



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIA E
BIOLOGIA CELULAR**

**AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO GENOTÓXICO E
NEUROTÓXICO DA ROTENONA EM POPULAÇÕES NEURONAIS DE
ENCÉFALO DE RATOS**

GEOVANNY BRAGA LIMA

**BELÉM – PA
2011**

GEOVANNY BRAGA LIMA

**AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO GENOTÓXICO E
NEUROTÓXICO DA ROTENONA EM POPULAÇÕES
NEURONAIS DE ENCÉFALO DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociência e Biologia Celular.

Área de Concentração: Neurociência

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sumi Yamada

GEOVANNY BRAGA LIMA

**AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO GENOTÓXICO E
NEUROTÓXICO DA ROTENONA EM POPULAÇÕES
NEURONAIS DE ENCÉFALO DE RATOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociência e Biologia Celular.

DATA DE APROVAÇÃO:

Banca Examinadora:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sumi Yamada
Universidade Federal do Pará (UFPA)

Avaliadora: Prof^a. Dr^a. Dulcidéia da Conceição Palheta
Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA)

Avaliador: Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Bahia
Universidade Federal do Pará (UFPA)

AGRADECIMENTO

À minha família que sempre me ajudou muito em todos os momentos por que passei.

À minha QUERIDA orientadora Dra. Elizabeth S. Yamada que me resgatou o incentivo e força de vontade, que sem ela jamais iria terminar esta dissertação; obrigado pela sua sabedoria e paciência.

Ao meu orientador Dr. Edmar Tavares que abriu as portas do Lanex para eu aprender muito com desafios e objetivos.

Ao Professor Cristovam Diniz pelo apoio e incentivo.

A todos os amigos e companheiros do Lanex, Arnaldo, Nilton, Anderson, Luciana, Dani, Gabi, as Larissas, Nonato parte dois... que proporcionaram momentos felizes em ambiente de trabalho, em especial a Amanda e Ana Alice, para as quais não há palavras para agradecer o que fizeram por mim. Obrigado pela amizade de vocês.

Ao Professor Dr. Rommel por acreditar em mim há anos.

À Patrícia Lima, tio Plínio e toda sua GDP do laboratório de citogenética, obrigado pela acolhida.

Ao povo da Universidade do Ceará e de Ribeirão Preto, pelos e-mails que trocamos que ajudaram nas adaptações do teste do cometa.

À FAPESPA pela concessão de bolsa.

Aos meus amigos de São Domingos do Araguaia e minha querida namorada Joice.

Aos meus eternos amigos Kelle, Dani, Renata, André, Cimi, Fabão, Gabriel, Lord louco, Marcus Paiva por todos os momentos anti-estresse que passamos.

SUMÁRIO

Lista de figuras e tabelas	iv
Lista de siglas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução	1
1.1. Doença de parkinson	1
1.2. Compostos vegetais e neurotoxicidade	2
1.3. Distúrbios mitocondriais na doença de Parkinson	3
1.4. Teste de Avaliação de genotoxicidade.....	4
2. Objetivos	5
2.1. Objetivo geral	5
2.2. Objetivos específicos	5
3. Material e métodos	6
3.1. Animais	6
3.2. Meio de cultura	6
3.3. Culturas primária: mistas neurônios/glia	6
3.4. Tratamento com rotenona	8
3.5. Teste do cometa	9
3.5.1 Soluções utilizadas	9
3.5.2. Preparação das lâminas para eletroforese	10
3.5.3. Coleta das células, lise, eletroforese e coloração	10
3.5.4. Avaliação dos cometas	11
3.6. Análise da viabilidade celular	13
3.7. Análise estatística	14
4. Resultados	15
4.1. Viabilidade celular após exposição à rotenona	15
4.2. Análise dos danos ao DNA através do teste do cometa	16
5. Discussão	21
6. Conclusão	25
7. Referência Bibliográfica	26

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Foto do encéfalo de rato com ilustração da região dos cortes para a dissecação do mesencéfalo ventral.

Figura 2 - Etapas do método de análise de danos com o teste do cometa.

Figura 3 - Imagens de neurônios corados com brometo de etídio exibindo diferentes graus de danos no DNA após migração em eletroforese.

Figura 4 - Representação esquemática da reação ocorrida para a análise de viabilidade celular através do ensaio colorimétrico de MTT.

Figura 5 - Análise da viabilidade celular de culturas mistas de mesencéfalo ventral de ratos Wistar neonatos, expostos à rotenona em concentrações de 5, 10, 20 e 30 nM por 24 ou 48 horas.

Figura 6 - Imagens dos nucleóides extraídos das culturas de mesencéfalo ventral corados com brometo de etídio após correr eletroforese.

Figura 7 - Média dos índices de dano ao DNA avaliado pelo teste dos cometas realizados em células de mesencéfalo ventral de ratos Wistar neonatos, após exposição a 5, 10, 20 e 30 nM de rotenona por 24 horas.

Figura 8 - Média dos índices de danos do teste do cometa realizado em células de mesencéfalo ventral de ratos Wistar neonato, do grupo controle e dos grupos expostos a 5, 10, 20 e 30 nM de rotenona por 48 horas.

Figura 9 - Comparação dos índices de dano ao DNA de acordo com o tempo de exposição.

Tabela 1 - Percentual de viabilidade celular, analisada através do teste colorimétrico de MTT.

Tabela 2 - Número de nucleóides analisados, através do teste do cometa, das culturas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos dos grupos controle e tratados com rotenona (5nM, 10nM, 20nM e 30nM) em 24 horas.

Tabela 03 - Número de nucleóides analisados, através do teste do cometa, das culturas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos dos grupos controle e tratados com rotenona (5nM, 10nM, 20nM e 30nM) em 48 horas.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

DP	Doença de Parkinson
DMEM	Dulbecco's modified Eagles's medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBS	Soro bovino Fetal
HS	Soro de Cavalo
LANEX	Laboratório de Neuropatologia Experimental
LMP	Baixo ponto de fusão (low-melting point)
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MPP ⁺	1-metil-4-fenilpiridínio
MTT	3-{4,5-dimetiltiazol-2il}-2,5-difenil brometo de tetrazólio
µl	Micro litro
µM	Micro Molar
NMP	Normal ponto de fusão
nm	Nanômetro
nM	Nano Molar
PND2	2º dia pós-nascimento
PND4	4º dia pós-nascimento
SNpc	Substância Negra, parte compacta

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa, que afeta principalmente neurônios dopaminérgicos da substância negra que projetam para o estriado. A rotenona, um composto amplamente usado como pesticida, pode estar relacionada a influências ambientais que aumentam o risco do aparecimento da DP. Estudo com análise de danos no DNA, como o ensaio em eletroforese do cometa foi introduzido neste trabalho para uma melhor compreensão de efeitos neurotóxicos da rotenona em modelo experimental da DP. O teste do cometa foi aplicado em neurônios provenientes de culturas mesencefálicas mistas de ratos expostas a diferentes concentrações em dois tempos de exposição, 24 e 48 horas. A média do índice de dano dos cometas mostrou-se, segundo análise estatística, significativamente diferente em relação ao grupo controle em todas as concentrações de rotenona testadas e nas duas durações analisadas. No entanto, na análise comparativa do índice de dano considerando o tempo de exposição para concentrações equivalentes, somente 20 e 30 nano molares demonstraram diferença significativa entre 24 e 48 horas de exposição. Este trabalho demonstrou que, nas condições empregadas, o teste do cometa detectou danos no material genético sem alteração detectável no teste de viabilidade celular pelo MTT (5 nM de rotenona por 24h), sugerindo que alterações genotóxicas podem anteceder alterações de viabilidade celular em neurônios expostos à rotenona. Entretanto, não é possível afirmar se tais alterações possuem caráter irreversível ou não.

ABSTRACT

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease that affects dopaminergic neurons of the substantia nigra whose neurons project to the striatum. Rotenone is a compound widely used as pesticide and which has been implicated among the environmental factors that increase the risk of developing PD. An assay that evaluates DNA damage, such as the electroforesis comet assay, was introduced in the present work, to better understand the neurotoxic effects of the rotenone in an experimental model of PD. The comet assay was applied to neurons from mixed mesencephalic cultures exposed to different concentrations of rotenone in two different exposure times, 24 and 48 hours. The mean comet damage index showed a significant difference between the control condition and all the rotenone concentrations tested in both exposure times. However, in the comparative analysis considering time exposure for equivalent concentrations, there was significant difference only with 20 and 30 nM rotenone concentrations. This study demonstrated that, in the experimental conditions used, the comet assay detected damage to the genetic material without detectable alterations in the MTT viability test (5 nM rotenone, 24h), suggesting that genotoxic alterations may precede viability alterations in rotenone-exposed neurons. It is not possible, however, to assure that such alterations are irreversible or not.

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa cuja neuropatologia clássica é caracterizada pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra mesencéfálica que projetam para o estriado (via nigroestriatal). Os neurônios remanescentes geralmente apresentam inclusões citoplasmáticas positivas para as proteínas ubiquitina e α -sinucleína denominadas de corpos de Lewy (Spillantini *et. al.*, 1997). A causa natural da DP é desconhecida e a degeneração nigroestriatal no mesencéfalo leva ao quadro de déficit motor caracterizado por bradicinesia (lentidão dos movimentos), tremor, rigidez muscular e alterações no equilíbrio. Utiliza-se o termo parkinsonismo para identificar o conjunto de pelo menos dois desses sintomas motores, os quais podem aparecer em outras doenças que não a DP.

São inúmeros fatores que podem induzir o indivíduo a apresentar o parkinsonismo, como o uso de determinadas drogas, exposição a substâncias neurotóxicas (e.g., 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, o MPTP), processos infecciosos ou pós-infecciosos, traumatismos cranioencefálicos, processos expansivos do SNC, processos vasculares e metabólicos, exposição a águas contaminadas, pesticidas, herbicidas, metais, além de agentes químicos industriais. Essas formas recebem a denominação de Parkinsonismo Secundário (Cotran, 1991; Rajput, 1992; Nitrini & Bacheschi, 1997; Merck, 1999; Le Couteur *et. al.*, 1999; Tanner *et. al.*, 1999; Ritz & Yu, 2000).

