UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITO DO 8-METOXIPSORALENO (8-MOP) NA CITOTOXICIDADE DA ROTENONA SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, UM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON *IN VITRO*

PIETRO ARAÚJO DOS SANTOS

Salvador – Bahia - Brasil
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

EFEITO DO 8-METOXIPSORALENO (8-MOP) NA CITOTOXICIDADE DA ROTENONA SOBRE CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, UM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON *IN VITRO*

PIETRO ARAÚJO DOS SANTOS

Orientador: Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Co-Orientadora: Dra. Giselle Pinto de Faria Lopes

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós- graduação em Patologia, para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil
2015

"EFEITO DO 8-METOXIPSORALENO (8-MOP) NA CITOTOXICIDADE DA RETENONA SOBRE CELULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: UM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON IN VITRO"

PIETRO ARAUJO DOS SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Claudio Lima Souza
Professor
UFBA

Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Dr. Ramon dos Santos El-Bachá
Professor Associado
UFBA

Dedico este trabalho à memória do meu pai, José Aílton. Enquanto esteve presente entre nós sempre foi um exemplo de comprometimento e de perseverança. Obrigado pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Viver longe da família não é fácil, mas aprendi com eles que o amor é maior que tudo, pois o que nos une é infinitamente maior daquilo que nos separa, e tenho certeza que a força e os pensamentos positivos emitidos por eles foram essenciais para a minha vitória. Então agradeço ao meu pai José Aílton, a minha mãe Maria Arlene, ao meu filho Matheus, a minha namorada Isabella, a minha irmã Priscilla, ao meu cunhado Wellington, e a minha sobrinha recém-chegada Maria Clara pelo amor, apoio e incentivo mesmo na distância física. Tudo que vocês fizeram por mim serviram de alicerce para que eu pudesse suportar as adversidades, buscasse coragem e não desanimasse diante dos problemas. Amo vocês!

Aos meus tios Antônio Marcos e Maria das Graças pelo acolhimento em sua casa, pelos conselhos e pelo suporte dado a minha adaptação à Salvador.

Ao meu orientador Ramon El-Bachá, pelo acolhimento e confiança em orientar um aluno recém-chegado à cidade. Obrigado por acreditar em mim, por ter sido meu orientador e por ter me ensinado valores que vão além dos acadêmicos. O senhor é um exemplo de ética, competência e dedicação naquilo que faz, não tenho como dimensionar os princípios adquiridos e fortalecidos contigo.

À minha co-orientadora Giselle Faria, pela paciência diante de minha inexperiência, pelos ensinamentos relacionados às técnicas laboratoriais e principalmente pela amizade que foi criada diante dos trabalhos desenvolvidos na bancada. Obrigado por ouvir minhas dúvidas, por me socorrer diante de algum entrave metodológico ou simplesmente por sempre confiar em mim. Muito obrigado!!

À professora Patrícia Luz, minha orientadora de monitoria na época de graduação na UESB, que me incentivou e me indicou como aluno de pós-graduação ao professor Ramon. Obrigado por tudo!

À Ana Paula, pelas conversas compartilhadas sobre assuntos relacionados aos nossos projetos de pesquisas, ou simplesmente pelo companheirismo entre amigos. À Tatiana, pela ajuda nos experimentos e por ter se tornado mais que uma colega de trabalho, uma amiga. À Alana, por compartilhar momentos difíceis e desafiadores no cumprimento dos créditos na FIOCRUZ: conseguimos!!

Obrigado a Julita, por ouvir meus desabafos e sempre ter uma palavra de conforto, suas palavras sempre foram bem vindas. À Mila, Isis, Cíntia e Érica por sempre estarem

dispostas a ajudar e contribuir para que eu alcançasse meus objetivos, meus sinceros agradecimentos. Muito obrigado também aos professores Diêgo e Victor, sempre dispostos a solucionar minhas dúvidas e contribuir para o enriquecimento do trabalho. Enfim, agradeço a toda família do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular: Rute, Beto, Cléo, João Victor, Karina, Leílton, Alessandra, Letícia, Fillipe, Socorro, Alex, Simone, Lívia, Sr. Carlos, Lúcia, e as professoras Fátima e Silvia.

Aos laboratórios de Virologia e Neurociências por darem suporte na realização de determinados experimentos.

A todos os meus amigos, sejam eles de Ibicaraí, Jequié ou Salvador. Obrigado por fazerem parte de uma história, a história de minha vida, cada um de vocês tem uma importância fundamental nela.

À Universidade Federal da Bahia e ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela oportunidade de ingressar em um Programa de Pós-Graduação.

A Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna pelo apoio dado na elaboração e confecção da dissertação.

Ao CNPq pelo financiamento desse estudo.

A Deus, por todas as bênçãos e pela tua presença em minha vida. Agradeço por ter colocado em meu caminho todas essas pessoas, pelo conhecimento adquirido e por todas as dificuldades vividas, pois tudo que passamos é para nossa própria evolução.

“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos.”

Paulo Coelho

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 15

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17

2.1 DOENÇA DE PARKINSON 17

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) 19

2.3 COMPLEXO I MITOCONDRIAL E ROTENONA 20

2.4 GLUTATION REDUZIDO (GSH) 23

2.5 8-METOXIPSORALENO (8-MOP): POSSÍVEL PAPEL NEUROPROTETOR 24

2.6 UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS COMO MODELOS EXPERIMENTAIS 25

3.OBJETIVOS 28

3.1 OBJETIVO GERAL 28

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 28

4.METODOLOGIA 29

4.1 MODELOS DE ESTUDO E SUMÁRIO METODOLÓGICO 29

4.2 METODOLOGIA DETALHADA 30

4.2.1 Cultura de células 30

4.2.2 Teste de exclusão do corante azul de Tripan 30

4.2.3 Avaliação da viabilidade celular 31

4.2.4 Análise morfológica por microscopia de contraste de fase 31

4.2.5 Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo 32

4.2.6 Visualização da presença de GSH por microscopia de fluorescência 33

4.2.7 Análise estatística dos dados 33

5.RESULTADOS 35

6.DISCUSSÃO 48

7.CONCLUSÕES 53

8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54

SANTOS, Pietro Araújo dos. Efeito do 8-metoxipsoraleno (8-mop) na citotoxicidade da rotenona sobre células do sistema nervoso central, um modelo de doença de parkinson *in vitro.*
62 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Faculdade de Medicina, Salvador, 2015.

RESUMO

Doença de Parkinson (DP) é caracterizada por uma perda seletiva e profunda dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta* (SNpc) do mesencéfalo, acompanhada pela espoliação de dopamina no corpo estriado. A maioria dos casos de DP apresenta etiologia multifatorial, com a presença de componentes genéticos e ambientais. Embora existam diferentes causas possíveis, a patogênese da desordem parece convergir para mecanismos relacionados à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e mau enovelamento proteico. Um modelo estabelecido na literatura para estudo desta doença, tanto *in vitro* quanto *in vivo* é a administração de rotenona, um pesticida derivado de plantas que inibe o complexo I mitocondrial e favorece a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), levando a uma espoliação de glutation reduzido (GSH) através do processo de detoxificação destes compostos eletrofílicos, catalisados por glutation *S*-transferases (GSTs). Sendo assim, a busca por novas substâncias com atividade neuroprotetora é atualmente o foco de estudos, e metabólitos isolados de plantas podem ser fontes destas moléculas. Dessa forma, o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), uma furocumarina, foi testado como um possível agente protetor sobre a citotoxicidade causada pela rotenona em modelos *in vitro* de gliomas, considerando o papel do glutation neste processo. O estudo adotou uma abordagem que associa técnicas bioquímicas e de biologia celular. Ensaios de viabilidade celular foram realizados em células de glioma murino (C6) e glioblastoma multiforme humano (U251) através da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), e visualização por microscopia de contraste de fase. O tipo de morte celular provocada pela rotenona nas células U251 foi realizado por marcação com anexina V e iodeto de propídeo (IP), seguido por quantificação por citometria de fluxo. A determinação do conteúdo de GSH intracelular após tratamento com rotenona e 8-MOP foi visualizado por marcação com monoclorobimano (MCB) nas linhagens C6 e U251. Os resultados demonstraram que a rotenona foi citotóxica em ambas as linhagens, reduzindo a viabilidade e alterando a morfologia celular, enquanto que o 8-MOP não apresentou atividade citotóxica. Contudo, o tratamento com o 8-MOP não foi capaz de proteger as células contra os efeitos deletérios da rotenona. No estudo do tipo de morte celular, a porcentagem de células marcadas com anexina V foi maior nos grupos tratados com rotenona, demonstrando que a morte celular ocorre principalmente por apoptose. A análise com MCB demonstrou que a rotenona espoliou GSH, porém o pré-tratamento com 8-MOP inibiu a espoliação. Embora o 8-MOP não tenha sido bem sucedido na proteção das células, a manutenção do conteúdo de GSH corrobora com estudos prévios que descrevem este composto como um potencial inibidor de GST, uma atividade farmacológica que deve ser testada para confirmar a sua eficácia como agente terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Parkinson; 8-Metoxipsoraleno; Glutation**.**

SANTOS, Pietro Araújo dos. Effect of methoxsalen (8-MOP) on the cytotoxicity of rotenone on the central nervous system cells, an *in vitro* model of Parkinson's disease.
62 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Faculdade de Medicina, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by a profound and selective loss of dopaminergic neurons in the substantia *nigra pars compacta* (SNpc) accompanied by midbrain dopamine depletion in the striatum. Most cases of PD present multifactorial etiologies, with the presence of genetic and environmental components. Although there are different possible causes, the pathogenesis of the disorder seems to converge to mechanisms related to mitochondrial dysfunction, oxidative stress and bad protein folding. An established model in the literature to study this disease, both *in vitro* and *in vivo* is rotenone administration, a pesticide derived from plants that inhibits the mitochondrial complex I and favors the generation of reactive oxygen species (ROS), leading to reduced glutathione (GSH) depletion through the detoxification process of this electrophilic compound catalyzed by glutathione *S*-transferases (GSTs). Thus, the search for new substances with neuroprotective activity is currently the focus of studies, and plant isolated metabolites can be sources of these molecules. Thus, 8-methoxypsoralen (8-MOP), a furocoumarin, was tested as a potential protective agent on the cytotoxicity caused by rotenone in glioma cells *in vitro* models, considering the role of glutathione in the process. The study adopted an approach that combines biochemical and cell biology techniques. Cell viability assays were performed in murine glioma cells (C6) and human glioblastoma (U251) cells through the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and visualization by phase contrast microscopy. The type of cell death caused by rotenone in U251 cells was performed by staining with annexin V and propidium iodide (PI) followed by flow cytometric quantitation. The determination of intracellular GSH content after treatment with rotenone and 8-MOP was visualized by staining with monochlorobimane (MCB) in the lineages U251 and C6. The results demonstrated that rotenone was cytotoxic to both cell lineages, reducing the viability and changing the cell morphology, whereas the 8-MOP did not show cytotoxic activity. However, the treatment with 8-MOP was not able to protect cells against the deleterious effects of rotenone. In the type of cell death studies, the percentage of cells stained with annexin V was higher in the groups treated with rotenone, demonstrating that cell death occurs primarily by apoptosis. The analysis with MCB has shown that rotenone depleted GSH, but pre-treatment with 8-MOP inhibited the depletion. Although the 8-MOP has not been successful in protecting cells, the maintenance of GSH content corroborates with previous studies that describe this compound as a potential inhibitor of GST, a pharmacological activity that should be tested to confirm its effectiveness as a therapeutic agent.

KEY-WORDS: Parkinson Disease; Methoxsalen; Glutathione.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-MOP – 8-metoxipsoraleno

ATP – Trifosfato de adenosina

BSO – Butionina Sulfoxamina

C6 – Linhagem de células de glioma murino

CAT - Catalase

CE_{50} – Concentração efetiva capaz de matar50% das células

CMC - Concentração mínima citotóxica

CO_2 – Dióxido de carbono

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Doença de Parkinson

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ERO – Espécie reativa de oxigênio

Fe-S - Ferro-enxofre

FITC – Isotiocinato de fluoresceína

FMN –Mononucleotídeo de Flavina

GPx – Glutation Peroxidase

GR – Glutation Redutase

GSH – Glutation reduzido

GST – Glutation *S*-transferase

GSSG – Glutation oxidado

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

IP – Iodeto de propídio

MCB – Monoclorobimano

MRP- Proteína relacionada à resistência a múltiplas drogas (do inglês *Multi-drug resistance protein*)

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium

NADH – Dinucleotídeo de Niacinamida

$NaHCO_3$ - Bicarbonato de sódio

NBDHEX – 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol

O_2^- - Radical superóxido

$OH^\bullet$ - Radical hidroxil

PBS – Tampão fosfato de sódio (do inglês *Phosphate buffered saline*)

PUVA – Psoraleno e Ultravioleta

R^2 – Coeficiente de regressão

SDS – Duodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

SNC – Sistema nervoso central

SNpc – Substância *nigra pars compacta*

SOD - Superóxido dismutase

U251 – Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano

UI – Unidades internacionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da via nigroestriada normal e afetada pela DP.....18

Figura 2. Estrutura química da rotenona. 22

Figura 3. Estrutura química do 8-MOP. 25

Figura 4. Viabilidade de células C6 após tratamento com rotenona. 35

Figura 5. Viabilidade de células U251 após tratamento com rotenona. 36

Figura 6. Alterações na morfologia celular provocadas pelo tratamento com rotenona. 37

Figura 7. Avaliação do tipo de morte celular após tratamento com rotenona. 38

Figura 8. Detecção de GSH em células C6 após tratamento com rotenona. 40

Figura 9. Detecção de GSH em células U251 após tratamento com rotenona. 41

Figura 10. Viabilidade celular após tratamento com 8-MOP em concentrações crescentes…42

Figura 11. Viabilidade celular após tratamento simultâneo com 8-MOP e rotenona. 43

Figura 12. Viabilidade celular após pré-tratamento com 8-MOP. 44

Figura 13. Detecção de GSH em células C6 após tratamento com 8-MOP e rotenona. 46

Figura 14. Detecção de GSH em células U251 após tratamento com 8-MOP e rotenona. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Percentual de células da linhagem U251 marcadas com anexina V e IP após tratamento com rotenona. 39

1. INTRODUÇÃO

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas por morte celular seletiva e excessiva em diversas regiões do encéfalo (THOMAS e BEAL, 2007), e sua incidência vem aumentando proporcionalmente com o avanço da expectativa de vida da população mundial (WALLACE, 2005). Estas desordens estão aumentando em dimensões alarmantes em países industrializados, e apesar dos esforços, o mecanismo molecular subjacente à morte celular ainda não está totalmente elucidado (SCHAPIRA e JENNER, 2011).

Dentre as doenças neurodegenerativas destaca-se a Doença de Parkinson (DP), desordem que foi descrita inicialmente em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, descrição tão rica e precisa em detalhes da doença que hoje leva o seu nome. A enfermidade é caracterizada pela presença de movimentos involuntários tremulantes, com redução da força muscular, tendência para a inclinação frontal do tronco e alteração da marcha, mantendo os sentidos e o intelecto não afetados inicialmente. A evolução da doença é posteriormente caracterizada pelo aumento da intensidade dos tremores e a piora acentuada da marcha (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; FERNANDEZ, 2012; GUERRERO *et al*., 2013).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer, e a sua prevalência em países industrializados está estimada em 0,3% da população geral, afetando mais de um milhão de pessoas nos Estados Unidos (SAMII *et al*., 2004; WALLACE, 2005). Sua incidência aumenta consideravelmente com a idade, de 20/100.000 aos 55 anos até 120/100.000 aos 70 anos de idade (SAMII *et al*., 2004).

