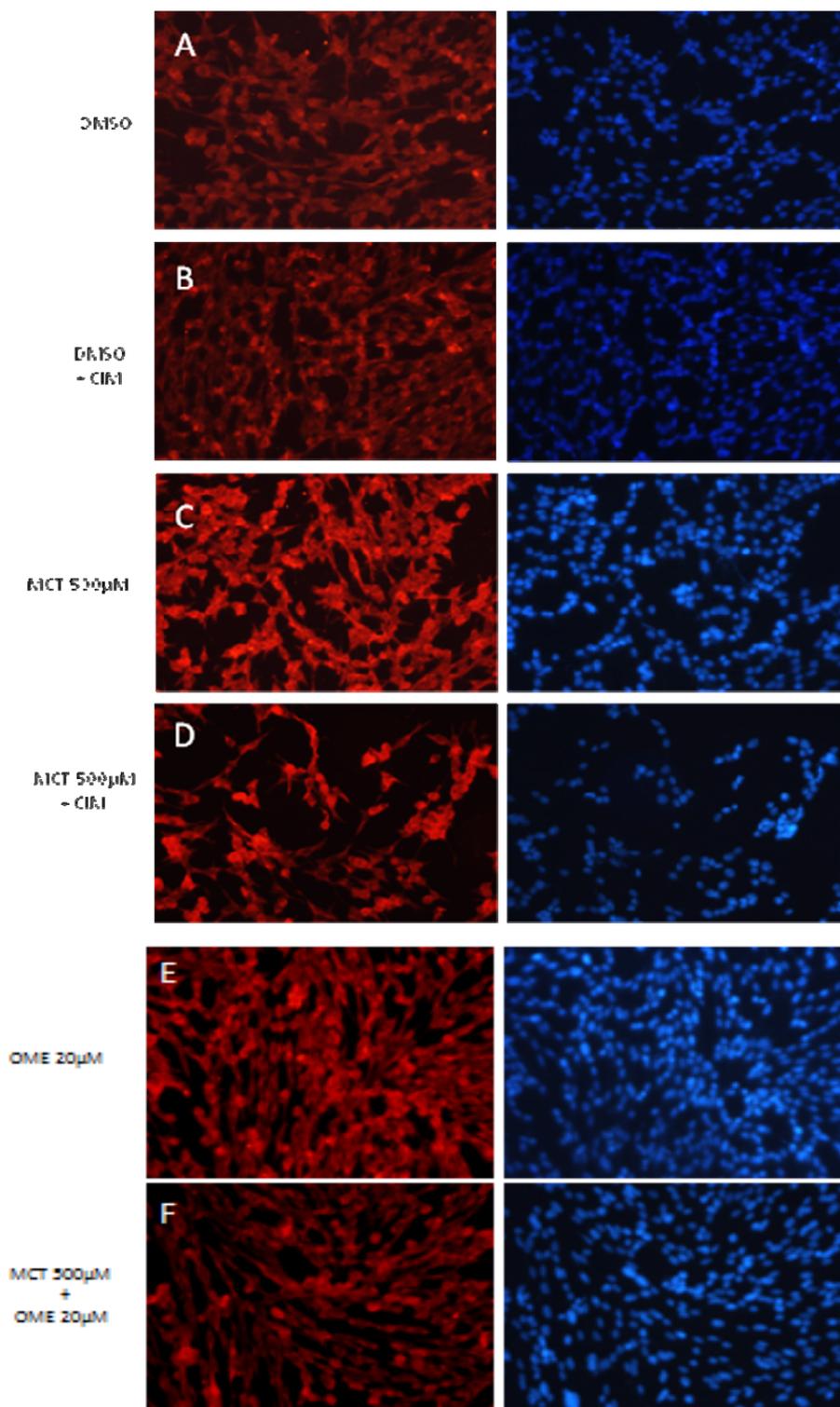


Fig 6: Análise da morfologia e expressão da proteína S100 em cultura de células C6 tratadas com o alcaloide MCT 500µM e com o inibidor de P450 CIM. MCT 500µM e com o ativador de P450 OMZ. Fotomicrografia de marcação imunocitoquímica de C6 expressando a proteína S100 em condições de controle (A e B), tratada (C, D, E, F). A cromatina nuclear das células foi marcada com Hoechst 33258.