A hipótese mais provável é que a DP seja uma desordem de caráter multifatorial, cuja etiopatogenia depende da interação entre múltiplos fatores, tais como a idade avançada, fatores genéticos e fatores ambientais (Semchuck *et. al.*, 1991; Seidler *et. al.*, 1996; Chase, 1997; Nussbaum & Polymeropoulos, 1997; Candura *et. al.*, 1998; Gasser, 1998; Langston, 1998; Marder *et. al.*, 1998; Smargiassi *et. al.*, 1998; Veldman *et. al.*, 1998; Di Monte, 2001; Tsai *et. al.*, 2002).

1.2. COMPOSTOS VEGETAIS E NEUROTOXICIDADE.

A rotenona é um pesticida extraído de plantas pertencentes à família das leguminosas (*Leguminosae*), particularmente das espécies *Derris spp* (presente na Malásia, África e América do sul) e *Lonchocarpus spp*, também conhecido como “cubé” (presente nas Américas Central e do Sul) (Lai *et. al.*, 1989; Rahde, 1990; IPCS, 1992; Fang & Cassida, 1997). Especialmente na Amazônia, as plantas das quais se extrai a rotenona são denominadas de timbó. Também se pode extrair rotenona de outros gêneros de plantas, como *Tephrosia*, *Mundulea*, *Milletia* e *Spatholobus* (Teixeira *et. al.*, 1984; Rahde, 1990).

A toxicidade destes extratos vegetais já era conhecida há milhares de anos por tribos indígenas, principalmente da África e da América do Sul, que faziam uso dos mesmos com a finalidade de intoxicar e até mesmo matar animais, como os peixes, visando aumentar o potencial de pesca da tribo (Teixeira *et. al.*, 1984; Saphyr, 1998; Prance, 1999).

Em alguns países a rotenona é amplamente utilizada como pesticida na agricultura, no ambiente doméstico e na horticultura, onde seu uso é comum em culturas de frutas, hortaliças, assim como para o controle de pestes, como larvas de insetos, vermes, traças, besouros, percevejos e outros parasitas vegetais. Na fazenda aplica-se rotenona no gado, para combater parasitas como carrapatos, piolhos, pulgas e larvas de insetos (Amer & Aboul-ela, 1985; Lai *et. al.*, 1989; Rahde, 1990; IPCS, 1992; Fang & Casida, 1999).

Em humanos, a rotenona pode ser utilizada para o tratamento externo de escabiose (IPCS, 1992), e o contato com o pesticida se dá na manipulação de compostos contendo rotenona. No Brasil, a rotenona não é oficialmente comercializada. No entanto existem ainda relatos de seu uso artesanal, segundo dados do Ministério da Agricultura (Brasil, 2010). Ou seja, devido sua ampla utilização, muitas das vezes nós humanos entramos em contato com a rotenona tanto por ingestão, quanto respiração entre outras vias, principalmente pessoas que trabalham próximo a este composto.

Devido às propriedades neurotóxicas descritas por Bertarbet *et. al.* (2000) e Thiruchelvam *et. al.* (2000), onde demonstrou-se o efeito degenerativo deste pesticida sobre a via nigroestriatal de animais experimentais, aumentou desde então

a busca por agentes específicos como possíveis causadores da DP. Betarbet *et. al.* (2000) relataram que a administração crônica da rotenona em ratos, além de degenerar seletivamente neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, induz a presença de inclusões citoplasmática positivas para proteínas ubiquitina e α -sinucleína e comportamentos descritos como hipocinesia e rigidez, reproduzindo então os “sintomas” chaves da DP em humanos, ratificando a neurotoxicidade deste composto vegetal.

1.3. DISTÚRBIOS MITOCONDRIAIS NA DOENÇA DE PARKINSON.

Após a descoberta dos efeitos biológicos do MPTP, ficaram mais evidentes as possíveis contribuições ambientais para o desenvolvimento de distúrbios mitocôndrias, e sua possível relação com a DP. A toxina produz uma síndrome que é similar anatômico e clinicamente à DP (Langston *et. al.*, 1983; Kopin & Markey, 1998). O metabólito ativo do MPTP, o MPP⁺, penetra em neurônios dopaminérgicos com auxílio do transportador de dopamina (DAT) localizado na membrana da célula nervosa (Irwin & Langston, 1985; Gainetdinov *et. al.*, 1997), interferindo com a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, levando à produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) (Cassarino *et. al.*, 1999). A doença de Parkinson não familiar é caracterizada pela diminuição de 15- 30% da atividade do complexo I mitocondrial (Schapira, 1994).

A rotenona tem mecanismo de ação semelhante ao MPTP, que envolve a inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, resultando em deficiência na transferência de elétrons (Sestilli *et. al.*, 1999; Suzuki *et. al.*, 1999; Betarbet *et. al.*, 2000; Chauvin *et. al.*, 2001). No entanto, por ser extremamente hidrofóbico, ao contrário do MPTP, este pesticida não precisa de transportador de dopamina para entrar em neurônios dopaminérgicos.

Tanto a lesão mitocondrial como a inibição do complexo I mitocondrial podem conduzir as células para a neurodegeneração, através da morte celular programada, que tem sido sugerido como um mecanismo primário na DP (Jenner & Olanow, 1998). A principal dificuldade com o modelo de DP induzido por MPTP é que o ritmo de progressão da lesão resultante é agudo ou subagudo, enquanto que a DP é um processo progressivo lento (Beal, 2001; Shimohama *et. al.*, 2003). Em

modelos *in vivo*. Quando se compara os resultados obtidos com a utilização de rotenona e MPTP, têm-se observado que o primeiro composto gera degeneração que se assemelha mais à patogenia da DP, principalmente pela aparição dos corpos de Lewy, que não são observados com o modelo do MPTP (Betarbet *et. al.*, 2000; Sherer *et. al.*, 2003).

Ao bloquear o complexo I, a rotenona induz permeabilidade transitória na membrana mitocondrial externa (Greenamyre *et. al.*, 1999; Chauvin *et. al.*, 2001). Com a permeabilidade, há dispersão de fatores mitocondriais pró-apoptóticos, como o citocromo C, o fator indutor de apoptose e as proteínas smac/diablo. Estes fatores por diferentes mecanismos induzem a morte celular programada (Liu *et. al.*, 1996; Du *et. al.*, 2000; Verhagen *et. al.*, 2000; Chauvin *et. al.*, 2001; Li *et. al.*, 2002). A disfunção do complexo I também aumentaria a produção de espécies reativas de oxigênio. O conjunto dessas alterações poderia induzir ao acúmulo de danos ao DNA, quer seja por ação direta no DNA e/ou devido ao mau funcionamento de mecanismos reparadores. Lima *et. al.* (2005) introduziram o teste do cometa na avaliação genotóxica da rotenona e demonstraram alto grau de dano ao DNA em linfócitos humanos expostos ao agente.

A toxicidade seletiva da rotenona para neurônios dopaminérgicos está atribuída à inibição da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial destas células, o que outorga tornarem mais vulneráveis aos danos do estresse oxidativo (Greenamyre *et. al.*, 1999; Jenner, 2001).

1.4. TESTE DE AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

O teste do cometa (também conhecido como ensaio cometa, teste em eletroforese de células individualizadas, em inglês *comet assay*), vem sendo utilizado há algum tempo para o biomonitoramento e a identificação de agentes genotóxicos, sendo descrito primeiramente por Ostling and Johanson (1984) e posteriormente modificado por Singh *et. al.* (1988). O teste do cometa é capaz de detectar baixos níveis de danos no DNA. Por ser de baixo custo, de aplicação viável e realizado em curto período, este teste já é classificado como vantajoso em relação a testes citogenéticos tradicionais (Kassie *et. al.*, 2000). O teste consiste em lisar as

células alvo da análise e submetê-las à eletroforese alcalina, sendo o DNA danificado atraído em direção ao ânodo, o que resulta, após coloração do nucleóide, a aparência de ter uma cauda, que classifica o cometa para aquela célula com DNA danificado. Ou em um nucleóide sem “cauda” identificando células com baixo dano celular. Diferentes parâmetros podem ser utilizados para a análise dos danos, sendo a medida do comprimento da cauda do cometa o mais empregado (Sing *et. al.*, 1988; De Boeck *et. al.*, 2000; Tice *et. al.*, 2000).

O teste do cometa foi utilizado no estudo de Lima *et. al.* (2005) para avaliação da ação genotóxica da rotenona em cultura de linfócitos humanos. Em nosso trabalho estudou-se os efeitos genotóxicos da rotenona sobre populações celulares provenientes do mesencéfalo, região encefálica onde se encontra a substância negra. Torna-se interessante, assim, a utilização do teste no estudo de populações celulares expostas a agentes indutores de parkinsonismo experimental, a fim de verificar se ocorre lesão a nível genômico neste modelo, mesmo que em baixos níveis de exposição.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as ações genotóxico *in vitro* da rotenona em culturas mistas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever efeitos citotóxicos decorrentes da exposição de rotenona a diferentes concentrações, em culturas mistas do mesencéfalo ventral de ratos.
- Avaliar, nestas culturas, a influência do tempo de exposição sobre os efeitos neurotóxicos da rotenona.
- Utilizar o teste do cometa a fim de descrever o potencial genotóxico da rotenona em culturas mistas do mesencéfalo ventral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Utilizamos ratos neonatos de linhagem Wistar com até quatro dias de idade, entre PND2 e PND4, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas no guia Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação, da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Os procedimentos experimentais aqui descritos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

3.2. MEIO DE CULTURA.

A solução que mantém nutricionalmente, entre outras propriedades homeostáticas a cultura celular chama-se meio de cultura, cuja constituição: DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS – do inglês *fetal bovine serum*), 10 % de soro de cavalo (HS – do inglês *horse serum*), 1% de glutamato, 10.000 unidades/mL de penicilina, 10.000 unidades/ml de estreptomicina, 3,5 gm de D-(+) Glicose e 3,7 gm bicarbonato de sódio. Quantidade referente 1L de meio.