A causa da doença ainda é desconhecida, no entanto, parece que a maioria dos casos de DP apresenta etiologias multifatoriais, com a presença de componentes genéticos e ambientais (SULZER, 2007). A DP esporádica ou idiopática refere-se à grande maioria dos casos diagnosticados que não possuem causa conhecida, porém vários fatores de risco já foram descritos, e uma importante associação é estabelecida entre a exposição ocupacional a herbicidas e pesticidas com o desenvolvimento da doença (ASCHERIO *et al*., 2006; TANNER *et al*., 2011).

Apesar das diferentes causas possíveis, a patogênese da desordem parece convergir para mecanismos relacionados à disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e mau enovelamento proteico (GREENAMYRE e HASTINGS, 2004). Desta forma, um modelo estabelecido na literatura para estudo da doença, tanto *in vitro* quanto *in vivo* é a

administração de rotenona, um pesticida derivado de plantas que tem como característica levar à morte celular por meio da inibição do complexo I mitocondrial e da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MOORE *et al*., 2005; RADAD *et al*., 2006; TANNER *et al*., 2011).

Processos oxidativos são fatores relevantes na patogênese de várias doenças, incluindo doenças neurodegenerativas como a DP, e a busca por novas substâncias com atividade neuroprotetora é atualmente o foco de estudos. Compostos isolados de fontes naturais, como plantas, não raramente são dotados de importante atividade biológica e podem doar estruturas base para a síntese de outros compostos. Plantas produtoras de metabólitos são uma realidade no bioma brasileiro, metabólitos estes como flavonoides, alcaloides e cumarinas, entre as quais estas últimas representam uma ampla classe de substâncias naturais provenientes da fusão do benzeno com o anel α-pirona (KOSTOVA, 2005; ARONSON, 2009). Aos derivados cumarínicos são atribuídas inúmeras propriedades terapêuticas (KOSTOVA, 2005; LEE *et al.*, 2011).

Diante do potencial proveito farmacológico de compostos naturais extraídos da biodiversidade brasileira, tem-se um campo amplo e promissor para pesquisas que visem explorar o potencial terapêutico desses compostos. Fica claro, portanto, a relevância da pesquisa na busca por novas moléculas com possíveis efeitos citoprotetores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer, afligindo mais de 4 milhões de pessoas ao redor do mundo (MARTIN *et al.*,2011). Nos Estados Unidos, esta desordem afeta 1% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade (FERNANDEZ, 2012), 60.000 mil novos casos são diagnosticados todo ano e sua incidência é projetada para quadruplicar até 2040 (WALLACE, 2005).

A doença é caracterizada por uma perda seletiva e profunda dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta* (SNpc) do mesencéfalo (LEES *et al*., 2009; BAE *et al*., 2011) acompanhada pela espoliação do neurotransmissor dopamina no corpo estriado (caudado e putamen) e pela presença de agregados proteicos intracitoplasmáticos denominados corpos de Lewy, compostos por alfa-sinucleína e ubiquitina nos neurônios remanescentes (LEES *et al*., 2009; TANNER *et al*., 2011; FERNANDEZ, 2012). Essas inclusões intracitoplasmáticas são consideradas as marcas citopatológicas da doença, porém, os chamados corpos de Lewy não estão confinados apenas na substância *nigra*, podendo ser vistos em outras regiões do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; SAMII *et al*., 2004).

A DP é caracterizada clinicamente por deficiências motoras, como o tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural, além de sintomas não motores (BERRY *et al*., 2010; GUERRERO *et al*., 2013). As deficiências motoras começam a expressar-se quando 80% da dopamina estriatal ou 60/70% dos neurônios dopaminérgicos da substância *nigra* foram perdidos (LANG e LOZANO, 1998; DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; SAMII *et al*., 2004). Isto acarreta uma degeneração da via nigroestriada e consequentemente déficits de dopamina nos gânglios da base (Figura 1) (BAE *et al*., 2011; GUERRERO *et al*., 2013). Além disso, os indivíduos podem experimentar disfunções não motoras, como distúrbios olfativos e do sono, fadiga, dor, apatia, depressão e psicose (DE LAU e BRETELER, 2006; THOMAS e BEAL, 2007; FERNANDEZ, 2012).

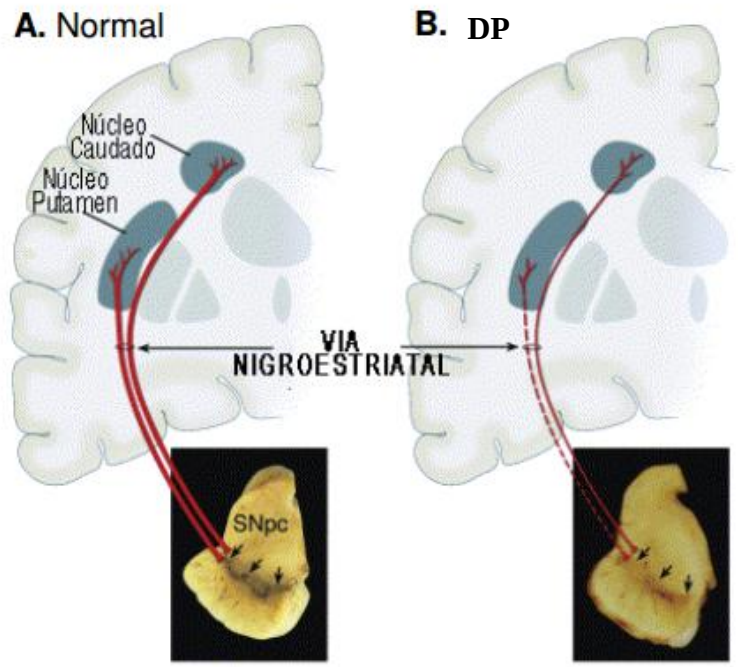

Figura 1. (**A**) Representação esquemática da via nigroestriada normal. Os neurônios dopaminérgicos da substância *nigra pars compacta* (SNpc) se projetam para o estriado (núcleos putamem e caudado). (**B**) Representação esquemática da mesma via afetada pela Doença de Parkinson (DP). As setas mostram a acentuada perda de neurônios dopaminérgicos que se projetam para o putamem e caudado (linha vermelha tracejada e fina). Modificado a partir de DAUER e PRZEDBORSKI, 2003.

A DP esporádica ou idiopática refere-se à grande maioria dos casos diagnosticados, e sua etiologia é complexa e ainda não totalmente esclarecida. Atualmente, considera-se que seja o resultado de múltiplos fatores, incluindo envelhecimento natural, susceptibilidade genética e exposição a fatores ambientais (SULZER, 2007). Embora a incidência aumente com a idade, não é plausível aceitar que a causa seja apenas um reflexo do processo de envelhecimento natural (SAMII *et al*., 2004).

Fatores genéticos contribuem para o desenvolvimento da doença, porém mais de 90% dos casos da doença não tem uma causa genética identificada (MARTIN *et al*., 2011). Apesar da maior parte das pessoas com DP não apresentarem história familiar, alguns genes foram identificados e caracterizados por desempenhar um papel importante no desenvolvimento de DP familiar, genes como o *SNCA, PRKN, SLC20A2, DJ-1 e PINK 1* (NUYTEMANS *et al*., 2010; WIDER *et al*., 2010; MARTIN *et al*., 2011).

Fatores ambientais também estão entre os prováveis componentes da etiologia da doença, e importantes associações foram estabelecidas entre a exposição ocupacional a herbicidas e pesticidas com o desenvolvimento da DP (ASCHERIO *et al*., 2006; TANNER *et al*., 2011). Esses eventos parecem convergir para mecanismos relacionados à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, no qual são formadas em excesso diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO), causando danos às organelas e a macromoléculas (SCHAPIRA, 2010; TAMILSELVAM *et al*., 2013; PARK *et al*., 2014; HOSAMANI *et al*., 2014).

Estudos *post-mortem* apresentaram evidências tanto de danos oxidativos quanto de uma inibição na atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons de neurônios da substância *nigra* em casos de DP (SHIMOHAMA *et al*., 2003; THAKUR e NEHRU, 2014). Essa inibição favorece o aumento da produção de radicais livres, mais especificamente de ERO e consequentemente seus efeitos deletérios para as células (PARK *et* al., 2014; THAKUR e NEHRU, 2014).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron não pareado em um orbital externo (LANGSTON *et al*., 1987) e a energia criada por essa configuração instável é liberada através de reações com moléculas adjacentes, muitas das quais são componentes essenciais das membranas e núcleos celulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1986). Os radicais livres possuem como característica desencadear reações em cadeia, nos quais as moléculas que interagem com eles também são convertidas em radicais livres, propagando assim uma cadeia de danos moleculares (ROBBINS *et al*., 2010).

Dentre os radicais livres, destacam-se algumas ERO, que são radicais derivados do oxigênio e que vem sendo o foco de muitos estudos (PATEL e CHU, 2011; YANG *et al*., 2014; PARK *et al*., 2014). As ERO são produzidas nas células através de reações de redução-oxidação que ocorrem durante processos metabólicos normais (BERG *et al*., 2008; ROBBINS *et al*., 2010). A mitocôndria é considerada o principal local da produção de ERO endógeno, derivado principalmente do Complexo I, através da redução parcial dos mononucleotídeos de flavina (FMN) associadas ao NADH e também da redução parcial da ubiquinona nos Complexos I e II (BERG *et al*., 2008; NELSON e COX, 2014). Como o oxigênio molecular é o receptor final dessas reações, são geradas pequenas quantidades de espécies intermediárias

parcialmente reduzidas, como o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($O^{\bullet}H$) (ROBBINS *et al*., 2010).

Normalmente as ERO são decompostas e eliminadas pelos sistemas de defesa celular, mantendo-se assim presentes transitoriamente e em baixos níveis sem causar danos às células. Quando a sua produção aumenta ou quando os sistemas de defesa são ineficientes para a remoção, o resultado é um excesso de ERO que leva a uma condição denominada de estresse oxidativo (THAKUR e NEHRU, 2014; NELSON e COX, 2014), podendo ocorrer o rompimento de membranas lipídicas e a oxidação de proteínas citoplasmáticas (BUTTERFIELD *et al*., 2010; HOSAMANI *et al*., 2014).

O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, devido a um alto consumo de oxigênio, elevados níveis de ácidos graxos poli-insaturados e relativamente baixos níveis de moléculas antioxidantes (ROBB e CONNOR, 2002). O dano oxidativo ao cérebro é uma consequência de inúmeros eventos que levam a um aumento na produção de ERO (CABEZAS *et al*., 2013; HOSAMANI *et al*., 2014).

Muitos elementos correlacionam o estresse oxidativo com o desenvolvimento de processos patológicos e, consequentemente, doenças neurodegenerativas como a DP (SCHAPIRA e JENNER, 2011; PARK *et al*., 2014), em que evidências associam o desenvolvimento da desordem com um desequilíbrio no Complexo I mitocondrial, produção de ERO e alteração da função da organela (PATEL e CHU 2011; TAMILSELVAM *et al*., 2013).

2.3 COMPLEXO I MITOCONDRIAL E ROTENONA

O complexo I é um dos componentes da cadeia transportadora de elétrons, possui atividade oxirredutase e induz a translocação de prótons da matriz para o espaço intermembranas da mitocôndria. Esse complexo contribui para estabelecer o gradiente eletroquímico utilizado para a geração de ATP, e para a formação do potencial de membrana mitocondrial (NELSON e COX, 2014). Estudos demonstraram seu papel no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, seja devido a mutações específicas ou por ter sido reconhecido como alvo para algumas toxinas exógenas que afetam a sua função (HOGLINGER *et al*., 2005; SCHAPIRA, 2010). Existem toxinas capazes de inibir o complexo I que frequentemente penetram na barreira hematoencefálica através de

transportadores específicos e têm o potencial de se acumular no cérebro (DICK, 2007; BROWN, 2007), outras, como a rotenona, não necessitam de transportadores devido à alta lipofilicidade (FIGURA 2) (BETARBET *et al*., 2000). Estes inibidores, após agirem sobre o Complexo I, favorecem a geração de ERO (PERFEITO *et al*., 2014), exaustão de ATP e influencia na sinalização de morte de astrócitos e neurônios (DICK, 2007; CABEZAS *et al*., 2013; PARK *et al*., 2014).

A rotenona é uma das substâncias neurotóxicas mais utilizadas como modelo de estresse oxidativo e DP (TAMILSELVAM *et al*., 2013; PARK *et al*., 2014; THAKUR e NEHRU, 2014), sendo responsável por induzir alterações comportamentais, bioquímicas e anatômicas semelhantes à doença (BETARBET *et al*., 2000; LIU *et al*., 2003). É um isoflavonoide produzido nas folhas, caules e raízes de plantas tropicais dos gêneros *Derris, Lonchocarpus e Tephrosia*, sendo muito utilizado como pesticida e inseticida (PATEL, 2011). Dessa forma, muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado que a exposição prolongada a pesticidas, como a rotenona, seja um fator de risco para o desenvolvimento de DP em populações humanas (LIU *et al*., 2003; TANNER *et al*., 2011).

Alguns estudos utilizaram a rotenona em modelos animais para avaliar seus efeitos no SNC, e os resultados demonstraram que a administração sistêmica e contínua da droga em camundongos e ratos reportou às características da DP, como defeitos no complexo I mitocondrial, degeneração seletiva do sistema dopaminérgico nigroestriado, ativação glial, formação de inclusões citoplasmáticas em neurônios e desordens do movimento (BETARBET *et al*., 2000; LIU *et al*., 2003; HOGLINGER *et al*., 2005; PAN-MONTOJO *et al*., 2010).

Evidências apontam também que a morte de neurônios dopaminérgicos associados com a rotenona poderia ser dependente de processos inflamatórios devido a ativação glial (OGAWA *et al*., 2005; THAKUR e NEHRU, 2014), além do que, o aumento da morte neuronal estaria relacionado diretamente com a presença de disfunções nos astrócitos (HAMBY e SOFRONIEW, 2010; SARAFIAN *et al*., 2010; BARRETO *et al*., 2011).

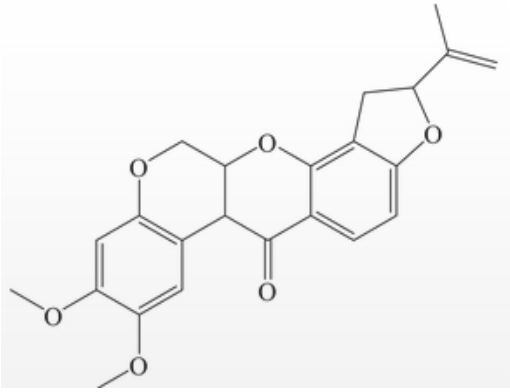

Figura 2. Estrutura química da rotenona.

FONTE: http://qnint.sbq.org.br acessado em 25/08/2014 às 14:35 h.

Os astrócitos são as células mais comuns no cérebro dos mamíferos, e são essenciais para diversos processos existentes no sistema nervoso, como facilitação da conexão neurovascular, desenvolvimento e conservação das características da barreira hematoencefálica, atração de células através da liberação de quimiocinas, captação do glutamato e produção de enzimas antioxidantes (HAMBY e SOFRONIEW, 2010; PARPURA *et al*., 2011; CABEZAS *et al*., 2013).

Em determinadas situações, como em uma lesão cerebral, estas características marcantes dos astrócitos podem ser perdidas, e a consequência desta disfunção é impactada diretamente sobre os neurônios, levando a condições patológicas (KIMELBERG e NEDERGAARD, 2010). Em condições normais ou patológicas, os astrócitos têm como característica auxiliar os neurônios (BARRETO *et al*., 2011), e mesmo servindo como suporte para estes durante um dano cerebral, lesões intensas também podem levar a uma disfunção do astrócito, acarretando no aumento da morte neuronal (WERNER e ENGELHARD, 2007; HSIEH *et al*., 2014).