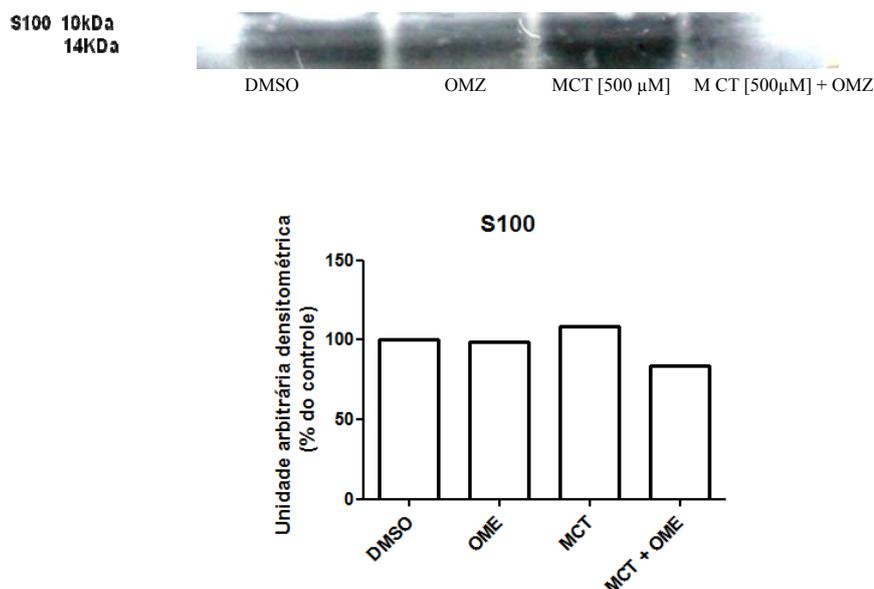


Fig 7: Ativação da proteína S100 em cultura de glia da linhagem C6, em condições controle (0,5% de DMSO) ou tratadas com o alcaloide MCT 500μM e o ativador de P450 OMZ 20μM foi determinada por Western Blott (A). A quantificação foi obtida pelo escaneamento e a análise de densitometria utilizando o programa Image J 1.33u. O gráfico de barras representa a expressão relativa de S100 (B)

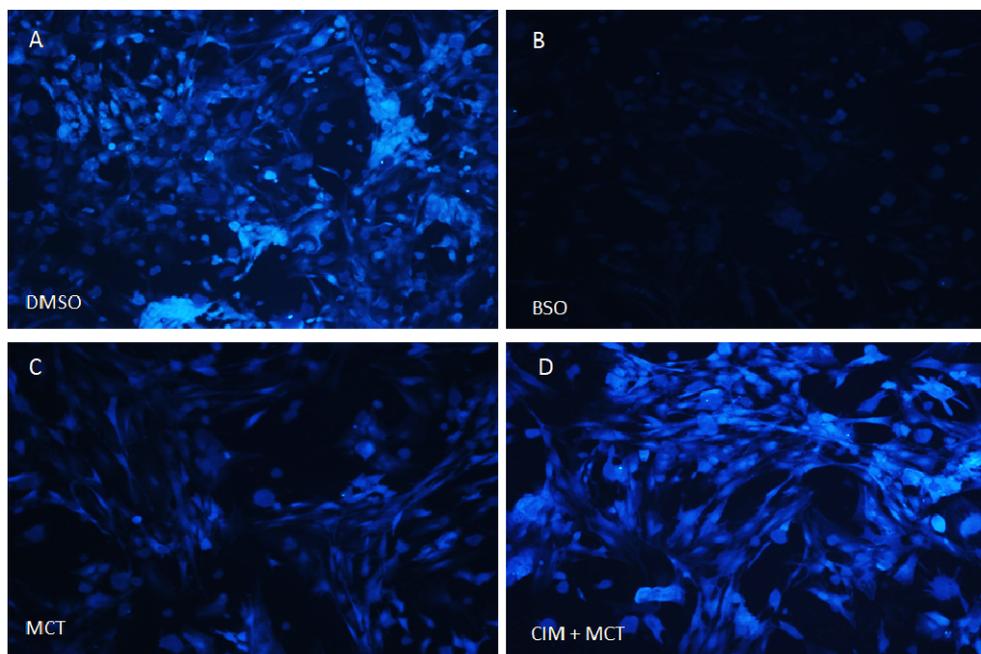


Fig 8: Efeito da MCT em cultura de células de astrócitos na depleção do glutation. (A) Cultura de células em controle negativo que não foram expostas a nenhum tratamento. (B) Cultura de células em controle positive expostas a 1 μM D,L-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO). (C) Células após 72 horas de tratamento ao alcaloide MCT 500μM. (D) Células previamente expostas a cimetidina (100 μM), um conhecido inibidor do sistema enzimático citocoma P450. Objetiva 20 x 0.70, scale bars = 10

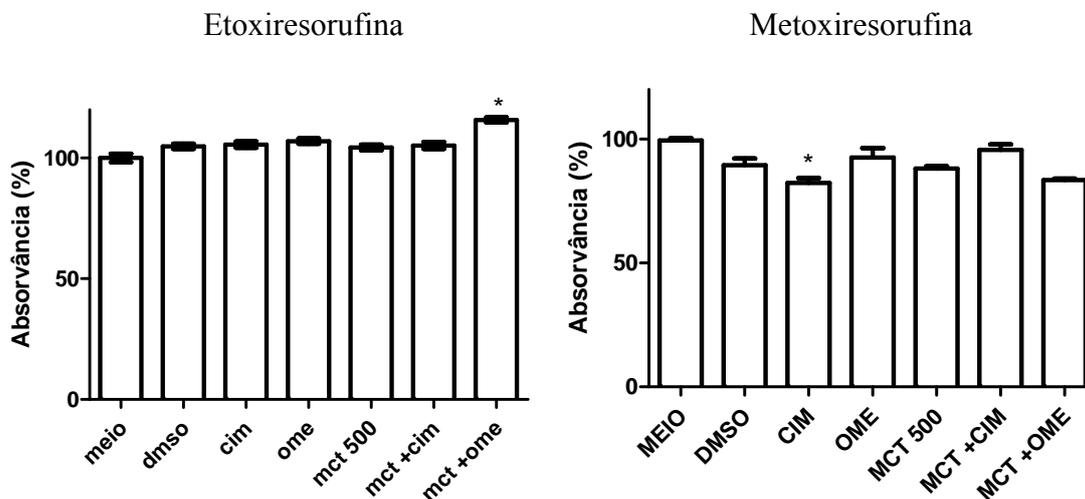


Fig 9: Efeito da MCT em cultura de células de C6 na metabolização via citocromo P450 1 A 1/2 usando os substratos etoxiressorufina e metoxiressorufina.