Meio de cultura para tratamento: este utilizado para receber a diluição da rotenona, foi suplementado com 2% de FBS, 2% de HSA, com as mesmas quantidades de antibióticos descritos acima (Gao *et. al.*, 2002). A rotenona, por ser lipofílica, foi preparada a partir da diluição da droga em dimetilsulfóxido (DMSO).

3.3. CULTURA PRIMÁRIA: MISTA NEURÔNIO/GLIA

Os animais utilizados nos experimentos foram anestesiados e sacrificados por decaptação abrupta, realizada fora da cabine de fluxo laminar sobre uma placa de petri contendo etanol 70%. Após a decaptação, foi realizada a remoção do encéfalo, feita dentro da cabine de fluxo laminar, sobre uma placa de petri com meio

de dissecação estéril e gelado. Os encéfalos foram manipulados em uma outra placa com meio de dissecação novo, para minimizar os riscos de contaminação. O mesencéfalo ventral, livre de meninge, foi removido em meio de dissecação estéril (Smeyne & Smeyne, 2002; Figura 01).

A região dissecada para poços de culturas foi escolhida de acordo com Smeyne *et. al.* (2002), onde os cortes específicos no encéfalos possibilitou a microdissecação de neurônios do mesencéfalo ventral, região afetada na neurodegeneração de indivíduos com DP (Figura 01). Posteriormente, estas células foram mantidas em cultura e expostas a dois tempos de tratamento em diferentes concentrações de rotenona: 24 e 48 horas; completado isto, as células foram submetidas as etapas para a análise de danos genotóxicos através do teste do cometa.

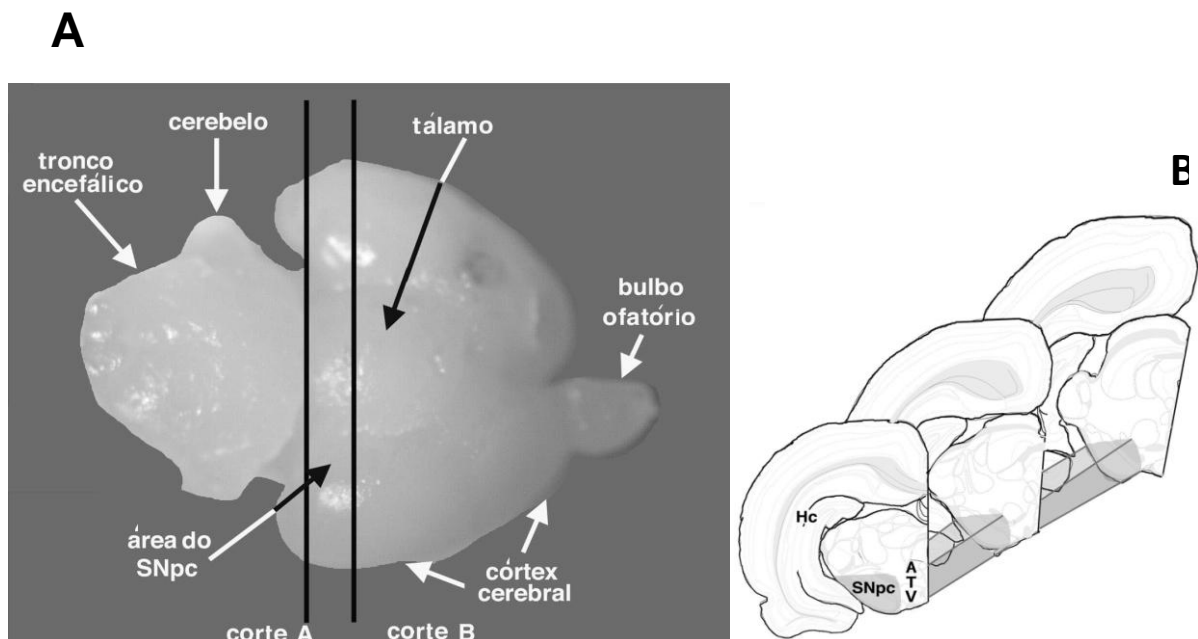


Figura 1 - Foto do encéfalo de rato com ilustração da região dos cortes para a dissecação do mesencéfalo ventral. Em "A", encéfalo dissecado preparado para receber dois cortes específicos: o corte A remove a parte posterior da região do cérebro, incluindo o tronco encefálico e o cerebelo; o corte B remove estruturas do prosencéfalo, como o tálamo, o bulbo olfatório e outras estruturas não visível na superfície ventral, como o estriado e hipocampo. Em "B", há representação esquemática em cinza da região de interesse. A substância negra pars compacta (SNpc) está na microdissecação do mesencéfalo ventral para cultivo celular. Localiza-se ao lado da área tegmentar ventral (ATV); Hipocampo (Hc). Extraído de Smeyne & Smeyne (2002).

As populações neuronais do mesencéfalo ventral, isoladas, foram incubadas por 8 minutos a 37°C em solução de tripsina-EDTA a 0,05% (Invitrogen) em solução livre de cálcio e magnésio (CMF – do inglês *calcium magnesium free*) para digestão enzimática, e depois foram transferidas para tubo eppendorf contendo 1,5 ml de meio de cultura DMEM (Invitrogen).

O tecido foi tripsinizado e triturado mecanicamente de maneira suave com o auxílio de pipeta Pasteur. O processo de trituração foi repetido com outra pipeta Pasteur flambada até metade de seu diâmetro da ponta original. As populações neuronais contida no sobrenadante foram semeadas em placas de cultura de 24 poços, volume do poço 3,29ml , diâmetro de 15,4mm.

A contagem das células semeadas ocorreu na câmara de Neubauer, utilizando protocolo de azul tripan. Foram semeadas aproximadamente 5×10^5 células/poço em 2 ml de meio em placas de cultura multipoços cobertas com poli-L-lisina e mantidas em incubadora com 5% CO₂ em atmosfera umidificada a 37°C (Costa *et. al.*, 2000; Gao *et. al.*, 2002). Após quatro dias, as culturas foram analisadas para a adição de 1 ml de meio de cultura.

Para o tratamento com rotenona, as culturas foram mantidas em meio DMEM suplementado com 2 % de FBS, 2 % HS, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, entre outros compostos já descritos (Gao *et. al.*, 2002).

3.4. TRATAMENTO COM ROTENONA

O tratamento com a rotenona foi realizado a partir do sétimo dia de cultura. A solução de rotenona foi preparada e diluída em DMSO (dimetilsulfóxido), com concentrações finais de 5, 10, 20 e 30 nM, escolhidas segundo experimentos *in vitro* já descritos na literatura com a utilização de preparações similares (Gao *et. al.*, 2002; Sherer *et. al.*, 2002), sendo as culturas expostas por 24 ou 48 horas.

Após setes dias de cultura, a rotenona diluída em DMSO foi misturada ao meio de cultura para tratamento. Então retirou-se o meio anterior para acrescentar 1 ml de meio para tratamento com rotenona. Em poços controle adicionou-se apenas meio de cultura sem rotenona. Como controle positivo (controle +), criado para ratificar a detecção de quebras no DNA pelo teste do cometa, alguns poços foram

tratados com doxorubicina ($C_{27}H_{29}NO_{11}$) na concentração de $1\mu M$, diluído $11,5\mu L$ por ml de meio de cultura.

3.5. TESTE DO COMETA

O teste do cometa foi realizado conforme o modelo proposto por Sing *et. al.* (1988), que primeiramente utilizaram a técnica, e Lima *et. al.* (2005) que realizaram o teste em cultura de linfócitos exposto a rotenona. No entanto algumas adaptações foram necessárias para o sucesso dos experimentos.

3.5.1. SOLUÇÕES UTILIZADAS:

- Solução de PBS 10x (livre de Ca^{++} e Mg^{++}): NaCl (2,5 M – 8 g), $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ – 21,07 g), KH_2PO_4 (6 g). Todos os reagentes foram misturados em água destilada completado até 1 litro;
- Solução de lise: NaCl (146,1 g), EDTA (100 mM – 37,2 g), TRIS (100 mM 1,2 g), 1000 ml de água destilada; esta é a solução de estoque. Para o preparo da solução de uso (que deve ser feita na hora do uso e estar em $4^\circ C$), adiciona-se 89 ml da solução estoque com Triton x-100 (1ml) e DMSO (10ml).
- Solução de eletroforese: solução A - EDTA (14,89 g) e água destilada (200 ml); Solução B: NaOH (40 g) e água destilada (100 ml). A solução de uso na eletroforese consiste da mistura de 5 ml da solução “A” e 30 ml da solução “B”, quantidade suficiente para fazer 1 litro.
- Solução de coloração (solução estoque): brometo de etídio (10 mg) e água destilada (50 ml). Diluição para uso 1:10.
- Agarose ponto de fusão normal (NMP) – 1,5 g (Invitrogen); PBS 1x (livre de Ca^{++} e Mg^{++}) – 100 ml. A agarose ponto de fusão normal foi diluída no calor de 2 a 3 vezes no microondas, não a deixando ferver.
- Agarose de baixo ponto de fusão (LMP, sigla em inglês low-melting point agarose) foi diluída seguindo a regra: agarose LMP – 0,5 g; PBS (livre de Ca^{++} e Mg^{++}) – 100 ml – logo após aquecida, sem deixar ferver, até chegar a $37^\circ C$ e mantidas em banho-maria.