Os astrócitos respondem a diversas formas de insultos cerebrais por um processo conhecido como gliose reativa, que envolve tanto alterações moleculares quanto morfológicas. Estas alterações podem ser benéficas para os neurônios, seja fornecendo substratos para o metabolismo, captando o glutamato ou fornecendo proteção contra o estresse oxidativo pela produção de enzimas antioxidantes como o superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) e a catalase (CAT; E.C. 1.11.1.6), e o tripeptídeo glutation reduzido (GSH)

(KANG e HEBERT, 2011; KARIMI-ABDOLREZAEE e BILLAKANTI, 2012). Toxinas ambientais, especialmente pesticidas como a rotenona, podem induzir astrogliose acompanhada por disfunção mitocondrial e consequente prejuízo às células neuronais (THAKUR e NEHRU, 2014).

Os astrócitos produzem numerosas moléculas antioxidantes, como o GSH, proporcionando maior proteção para os neurônios (BARRETO *et al*., 2011). Porém, essa proteção astrocitária é limitada, possivelmente devido a eventos que levam a uma espoliação do conteúdo de GSH e consequentemente alterações deletérias também nos neurônios (CHINTA e ANDERSEN, 2008).

2.4 GLUTATION REDUZIDO (GSH)

GSH é o composto antioxidante mais importante no cérebro, servindo como substrato para peroxidases e sendo essencial para manter outras moléculas antioxidantes na forma reduzida (SIMS *et al*., 2004). Em células eucarióticas, o GSH é encontrado no citoplasma e nas mitocôndrias, sendo que a concentração deste é muito superior no compartimento citosólico, correspondendo a 85% ou mais do total de GSH (MEISTER, 1995). Foi demonstrado que o co-cultivo de neurônios e astrócitos favoreceu para que estes neurônios exibissem elevados níveis de GSH em comparação com neurônios cultivados isoladamente (SLEMMER *et al*., 2008; GIORDANO *et al*., 2009). Além disso, a total espoliação de GSH em neurônios e astrócitos *in vitro* promoveu disfunção e morte celular (CHEN e SWANSON, 2003; RIZZARDINI *et al*., 2003), comprovando que os astrócitos auxiliam nas defesas antioxidantes dos neurônios, importantes para a sobrevivência de ambos, defesas estas que são promovidas pelo auxílio de enzimas antioxidantes, como a Glutation Peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9), a Glutation Redutase (GR; EC 1.8.1.7) e as Glutation *S*-transferases (GSTs; EC 2.5.1.18) (BOARD e MENON, 2013; NELSON e COX, 2014).

As GSTs são enzimas que apresentam múltiplas funções, estando envolvidas nos sistemas antioxidantes celulares e no metabolismo de fase II. São responsáveis pela detoxificação e proteção de macromoléculas da ação de compostos eletrofílicos diversos, incluindo as ERO (BAEZ *et al*., 1997; BOARD e MENON, 2013). O papel antioxidante se deve à capacidade da enzima de favorecer a conjugação entre os radicais livres e o GSH, enquanto que a ação detoxificante acontece quando a conjugação ocorre entre uma molécula

exógena parcialmente hidrofóbica e o GSH, a fim de aumentar a hidrossolubilidade e facilitar a eliminação (HAYESHI *et al*., 2007; GOTO *et al*., 2009). Essas reações de conjugação consomem GSH, não havendo a reciclagem do mesmo, o que não acontece no sistema antioxidante constituído pelas enzimas GPx, que reduz o peróxido de hidrogênio a água às custas da oxidação de GSH, e a GR que reduz o GSSG, forma oxidada do glutation, em uma reação dependente de NADPH (NELSON e COX, 2014).

Pesquisas que buscam uma proteção do SNC a partir da manutenção dos níveis de glutation não são recentes (LIMA *et al*., 2008; TAMILSELVAM *et al*., 2013), e uma das estratégias é a busca por inibidores de GSTs, o que favoreceria a não espoliação de GSH após a conjugação deste com uma molécula hidrofóbica via participação dessas enzimas.

2.5 8-METOXIPSORALENO (8-MOP): POSSÍVEL PAPEL NEUROPROTETOR

Em virtude das múltiplas funções dos astrócitos, inclusive o seu papel neuroprotetor pela presença de GSH durante o processo de estresse oxidativo, estudos têm buscado identificar moléculas específicas que possam exercer proteção também nestas células (OUYANG *et al.*, 2006; SAFI *et al.*, 2012).

Desta forma, destacam-se as cumarinas, que constituem uma grande classe de heterocíclicos de oxigênio, encontradas em fungos e bactérias, mas principalmente em plantas, oriundas da fusão do benzeno com o anel α-pirona (KOSTOVA, 2005; ARONSON, 2009). As cumarinas são classificadas em cumarinas simples, piranocumarinas, dicumarinas, fenilcumarinas e furanocumarinas (WU *et al*., 2009). Aos derivados cumarínicos são atribuídas inúmeras atividades, incluindo atividade anti-inflamatória, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antioxidante, antiviral (KOSTOVA, 2005; ARONSON, 2009), antitumoral e quimiossensibilizante (DE OLIVEIRA *et al*., 2014).

O psoraleno, pertencente à classe das cumarinas, é constituído pelo núcleo cumarínico com o anel furano, e seus derivados (furanocumarinas) também são alvo de pesquisas (SCAFFIDI *et al*., 2011; DE OLIVEIRA *et al*., 2014). O 8-metoxipsoraleno (8-MOP) é um desses derivados já com aplicação clínica com uso tópico e oral no tratamento de doenças de pele como eczema e psoríase (FIGURA 3). É utilizado associado à radiação ultravioleta tipo A em um tratamento conhecido como terapia PUVA, no qual é constituído pela administração oral de derivados de psoraleno com posterior ativação destes por meio de irradiação

ultravioleta diretamente na pele (INZINGER *et al*., 2011; SAPAM *et al*., 2012). Este método garante maior atividade do fármaco nas células da pele, embora a ocorrência de efeitos adversos não esteja descartada (CAO *et al*., 2008; INZINGER *et al*., 2011).

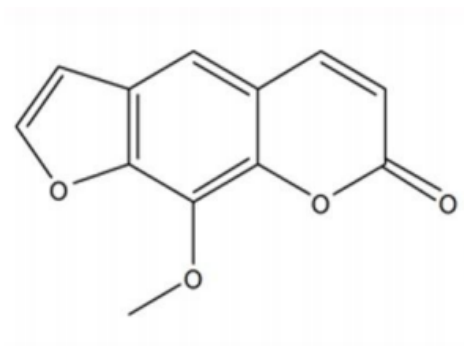

Figura 3. Estrutura química do 8-MOP.

FONTE: http://qnint.sbq.org.br acessado em27/08/2014 às 09:33 h.

Evidências apontam que muitos derivados cumarínicos apresentam atividades terapêuticas mesmo na ausência de irradiação (MA *et al*., 2012; LIU *et al*., 2012), e uma destas atividades é a possível inibição de GST mediante tratamento com o 8-MOP (DE OLIVEIRA *et al*., 2014), demonstrando que ainda há o que se explorar em relação ao potencial terapêutico desses compostos. Estudos *in vitro* realizados em nosso laboratório e ainda não publicados, utilizando o 8-MOP, apontaram esse composto como uma molécula promissora para o desenvolvimento de novas drogas com potencial efeito citoprotetor, justificando assim, a continuidade dos estudos *in vitro* com o 8-MOP que buscaram evidenciar seu possível efeito protetor, assim como os mecanismos celulares subjacentes.

2.6 UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS COMO MODELOS EXPERIMENTAIS

A cultura celular consiste na manutenção e multiplicação *in vitro* de células, e essa metodologia possibilita a análise do metabolismo e do comportamento celular. É possível conhecer os mecanismos envolvidos na regulação, síntese e destino de produtos celulares, além da influência de agentes externos na biologia destas (LUISI *et al*., 2004).

Os modelos experimentais *in vitro* são excelentes ferramentas para estudar de forma minuciosa alguns achados observados em modelos *in vivo*, sendo que o desenvolvimento de técnicas de cultivo de células humanas muito tem contribuído para a elucidação de diversos mecanismos celulares (LIMA *et al*., 2008; DE OLIVEIRA *et al*., 2014; PARK *et al*., 2014). Os modelos utilizando culturas celulares possuem a vantagem da realização de estudos em nível molecular, bem como permitem diminuir a influência de variáveis presentes, como condições ambientais, além da facilidade de manter tipos celulares através da criopreservação (O'BRIEN *et al*., 2000).

O desenvolvimento de linhagens celulares imortalizadas por volta de 1950 permitiu a aplicação rotineira de culturas celulares nos laboratórios de pesquisas biológicas e o desenvolvimento de sistemas de monitoramento de toxicidade induzida quimicamente. Técnicas celulares como ferramentas para a bioquímica toxicológica podem ser usadas para substituir testes em animais com alguns desfechos bem validados. Além disso, as linhagens celulares humanas imortalizadas podem ser utilizadas para comparar os efeitos tóxicos de determinadas substâncias em tecidos alvo (DE OLIVEIRA *et al*., 2010).

Esta técnica de prospecção representa uma alternativa à pressão imposta pela sociedade e por comitês de ética contra o uso indiscriminado de animais em pesquisas científicas, embora apresente algumas desvantagens. Por exemplo, a cultura celular é ineficaz em reproduzir fielmente as corretas condições do tecido neural *in vivo*; as interações entre neurônios e células da glia como em condições *in vivo* também são difíceis de reproduzir; e os efeitos de compostos neurotóxicos podem variar a depender das espécies utilizadas (STACEY e VIVIANI, 2001).

As linhagens celulares de gliomas têm sido utilizadas extensivamente como um modelo *in vitro* para o estudo de processos biológicos característicos das células da glia, além de fornecer resultados importantes há vários anos sobre os mecanismos de morte celular induzida por agentes, mecanismos envolvidos em doenças neurodegenerativas (DE OLIVEIRA *et al*., 2010; MIAO *et al*., 2014), bem como servir como modelo para o desenvolvimento de novas drogas (DE OLIVEIRA, 2014).

Dentre as linhagens celulares de gliomas, destacam-se as células C6 (glioma murino) e U251 (glioblastoma multiforme humano), utilizadas há décadas como modelos experimentais para o desenvolvimento de pesquisas direcionadas às células da glia. Ambas são linhagens de astrócitos pouco diferenciados, que apresentam uma morfologia predominantemente fusiforme, uma elevada capacidade para síntese de compostos intra e extracelulares, nos quais

alguns são fundamentais para a rápida proliferação, além disso, possuem a particularidade de serem incapazes de entrar no estado G0 do ciclo celular (DIETRICH *et al*., 1982; GILDERSLEEVE *et al*., 1989).

A utilização destas linhagens pode ser justificada pela facilidade na reprodutibilidade dos experimentos, visto que estas células apresentam um rápido crescimento, além do que estas expressam importantes componentes celulares, por exemplo, moléculas antioxidantes, servindo como uma opção plausível para modelos *in vitro* que buscam estudar determinadas ações características das células da glia (SWARNKAR *et al*., 2012; MIAO *et al*., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar *in vitro* o possível efeito protetor do 8-MOP sobre a citotoxicidade causada pela rotenona nas células do SNC, considerando o papel do glutation neste processo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a citotoxicidade da rotenona e 8-MOP através da morfologia e de teste de viabilidade celular;

b) Investigar o tipo de morte celular induzida pela rotenona através de citometria de fluxo;

c) Avaliar a presença de GSH celular diante do tratamento com rotenona através de microscopia de fluorescência;

d) Avaliar o possível efeito citoprotetor do 8-MOP diante do tratamento com rotenona através de teste de viabilidade celular.

e) Caso seja identificada espoliação de glutation diante do tratamento com rotenona, investigar se o 8-MOP é capaz de reverter esse processo através de microscopia de fluorescência.

4. METODOLOGIA

4.1 MODELOS DE ESTUDO E SUMÁRIO METODOLÓGICO

A fim de se alcançar os objetivos propostos, o modelo experimental *in vitro* foi dividido em dois grupos, um visando estudar a atividade citotóxica da rotenona e o outro visando o estudo do potencial efeito protetor do 8-MOP.

O primeiro grupo de experimentos consistiu na avaliação dos efeitos citotóxicos do tratamento de células em cultura com a rotenona. Para isso foram utilizadas duas linhagens celulares, uma de glioma murino (C6) e outra de glioblastoma multiforme humano (U251). Foram avaliados: (1) citotoxicidade através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) em diferentes concentrações, (2) as interferências na morfologia celular por microscopia de contraste de fase, (3) o tipo de morte celular por marcação com anexina V e iodeto de propídio (IP) por citometria de fluxo e (4) o GSH intracelular por microscopia de fluorescência após marcação com monoclorobimano (MCB).

O segundo grupo consistiu na avaliação dos efeitos protetores do 8-MOP em concentrações subtóxicas contra a citotoxicidade induzida pelo tratamento com a rotenona. Foram avaliados: (1) citotoxicidade pelo teste do MTT em diferentes concentrações, (2) as interferências na morfologia celular por microscopia de contraste de fase e (3) o GSH intracelular por microscopia de fluorescência após marcação com MCB.

4.2 METODOLOGIA DETALHADA

4.2.1 Cultura de células

Células da linhagem C6 e U251 foram cultivadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, em meio de cultura DMEM (Cultilab, Campinas, Brasil) suplementado com ácido pirúvico (1mM) (Acros Organics, New Jersey, U.S.A), L-(+)-glutamina (2mM) e $NaHCO_3$ (44mM) (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A), 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco, Paisley, Scotland), em atmosfera úmida com 5% de CO_2 a 37ºC. O meio de cultura foi renovado a cada dois dias. Para os testes, as células foram enzimaticamente descoladas das placas com tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A) a 0,05% em tampão fosfato de sódio com EDTA (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) a 20% e semeadas a uma densidade de $3{,}1 \times 10^4$ células/cm^2 em placas de 96 poços ou de 35 mm de diâmetro. Todas as células, estocadas em nitrogênio líquido até o momento do lançamento em placa, foram usadas no máximo até a décima passagem, as que atingiram passagens superiores foram descartadas a fim de garantir a homogeneidade e máxima reprodutibilidade dos resultados.

4.2.2 Teste de exclusão do corante azul de Tripan

O corante azul de Tripan (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A) foi utilizado a fim de distinguir células viáveis das não viáveis (estas últimas se coram de azul na presença do corante por apresentarem lesões na membrana plasmática). As células foram cultivadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro até alcançarem uma confluência correspondente a 80% da área da placa, posteriormente, o meio de cultura foi coletado, as células foram lavadas três vezes com PBS (Tampão Fosfato de Sódio a 0,01 M) a um volume de 3mL por lavagem e estas foram enzimaticamente descoladas das placas com tripsina. Então as células foram centrifugadas, juntamente com o sobrenadante, a 1000 *g* por 3 minutos. O sedimento foi ressuspendido em volume conhecido de meio de cultura e posteriormente diluído juntamente com o corante para a realização da técnica. A contagem foi realizada com auxílio de uma Câmara de Neubauer seguindo instruções do fabricante (BOECO - Germany).