DISCUSSÃO

As células gliais, em especial os astrócitos, são fundamentais para o controle da homeostasia no SNC, por fornecerem suporte nutricional e estrutural para neurônios e por participarem de outras funções, tais como função imune, metabolização e detoxificação (TARDY, 1991; MONTGOMERY, 1994; KANDEL, 2000) através do citocromo P450. Neste sentido, as células astrocíticas da linhagem C6 vêm sendo utilizadas para se estudar o envolvimento do sistema enzimático citocromo P450 em células nervosas (GENG e STROBEL, 1993), (GENG e STROBEL, 1997), por apresentarem uma eficiente expressão deste sistema nesta linhagem celular (STROBEL et al., 1995). Neste estudo buscamos determinar se a MCT modifica outros componentes estruturais em cultura primária de glia cortical de ratos e em células gliais da linhagem C6, bem como o papel do citocromo P450 na toxicidade do alcaloide usando um inibidor e um ativador do complexo enzimático, a cimetidina (CIM) e o omeprazol (OMZ), respectivamente (CHANG et al., 1992), LIN e LU, 1994, ANGIOLILLO et al, 2011, DRUG DATABASE). O uso do omeprazol como indutores

de metabolismo, em especial do P450 já é bastante conhecido em células hepáticas (DIAZ et al, 1990), (COUROUCLI, et al, 2002) na literatura. Neste estudo, o uso do omeprazol como indutor de P450 é inédito e os resultados são pioneiros neste tipo de modelo experimental.

Observamos, através do teste do MTT, que avalia a função mitocondrial, uma diminuição da viabilidade das células após 72 h do tratamento associado da MCT (500 μ M) com o OMZ (20 μ M) quando comparado aos demais controles e tratamentos (DMSO; DMSO + OMZ; DMSO + CIM; MCT + CIM). Em estudo realizado por Barreto et al. (2006; 2008), foi demonstrado que a monocrotalina em células astrocíticas não reduzia a viabilidade destas células, enquanto o seu metabólito dehidromonocrotalina (DHMC) induziu citotoxicidade desde 24 h após exposição à concentração de 1 μ M de MCT. Esta toxicidade da MCT associada ao metabólito DHMC foi também demonstrada por Silva-Neto et al. (2006) em modelo de células astrocíticas da linhagem GL-15. No entanto, Pitanga et al. (2011) mostrou haver uma redução na viabilidade de células em um sistema de co-culturas neurônio/glia tratadas com a MCT, mas não em cultura de neurônios, efeito revertido com a adição do inibidor CIM, indicando que a metabolização da monocrotalina a compostos tóxicos, produto da ação enzimas do sistema citocromo P450, é mais eficiente quando astrócitos estão interagindo com neurônios. Por outro lado, a evidência de toxicidade de MCT após adição de OMZ no presente modelo de células astrocíticas C6 reitera o envolvimento do sistema citocromo P450 na toxicidade da MCT.

A S100 é uma pequena proteína dimerica com um peso molecular de aproximadamente 10,5 kD, e pertence a uma família multigênica de proteínas de ligação de cálcio (DONATO, 2003). A S100A e a S100B expressam-se predominantemente pelas células do sistema nervoso central, principalmente células astrogliais, mas também se expressam nas células do melanoma e, em certa medida, noutros tecidos. A proteína funcional, que é composta por hetero ou homodímeros de A1 e B, está implicada em várias atividades reguladoras intra e extracelulares (ZIMMER, 2003; HEIZMANN et al., 2002). Análise da expressão da proteína S100 em células expostas à apenas MCT 500 μ M, demonstrou um aumento na expressão desta proteína. Estudos têm demonstrado que o aumento na expressão de S100 está relacionado a danos em células neurais, (DONATO, 2003) mais especificamente como uma resposta astrocítica (HEIZMANN et al., 2002). Estes dados nos revelam que a monocrotalina induz diretamente resposta glial, que neste caso parece ser eficiente na proteção destas células, o que não ocorre quando supostamente a produção do metabólito tóxico é aumentada pela presença do omeprazol, onde visualizamos uma redução na

expressão da proteína S100. Em estudo utilizando co-cultura neurônio-glia, Pitanga et al. (2011) mostrou haver uma falha na polimerização da proteína de citoesqueleto de neurônios, a beta-III-tubulina, sendo mais evidente 72 h após tratamento com a MCT. Outros estudos realizados por Silva-Neto et al. (2006) em culturas utilizando células gliais da linhagem GL-15, revelaram que a MCT induz importante regulação negativa na expressão de proteínas associadas à microtubulos (MAPs), fundamental para a manutenção da dinâmica dos microtubulos (HEALD e NOGALES, 2002). Além disso, a indução de modificação de expressão da proteína de citoesqueleto astrocitário GFAP foi também verificada em culturas primárias após tratamento tanto com a MCT, quanto pelo seu metabólito DHMC (BARRETO et al., 2006; BARRETO et al., 2008). Todos esses achados vêm reforçar a hipótese defendida anteriormente por nosso grupo que proteínas do citoesqueleto neuronal e glial são alvos moleculares da MCT e seus metabólitos.