3.5.2. PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS PARA ELETROFORESE:

As lâminas utilizadas para receber as células das culturas de mesencéfalo ventral apresentam, em um dos lados, parte da superfície fosca. Esta característica foi importante para a adesão da primeira camada de agarose normal (1,5%). As lâminas foram mergulhadas uma a uma em gel de agarose normal que estava em banho-maria (60°C). Os excessos de agarose foram limpos com toalha de papel, e as lâminas permaneceram em temperatura ambiente e em posição horizontal, até secarem.

3.5.3. COLETA DAS CÉLULAS, LISE, ELETROFORESE E COLORAÇÃO

As células da cultura foram gentilmente raspadas do fundo dos poços e isoladas em tubos, 20 µl do material raspado foi misturado e resuspenso em 80 µl da agarose LMP a 37° C. A mistura foi então colocada cuidadosamente em uma lâmina revestida com agarose normal, posteriormente coberta por lamínula 24 x 60 mm e levada à geladeira por 5 minutos. Após retirada cuidadosa da lamínula, a lâmina foi mergulhada verticalmente em solução de lise recém-preparada e armazenada de um a sete dias na geladeira, protegida da luz (Figura 02).

Em ambiente com baixa luminosidade e gelado, as lâminas foram retiradas da solução de lise e colocadas na cuba de eletroforese, em posição horizontal. A solução tampão de eletroforese a 4°C foi colocada até cobrir as lâminas. O material “descansou” por 20 minutos e em seguida a eletroforese foi realizada durante 20 minutos a 34 V e 300 mA. O valor da voltagem obedeceu ao padrão de 0.8 V/cm da distância entre os eletrodos (Giovannelli *et. al.* 2003).

Passado o tempo da eletroforese, as lâminas foram lavadas e imersas em água destilada durante cinco minutos, com o intuito de neutralizar o material biológico. Após secagem em temperatura ambiente, foram fixadas em etanol 100% por 3 minutos.

Para análise dos cometas corou-se as lâminas com 50 µl de brometo de etídio, cobrindo-se a lâmina cuidadosamente com lamínula. A leitura foi feita imediatamente após a coloração em microscópio de fluorescência (Axiopot Carl Zeiss) com filtro de 516-550 nm, barreira de filtro de 590 nm e aumento total de 400x.

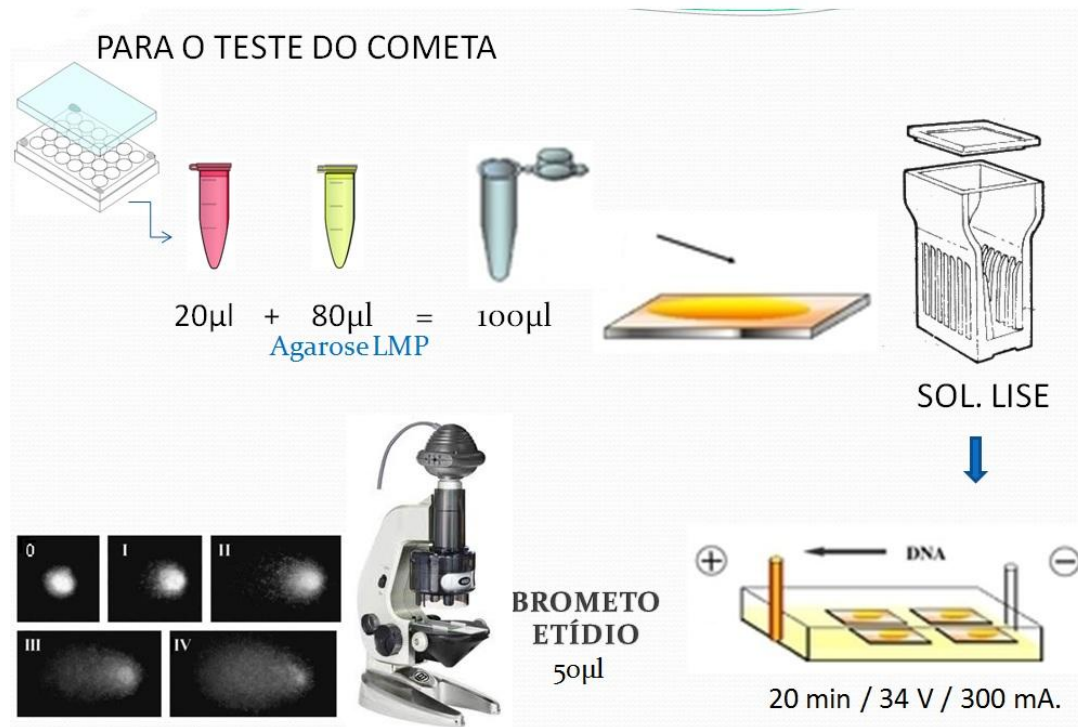


Figura 02 – Etapas do método de análise de danos com o teste do cometa.

3.5.4. AVALIAÇÃO DOS COMETAS

As 33 lâminas com o material biológico e submetidas à eletroforese foram analisadas em microscópio de fluorescência (aumento de 400x) no Laboratório de Citogenética da UFPA (ANEXO). Este equipamento possibilitou a visualização do material genético, corado com brometo de etídio, onde o fenótipo nuclear era passivo de classificação

Várias são as metodologias empregadas para avaliar a extensão do dano ocasionado ao DNA. A medida aqui utilizada na avaliação deste dano foi feita pela relação entre o raio do núcleo e a extensão das caudas formadas pelo DNA em migração. Esta análise tanto pode ser feita visualmente como através de softwares especiais (Ferraro *et. al.*, 2004). A classificação dos cometas obedeceram cinco tipos diferentes de classes, sendo a classe “zero” aquele que pode permitir visualização de estrutura com centro circular (sem dano no DNA) e as demais classes avaliados a partir da visualização da estrutura genômica com “cauda” semelhante a de um de “cometa” (com dano no DNA).

O tamanho da cauda significa a distância de migração da fita de DNA danificado, logo quanto maior a cauda maior o número de danos. Isto possibilitou a classificação nas cinco categorias, ou classes (0-4) que obtiveram base comparativa com os trabalhos de Singh *et. al.* (1988), Lima *et. al.* (2005) e Machado da Rocha *et. al.*(2009). De acordo com os mesmos, as quantidades de danos no DNA seguem a seguinte classificação (Figura 3):

- Classe 0: sem danos (<5%).
- Classe 1: baixo nível de danos (5-20%).
- Classe 2: médio nível de danos (20-40%).
- Classe 3: alto nível de danos (40-95%).
- Classe 4: dano total (>95%).

A partir da classificação dos 50 nucleóides por lâmina, organizado em suas respectivas classes de dano, foi gerado um coeficiente denominado índice de dano (ID) o qual define o escore total da lâmina. As classes dos cometas foram classificadas segundo o comprimento da cauda dos nucleóides. Para a análise estatística foram atribuídos valores numéricos (ranques) de 0 a 4 para cada uma das classes, respectivamente. As células foram ranqueadas visualmente, de acordo com a intensidade relativa de fluorescência do DNA na cauda (de 0 = incólumes, sem DNA na cauda; a 4 = maximamente danificadas, mais de 80% de DNA na cauda). O escore total para 50 células (entre 0 e 200) foi obtido multiplicando o número de nucleóides de cada classe pelo ranque da classe de dano. Assim, o índice de dano (ID) foi indicado usando a seguinte fórmula:

$$ID = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4),$$

onde n = número de células em cada classe analisada (Collins *et. al.*, 1995; Silva *et. al.*, 2000; Collins *et. al.*, 2001, Machado da Rocha *et. al.*, 2009).

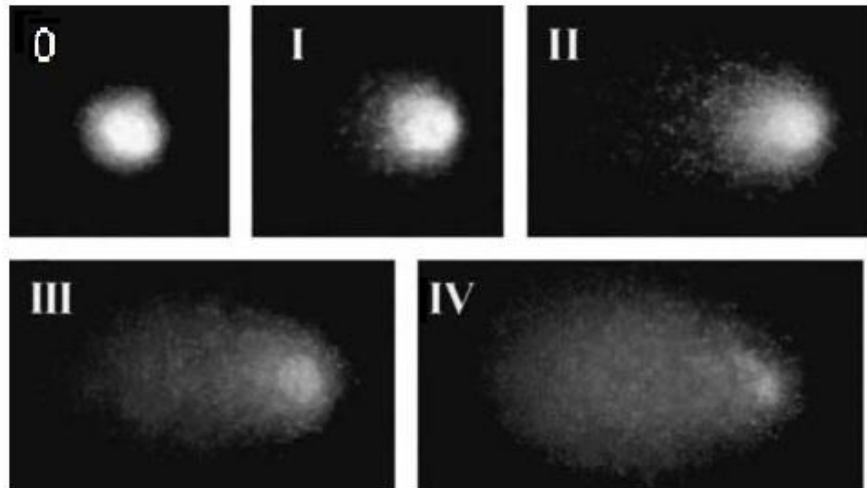


Figura 3 – Imagens de neurônios corados com brometo de etídio exibindo diferentes graus de danos no DNA após migração em eletroforese. Cada imagem representa uma classe de dano como indicado em cada quadrante. A classe do cometa aumenta conforme o aumento do dano no DNA (classe 0; classe I, classe II, classe III e classe IV). Extraído de Giovannelli *et. al.* 2002.

3.6. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de proliferação e viabilidade celular são de extrema importância e já fazem parte de diversas aplicações de rotina em biologia celular. Os sais de tetrazólio (*e.g.*, MTT, XTT, NBT) são particularmente úteis neste tipo de análise. Estes sais são clivados até compostos de formazan por enzimas desidrogenases, que pertencem à cadeia respiratória da mitocôndria, e estão ativas apenas em células metabolicamente intactas. A figura abaixo ilustra um exemplo deste tipo de reação:

O ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) foi utilizado neste trabalho como uma ferramenta para a determinação quantitativa de efeitos antiproliferativos ou citotóxicos mediados pela rotenona. O método é baseado na clivagem, por células, do sal de tetrazólio MTT agindo sobre coloração amarelada em formazan, de coloração azul escura ou púrpura, por células

metabolicamente

ativas.