4.2.3 Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi mensurada através do método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A). O teste baseia-se na capacidade das células viáveis de metabolizar, através das desidrogenases mitocondriais, o MTT de coloração amarela, em um produto (formazan) de coloração purpúrea (MOSMANN, 1983). A técnica foi realizada em placas de 96 poços. As células foram lançadas com densidade de 3,1 x 10^4 células/cm^2 nas placas e após 24 horas do plaqueamento, submetidas aos tratamentos de interesse por tempo determinado. Depois do tempo de tratamento o meio de cultura foi trocado e o MTT foi adicionado em cada poço (0,5 mg/mL). Após duas horas de incubação, o MTT foi retirado e as células foram lisadas pela adição de 100 µL de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) em dimetilformamida a 50% (v/v) em pH 4,7 ajustado pela adição de ácido clorídrico e cloreto de sódio (1M) (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A). Para quantificação da viabilidade, a placa foi submetida à espectrofotometria e a absorbância medida em um comprimento de onda de 595 nm, usando um leitor de microplacas (THERMO PLATE, modelo TP-reader). Um poço vazio foi usado como branco, e o valor de absorbância deste foi descontado de todos os outros. Todos os experimentos constaram de um grupo controle em que as células foram tratadas apenas com os veículos das substâncias testadas. Altos valores de absorbância, indicando presença de formazan, foram relacionados positivamente a elevada viabilidade. Os dados foram expressos relativamente como percentual do controle, cuja média ou mediana correspondeu a 100% de viabilidade. Os resultados foram submetidos às análises estatísticas adequadas, incluindo cálculo de CE_{50} por regressão não linear.

4.2.4 Análise morfológica por microscopia de contraste de fase

Todas as culturas foram visualizadas e registradas, em um aumento de 40x, através de microscopia de contraste de fase utilizando um microscópio invertido Eclipse TS100 (Nikon, Japão), sendo também avaliada a densidade e morfologia celular. Imagens foram adquiridas através de câmera digital de alta resolução (SONY*Cyber-shot*10.1 megapixels) acoplada ao microscópio. Uma régua micrométrica com marcas a cada 10µm (Olympus, Japão) foi

fotografada sob as mesmas condições das amostras para confecção da barra de escala das fotomicrografias.

4.2.5 Avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo

As células foram semeadas a uma densidade de 3,1 x 10^4 células/cm^2 nas placas de Petri (35 mm de diâmetro) e tratadas com rotenona (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A) nas concentrações de 3, 6 e 30 nM por 72 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e enzimaticamente descoladas por tripsina e centrifugadas (1000 *g* por 5 minutos) juntamente com o sobrenadante. Após a centrifugação, as células foram ressuspendidas em 500 µL de solução com 2% de albumina do soro bovino (BSA) em PBS gelado e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Após os 30 minutos as células foram centrifugadas novamente, ressuspendidas em um tampão de ligação com anexina V conjugada ao fluorocromo fluoresceína (FITC) e iodeto de propídio (IP) (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A anexina V é uma proteína com propriedades de ligação à fosfatidilserina. Em células normais a fosfatidilserina está localizada na região interna da membrana plasmática. Durante o processo de apoptose a fosfatidilserina é translocada para a região externa da membrana, ficando exposta a marcadores celulares como a anexina V. Entretanto, recomenda-se a utilização do IP, que marca as células necrosadas ou em estágio tardio de apoptose, permitindo a diferenciação dos dois processos. Células em apoptose tardia mostram ligação da anexina V com a fosfatidilserina e, com a evolução do processo, apresentam dano à membrana permitindo a entrada do IP, resultando em uma dupla marcação. As células não-apoptóticas não são marcadas nem por anexina V, nem por IP. Foram adquiridos 10.000 eventos pelo citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, U.S.A.) nos detectores FL-1(530/30nm) para anexina-V e FL-2 (585/42nm) para IP. A compensação eletrônica de interferência dos filtros e as análises dos resultados foram feitas com auxílio do *software Summit V4.3* (DAKO).

4.2.6 Visualização da presença de GSH por microscopia de fluorescência

A avaliação de GSH intracelular foi realizada através da reação com o monoclorobimano (MCB) (Sigma Aldrich, St. Louis, U.S.A), reagente que atravessa livremente a membrana plasmática íntegra e sofre conjugação com GSH catalisada por diversas isoformas de GST, resultando em um conjugado fluorescente azul quando excitado com luz ultravioleta. Para o teste, as células foram semeadas a uma densidade de 3,1 x 10^4 células/cm^2 nas placas de Petri (35 mm de diâmetro). Após os tratamentos por tempos estipulados, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 400 µL de meio contendo 1mM de MCB durante 30 minutos no escuro. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS e cobertas com lamínulas usando glicerina 50 % como líquido de montagem. As placas foram observadas em um aumento de 40x em microscópio de fluorescência (Olympus BX 51 - URA2, San Jose, U.S.A., Faixa de excitação: 330-385 nm; faixa de emissão: 420 nm) e as imagens capturadas com uma câmera Olympus BX-2 adaptada ao microscópio com dez milissegundos de exposição. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de GSH presente. Para melhor qualidade da resolução de imagem, todas as fotomicrografias foram ajustadas para obter 100% de brilho através do programa *Windows Live* para fotografias.

4.2.7 Análise estatística dos dados

Todos os dados gerados receberam tratamento estatístico adequado, sendo expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e percentis (25 e 75%). A escolha da medida de tendência central e das medidas de dispersão foi feita de acordo com a distribuição dos dados em um histograma de frequência. Como o número amostral não foi superior a 20 em nenhum dos testes, a distribuição foi considerada normal se satisfizesse as seguintes condições: apresentar assimetria no intervalo entre -1 e +1 e curtose no intervalo entre -2 e +2; e considerada não normal se satisfizesse as seguintes condições: não passar em qualquer dos testes de normalidade (teste de *Shapiro-Wilk* ou teste de *D'Agostino* e *Pearson*) ou apresentar assimetria ou curtose fora dos intervalos citados.

Para conjuntos de dados representados por média (portanto, com distribuição normal), testes estatísticos paramétricos foram usados nas comparações entre grupos tratados e

controles, enquanto testes não paramétricos foram usados para aqueles representados por mediana (com distribuição não-normal). O teste usado para cada análise está especificado na apresentação dos resultados; os mais utilizados foram os paramétricos ***t*** de *Student* não pareado para análise binária, *One-Way* ANOVA (seguido do teste de *Dunnett*) para múltipla comparação com apenas um parâmetro variável e os não paramétricos de *Mann-Whitney* para análise binária ou de *Kruskal-Wallis* (seguido do teste de *Dunn's*) para múltipla comparação.

O *software GraphPadPrism*, versão 5.0 para *Windows (GraphPad Software*, San Diego California, EUA) foi utilizado para todas as análises. Regressões não lineares, como a utilizada para cálculo da CE_{50}, foram feitas utilizando-se modelos de equações da biblioteca do programa e só foram consideradas para efeito de cálculos quando o coeficiente de determinação (R^2) foi superior a 0,9. Os valores calculados dos parâmetros de melhor ajuste foram plausíveis em relação aos dados experimentais e seus intervalos de confiança de 95% foram estreitos. Os valores de p adotados como estatisticamente significativos nas análises foram aqueles inferiores a 0,05.

5. RESULTADOS

PARTE I: EFEITOS DO TRATAMENTO COM ROTENONA

Testes prévios realizados em nosso laboratório avaliaram a ação da rotenona, em diferentes concentrações e diferentes períodos de tempo sobre células C6. Essa avaliação foi realizada, inicialmente, através da medida de viabilidade celular através do teste do MTT, bem como pela observação do aspecto morfológico das células por microscopia de contraste de fase. Os resultados apontaram que a rotenona apresentou ação citotóxica na linhagem estudada, apresentando atividade dose-dependente (Figura 4). A equação que representa a curva de dose-resposta, construída a partir de regressões não lineares com os dados experimentais e que é utilizada para o cálculo do valor do CE_{50} está representada abaixo.

$$V = 14{,}32 + \{77{,}96 / [1+10^{(2{,}87\ \mathrm{LogC}-1{,}16)}]\};(R^2 = 0.9606)$$

No qual, *V* corresponde à viabilidade celular relativa em comparação com o controle e *C* é o logaritmo da concentração de rotenona. O valor da CE_{50}, correspondente à mediana dos valores encontrados foi de 3,5 nM (Variação: 0,4 – 4,2 nM).

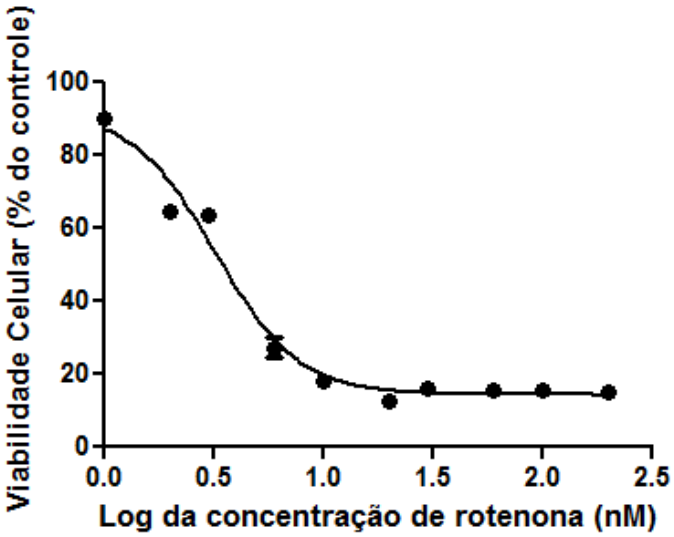

Figura 4. Viabilidade celular (avaliada pelo teste do MTT) de células da linhagem C6 após tratamento com rotenona em concentrações crescentes. Curva de viabilidade em células C6 em função da concentração de rotenona após 48 horas de tratamento. Foram realizados três experimentos independentes, com n = 8 para cada concentração.

Na linhagem U251 não foi alcançada a CE_{50} na faixa de concentração testada, sendo determinada a menor concentração estatisticamente diferente do grupo controle, ou seja, a concentração mínima citotóxica (CMC). Esta concentração corresponde ao valor de 6nM durante o período de tratamento por 72 horas, valor presente nos três experimentos independentes, com n = 8 para cada concentração (Figura 5).

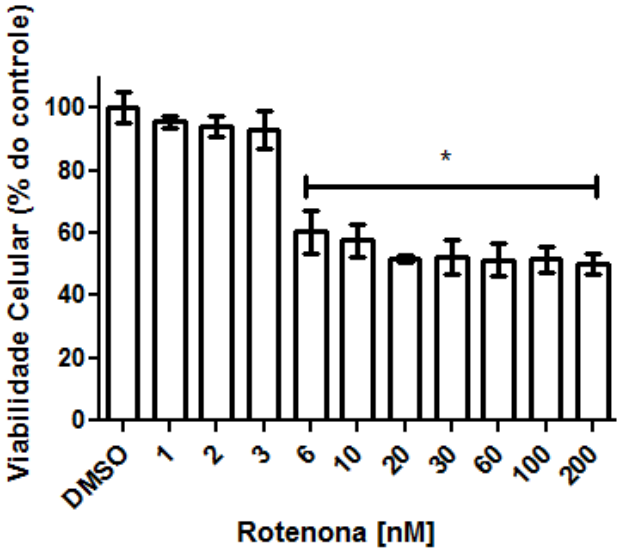

Figura 5. Viabilidade celular (avaliada pelo teste do MTT) de células da linhagem U251 após tratamento com rotenona em concentrações crescentes. Estudo da viabilidade de células U251 após 72 horas de tratamento com rotenona. Figura representa o experimento com valor mediano. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de *Dunnett* para múltiplas comparações. * $P < 0,05$ para comparação com DMSO 0,5%.

Através da visualização por microscopia de contraste de fase foi possível observar, nas células da linhagem C6, um fenótipo fusiforme e uma íntima distribuição espacial das células em condições controle (DMSO 0,5%) (Figura 6A). Quando tratadas com rotenona, as células apresentaram aparência de glia reativa, sendo notável a perda da morfologia predominantemente fusiforme, bem como a diminuição do número de células (Figura 6B).

Para as células da linhagem U251, aquelas em condições controle (DMSO 0,5%) também apresentaram um fenótipo fusiforme, com extremidades alongadas e afiladas (Figura 6C). Por outro lado, as células tratadas com rotenona apresentaram aparência fibrilar, com retração do citoplasma e formação de processos filamentosos, sugerindo reatividade ao agente (Figura 6D). Foram notáveis as modificações na distribuição e conexão das células com as circunvizinhas, saindo de um padrão mais bem organizado para outro mais aleatório e com maior espaço entre elas.

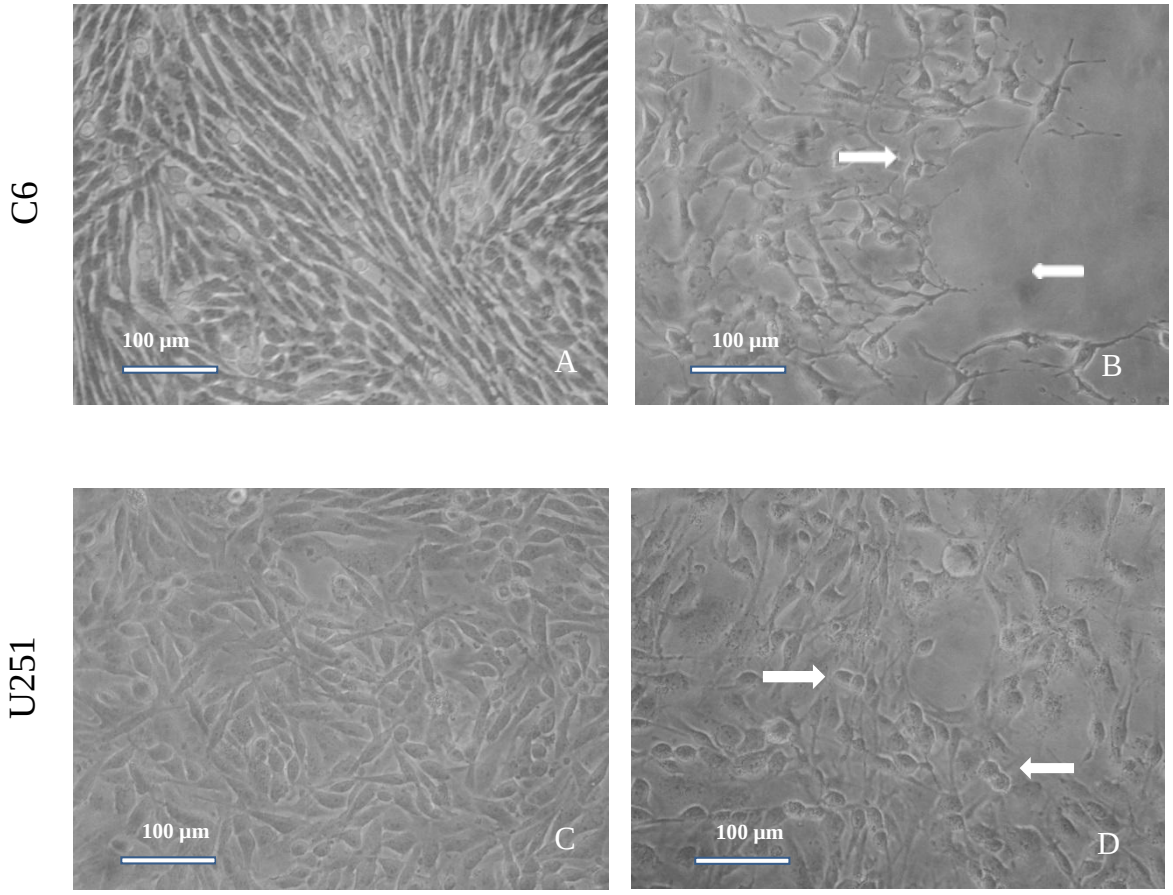

Figura 6. Alterações na morfologia celular provocadas pelo tratamento com rotenona. Células C6 com DMSO 0,5% (**A**) e tratadas com rotenona 3,5 nM por 48 horas (**B**). Células U251 com DMSO 0,5% (**C**) e tratadas com rotenona 6nM por 72 horas (**D**). As setas brancas representam células com retração do citoplasma e formação de processos filamentosos.