Sabe-se que tanto o DNA como as proteínas são macromoléculas alvos de metabólitos da MCT e que danos em macromoléculas são eventos importantes para desencadear a morte celular programada (apoptose), que já foi sugerida como tipo de morte induzida pelo metabólito DHMC (Silva-Neto et al., 2006). Ocorre que apoptose e autofagia não são vias exclusivas, elas poderiam ocorrer em sinergia, onde ambas as vias são interligadas. É possível que tanto a parte de apoptose, quanto a autofagia se forme de um mesmo mecanismo, onde a autofagia atua como um antagonista para bloquear a apoptose e promover a sobrevivência da célula (EISENBERG-LERNER et al., 2009). Estas informações nos sugerem que os vacúolos citoplasmáticos induzidos por exposição das células à monocrotalina possam expressar um processo de autofagia, principalmente pelo fato de que autolissossomos (vacúolos autofágicos) podem ser observados por microscopia óptica (Aki et al., 2012). Neste estudo observamos que a MCT induz um aumento na quantidade de células C6 em processo de vacuolização de 10 e 8 vezes após tratamento com o alcaloide isolado ou em associação com o omeprazol, respectivamente. Além disso, vacuolização também foi evidenciada em astrócitos das culturas primárias após tratamento com a MCT ou em associação com o OMZ. Interessante ressaltar que Pitanga et al. (2011) mostrou haver vacuolização em co-culturas neurônio/glia tratadas com MCT (100 μ M). Vacuolização citoplasmática foi igualmente verificada por Santos et al. (2008) através da histologia hepática em equínos e ruminantes alimentados acidentalmente por plantas hepatotóxicas (*Panicum spp.*, *Tribulus terrestris*, *Agave lechiguilla* e *Nathercium ossifragum*), o que sugere uma hiperplasia do retículo citoplasmático liso em função da detoxificação da droga (PITANGA et al, 2011). Somado a

este achado, a associação de MCT e o estimulante de P450 OMZ também induziu os astrócitos a adquirirem fenótipo bipolar gerando zonas restritas a células com fenótipo microglial, que se apresentaram bastante ramificadas. A proliferação e interação de células de microglia através de seus prologamentos celulares já foi demonstrada após insultos neurotóxicos e pode ser resultado de sua ativação estando relacionado à sua função na neuroproteção (BLOCK et al., 2007).

O P450 é um complexo enzimático o qual é utilizado como via de metabolização de xenobióticos (COOPER and ROSENTAL, 1965 *apud* LOURENÇO, 2009). 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), porém, a localização de CYP para regiões específicas do cérebro e tipos de células permitem ter um impacto considerável sobre o metabolismo de certos microambientes no cérebro e do cérebro como um todo (MIKSYS et al., 2002). Em nosso estudo, utilizamos dois substratos etoxiresorufina e metoxiresorufina, específicos das famílias CYP 1A 1 e CYP 1A 2, respectivamente, nas culturas tratadas com o MCT e/ou a cimetidina e omeprazol. Estes substratos, quando em contato com maquinaria celular poderiam ser convertidos ao produto fluorescente resorufina, que seria lançado no meio das culturas tratadas, mostrando o envolvimento destas famílias na metabolização da MCT. É sabido que a MCT é metabolizada no fígado pela família CYP 3A4 (COUET et al., 1996, KASAHARA et al., 1997). Investigamos o envolvimento de CYP 1 A pelo fato de células astrocíticas expressarem muitas isoformas de CYP 1A (FERGUSON e TYNDALE, 2011) e pelo fato de nossos modelos *in vitro* de cultura de células glia e co-culturas neurônio/glia utilizar células de ratos da linhagem wistar. Nossos resultados mostraram aumento na conversão de etoxiresorufina a resorufina somente nas culturas tratadas com ambos MCT e OMP, indicando que a ativação do CYP 1A 1, o que pode estar relacionada a toxicidade observada pelo MTT nesta condição. Estudos desenvolvidos por Nicholson e Renton, (1999), dosaram no sobrenadante de culturas primárias de astrócitos a resorufina após metabolização via citocromo P450 da etoxiresorufina em culturas previamente expostas ao LPS induzindo resposta inflamatória aos astrócitos. Por outro lado, estudos de metabolismo *in vitro* que envolvem o sistema citocromo P450 são realizados utilizando frações microssomais, que estão presentes no retículo endoplasmático de tecidos. Em estudo desenvolvido por Nicareta (2004), avaliou efeitos de doses subletais da deltametrina em biomarcadores bioquímicos como os níveis de citocromo P450 total (CYP450), a atividade da enzima EROD

(etoxiresorufina – O – desetilase), a atividade da Atpase, na forma $\text{Na}^+ \text{K}^+$ - ATPase e a atividade da colinesterase (ChE) em peixes, utilizando frações microssomais de fígado destes animais. Assim, nossos resultados mostraram o envolvimento da CYPs 1 A1 na toxicidade da MCT 12 h após tratamento, no entanto, estudos após maior tempo de exposição e usando frações microssomais devem ser desenvolvidos para maior esclarecimento de isoformas de P450 envolvidas no metabolismo e toxicidade do alcaloide.