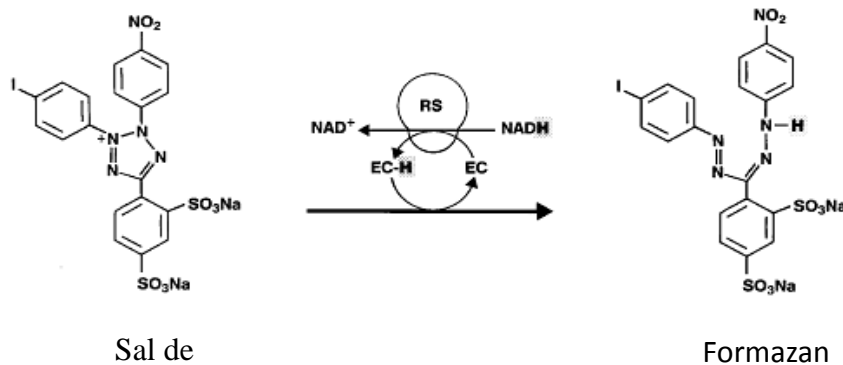


Figura 4 - Representação esquemática da reação ocorrida para a análise de viabilidade celular através do ensaio colorimétrico de MTT, onde o sal de tetrazolium sofre reações na cadeia respiratória mitocondrial e converte-se ao formazan.

O sal de tetrazólio estava diluído em PBS em concentração de 5 mg/ml. Na placa de cultura, cada poço recebeu 50 μ l desta solução, posteriormente incubada por 3 horas em condições normais de cultura. Para a análise colorimétrica, os cristais de formazan do MTT foram solubilizados em isopropanol e quantificados em espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 570 nm.

Um aumento no número de células vivas resulta em aumento da atividade metabólica total, o que leva a formação de cor mais forte. Utilizando-se a absorbância média do controle negativo como 100%, foi calculada a porcentagem de viabilidade de todas as amostras testes usando-se a absorbância média de cada amostra (Mosmann, 1983). Para observar o índice de danos em culturas é necessário que a viabilidade celular deve estar igual ou superior a 75%.

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão descritos em média \pm DP (desvio padrão médio). A análise estatística foi feita no programa Biostat 5.0 (Ayres 2007) e Microsoft Excel versão 2007. Os dados coletados apresentaram distribuição normal, possibilitando a análise paramétrica da amostra. As médias dos resultados foram comparadas através da análise de variância (ANOVA) de um critério seguida de teste de Tukey pra averiguar a magnitude das diferenças, considerando-se $p < 0,05$ para que os resultados fossem considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. VIABILIDADE CELULAR APÓS EXPOSIÇÃO À ROTENONA

O percentual de viabilidade celular em culturas mistas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos da linhagem Wistar foi avaliado através do ensaio do MTT após exposição a quatro concentrações de rotenona durante 24 ou 48h. A viabilidade celular após 24h de exposição foi significativamente menor nas concentrações de 10, 20 e 30 nM, em comparação com o grupo controle. Após 48h de exposição, a viabilidade celular foi significativamente menor em todas as concentrações utilizadas (Figura 5).

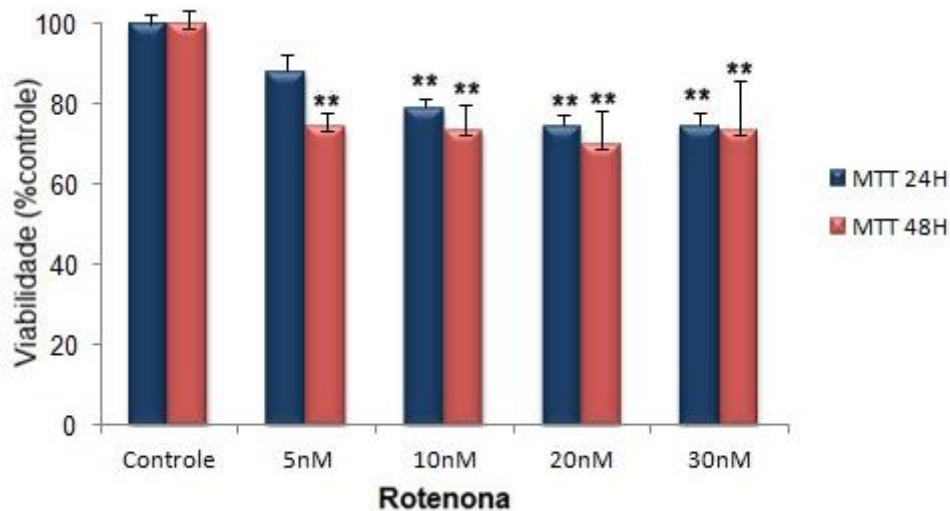


Figura 5 - Análise da viabilidade celular de culturas mistas de mesencéfalo ventral de ratos Wistar neonatos, expostos à rotenona em concentrações de 5, 10, 20 e 30 nM por 24 ou 48 horas. Os resultados foram expressos em valores de média de três repetições (triplicata) e desvio padrão dos percentuais de viabilidade em relação à encontrada no grupo controle correspondente. Utilizou-se ANOVA de um critério e teste de Tukey. (**) $p < 0,05$ comparados aos poços de cultura do grupo controle.

O resumo dos dados de viabilidade celular está na tabela 1, onde estão os valores da porcentagem de viabilidade celular \pm desvio padrão, de acordo com as concentrações expostas às culturas celulares nas duas durações analisadas.

Tabela 1 - Percentual de viabilidade celular, analisada através do teste colorimétrico de MTT, das culturas de mesencéfalo ventral dos grupos expostos à rotenona em concentrações nanomolares (nM) de rotenona por 24 ou 48 horas. Resultados expressos a partir do percentual em relação ao grupo controle, média \pm desvio padrão.

	5nM	10nM	20nM	30nM
24 horas	88.2% \pm 4.3	79.1 % \pm 2.3	74.6 % \pm 2.6	74.5 % \pm 3.3
48 horas	74.4 % \pm 3.4	73.5 % \pm 6.5	69.9 % \pm 8.3	73.2 % \pm 12.6

4.2. ANÁLISE DOS DANOS AO DNA ATRAVÉS DO TESTE DO COMETA

Com os dados de viabilidade após exposição das culturas à rotenona, analisou-se, nas mesmas concentrações previamente testadas, os danos causados no DNA, através do teste do cometa.

Cinquenta nucleóides por lâmina foram avaliados, totalizando 1.650 nucleóides. Esse registro gerou um índice de dano, para a quantificação do grau de DNA fragmentado (Figura 6). Os índices de danos, os quais apresentaram amostra com distribuição normal, foram estatisticamente submetidos à análise de variância um critério (ANOVA, seguido de teste Tukey).

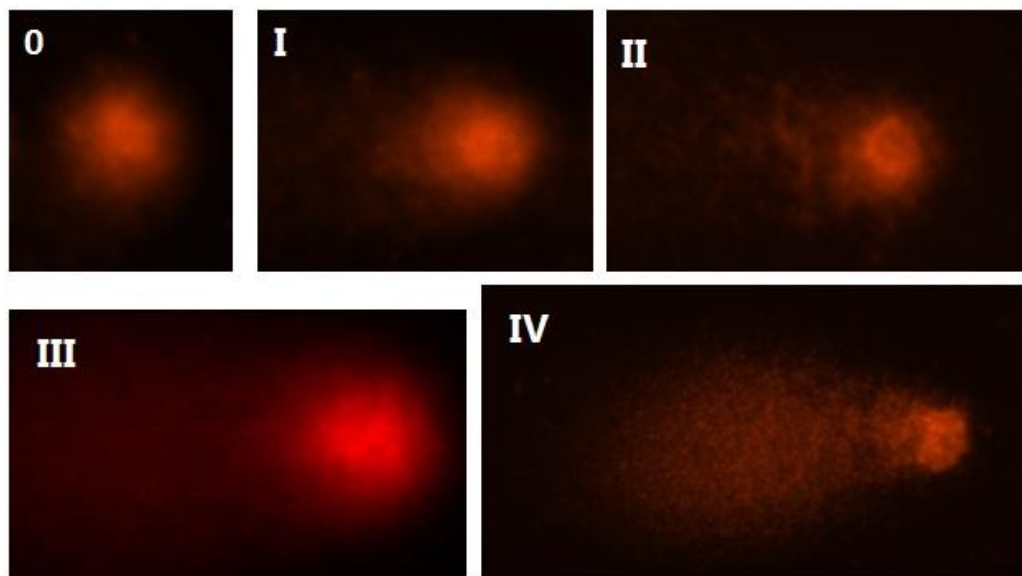


Figura 6 - Imagens dos nucleóides extraídos das culturas de mesencéfalo ventral corados com brometo de etídio após correr eletroforese. Cada quadrante tem representantes das classes observadas (classe 0, classe I, classe II, classe III e classe IV).

Tabela 02 - Número de nucleóides analisados, através do teste do cometa, das culturas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos dos grupos controle e tratados com rotenona (5nM, 10nM, 20nM e 30nM) em 24 horas.

24 Horas	Número de Células		Classes / 150 células					Índice de Dano
	Analisadas	Alteradas	0	1	2	3	4	
C1	50	17	33	1	3	11	2	48
C2	50	14	36	9	4	0	1	21
C3	50	19	31	13	5	0	1	27
5nM1	50	26	24	11	7	4	4	53
5nM2	50	32	18	13	10	4	5	65
5nM3	50	34	16	15	8	7	4	68
10nM1	50	25	25	4	9	7	5	63
10nM2	50	31	19	7	4	7	13	88
10nM3	50	35	15	11	13	5	6	76
20nM1	50	43	20	11	4	3	12	76
20nM2	50	42	27	3	4	5	11	70
20nM3	50	40	19	13	7	5	6	66
30nM1	50	33	17	19	3	3	8	66
30nM2	50	27	23	6	10	4	7	66
30nM3	50	40	10	15	13	11	1	78
Cont + 1	50	37	13	7	18	8	4	87
Cont + 2	50	34	16	13	10	6	5	76
Cont +3	50	38	12	20	6	3	9	86

Triplicata dos experimentos de 24 horas: Poços de cultura de mesencéfalo ventral do grupo controle C e poços de cultura de mesencéfalo ventral exposto à Rotenona em dosagens 5 nano molar (nM), 10nM, 20nM e 30nM. Controle positivo, Cont+, poços tratados com 11,5 µL de doxorubicina.