Diante do efeito citotóxico e das alterações morfológicas induzidas pela rotenona nas células em estudo, buscou-se elucidar o tipo de morte celular provocado pela droga. O teste utilizado nesta etapa foi o de dupla marcação com anexina V e IP. A quantificação por citometria de fluxo demonstrou que as células U251 tratadas com rotenona apresentaram uma diminuição na porcentagem de células viáveis não marcadas quando comparadas com células do grupo controle (Figura 7). A porcentagem de células marcadas com anexina V (células apoptóticas) foi maior nos grupos tratados com rotenona que em células do grupo controle, no qual na concentração de 6 nM, 18,1% das células estavam em apoptose, enquanto que no grupo controle (DMSO 0,5%) apenas 9,8% se encontravam em processo apoptótico. Já a porcentagem de células em necrose não divergiu estatisticamente entre os grupos tratados com concentrações crescentes da droga, demonstrando assim, que a morte celular ocorre principalmente por apoptose (Tabela 1).

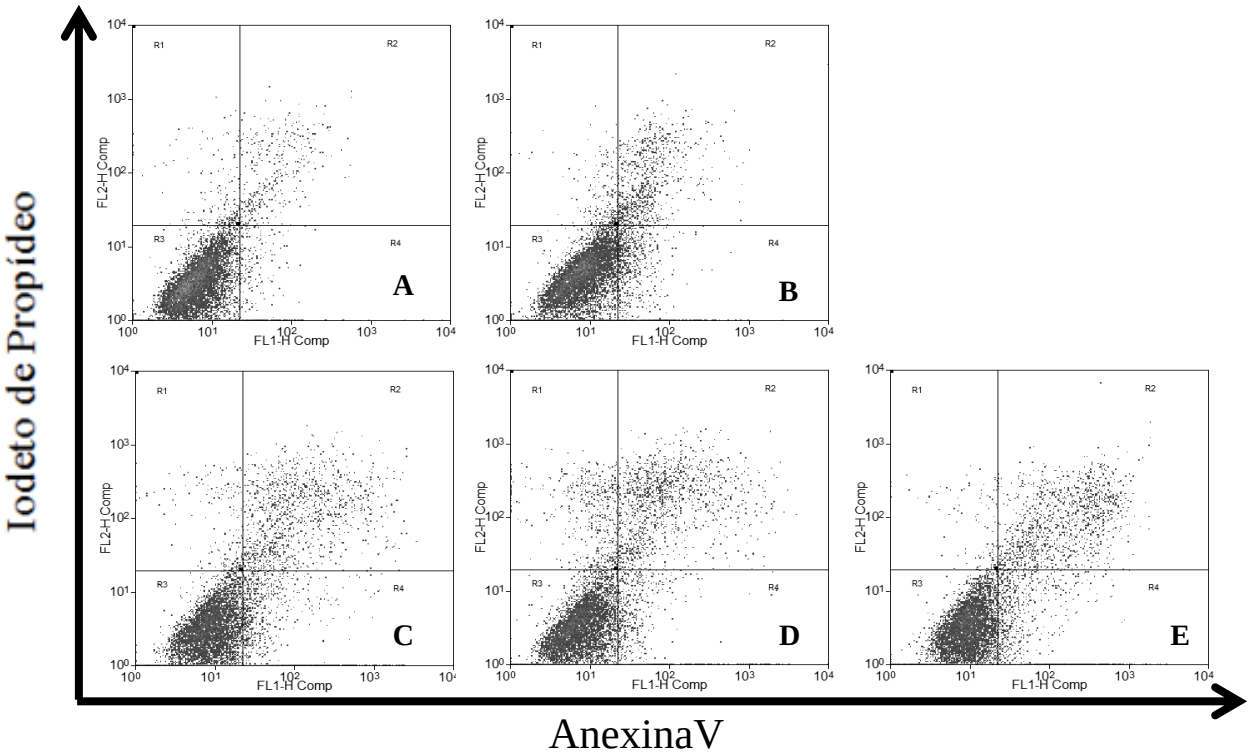

Figura 7. Avaliação do tipo de morte celular após tratamento com rotenona. Células U251 cultivadas por 72 horas apenas com meio de cultura (**A**); células com DMSO 0,5% (72 horas) (**B**); células tratadas com rotenona 3nM (**C**), 6 nM (**D**) e 30 nM (72 horas) (**E**). Quadrantes: inferior esquerdo - células vivas não marcadas; inferior direito - células marcadas apenas com anexina V (apoptose inicial); superior esquerdo – células marcadas apenas com IP (necrose); superior direito – duplamente marcadas (apoptose tardia).

Tabela 1. Percentual de células da linhagem U251 marcadas com anexina V e IP após tratamento com rotenona. Os dados representam à mediana e os percentis 25 e 75% de um experimento realizado em triplicata.

	U251				
	Meio	**DMSO 0,5%**	**ROT 3nM**	**ROT 6nM**	**ROT 30 nM**
Viáveis	85,9 (84,7 – 92)	83,7 (83,3 – 84,7)	75,5 (74,3 – 76,4)	76,8 (75,7 – 78,2)	76,9 (76,6 – 78,1)
Apoptose Inicial	1,8 (1,2 – 2,4)	3,6 (2,1 – 4,2)	6,4 (6,4 – 9,5)	6,6 (4,1 – 6,7)	6,3 (4,6 – 6,4)
Apoptose Tardia	6 (2,9 – 8,6)	6,2 (6,1 – 6,7)	12,5 (11,8 – 13,1)	11,5 (9,6 – 12,7)	12,6 (11,9 – 13,5)
Necrose	4,8 (3,7 – 5,7)	5,3 (4,9 – 5,8)	4,6 (3,1 – 6,1)	4,5 (4 – 8,2)	4 (3 – 6,1)

A partir dos resultados demonstrando o efeito citotóxico da rotenona nas células em estudo, foi realizado o teste com o MCB para avaliar o conteúdo de GSH intracelular, partindo-se da premissa que se a rotenona for conjugada com GSH por ação de qualquer isoforma de GST, a célula será espoliada de GSH, processo em que não ocorre a reciclagem deste.

Os resultados apresentados através de microscopia de fluorescência demonstraram que não houve redução do conteúdo de GSH intracelular com DMSO 0,5% (Figuras 8D e 9D), mas houve uma espoliação acentuada após tratamento com BSO, agente que conhecidamente espolia GSH (controle positivo da técnica), e rotenona nas concentrações e tempos determinados (Figuras 8E e F; 9E e F). A análise por microscopia em contraste de fase demonstrou a presença de células viáveis e morfologicamente normais nos grupos controle (Figuras 8A e B; 9A e B), porém, nos grupos tratados com rotenona houve a presença de espaços vazios entre as células, e estas apresentaram a aparência de glia reativa, com retração do citoplasma e formação de processos filamentosos como anteriormente descrito (Figuras 8C e 9C).

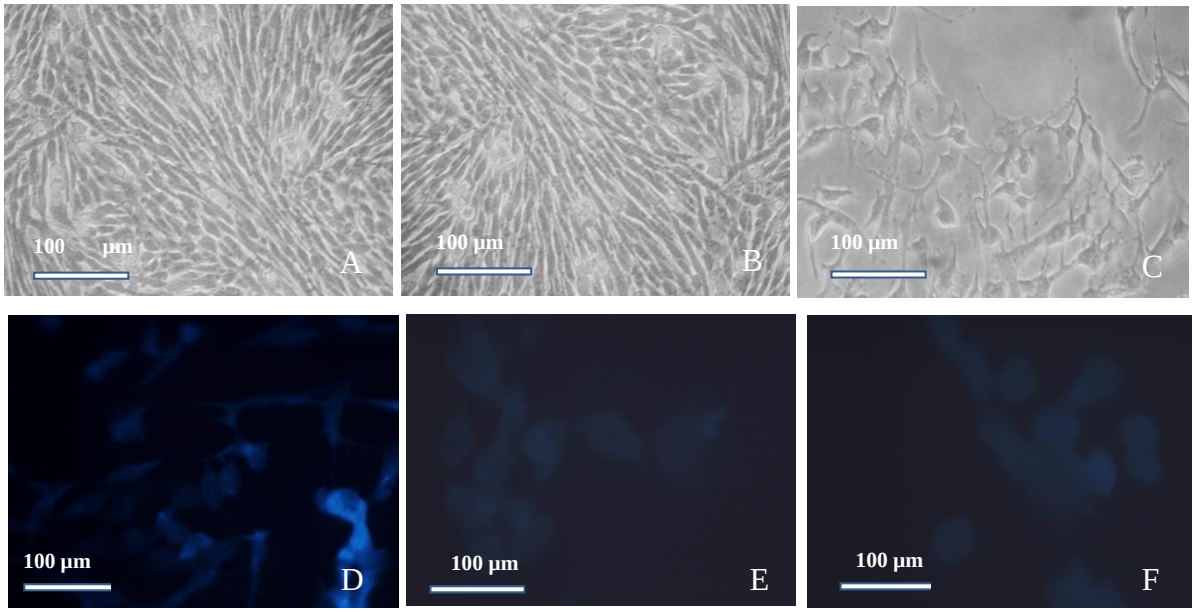

Figura 8. Detecção de GSH em células C6 após tratamento com rotenona. Análise por microscopia de contraste de fase das células com DMSO 0,5% por 48 horas **(A)** e BSO (1mM) por 24 horas **(B)**; células tratadas com rotenona (3,5 nM) por 48 horas **(C)**. Análise por microscopia de fluorescência das células com DMSO 0,5% por 48 horas **(D)**; tratamento com BSO (1mM) por 24 horas **(E)**; tratamento por 48 horas com rotenona 3,5 nM **(F)**. As imagens referentes à microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram representativas de diferentes campos da placa. Estudo realizado através de três experimentos independentes em triplicata.

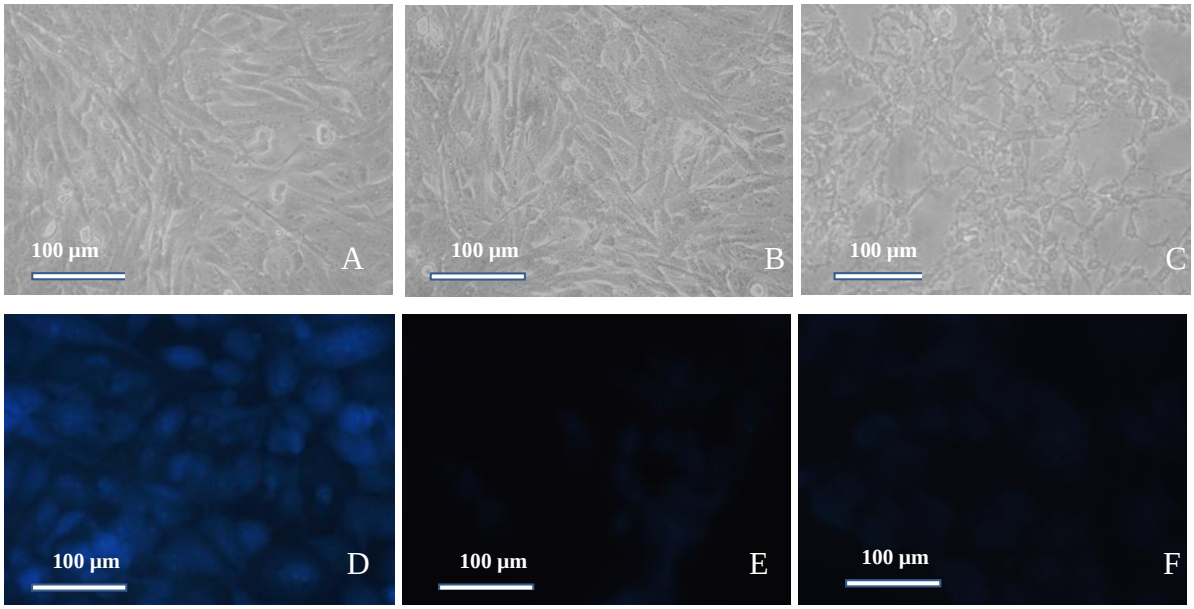

Figura 9. Detecção de GSH em células U251 após tratamento com rotenona. Análise por microscopia de contraste de fase das células com DMSO 0,5% por 72 horas **(A)** e BSO (1mM) por 24 horas **(B)**; células tratadas com rotenona (6 nM) por 72 horas **(C).** Análise por microscopia de fluorescência das células com DMSO 0,5% por 72 horas **(D)**; tratamento com BSO (1mM) por 24 horas **(E)**; tratamento por 72 horas com rotenona 6nM **(F)**. As imagens referentes à microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram representativas de diferentes campos da placa. Estudo realizado através de três experimentos independentes em triplicata.

PARTE II: EFEITOS DO TRATAMENTO COM 8-MOP

Este segundo bloco de experimentos consistiu em avaliar o efeito citotóxico do 8-MOP em diferentes concentrações, utilizando o tempo correspondente à determinação da CE_{50} da rotenona nas células da linhagem C6, e da determinação da concentração mínima citotóxica encontrada nas células da linhagem U251.

Essa avaliação foi realizada através da medida de viabilidade celular através do teste do MTT, bem como pela observação do aspecto morfológico das células por microscopia de contraste de fase. Os resultados demonstraram que apenas a concentração de 200 µM de 8-MOP promoveu uma diminuição da viabilidade celular de forma estatisticamente significante em relação ao grupo controle com DMSO 0,5%, fato este que se repetiu nas duas linhagens testadas (Figura 10A e B). Desta forma, a concentração de 200 µM de 8-MOP foi excluída dos testes seguintes que buscaram determinar ação protetora.

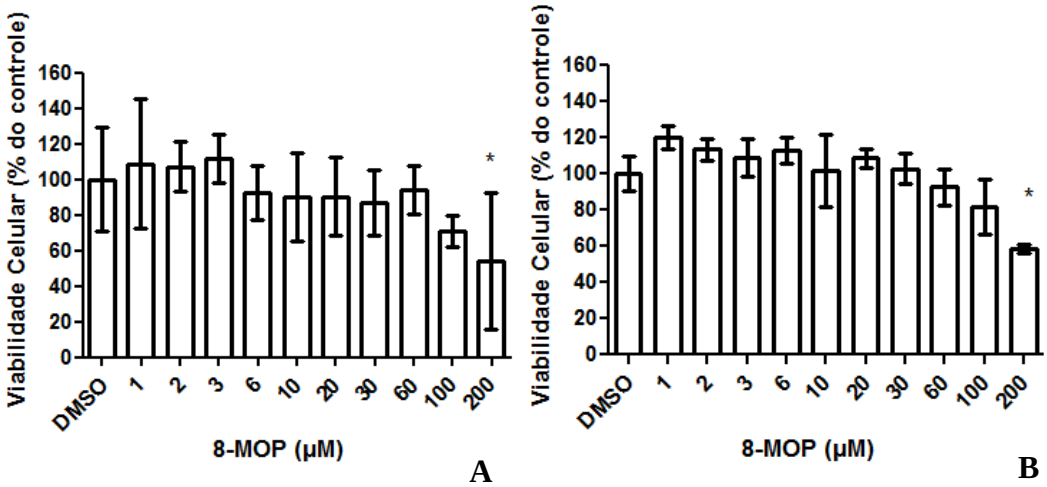

Figura 10. Viabilidade celular após tratamento com 8-MOP em concentrações crescentes. Estudo da viabilidade de células C6 (48 horas) (**A**) e U251 (72 horas) (**B**) em função da concentração de 8-MOP. Figuras representativas da média ou mediana de três experimentos realizados em triplicata para cada linhagem. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de *Dunnett* para múltiplas comparações. * $P < 0,05$ para comparação com DMSO 0,5%.