Como discutido acima, para ser tóxico o alcaloide MCT precisa ser metabolizado pelo citocromo P450 que por sua vez gera metabólitos ativos (DHMC) capazes de causar toxicidade as células. Por sua vez, esses metabólitos são conjugados com a glutatona para seguir a rota de detoxificação. No presente estudo, utilizamos o monoclorobimano (MCB) para avaliar a depleção da GSH que mostrou que ambas as exposições à MCT (500 μM) e ao BSO (controle positivo) depletam GSH em cultura primária de astrócitos, registrado por uma ausência de fluorescência. Porém, vale ressaltar que a depleção da GSH pela MCT apresentou-se de forma parcial. De forma interessante, a inibição do sistema enzimático citocromo P450 por pré-tratamento com 100 μM de cimetidina, inibiu a depleção de GSH, observada pela presença de fluorescência. Este resultado é interessante uma vez que Pitanga et al. (2011) mostrou haver depleção total pela MCT (100 μM) em co-culturas neurônio glia desde 12 h após tratamento. Isso mostra que astrócitos isolados são capazes de sozinhos realizarem metabolismo de fase II. Em trabalho desenvolvido por Lee et al., (2010) indicaram que células da glia contém GSH que protege contra o stresse oxidativo e a sua depleção está associada a várias alterações moleculares que podem estar relacionadas a desordens neurológicas. Assim, o presente estudo e aqueles desenvolvidos por Barreto et al. (2006; 2008) e Silva-Neto (2006) sugerem que a falta de citotoxicidade observada em células glia pode ser devida a uma eficiente proteção através de conjugação de metabólitos tóxicos com GSH.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram:

- Que a proteína de citoesqueleto e ligante de cálcio (S100) expressa em células astrócíticas da linhagem C6 é um alvo molecular do alcaloide MCT
- Que a MCT apresenta citotoxicidade para células C6 após estímulo da isoforma 1A do sistema P450 e que a mesma está associada ao subtipo 1A1.
- Que a MCT gera depleção parcial de glutatona em cultura primária de glia enriquecida de astrócitos
- Ainda, os resultados obtidos mostram uma possível ativação da microglia após estímulo ao metabolismo da MCT com o tratamento com OMZ, que deve ser investigada em estudos complementares.

Os resultados apresentados nesta dissertação vêm, assim, contribuir para elucidar o metabolismo e neurotoxicidade da MCT e os impactos neurológicos já observados em animais intoxicados pelo consumo da *Crotalaria retusa* e servirão como norteadores para pesquisas aplicadas que visem contribuir para a prevenção e tratamento de intoxicações animais por consumo de folhas ou sementes da *Crotalaria*, além de constituir um bom modelo de estudo de neurotoxicidade.

Referências:

- ANGIOLILLO, D. J; GIBSON, C. M; CHENG, S; OLLIER, C; NICOLAS, O; BERGOUGNAN, L; PERRIN, L; LACRETA, F.P; HURBIN, F, AND DUBAR, M. (2011) Differential effects of omeprazole and pantoprazole on the pharmacodynamics and pharmacokinetics of clopidogrel in healthy subjects: randomized, placebo-controlled, crossover comparison studies. **Clin Pharmacol Ther.** v. 89, p. 65-74, 2004.
- 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. **Rev Bras Saúde Prod Anim.** v. 7 (2), p. 112-127, 2004.
- 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 pyrrol is cytotoxic and alters the patterns of GFAP expression on astrocyte primary cultures. **Toxicology in Vitro.** v. 22 (5), p. 1191–1197, 2008.
- BLOCK, M.L.; ZECCA, L.; HONG J.-S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience.** v. 8, p. 57-69, 2007.
- BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholantrene. **Drug metabolism and Disposition.** v. 2, p. 583-588, 1974.
- CHANG, T.; LEVINE, M; BELLWARD, G.D. Selective inhibition of rat hepatic microsomal cytochrome P-450. II. Effect of the in vitro administration of cimetidine. **J Pharmacol Exp Ther.** v. 260(3), p. 1450-5, 1992.
- COUROUCLI, X.I.; WELTY, S. E.; GESKE, R.S, and MOORTHY, B. Regulation of pulmonary and hepatic cytochrome P4501A expression in the rat by hyperoxia: implications for hyperoxic lung injury. **Mol Pharmacol.** v. 61, p. 507–515, 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** v.37 p.520-530. 2001
- COUET, C. E., CREWS, C., AND HANLEY, A. B. Analysis, separation, and bioassay of pyrrolizidine alkaloids from comfrey (*Symphytumofficinale*). **Natural Toxins.** v. 4(4), p. 163-7, 1996.
- CULVENOR C. C. J; SMITH, L. W. The alkaloids of *Crotalaria retusa*. **L. Aust J Chem** . v. 10, p. 464 – 473, 1957.

DIAZ, D.; FABRE, I.; DAUJAT, M.; SAINT AUBERT, B.; BORIES, P.; MICHEL, H, and MAUREL, P. Omeprazole is an aryl hydrocarbon-like inducer of human hepatic cytochrome P450. **Gastroenterology**. v. 99, p.737–747, 1990.

DONATO R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int J Biochem Cell Biol**.v. 33, p. 637-668, 2001.

DRUG DATABASE :<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00338>. acesso em 20 de fevereiro de 2012.