Em todas as concentrações de rotenona testadas, o índice de dano ao DNA foi significativamente maior do que o índice obtido para o grupo controle tanto na duração de 24h (Figura 7) como de 48h (Figura 8).

Valores das contagens dos índices de danos estão distribuídos nas tabelas 02 e 03.

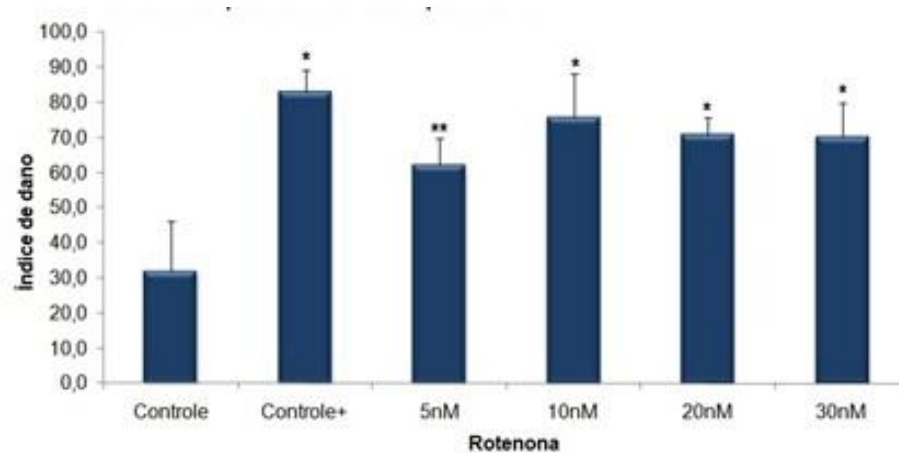


Figura 7 - Média dos índices de dano ao DNA avaliados pelo teste dos cometas realizados em células de mesencéfalo ventral de ratos Wistar neonatos, após exposição à 5, 10, 20 e 30 nM de rotenona por 24 horas. Controle positivo (Controle +) representam células expostas a 11,5 µL de doxorrubicina por 24 horas. Apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle todas as concentrações testadas, além do controle + (valores de triplicata). Não houve diferença significativa quando comparou-se as médias dos índices de danos entre as concentrações testadas. Dados de acordo com análise de variância um critério (ANOVA, teste Tukey.), * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

Tabela 03 - Número de nucleóides analisados, através do teste do cometa, das culturas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos dos grupos controle e tratados com rotenona (5nM, 10nM, 20nM e 30nM) em 48 horas.

48 Horas	Número de Células		Classes / 150 células					Índice de Dano
	Analisadas	Alteradas	0	1	2	3	4	
C1	50	22	28	13	6	3	0	34
C2	50	16	34	8	7	1	0	25
C3	50	18	32	8	6	3	1	33
5nM1	50	34	16	13	17	0	4	63
5nM2	50	32	18	7	16	11	2	80
5nM3	50	33	17	11	8	9	5	74
10nM1	50	38	12	12	9	11	6	87
10nM2	50	35	15	7	11	8	9	89
10nM3	50	33	17	6	14	10	3	76
20nM1	50	43	7	8	13	10	12	112
20nM2	50	42	8	5	23	6	8	101
20nM3	50	40	10	15	12	7	6	84
30nM1	50	37	13	11	7	9	10	92
30nM2	50	38	12	12	6	11	9	93
30nM3	50	41	9	13	7	14	7	97

Triplicata dos experimentos de 48 horas: Poços de cultura de mesencéfalo ventral do grupo controle C e poços de cultura de mesencéfalo ventral tratado com Rotenona em dosagens 5 nano molar (nM), 10nM, 20nM e 30nM.

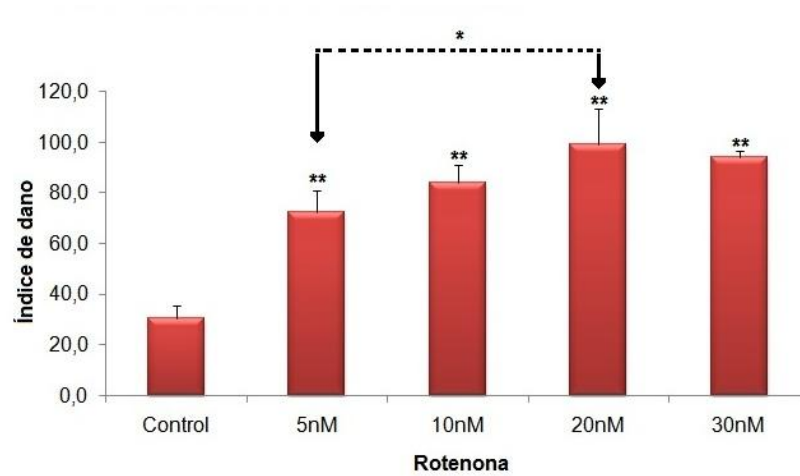


Figura 08 - Média dos índices de danos do teste do cometa realizado em células de mesencéfalo ventral de ratos Wistar neonato, do grupo controle e dos grupos expostos à 5, 10, 20 e 30 nM de rotenona por 48 horas. Apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle todas as concentrações testadas (valores de triplicatas). Entre as concentrações, somente há diferença significativa quando comparado as médias dos índices de danos entre 5nM e 20nM. Dados de acordo com análise de variância um critério (ANOVA , teste Tukey.), * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$.

A análise comparativa entre os tempos de exposição de 24 e 48h para as mesmas concentrações de rotenona, demonstrou haver diferença significativa apenas para os grupos expostos a 20 e 30 nM (Figura 8). Ou seja, 48 horas de exposição a 20 ou 30 nM de rotenona aumenta significativamente o índice de dano em relação à exposição para as mesmas concentrações por 24 horas (ANOVA, Tukey $p < 0,05$).

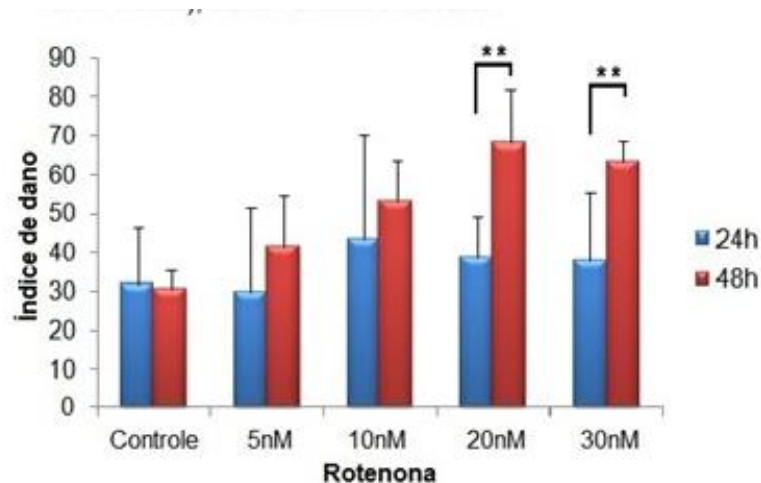


Figura 9 – Comparação dos índices de dano ao DNA de acordo com o tempo de exposição. Cada concentração testada obteve a subtração do valor do índice de dano de seu respectivo grupo controle, a fim de visualizar a média do índice de dano causado pela exposição ao agente genotóxico, uma vez que os danos basais causados pela técnica e pelo metabolismo *in vitro* do ciclo celular foram registrados pelos grupos controles. Foi significativamente diferente o índice de dano entre os períodos de exposição analisados nos poços de cultura com concentração de 20 e 30 nM de rotenona (** $p < 0,05$), de acordo com análise de variância (ANOVA, teste Tukey); valores de experimento em triplicata.

5. DISCUSSÃO

Os mecanismos patogênicos da doença de Parkinson não são completamente compreendidos, porém o estresse oxidativo parece ser um dos principais mecanismos envolvidos no processo degenerativo desta doença.

O estresse oxidativo descreve uma condição na qual as defesas antioxidantes celulares são insuficientes para manter os níveis de EROs abaixo de um limiar tóxico (Lotharius e Brundin, 2002; Jenner, 2003). A alta taxa metabólica dos neurônios já implica numa produção basal elevada de EROs, e soma-se a isso o caso específico de neurônios dopaminérgicos cujo metabolismo oxidativo da dopamina é citotóxico devido à produção de radicais livres. Os neurônios da substância negra, portanto, são particularmente propensos ao estresse oxidativo, que associado à deficiência parcial no complexo I mitocondrial da via nigroestriatal, têm sido sugeridos como os principais contribuintes para a perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson (Lotharius e Brundin, 2002; Jenner 2003).

No presente trabalho utilizou-se a exposição de culturas mistas de mesencéfalo ventral à rotenona, um conhecido inibidor do complexo I mitocondrial. O teste colorimétrico de MTT foi utilizado para análise de viabilidade celular das culturas após exposição a 5, 10, 20 e 30 nM de rotenona por 24 ou 48h. O dano ao DNA foi avaliado nas mesmas condições de intoxicação através do teste do cometa.