Com base nos resultados de toxicidade, buscou-se estabelecer se o 8-MOP exercia efeito protetor contra a citotoxicidade induzida pelo tratamento com rotenona. Para tal propósito, o 8-MOP foi adicionado nas concentrações de 1 a 100 µM simultaneamente ao meio contendo rotenona nas concentrações de 3,5 nM para as células da linhagem C6, ou 6 nM para as células da linhagem U251, e a viabilidade celular foi avaliada através do teste de MTT.

Os resultados de viabilidade mitocondrial evidenciaram que o tratamento com 8-MOP em concentrações crescentes, simultâneo ao tratamento com rotenona, não protegeu as células de ambas as linhagens contra os efeitos deletérios induzidos pelo pesticida. Diferenças estatisticamente significativas não foram alcançadas entre os grupos tratados com rotenona e 8-MOP em relação aqueles tratados apenas com rotenona (Figura 11A e B).

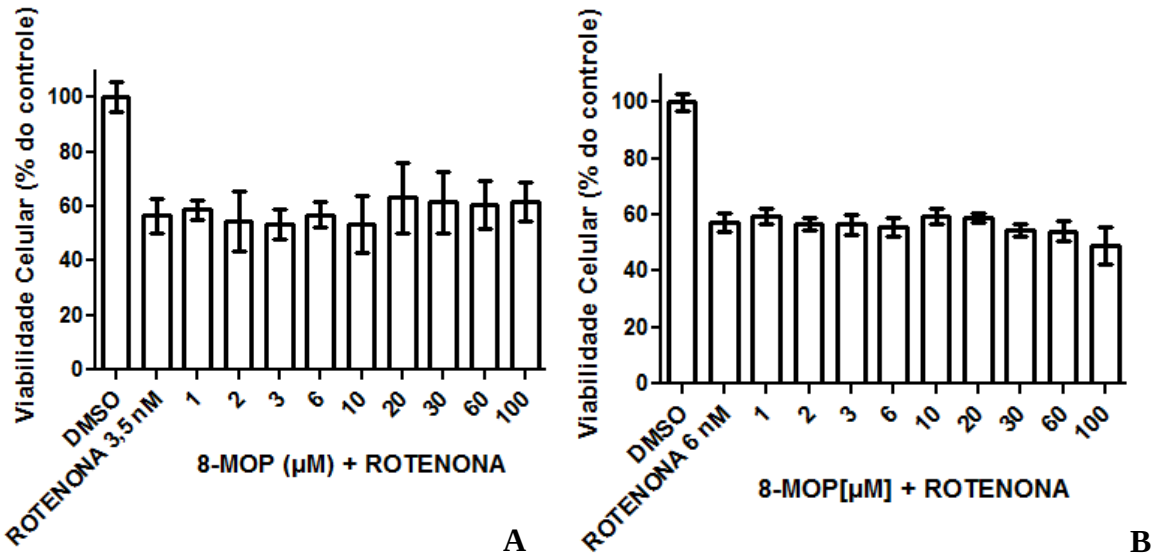

Figura 11. Viabilidade celular após tratamento simultâneo com 8-MOP e rotenona. As células C6 (48 horas) **(A)** e U251 (72 horas) **(B)** foram tratadas simultaneamente com rotenona e concentrações crescentes de 8-MOP. Figuras representativas da média ou mediana de três experimentos realizados em triplicata para cada linhagem. Os dados apresentaram distribuição normal, portanto foi utilizado o teste de *one-way* ANOVA, seguido do teste de *Newman-Keuls* para múltiplas comparações entre os grupos tratados apenas com rotenona daqueles tratados com rotenona e 8-MOP.

Algumas pesquisas demonstraram que em determinadas situações compostos derivados de produtos naturais necessitaram de tratamentos prévios para alcançar efeitos protetores diante de agentes tóxicos (GÓES, 2013; PARK *et al*., 2014). Dessa forma, visto que o tratamento simultâneo de 8-MOP não obteve êxito no aspecto protetor contra a rotenona, optou-se pela realização de um pré-tratamento por 1 hora utilizando o 8-MOP em concentrações reduzidas.

Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados apenas com rotenona daqueles pré-tratados com 8-MOP, ou seja, o pré-tratamento com 8-MOP em concentrações reduzidas também não protegeu as células de ambas as linhagens contra os efeitos deletérios induzidos pelo pesticida (Figura 12A e B).

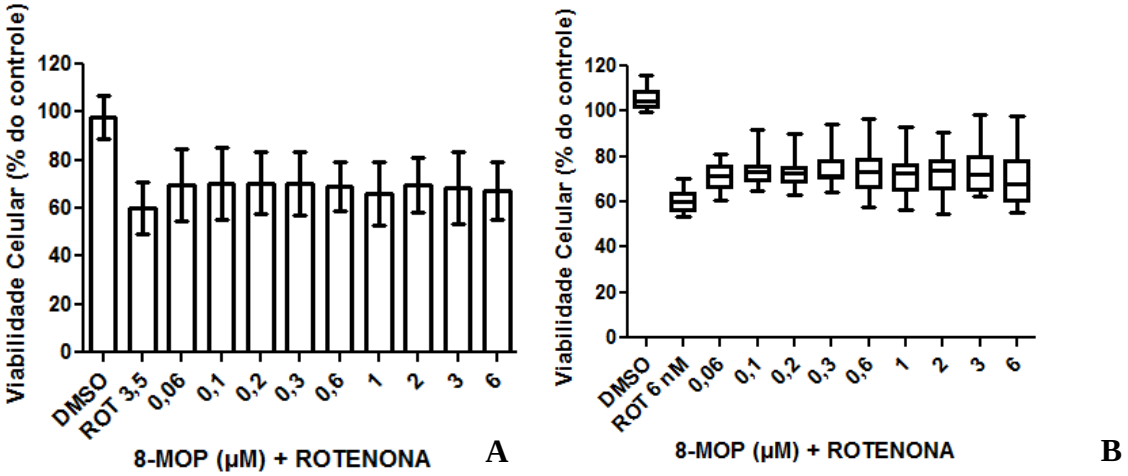

Figura 12. Viabilidade celular após pré-tratamento com 8-MOP. As células C6 **(A)** e U251 **(B)** foram pré-tratadas por 1 hora com concentrações crescentes de 8-MOP (0,06 µM – 6 µM), e então tratadas simultaneamente com rotenona e concentrações crescentes de 8-MOP por 48 (C6) e 72 (U251) horas. Figuras representativas da média ou mediana de três experimentos realizados em triplicata para cada linhagem. Na Figura (**A**), os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste *one-way* ANOVA, seguido do teste de *Newman-Keuls* para múltiplas comparações. Na Figura (**B**), os dados apresentaram distribuição não normal e foram analisados estatisticamente pelo teste *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Dunn's* para múltiplas comparações. Os testes acima citados foram utilizados nas comparações entre os grupos tratados apenas com rotenona daqueles tratados com rotenona mais 8-MOP.

Como até então os resultados demonstraram que o 8-MOP não foi eficaz em proteger, a nível mitocondrial, as linhagens celulares contra a citotoxicidade induzida pela rotenona, foi adotado o modelo experimental que buscou verificar a presença de GSH intracelular após um pré-tratamento por 1 hora utilizando o 8-MOP na maior concentração utilizada no experimento anterior, ou seja, a concentração de 6 µM.

Os resultados apresentados através de microscopia de fluorescência demonstraram que não houve redução do conteúdo de GSH intracelular com DMSO 0,5% (Figuras 13E e 14E), mas houve uma espoliação acentuada após tratamento com BSO e rotenona (Figuras 13F e G; 14F e G), porém após o pré-tratamento com 8-MOP o conteúdo de GSH foi mantido (Figuras 13H e 14H). A análise por microscopia em contraste de fase demonstrou a presença de células viáveis e morfologicamente normais nos grupos controle (Figuras 13A e B; 14A e B), as células tratadas apenas com rotenona apresentaram a aparência de glia reativa, com retração do citoplasma e formação de processos filamentosos (figuras 13C e 14C), enquanto que as células pré-tratadas com 8-MOP apresentavam-se morfologicamente semelhantes às células não tratadas (Figuras 13D e 14D).

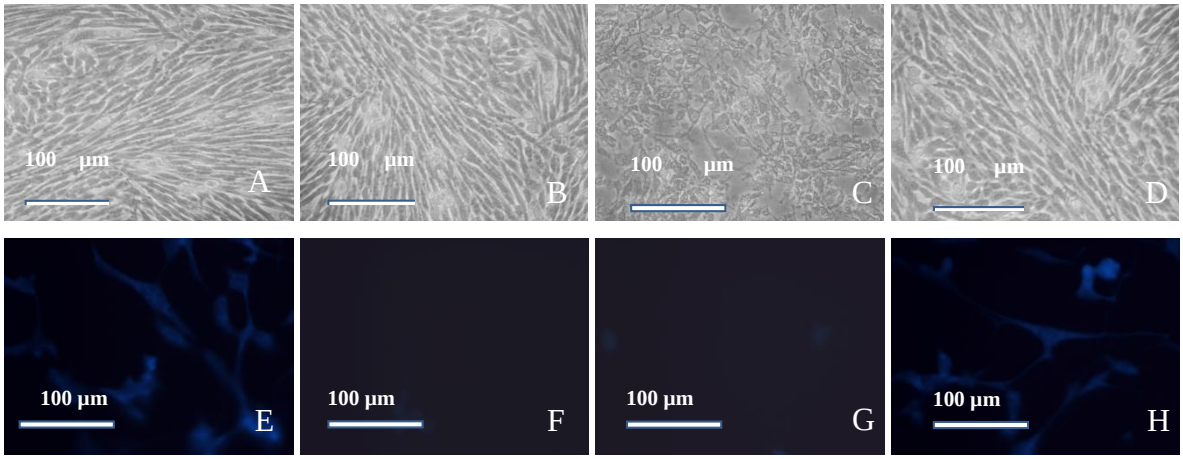

Figura 13. Detecção de GSH em células C6 após tratamento com 8-MOP e rotenona. Análise por microscopia de contraste de fase das células com DMSO 0,5% por 48 horas **(A)** e BSO (1mM) por 24 horas **(B)**; células tratadas com rotenona (3,5 nM) por 48 horas **(C)**; células pré-tratadas com 8-MOP **(D).** Análise por microscopia de fluorescência das células com DMSO 0,5% por 48 horas **(E)**; tratamento com BSO (1mM) por 24 horas **(F)**; tratamento por 48 horas com rotenona 3,5 nM **(G)**; pré-tratamento com 8-MOP por 1 hora **(H)**. As imagens referentes à microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram representativas de diferentes campos da placa. Estudo realizado em triplicata.

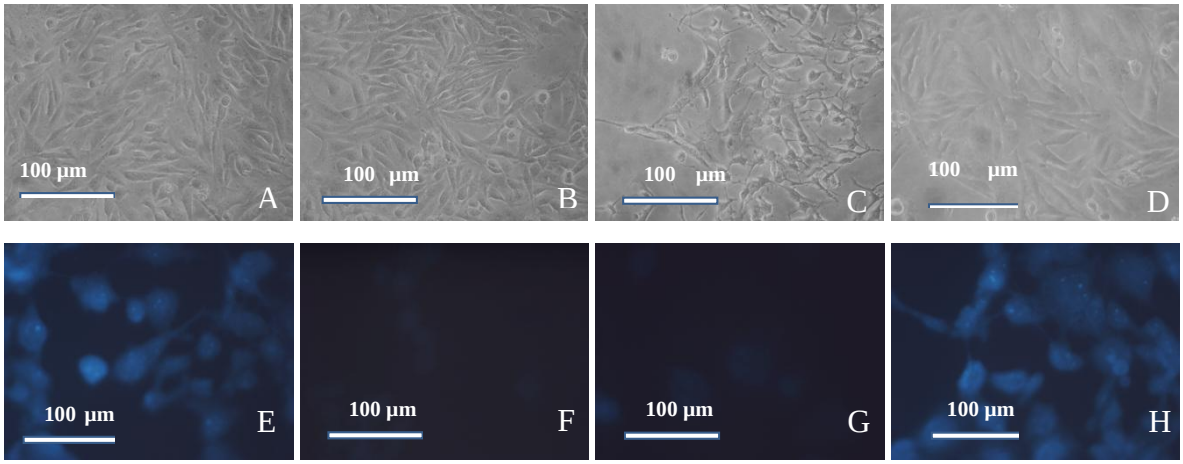

Figura 14. Detecção de GSH em células U251 após tratamento com 8-MOP e rotenona. Análise por microscopia de contraste de fase das células com DMSO 0,5% por 72 horas **(A)** e BSO (1mM) por 24 horas **(B)**; células tratadas com rotenona (6 nM) por 72 horas **(C)**; células pré-tratadas com 8-MOP **(D).** Análise por microscopia de fluorescência das células com DMSO 0,5% por 72 horas **(E)**; tratamento com BSO (1mM) por 24 horas **(F)**; tratamento por 72 horas com rotenona 6nM **(G)**; pré-tratamento com 8-MOP por 1 hora **(H)**. As imagens referentes à microscopia de contraste de fase e de fluorescência foram representativas de diferentes campos da placa. Estudo realizado em triplicata.

6. DISCUSSÃO

Evidências sugerem que a exposição a toxinas ambientais, tais como pesticidas, podem ser fatores de risco subjacentes ao desenvolvimento de muitas doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (ASCHERIO *et al*., 2006; TANNER *et al*., 2011), e a rotenona, um pesticida derivado de plantas foi relatado constantemente estar associado com o desenvolvimento da DP em populações humanas (LIU *et al*., 2003). Atendo-se para a temática da toxicidade, estudos *in vitro* demonstraram que a rotenona é tóxica para células do SNC (SWARNKAR *et al*., 2012; THAKUR e NEHRU, 2014; PARK *et al*., 2014), fenômeno que foi observado neste estudo e pode ser correlacionado com a diminuição da viabilidade celular.

A avaliação da viabilidade celular pelo teste do MTT demonstrou que a rotenona apresentou um efeito citotóxico sobre as células estudadas, efeito este que foi dose dependente. Além disso, alterações na morfologia celular também são indícios de toxicidade de um agente, dessa forma, as células tratadas com rotenona apresentaram aparência de glia reativa, com retração do citoplasma e formação de processos filamentosos, fugindo de um padrão fenotípico fusiforme encontrado nas células não tratadas por esta droga.

A citotoxicidade induzida pela rotenona está relacionada diretamente com um aumento na produção de ERO e a uma falência na produção de ATP, devido à particularidade de ser um inibidor da cadeia respiratória mitocondrial (DICK, 2007; SWARNKAR *et al*., 2012; TAMILSELVAM *et al*., 2013).

A cadeia respiratória é um complexo multienzimático formado por quatro subunidades presentes na membrana interna mitocondrial, que tem a função de carrear elétrons a partir de aceptores iniciais para o aceptor final, o oxigênio molecular (O_2), favorecendo neste processo a formação de água e a transferência de prótons (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas, gerando um potencial eletroquímico e conservando temporariamente energia. Quando os prótons fluem a favor de seu gradiente eletroquímico, a energia se faz disponível para realizar trabalho, impulsionando a síntese de ATP (NICHOLLS e BUDD, 2000; NELSON e COX, 2014).

Diante dessas informações, mais que um inibidor geral da cadeia respiratória mitocondrial, a rotenona demonstrou ser um inibidor específico do primeiro complexo multienzimático, o Complexo I, também chamado de NADH-desidrogenase (EC 1.6.5.3)

(THAKUR e NEHRU, 2014). Este complexo recebe dois elétrons do carreador NADH, e internamente estes elétrons são transferidos para outros carreadores, incialmente para flavoproteínas contendo um nucleotídeo de flavina (FMN) e posteriormente para proteínas ferro-enxofre (Fe-S) até alcançar a ubiquinona, que transportará os elétrons para o Complexo III (NICHOLLS e BUDD, 2000). Sendo assim, a rotenona age por inibir a transferência de elétrons do centro Fe-S à ubiquinona, impedindo o carreamento correto dos elétrons ao aceptor final e a formação do gradiente eletroquímico, favorecendo um prejuízo na síntese de ATP e contribuindo para o aumento da produção de ERO (CABEZAS *et al*., 2013; NELSON e COX, 2014).