E. HEDLUND; GUSTAFSSON. J, A.; WARNER, M. Cytochrome P450 in the brain; a review. **Curr. Drug Metab**. v. 2, p. 245–26, 2001.

EISENBERG-LERNER, A.; BIALIK, S.; SIMON, H. U., and KIMCHI, A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. **Cell Death Differ**. v. 16, p. 966–975, 2009.

FUNCK-BRENTANO, C.; BECQUEMONT, L.; LENEVU. A.; ROUX. A.; JAILLON, P and BEAUNE, P. Inhibition by omeprazole of proguanil metabolism: mechanism of the interaction in vitro and prediction of in vivo results from the in vitro experiments. **J Pharmacol Exp Ther**. v. 280, p. 730-738, 1997.

GUPTA, V.; GUPTA, N.; SHAIK, I.H.; MEHVAR, R.; NOZIK-GRAYCK, E.; MCMURTRY, I.F.; OKA, M.; KOMATSU, M.; AHSAN.; F, INHALED. PLGA Particles of Prostaglandin E1 Ameliorate Symptoms and Progression of Pulmonary Hypertension at a Reduced Dosing Frequency. **Mol Pharm**. v. 6;10 (5), p. 1655-67, 2013.

HASHIOKA. S.; KLEGERIS, A.; MCGEER, P. L. Proton pump inhibitors reduce interferon- γ -induced neurotoxicity and STAT3 phosphorylation of human astrocytes. **Glia**. v. 59(5), p. 833-40, 2011.

HEALD, R and NOGALES, E. Microtubule dynamics. **Cell Science at a Glance**. J.Cell Sci. v. 115, p. 3-4, 2002.

HEIZMANN, C.W.; FRITZ, G.; SCHÄFER, B. W. S100 Proteins: Structure, Function and Pathology. **Frontiers in Bioscience**. v. 7, p. 1356-1368, 2002.

HENRY, W.; STROBEL, HIDENORI.; KAWASHIMA, JUN, GENG.; DAVID, SEQUEIRA.; ARTHUR, BERGH.; ANNE, V, HODGSON.; HUAMIN, WANG.; SIJIU SHEN. Expression of multiple forms of brain cytochrome P450. **Toxicology Letters**. v. 82/83, p. 639-643, 1995.

JOHANSSON, A. S.; BOLTON-GROB, R., and MANNERVIK, B. Use of silent mutations in cDNA encoding human glutathione transferase M2-2 for optimized expression in *Escherichia coli*. **Protein Expression Purif**.v. 17, p. 105, 1999.

JUN GENG and HENRY W. STROBEL. Expression and induction of cytochrome *P*-450 1A1 and *P*-450 2D subfamily in the rat glioma C6 cell line. **Brain Research**. v. 774, p. 11–19, 1997.

JUN GENG , HENRY W. STROBEL. Identifications of cytochromes P450 1A2, 2A1, 2C7, 2E1 in rat glioma c6 cell line by RT-PCR and specific restriction enzyme digestion . **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 197, n 3, p. 1179 – 1184, 1998.

KANDEL, E.R. **Nerve cells and behavior**. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSELL, KASAHARA, Y., KIYATAKE, K., TATSUMI, K., SUGITO, K., KAKUSAKA, I., YAMAGATA, S., OHMORI, S., KITADA, M., and KURIYAMA, T. Bioactivation of monocrotaline by *P*-450 3A in rat liver. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 30, p.124-129, 1997.

LIN, J.H. and LU, A.Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 35, n. 5, p. 361-390, 1994.

LOURENÇO, C.L.S. Sistemas bacterianos com expressão do complexo enzimático de citocromos P450 humanos: Aplicação para estudos de NADPH oxidoreductase dos citocromos P450. **Dissertação de Mestrado**, 2009. Universidade do Algarve

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., and RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Biol Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

M.R. BRITTO.; P.J. WEDLUND. Cytochrome P-450 in the brain. Potential evolutionary and therapeutic relevance of localization of drug-metabolizing enzymes. **Drug Metab. Dispos.** v. 20, p. 446–450, 1992.

MARTINEZ, S. T. Constituintes químicos de 3 espécies do gênero *Crotalaria* do campus da cidade universitária da UFRJ. **Dissertação de Mestrado**. UFRJ. 2009

MATHEW, R; ZEBALLOS, G.A; GLOSTER, T; SUNDARARAJAN, C; GEWITZ, M.H. Role of inhibition of nitric oxide production in monocrotalina induced pulmonary hypertension. **Appl. Physiol.** v. 82(5), p. 1493-1498, 1997

MESSIAS, E. Interações Medicamentosas em Psicofarmacologia. **The International Journal of Psychiatry**, v. 9, n. 5, 2004.

MIKSYS, S., RAO, Y.; HOFFMANN, E.; MASH, D.C.; TYNDALE, R. F. Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. **J Neurochem.** v. 82(6), p. 1376-87, 2002.

MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: form, function and roles in diseases. **Vet Pathol**, v.31, p.145-167, 1994.

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

NICARETA, LILIAN. Biomarcadores para a detecção de efeitos subletais causados pela deltametrina em *Ancistrus multispinnis* / Lilian Nicareta. – Curitiba. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2004.

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.