Pela análise da viabilidade celular com o ensaio do MTT, das concentrações e durações testadas, apenas a condição de 5 nM por 24 h não apresentou diferença significativa em relação ao seu grupo controle. Por outro lado, mesmo nesta condição, a menor concentração e duração empregadas neste trabalho, já houve dano no DNA significativamente aumentado em relação à condição controle. No ensaio do MTT em todas as condições, assim como no teste do cometa nas condições de 24h, não houve uma relação clara entre concentração de rotenona e efeito. Para 48 horas de exposição à rotenona, o aumento no índice de dano ao DNA causado pelo aumento da concentração, foi significativo entre 5 nM e 20 nM, mostrando um efeito dependente de concentração. Na comparação entre os dois tempos testados, as maiores concentrações testadas, 20 e 30 nM apresentaram aumento significativo no índice de dano no DNA dependente do tempo, sendo maior com o maior tempo de exposição. Estes resultados como um todo podem ser explicados pela faixa de concentrações de rotenona, relativamente baixas, utilizadas no presente trabalho. Os resultados também indicam que, na faixa de concentrações testadas, mesmo não tendo havido uma diminuição na viabilidade celular dependente do aumento na concentração de rotenona, o teste do cometa foi capaz de detectar aumentos nos danos no DNA, sugerindo que tais alterações possam ocorrer de forma silenciosa, sem necessariamente afetar o funcionamento celular na mesma proporção.

Gao *et. al.* (2002) não observaram nenhuma diminuição estatisticamente significativa de neurônios dopaminérgicos, também cultivados em culturas mistas de mesencéfalo, tratados com até 10 nM de rotenona por 48h. O efeito neurotóxico somente foi observado a partir de concentrações de 20 e 25 nM (Gao *et. al.*, 2002). Além disso, neurônios não dopaminérgicos são até mais resistentes, não ocorrendo diminuição significativa mesmo após 8 dias de exposição a 20 nM de rotenona (Gao *et. al.*, 2002).

Para o tipo de cultura utilizada em nossos ensaios, culturas mistas de mesencéfalo ventral de ratos neonatos, tem sido descrita uma composição de 12% microglia, 48% de astrócitos e 40% de neurônios dos quais 2,8–3,8% são neurônios catecolaminérgicos imunorreativos para a enzima tirosina-hidroxilase (Gao *et. al.*, 2002). Como no presente trabalho não foi feita a avaliação sobre o percentual representado por cada tipo celular presente nas culturas, não é possível afirmar se os efeitos observados atingiram de forma preponderante a população neuronal ou glial. Sabe-se, entretanto, que neste tipo de cultura mista, as micróglia são cruciais para o efeito neurotóxico da rotenona (Gao *et. al.*, 2002, Gao *et. al.*, 2003), as quais tornam-se ativadas e são as principais responsáveis pela geração de EROs. Portanto, é possível que nos nossos ensaios o tratamento com rotenona também tenha provocado o aumento do estresse oxidativo e que este tenha sido a causa da diminuição da viabilidade celular e do dano ao DNA observados.

O teste do cometa, através da contagem dos escores observados nas lâminas, permitiu calcular o índice de danos das células cultivadas. O tamanho da “cauda” do cometa, o qual determina o escore do cometa é diretamente proporcional ao número de danos na molécula de DNA, tanto dano proveniente da quebra de fita simples quanto quebra de fita dupla, além de detectar sítio álcali-lábeis e reparações incompletas da macromolécula (Tice *et. al.* 2000). Neste nosso estudo, índices de danos foram identificados com exposição da rotenona às culturas. Estas quebras, em nosso modelo experimental da doença de Parkinson, pode ter origem a partir do estresse oxidativo sofrido com exposição ao pesticida.

Diversas condições pró-oxidantes têm sido demonstradas no tecido do mesencéfalo de pacientes com DP, incluindo aumento dos níveis de ferro e diminuição dos níveis de glutathione redutase, o que pode provocar o aparecimento crescente de produtos oxidativos de lipídios, de proteínas e do DNA (Sian *et. al.* 1994). A exposição a toxinas ambientais que induzam disfunção mitocondrial e estresse oxidativo seria um fator ambiental a mais a agir sobre indivíduos geneticamente suscetíveis, assim contribuindo para iniciar uma cadeia de eventos deletérios que culminem com o desenvolvimento da doença.

O teste do cometa vem sendo demonstrado por diversos autores possuir alto grau de sensibilidade na detecção de quebras de DNA, tanto quebras duplas quanto quebra simples (Lima *et. al.* 2005, Giovannelli *et. al.* 2002 e 2003). As

quebras da molécula de DNA são detectáveis pelo mecanismo de reparo do ciclo celular, que pode reajustar possíveis quebras e danos na cadeia, tornando a célula viável para sua função. Certamente, com danos e quebras de quantidade elevada, torna inviável o reparo celular e a célula entra em morte programada. Ainda são poucas as informações sobre o grau de danos que o DNA das células de culturas mista de mesencéfalo ventral necessita para a ativação da sinalização de reparo ou morte celular programada. Portanto, não sabemos se o dano ao DNA observado em nossos ensaios levaria fatalmente à morte celular, ou se mecanismos de reparo poderiam ter resgatado às células desse destino, tivesse sido dado o tempo necessário para tal.

De qualquer maneira, a execução dos ensaios e os dados obtidos geraram experiência na compreensão e interpretação desta técnica, bem como adaptações para otimizar o teste para culturas primárias neuronais. Então devemos aprofundar os conhecimentos a respeito do limiar entre o reparo celular e a morte celular programada. Testes que detectem danos no material genético, devem ser utilizados de maneira estratégica, a fim de medir os níveis alterados do índice de danos em células que passaram por terapia ou tratamentos experimentais.

Os resultados obtidos em nossas condições experimentais de cultura proporciona a concentração de 20 nM e 30 nM como estratégica, pois a utilização de terapia ou tratamentos com neuroprotetores podem ser avaliados, a fim de diminuir significativamente danos no DNA como resultado positivo. Entretanto técnicas adicionais na análise do cometa, como o uso de espectrometria para avaliação dos escores ou até mesmo administração de inibidores de reparo celular, nas culturas expostas a agentes genotóxicos, podem direcionar avaliação precisa de alterações de danos na molécula de DNA, como resposta ao efeito de terapia ou tratamento.

6. CONCLUSÃO

A viabilidade de células cultivada *in vitro*, provenientes de cultura primária do mesencéfalo ventral de ratos neonatos é afetada significativamente após exposição à rotenona durante 24 e 48 horas.

A rotenona provoca danos significativos no DNA, após 24 e 48 horas de exposição em concentrações de 5 nM, 10nM, 20nM e 30nM, de acordo com análise do teste do cometa.

O teste do cometa demonstrou-se eficaz na detecção de danos no DNA ocorrido em culturas primárias de neurônios mesencefálicos submetidas a baixas concentrações de rotenona, um potente inibidor mitocondrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMER, S.M.; ABOUL-ELA, E.I. Cytogenetic effects of pesticides: III. Induction of micronuclei in mouse bone marrow by the insecticides cypermethrin and rotenone. *Mutation Research*, 155: 135-142, 1985.
- AYRES M, AYRES-JUNIOR M, AYRES D e SANTOS A. *Bioestat 5.0: Statistical Applications in Biological Science and Medicine*. Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, Brazil. 364p. 2007
- BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 2: 325-332, 2001.
- BETARBET; R.; SHERER, T.B.; DI MONTE, D.A.; GREENAMYRE, J.T. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathology*, 12 (4) : 499-510, 2002.
- 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. *Nat. Neurosci.* 3, 1301–1306, 2000.
- CANDURA, S. M.; MANZO, L. COSTA, L.G. Role of occupational neurotoxicants in psychiatric and neurodegenerative disorders. *Occupational Neurotoxicology*. Costa, L.G.; Manzo, L. eds. Boca raton. p. 131-167. CRC Press, 1998.
- CASSARINO, D.S; PARKS, J.K; RARKER, W.D JR; BANNETT, J.P JR. The Parkinsonian neurotoxin MPP⁺ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome C in mitochondria via an oxidative mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1453 (1): 49-62, 1999.

- COLLINS, A., AI-GUO, M; DUTHIE, SJ. A cinética de reparação de dano oxidativo ao DNA (quebras de fita e pirimidinas oxidadas) em células humanas. *Mut. Res.* 336: 69-77, 1995
- COSTA, E.T., OLIVEIRA, D.S., MEYER, D.A., FERREIRA, V.M.M., SOTO, E.E., FRAUSTO, S., SAVAGE, D.D., BROWNING, M.D., VALENZUELA, C.F. Fetal alcohol exposure alters neurosteroid modulation of hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 38268-38274, 2000.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. ROBBINS. Patologia estrutural e funcional. 4ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1231p, 1999.
- CHASE, T.N. A gene for Parkinson disease. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 54: 1156-57, 1997.
- CHAUVIN, C.; OLIVEIRA, F. DE; RONOT, X.; MOUSSEU, M.; LEVERVE, X.; FONTAINE, E. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 276 (44) : 41394-98, 2001.
- DE BOCK, M.: TOULL, N.; DE VISSCHER, G.; VANDE, P.A.; KIRSCH-VOLDERS, M. Validation and implementation of an internal standard in comet assay analysis. *Mutation Research*, 469: 181-167, 2000.
- DI MONTE DA. The role of environmental agents in Parkinson's disease. *Clin. Neurosci. Res.* 1: 419-426, 2001.
- DU, C.; FANG, M.; LI, L.; WANG, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102 (1) : 33-42, 2000.