Já está bem descrito na literatura que a rotenona provoca disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, e estes contribuem para gerar danos celulares, e de fato, podem provocar alterações moleculares e bioquímicas que culminam em morte celular, especificamente morte celular por apoptose (PERFEITO *et al*., 2014; PARK *et al*., 2014). Este processo é um tipo de morte caracterizada por retração celular, vacuolização citoplasmática, fragmentação nuclear, condensação e marginalização da cromatina, formação de corpos apoptóticos e externalização da fosfatidilserina. Eventos bioquímicos importantes neste processo ainda incluem a ativação de membros de uma família de cisteína proteases (caspases), principalmente a caspase iniciadora 9 e a executora 3, além da fragmentação de proteínas e do DNA, eliminando células que foram lesadas de modo irreparável (ROBBINS *et al*., 2010; TAMILSELVAM *et al*., 2013).

Para confirmar as informações citadas na literatura especializada, testes por citometria de fluxo foram executados a fim de caracterizar o tipo de morte celular gerado pela rotenona. Dentre as formas de identificar o tipo de morte, a marcação da fosfatidilserina com anexina V é comumente aceita para a determinação de células apoptóticas. Por outro lado, a perda da integridade da membrana plasmática tem sido extensivamente avaliada através do uso do IP (LAW *et al*., 2007; DE OLIVEIRA *et al*, 2010; GÓES, 2013).

Os resultados deste estudo estão de acordo com a literatura, uma vez que, evidenciaram que a maior parte das células que apresentaram dano foram marcadas com anexina V, demonstrando um aumento no percentual de células apoptóticas promovido pelo tratamento com a rotenona, ao passo que não houve uma variação significativa na porcentagem das células em necrose, sugerindo assim que a morte celular ocorre principalmente por apoptose (PERFEITO *et al*., 2014; PARK *et al*., 2014).

Importante ressaltar também que as células em apoptose tardia foram marcadas concomitante com anexina V e IP, acontecimento este que pode ser explicado pelo fato de que nos últimos estágios da apoptose a membrana plasmática pode se tornar permeável aos solutos normalmente retidos, e formas de morte celular com características de apoptose bem como de necrose não são incomuns após estímulos ofensivos (ROBBINS *et al*., 2010).

Diante desse cenário de toxicidade e indução de morte celular induzida pela rotenona, buscou-se averiguar a relação do GSH com estes eventos, visto que o mesmo é um tripeptídeo que possui diversas funções, incluindo ação antioxidante e detoxificação de xenobióticos, onde serve de substrato para as enzimas glutation *S*-transferases e glutation peroxidase, que catalisam as reações de detoxificação (SIMS *et al*., 2004; GOTO *et al*., 2009; BOARD e MENON, 2013).

Uma vez conjugada com enzimas glutation-*S*-transferases, esses conjugados (GSH-xenobióticos) são reconhecidos e eliminados por bombas de efluxo de drogas, principalmente a MRP 1 (*multi-drug resistance protein*), ocorrendo o consumo de GSH e não havendo a reciclagem do mesmo (DEPEILLE *et al*., 2005). Já no sistema antioxidante constituído pela enzima glutation peroxidase, o peróxido de hidrogênio é reduzido a água à custa da oxidação de GSH, porém a GR reduz novamente o GSSG em GSH em uma reação dependente de NADPH (NELSON e COX, 2014).

Evidências na literatura mostraram que a diminuição de GSH seria um dos eventos característicos de morte celular por apoptose, pois quando há uma diminuição nos níveis de GSH a produção de energia é afetada, favorecendo a célula sofrer apoptose (SLATER *et al*., 1995). Logo um importante fator para a morte celular por apoptose é a espoliação de GSH, e esta redução foi constatada após tratamentos com a rotenona, resultados estes que corroboraram com a literatura (TAMILSELVAM *et al*., 2013; THAKUR e NEHRU, 2014b).

Neste estudo, observou-se uma diminuição na intensidade de fluorescência do MCB nas células tratadas com BSO e rotenona quando comparadas com células com DMSO a 0,5%. Em relação ao BSO, este é extensivamente utilizado para induzir a espoliação de GSH, uma vez que inibe a γ-glutamilcisteína sintetase (EC 6.3.2.2), enzima importante para a síntese de glutation (GRIFFITH e MEISTER, 1979), e comprovando a sua eficácia, ele induziu espoliação de GSH em astrócitos (GABRYEL e MALECKI, 2006) e glioblastoma humano (DE OLIVEIRA *et al*, 2010; GÓES, 2013).

Como foi citado anteriormente, as células tratadas com rotenona apresentaram a aparência de glia reativa, sugerindo reatividade ao agente, e uma redução da intensidade de

fluorescência, ou seja, um consumo de GSH se comparadas com as células do controle negativo (DMSO 0,5%), e estes resultados demonstram que a morte celular após o tratamento com este pesticida pode estar relacionada a um mecanismo de espoliação de GSH (TAMILSELVAM *et al*., 2013; THAKUR e NEHRU, 2014b).

Não são recentes as pesquisas que buscam uma proteção do SNC a partir de produtos naturais, e neste contexto, a manutenção dos níveis de glutation ganha visibilidade cada dia mais (LIMA *et al*., 2008; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010; TAMILSELVAM *et al*., 2013). Uma das estratégias mais plausíveis é a busca por inibidores efetivos de GSTs, o que favoreceria a não espoliação de GSH após a conjugação deste com uma molécula hidrofóbica via participação dessas enzimas.

Diante desse cenário em que se mostra necessária a busca por alternativas no tratamento baseado em GST, este trabalho avaliou o 8-MOP, um composto de estrutura relativamente simples, e que já foi visto ser um promissor inibidor de GST, principalmente a isoforma π, mais frequente em gliomas (SAL *et al*., 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2014). Os resultados dos testes de viabilidade celular demonstraram que o 8-MOP não foi citotóxico nas concentrações utilizadas, porém a sua utilização não protegeu as células, a nível mitocondrial, dos efeitos nocivos da rotenona. Mais interessante que este efeito, foi o fato do pré-tratamento por 1 hora com o 8-MOP, antes do tratamento com a rotenona favorecer a manutenção do GSH intracelular após testes com o MCB, demonstrando que mesmo não desempenhando um eficaz papel protetor, o mesmo se mostrou um inibidor efetivo de GST, possivelmente da isoforma π.

DE OLIVEIRA *et al* (2014) demonstraram que o 8-MOP age no sítio ativo da enzima, ocupando especificamente o sítio H (de ligação a substratos hidrofóbicos), ao passo que deixa livre o sítio para ligação do GSH (sítio G), mas apesar disso, não é um substrato, pois não sofre conjugação com GSH.

Para os testes relacionados às GSTs, foi utilizado o agente MCB, já anteriormente descrito, que é substrato de diversas isoformas de GST (EKLUND *et al.*, 2002), apresentando fluorescência quando conjugado com o GSH. Portanto a fluorescência observada reflete não apenas o conteúdo citoplasmático de GSH, mas também a atividade das GSTs (UBLACKER *et al*., 1991).

Moléculas com comprovada ação inibitória das GSTs normalmente compartilham características como peso molecular relativamente baixo e moderada hidrofobicidade, como é o exemplo do 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio) hexanol(NBDHEX) e a vitamina E, cujo

núcleo apresenta certa semelhança com o núcleo cumarínico (RICCI *et al*., 2005).Tais características estão presentes também no 8-MOP, além de uma simplicidade estrutural, proporcionando maior facilidade em atravessar membranas biológicas e uma síntese mais acessível. Outro ponto importante em relação ao 8-MOP é a possibilidade de execução de testes em humanos em curto prazo, uma vez que já existem ensaios clínicos com essa droga, ainda que para outras finalidades terapêuticas (BERROETA *et al*., 2010).

Os inibidores de GSTs podem ainda ter outras serventias, como sensibilização à quimioterapia, implicações na resposta ao estresse oxidativo, ou até mesmo na melhoria da abordagem terapêutica de doenças infecciosas (MAHAJAN e ATKINS, 2005). As GSTs podem ainda ter importante papel na etiologia de doenças, incluindo doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla e asma (BAEZ *et al*., 1997; MAPP *et al*., 2002; TEW e TOWNSEND, 2011), além de também estarem envolvidas na biossíntese de metabólitos importantes do ácido araquidônico, tais como prostaglandinas e leucotrienos, mediadores inflamatórios, de forma que a modulação desta enzima poderia ainda ser útil no controle dos níveis dessas substâncias (BLADEREN e OMMEN, 1991).

Esforços terapêuticos que visem à remoção ou à prevenção da formação de radicais livres podem ser benéficos em doenças neurodegenerativas, e em relação a este ponto, produtos naturais são atrativas possibilidades de estruturas químicas que exibem potente atividade biológica com perfis farmacológicos desejáveis. Ficou evidente que o 8-MOP favoreceu uma manutenção do GSH após o tratamento com rotenona, e este fato pode ser explicado pela inibição de GST. Contudo, estudos complementares serão necessários para esclarecer se a manutenção do GSH, através da inibição de GST, pode realmente ser um fator pontual no tratamento de doenças neurodegenerativas.

7. CONCLUSÕES

Este estudo buscou compreender os mecanismos de toxicidade da rotenona sobre células do SNC, e se o 8-MOP, uma furocumarina, possuía algum efeito protetor frente a esse agente tóxico. Os resultados permitiram concluir que:

- A rotenona apresentou toxicidade nas células testadas, sendo responsável pela indução de alterações morfológicas, em que as células apresentaram aparência de glia reativa, com retração do citoplasma e formação de processos filamentosos; diminuição da viabilidade celular através do teste do MTT; morte celular por apoptose, evidenciada pela marcação com anexina V e espoliação de GSH intracelular através da marcação com o MCB.

- O 8-MOP não demonstrou ser tóxico nas concentrações testadas, porém, não foi capaz de proteger as células, a nível mitocondrial, dos efeitos deletérios proporcionados pela rotenona. Contudo, um achado importante foi a manutenção de GSH intracelular após o pré-tratamento com 8-MOP e subsequente tratamento com rotenona, fato este, de potencial relevância terapêutica.

Este efeito foi encontrado em modelos experimentais que não incluem irradiação com luz ultravioleta, como normalmente é realizado, e o amplo conhecimento que se vem obtendo, não apenas do 8-MOP, mas também de outros derivados de psoraleno, deixa esse composto muito mais próximo de testes que venham a confirmar sua eficácia como agente terapêutico.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONSON, J. K. Meyler's side effects of herbal medicines. **Elsevier, Amsterdam**, 2009.

ASCHERIO, A.; CHEN, H.; WEISSKOPF, M. G.; O'REILLY, E.; MCCULLOUGH, M. L.; CALLE, E. E.; SCHWARZSCHILD, M. A, THUN, M. J. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 60, p. 197-203, 2006.

BAE, N. Y.; AHN, T. K.; CHUNG, S. K.; OH, M. S.; KO, H. S.; OH, H. G.; PARK, G. H.; YANG, H. O. The neuroprotective effect of modified yeoldahanso-tang via autophagy enhancement in models of Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 134, p. 313-322, 2011.

BAEZ, S.; SEGURA-AGUILAR, J.; WIDERSTEN, M.; JOHANSSON, A.; MANNERVIK, B. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (*o*-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. **Biochemical Journal**, v. 324, p. 25-28, 1997.

BARRETO, G. E.;GONZALEZ, J.; TORRES, Y.; MORALES, L. Astrocytic-neuronal crosstalk: implications for neuroprotection from brain injury. **Neuroscience Research**, v. 71, p.107–113, 2011.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. Sexta edição, Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2008.

BERROETA, L.; MAN, I.; DAWE, R. S.; FERGUSON, J.; IBBOTSON, S. H. Randomized double-blind comparative study of 8-methoxypsoralen bath plus UV-A treatment regimens. **Actas Dermosifiliogr**, v. 101, p. 729–730, 2010.

BERRY, C.; LA VECCHIA, C.; NICOTERA, P. Paraquat and Parkinson's disease. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, p. 1115–1125, 2010.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; MACKENZIE, G.; GARCIA OSUNA, M.; PANOV, A. V.;GREENAMYRE, J. T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 1301–1306, 2000.

BLADEREN, P. J. V.; OMMEN, B. V. The inhibition of glutathione *S*-transferases: mechanisms, toxic consequences and therapeutic benefits. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 51, p. 35-46, 1991.

BOARD, P.G.; MENON, D. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3267–3288, 2013.

BROWN, G. C. Nitric oxide and mitochondria. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1024–1033, 2007.

BUTTERFIELD, D. A.; BADER LANGE, M.L.; SULTANA, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1801, p. 924–929, 2010.

CABEZAS, R.; AVILA, M. F.; TORRENTE, D.; EL-BACHÁ, R. S.; MORALES, L.; GONZALEZ, J.; BARRETO, G. E. Astrocytes role in Parkinson: a double-edged sword. **Neurodegenerative Diseases**, v. 20, p. 491-517, 2013.

CAO, H.; HEARST, J. E.; CORASH, L.; WANG, Y. LC-MS/MS for the detection of DNA interstrand cross-links formed by 8-methoxypsoralen and UVA irradiation in human cells. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 2932-2938, 2008.

CHEN, Y.; SWANSON, R. A. Astrocytes and brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 23, p. 137–149, 2003.

CHINTA, S.; ANDERSEN, J. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1780, p. 1362–1367, 2008.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, p. 889–909, 2003.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 5, p. 525–535, 2006.

DE OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; DE ANDRADE, D. V. G.; SARACENO, E.; AON-BERTOLINO, L.; CAPANI, F.; EL-BACHÁ, R. S.; GIRALDEZ, L. D. Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an in vitro experimental model of Parkinson disease. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 215–220, 2009.

DE OLIVEIRA, D. M.;DE FARIAS, M. T.; TELES, A. L. B.; DOS SANTOS JUNIOR, M. C.; DE CERQUEIRA, M. D.; LIMA, R. M. F.; EL-BACHÁ, R. S. 8-Methoxypsoralen is a competitive inhibitor of glutathione *S*-transferase P1-1. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p.1-11, 2014.

DE OLIVEIRA, D. M.; PITANGA, B. P. S.; GRANGEIRO, M. S.; LIMA, R. M. F.; COSTA, M. F. D.; COSTA, S. L.; CLARÊNCIO, J.; EL-BACHÁ, R. S. Catechol cytotoxicity in vitro: induction of glioblastoma cell death by apoptosis. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, p. 199-212, 2010.

DEPEILLE, P.; CUQ, P.; PASSAGNE, I.; EVRARD, A.; VIAN, L. Combined effects of GSTP1 and MRP1 in melanoma drug resistance. **British Journal of Cancer**, v. 93, p. 216 – 223, 2005.

DICK, F. D. Parkinson's disease and pesticide exposures. **British Medical Bulletin**, v. 79-80, p. 219–231, 2007.

DIETRICH, C.P.; ARMELIN, H.A.; NOGUEIRA, Y.L.; NADER, H.B.; MICHELACCI, Y.M. Turnover, change of composition with rate of cell growth and effect of phenylxyloside on synthesis and structure of cell surface sulfated glycosaminoglycans of normal and transformed cell. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 717, p. 387–397, 1982.

EKLUND, B. I.; EDALAT, M.; STENBERG, G.; MANNERVIK, B. Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane. **Analytical Biochemistry**, v. 309, p. 102-108, 2002.