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

PINHEIRO, J. D. A S. N. Determinação de modificações morfológicas e genotoxicidade induzida pelo alcalóide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, em um modelo de células gliais. **Dissertação** (Mestrado em Ciência Animal Nos Trópicos) - Universidade Federal da Bahia, 2007.

PITANGA, B. P.; SILVA, V. D.; SOUZA, C. S.; JUNQUEIRA, H. A.; FRAGOMENI, B. O.; NASCIMENTO, R. P.; SILVA, A. R.; COSTA, M. F.; EL-BACHÁ, R. S., and COSTA, S. L. Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte / neuronco-culture system. **Neurotoxicology**. v. 32(6), 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.

RADIO, N. M.; BREIER, J.M.; SHAFER, T.J.; MUNDY, W.R. Assessment of chemical effects on neurite outgrowth in PC12 cells using high content screening. **Toxicol Sci**. v. 105(1),p. 106-18, 2008.

ROSENFELD, G. **Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica: Nova combinação dos componentes do May Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego prático**. Mem Inst Butantã, v.20, p.329-335, 1947.

SHAIK, I.H; MEHVAR, R. Effects of cytochrome p450 inhibition by cimetidine on the warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. **J Surg Res**. v. 159(2), p. 680-8, 2010.

SHIH, H.; PICKWELL, G.V.; GUENETTE, D.K.; BILIR, B., and QUATTROCHI, L.C. Species differences in hepatocyte induction of CYP1A1 and CYP1A2 by omeprazole. **Hum Exp Toxicol**. v.18, p.:95–105, 1999.

SHIRASAKA, Y.; SAGER, J.E. ; LUTZ, J.D. ; DAVIS, C. ; ISOHERRANEN, N. Inhibition of CYP2C19 and CYP3A4 by Omeprazole Metabolites and their Contribution to Drug-Drug Interactions. **Drug Metab Dispos**. 2013

SOONS, P.A.; VAN DEN BERG, G.; DANHOF, M.; VAN BRUMMELEN, P.; JANSEN, J.B.; LAMERS, C.B, and BREIMER, D.D. Influence of single- and multiple-dose omeprazole treatment on nifedipine pharmacokinetics and effects in healthy subjects. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 42, p.319-324,1992.

T.M. Principles of neural science. 4. ed. New York, 2000. Tara, E; Nicholson, K.; Renton, W. **Modulation of cytochrome P450 by inflammation in astrocytes.** Brain Research, 827, (1999) 12-18

TARDY, M. Astrocyte et Homeostasie. **Méd. Sci.** v. 8, p. 799–804, 1991.

TOMPKINS, L.M and WALLACE, A.D. Mechanisms of cytochrome P450 induction. **J Biochem Mol Toxicol.** v. 21, p.176 –181, .2007.

YU, K.S.; YIM, D.S.; CHO, J.Y.; PARK, S.S; PARK, J.Y.; LEE, K.H.; JANG, I.J.; YI, S.Y.; BAE, K.S, and SHIN, S.G. Effect of omeprazole on the pharmacokinetics of moclobemide according to the genetic polymorphism of CYP2C19. **Clin Pharmacol Ther.** v. 69, p.266-273, 2001.

ZIMMER, D.B.; SADOSKY, P.W.; WEBER, D.J. Molecular Mechanisms of S100-Target Protein Interactions. **Microscopy Research and Technique** . v. 60, p. 552-559, 2003.

Referências gerais:

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

DANTAS, A.F.M.; NOBRE, V.M.T.; RIET-CORREA F.; TABOSA, I.M.; JÚNIOR G.S.; MEDEIROS J.M.; SILVA, R.M.N.;SILVA, E.M.N.; ANJOS, B.L.; MEDEIROS, J.K.D. Intoxicação crônica espontânea por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em ovinos na região do semi-árido paraibano, Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 24(Supl.). p. 18-19, 2004.

GOEGER, D.E.; CHEEKE, P.R.; SCHMITZ, J.A.; BUHLER, D.R. Effects of feeding Milk from goats fed Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea*) to rats and calves. **Am J Vet Res.** v. 43. p.1631 – 1633, 1982.

JUN GENG , HENRY W. STROBEL. Identifications of cytochromes P450 1A2, 2A1, 2C7, 2E1 in rat glioma c6 cell line by RT-PCR and specific restriction enzyme digestion . **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 197, n 3, p. 1179 – 1184, 1998.

JUN GENG and HENRY W. STROBEL. Expression and induction of cytochrome *P*-450 1A1 and *P*-450 2D subfamily in the rat glioma C6 cell line. **Brain Research**. v. 774, p. 11–19, 1997.

PARKER, J.C.; PARRIS, E.L.; REYES, P.F. Clinicomorphologic markers for predicting behavior and guiding therapy for brain tumors. **J.Surg Oncol**. v. 14. P. 21-34, 1980.

RIET-CORREA, F. & MÉNDEZ, M.C. 2007. Intoxicações por plantas e micotoxinas, p.99-221. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol. 2. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

SANTOS, A. Q. Reverastrol e glioma C6: Uma abordagem celular, molecular e protetora contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO, Porto Alegre, 2007.

TYNDALE, R. C and CHARMAINE, S. F. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. **Trends in Pharmacological Sciences**. v. 32, n. 12, 2011.

WILLIAMS, M.C and MOLYNEUX, R.J. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Sci**. v. 35. p. 476-481, 1987.