- FANG, N.; CASIDA, J.E. Novel bioactive cube insecticide constituents: isolation and preparation of 13-homo-13-oxa-6^a-dehydrorotenoids. *J. Org. Chem.*, 62: 350-353, 1997.
- FANG, N.; CASIDA, J.E. Cubé resin insecticide: identification and biological activity of 29 rotenoid constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (5) : 2130-36, 1999.
- FERRARO, M.V.M.; FENOCCHIO, A.S.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; CESTARI, M.M. Mutagenic effects of trybutyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology*. V.27. p.103-107, 2004.
- GASSER, T. Genetics of Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 50(5): 1346-50, 1998.
- GAINETDINOV, R.R; FUMAGALLI, F; JONES, S.R; CARON, M.G. Dopamine transporter is required for *in vivo* MPTP Neurotoxicity: evidence from mice lacking the transporter. *Journal of Neurochemistry*, 69 (3): 1322-1325, 1997.
- GAO, H.M., HONG, J.S., ZHANG, W., LIU, B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *Journal of Neuroscience* 22: 782-790, 2002
- GAO, H.M.; LIU, B.; ZHANG, W.; HONG, J. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, v. 24(8), p. 395-401, 2003.
- GIOVANELLI, L; DECOROSI, F; DOLARA, P; PULVIRENTI, L. Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain Research* 969: 244-277, 2003.
- GIOVANELLI, L; COZZI, A; GUARNIERI, I; DOLARA, P; MORONI, F. Comet Assay as a Novel Approach for studying DNA Damage in Focal Cerebral Ischemia:

Differential Effects of NMDA Receptor Antagonists and Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 22:697–704 © 2002.

GREENAMYRE, J.T., BETARBET, R., SHERER, T., PANOV, A. Response: Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci*. 24, 247. 2001.

GREENAMYRE; J.T.; MACKENZIE, G.; STEPHANS, S.E. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem. Soc. Symp.*, 66: 85-97, 1999.

IRWIN, I; LANGSTON, J.W. Selective accumulation of MPP⁺ in the substantia nigra: a key to Neurotoxicity? *Life Science*, 36 (3): 207-212. 1985.

IPCS. INCHEM. International Programme on Chemical Safety. Rotenone: health and safety guide. Geneva, (Health and safety guide; n. 73) ISBN 9241510730. ISSN 0259-7268. Disponível em: www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg073.htm. 1992.

JENNER, P.; OLANOW, C.W. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 44 (Supplement) : p. S72-S84, 1998.

JENNER P. Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 16 (Suppl 1):S3–S7. 2003.

LANGSTON, J.W. Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate. *Annals of Neurology*, 44 (suppl. 1) : S45-S52, 1998.

LANGSTON, J.W; BALLARD, P.A JR. Parkinson's disease in a chemist working with 1- methyl- 4- phenyl- 1, 2, 5, 6 – tetrahydropyridine. *The New England Journal of Medicine*, 309 (5): 310. 1983.

- LAI, S. M. F.; ORCHISON, J.A.; WHITING, D.A. A new synthetic approach to the rotenois ring system. *Tetrahedron*, 45 (18) : 5895-5906, 1989.
- LE COUTEUR DG; McLEAN A.J.; TAYLOR M.C.; WOODHAM B.L.; BOARD PG
Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53: 122-130;
1999.
- LI, N.; RAGHEB, K.; LAWLER, G.; STURGIS, J.; RAJWA, B.; MELENDEZ, A.J.;
ROBINSON, P.J. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone oxygen species
production. *J. Biol. Chem.*, 2002.
- LIMA, P.D.L.; YAMADA, E.S.; COSTA, E.T.; PESSOA, C.O.; RABENHORST, S.H.B.,
BAHIA, M.O.; CARDOSO, P.C.; SANTOS, R. A.; SMITH, M.A.C.; BURBANO,
R.R. Genotoxic effects of rotenone on cultured lymphocytes. *Genet. Mol. Res.*
4 (4): 822-831, 2005.
- LIU, X.; KIM, C.N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic
program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86
(1) : 147-57, 1996.
- LOTHARIUS J AND BRUNDIN P; Impaired dopamine storage resulting from alpha-
synuclein mutations may contribute to the pathogenesis of Parkinson's disease.
Human Molecular Genetics 11:2395-2407. 2002.
- MACHADO DA ROCHA. Avaliação da genotoxicidade do cloreto de metilmercúrio
em duas espécies de peixes neotropicais. Tese de doutorado Programa de
Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Pará. 2009
- MARDER, K.; LOGROSCINO, G.; ALFARO, B.; MEJIA, H.; HALIM, A.; LOUIS, E.;
COTE, L.; MAYEUX, R. Environmental risk factors for Parkinson's disease in
an urban multiethnic community. *Neurology*, 50: 279-281, 1998.

- MERCK. Parkinson's disease: (Sharking Palsy). In: The Merck manual of diagnosis and therapy. 17^a ed. NJ, USA, Disponível em: www.merck.com/pubs/manual/sectional14/chapter179/179e.htm, 1999.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63, 1983.
- NITRINI, R.; BASCHESCHI, L. A. A neurologia que todo médico deve saber. São Paulo. Maltese, 332 p. 1997.
- NUSSBAUM, R.L.; POLYMERPOULOS, M.H. Genetics of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*, 6(10) : 1687-1691, 1997.
- PRANCE, G. The poisons and narcotics of the Amazonian Indians. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 33(4) : 368-376, 1999.
- OSTLING.O. AND JOHANSON,K.J; Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 291-298, 1984.
- KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMÜLLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation research*, 463: 13-31, 2000.
- KOPIN, I.J & MARKEY, S.P. MPTP toxicity implications for research in Parkinson's disease. *Annual Review of Neuroscience*, 11: 81-96. 1998.
- RAHDE, A.F. Rotenone. Ontario: IPCS INCHEM, April 1990. (International Programme on chemical Safety Poisons Information. Monograph, 474). Disponível em: www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim474.htm.

- RAJPUT, A.H. Frequency and cause of Parkinson's disease. *Le Journal Canadien des sciences Neurologiques*, 19(1) : 103-107, 1992.
- RITZ, B & YU, F. Parkinson's disease mortality and pesticide in California 1984 - 1994. *International Journal of Epidemiology*, 20 (3): 323-329. 2000.
- SAPHYR. The Rotenone, Antibes, Disponivel em: www.rotenone.com,1998.
- SCHAPIRA, A.H., COOPER, J.M., DEXTER, D., CLARK, J.B., JENNER, P., MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry* 54: 823-827, 1990.
- SCHAPIRA, A.H. Mitochondrial function and neurotoxicity. *Current Opinion in neurology* 7 (6): 531-534, 1994.
- SEIDLER, A.; HELLENBRAND, W.; ROBRA, B.-P.; VIEREGGE, P.; NISCHAN, P.; JOERG, J.; OERTEL, W.H.; ULM, G.; SCHENEIDER, E. Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*, 46: 1275-84, 1996.
- SEMCHUCK, K.M.; LOVE, E.J.; LEE, R.G. Parkinson's disease and exposure to rural environmental factors: a population based case-control study. *Le journal Canadien des Sciences Neurologiques*, 18(3) : 279-286, 1991.
- SESTILI, P.; BRAMBILLA, L.; CANTONI, O. Rotenone and pyruvate prevent the tert-butylhydroperoxide-induced necrosis of U937 cells and allow them to proliferate. *FEBS Letters*, 457: 139-143, 1999.
- SMARGIASSI, A.; MUTTI, A.; DE ROSA, A.; DE PALMA, G.; NEGROTTI, A.; CALZETTI, S. A case-control study of occupational and enviromental risk factors for Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, 44: 45-52, 1998.

- SMEYNE & SMEYNE. Method for culturing postnatal substantia nigra as an *in vitro* model of experimental Parkinson's disease. *Brain Research Protocols* 9, (105-111), 2002.
- SHERER, T.B., BETARBET, R., KIM, J.H., GREENAMYRE, J.T. Selective microglial activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 341, 87–90, 2003.
- SHERER, T.B., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *The Neuroscientist* 8: 192-197, 2002.
- SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., KITAMURA, Y., TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. *TRENDS in Molecular Medicine*, 9: 360-365, 2003.
- SHIMIZU, K., MATSUBARA, K., OHTAKI, K., SHIONO, H. Paraquat leads to dopaminergic neural vulnerability in organotypic midbrain culture. *Neurosci. Res.* 46, 523–532, 2003.
- SPILLANTINI, M.G., SCHMIDT, M.L., LEE, V.M., TROJANOWSKI, J.Q., JAKES, GOEDERT, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies [letter]. *Nature* 388, 839– 840, 1997.
- SIAN J, DEXTER DT, LEES AJ, DANIEL S, JENNER P, MARSDEN CD. Glutathione-related enzymes in brain in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. Vol 36, issue 3, 356-361; 1994
- SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR AND SCHNEIDER EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191, 1988.
- SUZUKI, S.; HIGUCHI, M.; PROSKE, R.J.; ORIDATE, N.; HONG, W.K.; LOTAN, R. Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome c

and caspase-3 in n-(4-Hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Oncogene*, 18: 6380-87, 1999.

TANNER, C.M & BEN-SHLOMO, Y. Epidemiology of Parkinson's disease. *Advances in Neurology*, 80: 153-159. 1999.

TEIXEIRA, J.R.M.; LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; VALLE, J.R. Timbós: ichthyotoxic plants used by brazilian Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 10: 311-318, 1984.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y.F. Single gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221, 2000.

THIRUCHELVAM M, RICHFIELD EK, BAGGS RB, TANK AW, CORY-SLECHTA DA; The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. *J Neurosci* 20:9207–9214, 2000.

TSAI, C.H.; LO, S.K.; SEE, L.C.; CHEM, H.Z.; CHEM, R.S.; WENG, F.C.; LU, C.S. Environmental risk factors of young onset Parkinson's disease: a case-control study. *Clinical Neurology and Neurosurgery* (00) : 1-6, 2002.

VELDMAN, B.A.; WIDN, A.M.; KNOERS, N.; PRAMSTRA, P.; HOSTINK, M. W. Genetic and environmental risk factors in Parkinson's disease. *J. Neuro. Chem.*, 71: 295-301, 1998.

VERHAGEN; A.M.; EKERT, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKER, J.; CONNOLY, L.M.; REID, G. E.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R.J.; VAUX, D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102 (1) : 43-53, 2000.