FERNANDEZ, H. H. Updates in the medical management of Parkinson disease. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 79, p. 28-35, 2012.

GABRYEL, B.; MALECKI, A. Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione: comparison with glutathione precursors. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 381-392, 2006.

GILDERSLEEVE, D.L.; LIN, T.; WIELAND, D.M.; CILIAX, B.J.; OLSON, J.M.M.; YOUNG, A.B. Synthesis of a high specific activity I-labeled analog of PK 11195, potential agent for SPECT imaging of the peripheral benzodiazepine binding site. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 16, p. 423-429, 1989.

GIORDANO, G.; KAVANAGH, T. J.; COSTA, L. G. Mouse cerebellar astrocytes protect cerebellar granule neurons against toxicity of the polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture DE-71. **Neurotoxicology**, v. 30, p. 326-329, 2009.

GÓES, L. M. Caracterização dos efeitos tóxicos do 1,2-dihidroxibenzeno em células originadas do sistema nervoso: investigação do efeito protetor de derivados de plantas. Dissertação (Mestrado em Patologia Humana) – **Universidade Federal da Bahia**, Salvador, 2013.

GOTO, S.; KAWAKATSU, M.; IZUMI, S.; URATA, Y.; KAGEYAMA, K.; IHARA, Y.; KOJI, T.; KONDO, T. Glutathione *S*-transferase π localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 1392–1403, 2009.

GREENAMYRE, J. T.; HASTINGS, T. G. Parkinson's divergent causes, convergent mechanisms. **Science**, v. 304, p. 1120–1122, 2004.

GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. Glutathione: interorgan translocation, turnover, and metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 5606-5610, 1979.

GUERRERO, E.; VASUDEVARAJU, P.; HEGDE, M. L.; BRITTON, G. B.; RAO, K.S. Recent advances in α-synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. **Molecular Neurobiology**, v. 47, p. 525-536, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HAMBY, M. E.; SOFRONIEW, M. V. Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. **Neurotherapeutics**, v. 7, p. 494–506, 2010.

HAYESHI, R.; MUTINGWENDE, I.; MAVENGERE, W.; MASIYANISE, V.; MUKANGANYAMA, S. The inhibition of human glutathione *S*-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 286–295, 2007.

HOGLINGER, G.U.; LANNUZEL,A.; KHONDIKER, M.E., MICHEL, P.P.; DUYCKAERTS, C.; FEGER,J.; CHAMPY, P.; PRIGENT, A.; MEDJA, F.; LOMBES, A.; OERTEL, W.H.; RUBERG, M.; HIRSCH, E.C. The mitochondrial complex I inhibitor rotenone triggers a cerebral tauopathy. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, p. 930–939, 2005.

HOSAMANI, R.; KRISHNA, G.; MURALIDHARA. Standardized *Bacopamonnieri* extract ameliorates acute paraquat-induced oxidative stress, and neurotoxicity in prepubertal mice brain**. Nutritional Neuroscience**, v. 1, p.1-13, 2014.

HSIEH, H.; CHI, P.; LIN, C.; YANG, C.; YANG, C. Up-regulation of ROS-dependent matrix metalloproteinase-9 from high-glucose-challenged astrocytes contributes to the neuronal apoptosis. **Molecular Neurobiology**, p.1-14, 2014.

INZINGER, M.; HESCHL, B.; WEGER, W.; HOFER, A.; LEGAT, F.J.; GRUBER-WACKERNAGEL, A.; TILZ, H.; SALMHOFER, W.; QUEHENBERGER, F.; WOLF, P. Efficacy of psoralen plus ultraviolet A therapy vs. biologics in moderate to severe chronic plaque psoriasis: retrospective data analysis of a patient registry. **British Journal of Dermatology**, v. 165, p. 640-645, 2011.

KANG, W.; HEBERT, J. M. Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. **Molecular Neurobiology**, v. 43, p. 147–154, 2011.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S.; BILLAKANTI, R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury beneficial and detrimental effects. **Molecular Neurobiology**, v. 46, p.251–264, 2012.

KIMELBERG, H. K.; NEDERGAARD, M. Functions of astrocytes and their potentialas therapeutic targets. **Neurotherapeutics**, v. 7, p. 338–353, 2010.

KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Current Medicinal Chemistry Anti-Cancer Agents**, v. 5, p. 29-46, 2005.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 15, p. 1044–1053, 1998.

LANGSTON, J.W.; IRWIN, I.; RICAURTE, G. A. Neurotoxins, parkinsonism and Parkinson's disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 32, p. 19-49, 1987.

LAW, C.L.; MCEARCHERN, J.; DRACHMAN, J.G. Anti-CD70 antibody-drug conjugates and their use for the treatment of cancer and immune disorders. **U.S. Pat.20070292422**, 2007.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, p. 2055–2066, 2009.

LEE, S.J.; NAM, K.W.; MAR, W. Effects of psoralen from *Psoraleacorylifolia* on quinone reductase, ornithine decarboxylase, and JB6 cells transformation promotion. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, p. 31-36, 2011.

LIMA, R.M.F.; ALVAREZ, L.D.G.; COSTA, M.F.D.; COSTA, S.L.; CLARÊNCIO,J.; EL-BACHÁ,R.S. Cytotoxic effects of catechol to neuroblastoma N2a cells. **General Physiology and Biophysics**, v. 27, p. 306-314, 2008.

LIU, B.; GAO, H.; HONG, J. Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, p. 1065–1073, 2003.

LIU, W.; JIA, F.; HE, Y.; ZHANG, B. Protective effects of 5-methoxypsoralen against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, p. 2197-2202, 2012.

LUISI, S.B.; BARBACHAN, J.J.D.; CHIES, J.A.B.; FILHO, M.S.A. Cell culture as a tool for dental pulp behavior studies. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v.45, p.3-8, 2004.

MA, Y.; XIE, C.; CHEN, D.; LI, J. Novel microtubule-targeted agent 6-chloro-4-(methoxyphenyl) coumarin induces G2-M arrest and apoptosis in HeLa cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, p. 407-417, 2012.

MAHAJAN, S.; ATKINS, W.M. The chemistry and biology of inhibitors and pro-drugs targeted to glutathione *S*-transferases. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 62, p. 1221-1233, 2005.

MAPP, C.E.; FRYER, A.A.; DE MARZO, N.; POZZATO, V.; PADOAN, M.; BOSCHETTO, P.; STRANGE, R. C.; HEMMINGSEN, A.; SPITERI, M. A. Glutathione *S*-transferase *GSTP1* is a susceptibility gene for occupational asthma induced by isocyanates. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 109, p. 867-872, 2002.

MARTIN, I.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 12, p. 301–325, 2011.

MEISTER, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1271, p. 35–42, 1995.

MIAO, S.; SUN, H.; YE, Y.; YANG, J.; SHI, Y.; LU, M.; HU, G.; ZHOU, J. Astrocytic JWA expression is essential to dopaminergic neuron survival in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neuroscience & Therapeutics**, v. 20, p. 754-762, 2014.

MOORE, D.J.; WEST, A.B.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, p. 57–87, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: **Artmed**, p. 731-746, 2014.

NICHOLLS, D.G.; BUDD, S.L. Mitochondria and neuronal survival. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 315-360, 2000.

NUYTEMANS, K.; THEUNS, J.; CRUTS, M.; VAN BROECKHOVEN, C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. **Human Mutation**, v. 31, p. 763-780, 2010.

O'BRIEN, N. M.; WOODS, J. A.; AHERNE, S. A.; O'CALLAGHAN, Y. C. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative reactions in cell-culture models: modulatory effects of phytochemicals. **Biochemical Society Transactions**, v. 28, p. 22-26, 2000.

OGAWA, N.; ASANUMA, M.; MIYAZAKI, I.; DIAZ-CORRALES, F.J.; MIYOSHI, K.L-DOPA treatment from the view point of neuroprotection. Possible mechanism of specific and progressive dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 252, p. 23–31, 2005.

OUYANG, Y.B.; XU, L.J.; SUN, Y.J.; GIFFARD, R.G. Overexpression of inducible heat shock protein 70 and its mutants in astrocytes is associated with maintenance of mitochondrial physiology during glucose deprivation stress. **Cell Stress & Chaperones**, v. 11, p. 180–186, 2006.

PAN-MONTOJO, F.; ANICHTCHIK, O.; DENING, Y.; KNELS, L.; PURSCHE, S.;JUNG, R.; JACKSON, S.; GILLE, G.; SPILLANTINI, M. G.; REICHMANN, H.; FUNK, R. H. Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. **Plos One**, v.5, p. 1-10, 2010.

PARK, S.E.; SAPKOTA, K.; CHO, J.H.; KIM, M.K.; KIM, Y.H.; KIM, K.M.; KIM, K.J.; OH, H.N.; KIM, S.J.; KIM, S. Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. **Neurochemical Research**, v. 39, p. 707–718, 2014.

PARPURA, V.; GRUBISIC, V.; VERKHRATSKY, A. Ca (2+) sources for the exocytotic release of glutamate from astrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 5, p. 984–991, 2011.

PATEL, F. Pesticidal suicide: adult fatal rotenone poisoning. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 18, p. 340–342, 2011.

PATEL, V.P.; CHU, C.T. Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 4, p. 215–229, 2011.

PERFEITO, R.; LAZARO, D.F.; OUTEIRO, T.F.; REGO, A.C. Linking alpha-synuclein phosphorylation to reactive oxygen species formation and mitochondrial dysfunction in SH-SY5Y. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 62, p. 51–59, 2014.

RADAD, K.; RAUSCH, W.D.; GILLE, G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. **Neurochemistry International**, v. 49, p. 379–386, 2006.

RICCI, G.; DE MARIA, F.; ANTONINI, G.; TURELLA, P.; BULLO, A.; STELLA, L.; FILOMENI, G.; FEDERICI, G.; CACCURI, A.M. 7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a new class of suicide inhibitors for glutathione *S*-transferases: mechanism of action of potential anticancer drugs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 26397–26405, 2005.

RIZZARDINI, M.; LUPI, M.; BERNASCONI, S.; MANGOLINI, A.; CANTONI, L. Mitochondrial dysfunction and death in motor neurons exposed to the glutathione-depleting agent ethacrynic acid. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 207, p. 51–58, 2003.

ROBB, S.J.; CONNOR, J.R. Nitric oxide protects astrocytes from oxidative stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 962, p. 93–102, 2002.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Bases patológicas das doenças. 8ª Edição. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.

SAFI, R., GARDANEH, M., PANAHI, Y., MAGHSOUDI, N., ZAEFIZADEH, M., GHARIB, E. Optimized quantities of GDNF overexpressed by engineered astrocytes are critical for protection of neuroblastoma cells against 6-OHDA toxicity. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 46, p. 654–665, 2012.

SAMII, A.; NUTT, J.G.; RANSOM, B.R. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 363, p. 1783–1793, 2004.

SAPAM, R.; AGRAWAL, S.; DHALI, T.K. Systemic PUVA vs. narrowband UVB in the treatment of vitiligo: a randomized controlled stydy. **International Journal of Dermatology**, v.51, p.1107-1115, 2012.

SARAFIAN, T.A.; MONTES, C.; IMURA, T.; QI, J.; COPPOLA, G.; GESCHWIND, D.H.;SOFRONIEW, M.V. Disruption of astrocyte STAT3 signaling decreases mitochondrial function and increases oxidative stress *in vitro*. **Plos One**, v.5, p.1-11, 2010.

SAU, A.; TREGNO, F.P.; VALENTINO, F.; FEDERICI, G.; CACCURI, A.M. Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, p. 116–122, 2010.

SBQ, **Sociedade brasileira de química**, Campinas, São Paulo – Brasil, 2014. http://qnint.sbq.org.br. Acessado em 25/08/2014 às 14:35 h e 27/08/2014 às 09:33 h.

SCAFFIDI, J.P.; GREGAS, M.K.; LAULY, B.; ZHANG, Y.; VO-DINH, T. Activity of psoralen-functionalized nanoscintillators against cancer cells upon x-ray excitation. **American Chemical Society**, v. 5, p. 4679-4687, 2011.

SCHAPIRA, A. H. Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. **Experimental Neurology**, v. 224, p. 331–335, 2010.

SCHAPIRA, A.H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, p. 1049–1055, 2011.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUGHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 360-365, 2003.

SIMS, N.R.; NILSSON, M.; MUYDERMAN, H. Mitochondrial glutathione: a modulator of brain cell death. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.36, p. 329–333, 2004.

SLATER, A.F.G.; STEFAN, C.; NOBEL, I.; VAN DEN DOBBELSTEEN, D.J.; ORRENIUS, S. Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. **Toxicology Letters**, v. 82/83, p. 149-153, 1995.

SLEMMER, J.E.; SHACKA, J.J.; SWEENEY, M.I.; WEBER, J.T. Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. **Current Medical Chemistry**, v. 15, p. 404–414, 2008.

STACEY, G.; VIVIANI, B. Cell culture models for neurotoxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, p. 319–334, 2001.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 30, p. 244–250, 2007.

SWARNKAR, S.; SINGH, S.; GOSWAMI, P.; MATHUR, R.; PATRO, I.K.; NATH, C. Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. **Neurochemical Research**,v. 37, p. 2178–2189, 2012.

TAMILSELVAM, K.; BRAIDY, N.; MANIVASAGAM, T.; MOHAMED E.M.; PRASAD, N.R.; KARTHIKEYAN, S.; THENMOZHI, A.J.; SELVARAJU, S.; GUILLEMIN, G.J. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-11, 2013.

TANNER, C.M., KAMEL, F., ROSS, G.W., HOPPIN, J.A., GOLDMAN, S.M., KORELL, M., MARRAS, C., BHUDHIKANOK, G.S., KASTEN, M., CHADE, A.R., COMYNS, K., RICHARDS, M.B., MENG, C., PRIESTLEY, B., FERNANDEZ, H.H., CAMBI, F., UMBACH, D.M., BLAIR, A., SANDLER, D.P., LANGSTON, J.W. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, p. 866–872, 2011.

TEW, K.D.; TOWNSEND, D.M. Regulatory functions of glutathione *S*-transferase P1-1 unrelated to detoxification. **Drug Metabolism Reviews**, v. 43, p. 179–193, 2011.

THAKUR, P.; NEHRU, B. Inhibition of neuroinflammation and mitochondrial dysfunctions by carbenoxolone in the rotenone model of Parkinson's disease. **Molecular Neurobiology**, p. 01-11, 2014.

THAKUR, P.; NEHRU, B. Modulatory effects of sodium salicylate on the factors affecting protein aggregation during rotenone induced Parkinson's disease pathology. **Neurochemistry International**, v. 75, p. 1–10, 2014b.

THOMAS, B.; BEAL, M.F. Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**, v. 16, p. 183-194, 2007.

UBLACKER, G.A.; JOHNSON, J.A.; SIEGEL, F.L.; MULCAHY, R.T. Influence of Glutathione *S*-transferases on cellular glutathione determination by flow cytometry using monochlorobimane. **Cancer research**, v. 51, p. 1783-1788, 1991.

WALLACE, D. C.A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. **Annual of Review of Genetics**, v. 39, p. 359–407, 2005.

WERNER, C.; ENGELHARD, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. **British Journal of Anesthesia**, v. 99, p. 4–9, 2007.

WIDER, C.; FOROUD, T.; WSZOLEK, Z. Clinical implications of gene discovery in Parkinson disease and parkinsonism. **Movement Disorders**, v. 25, p. 15–20, 2010.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The structure and pharmacological functions of coumarins and their derivates. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, p.4236-4260, 2009.

YANG, C.; HSIEH, H.; YU, P.H.; LIN, C.; LIU, S. IL-1β induces MMP-9-dependent brain astrocytic migration via transactivation of PDGF receptor/NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species signals. **Molecular Neurobiology**, p. 1-15, 2014.