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

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Resumos publicados e apresentados em Eventos Científicos diretamente relacionados à Dissertação.

NASCIMENTO, R. P. ; Silva, V. D. A ; REIS, L. T. C. ; PITANGA, B. P. S. ; Costa, M. F. D. ; El-Bachá, R. S ; COSTA, S. . Monocrotaline neurotoxicity in astrocyte/neuron co-culture system. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso SBBQ)

PITANGA, B. P. S., Silva, V. D. A, Souza, C. S, Junqueira, H. A, FRAGOMENI, B.O, SILVA, A. R., **NASCIMENTO, R. P.**, Ramon El-Bachá, Costa, M. F. D., COSTA,S.L **Assessment of neurotoxicity of monocrotaline alkaloids extracted from *Crotalaria retusa* in co-culture model of neurons /glia cell**, 2010. (Apresentação de Trabalho, Congresso SBBC)

PITANGA, B. P. S., Silva, V. D. A, Junqueira, H. A, FRAGOMENI, B.O, **NASCIMENTO, R. P.**, Costa, M. F. D., Ramon El-Bachá, COSTA,S.L **Assessment of Neurotoxicity of**

Monocrotaline Alkaloids extracted from *Crotalaria retusa* In co-culture model of neurons/glia cell., 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho, I Simpósio de Farmacologia)

Artigos publicados diretamente relacionados à dissertação

PITANGA, B.P, **NASCIMENTO, R.P**, **SILVA, V.D**, **COSTA, S.L**. The Role of Astrocytes in Metabolism and Neurotoxicity of the Pyrrolizidine Alkaloid **Monocrotaline**, the Main Toxin of *Crotalaria retusa*. **Front Pharmacol.** 2012; 3:144

PITANGA, B. P. S. ; SILVA, V. D. A. ; Souza, CS ; JUNQUEIRA, H. ; FRAGOMENI, B.O.; **NASCIMENTO, R.P.**; Silva, Ana Rita; COSTA, M. F. D. ; ELBACHÁ, R. S.; COSTA, S. L. . Assessment of neurotoxicity of monocrotaline, an alkaloid extracted from *Crotalaria retusa* in astrocyte/neuron co-culture system. *Neurotoxicology (Park Forest South)*, v. 32, p. 776-784, 2011.

SILVA, V.D.A; PITANGA, B.P.S; **NASCIMENTO, R.P** ; SOUZA, C.S.; PAULO LUCAS C. COELHO, P.L.C; MENEZES-FILHO, N; SILVA, A.M.M; COSTA, M.F.D; ELBACHA, R.S.; EUDES S.; VELOZO, E.S.; COSTA, S.L. Submetido para a revista **Toxicologic Pathology**.

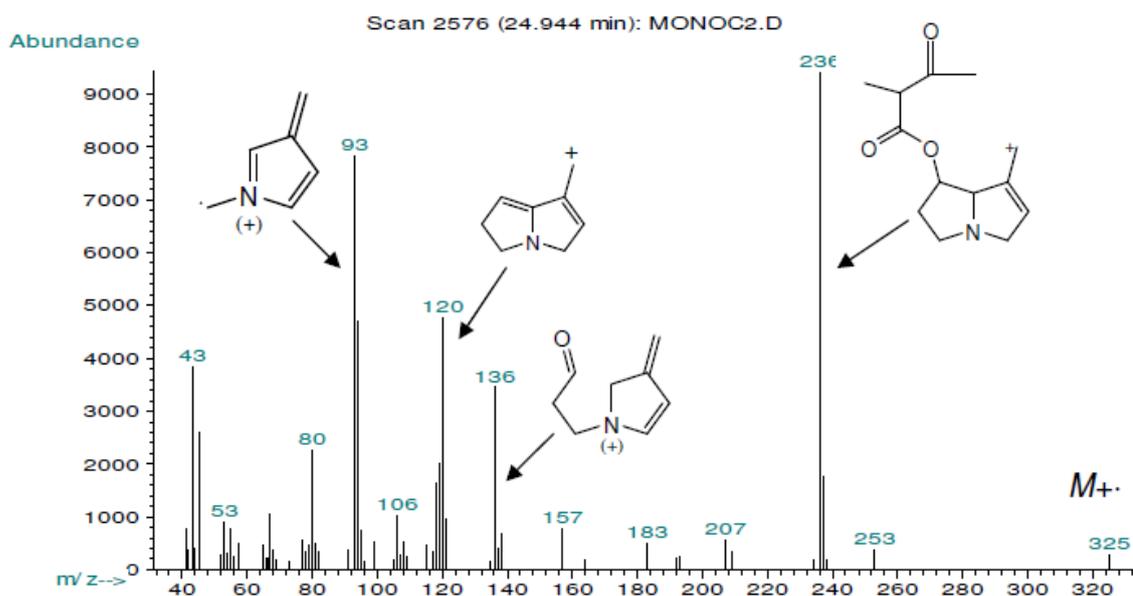
ANEXOS:

Anexo 1: Estrutura química determinada por difração de raio-x da monocrotalina.



Anexo 1: Estrutura química determinada por difração de raio-x da monocrotalina. (Martinez,2009).

Anexo 2: Espectro de massas da monocrotalina



Anexo 2: Espectro de massas da monocrotalina (Martinez, 2009).

Anexo 3: Ressonância Magnética da monocrotalina do estudo

