

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DISTÚRBIOS DA COMUNICAÇÃO HUMANA**

**EFEITOS DA VINCRISTINA E DO GUARANÁ EM
CULTURA CELULAR DE CÉREBRO E CEREBELO
DE CAMUNDONGOS NA VIABILIDADE CELULAR E
METABOLISMO OXIDATIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolina Fantinel Veloso

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

**EFEITOS DA VINCRISTINA E DO GUARANÁ EM CULTURA
CELULAR DE CÉREBRO E CEREBELO DE
CAMUNDONGOS NA VIABILIDADE CELULAR E
METABOLISMO OXIDATIVO**

Carolina Fantinel Veloso

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, Área de Concentração em Audição e Equilíbrio, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana

Orientador: Prof. Dr. Aron Ferreira da Silveira
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Santa Maria, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Veloso, Carolina Fantinel

Efeitos da vincristina e do guaraná em cultura celular de cérebro e cerebelo de camundongos na viabilidade celular e metabolismo oxidativo / Carolina Fantinel Veloso.-2014.

72 p.; 30cm

Orientador: Aron Ferreira da Silveira

Coorientadora: Ivana Beatrice Mânica da Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, RS, 2014

1. Camundongos 2. Guaraná 3. In vitro 4. Sistema nervoso central 5. Viabilidade celular. Vincristina I. Silveira, Aron Ferreira da II. Cruz, Ivana Beatrice Mânica da III. Título.

© 2014

Todos os direitos autorais reservados a Carolina Fantinel Veloso. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: caroveloso_fisio@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-graduação em
Distúrbios da Comunicação Humana**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITOS DA VINCRISTINA E DO GUARANÁ EM CULTURA
CELULAR DE CÉREBRO E CEREBELO DE CAMUNDONGOS NA
VIABILIDADE CELULAR E METABOLISMO OXIDATIVO**

elaborada por
Carolina Fantinel Veloso

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Distúrbios da Comunicação Humana

COMISSÃO EXAMINADORA:

Aron Ferreira da Silveira, Prof. Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Valdete Alves Valentins dos Santos Filha, Prof^a. Dr^a. (UFSM)

Patrícia Gomes, Prof^a. Dr^a. (UNIFRA)

Santa Maria, 14 de março de 2014.

*Dedico este trabalho à minha família,
aos mestres, à Deus,
e a tudo e todos que me
permitiram chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Jesus Cristo, que são os mantenedores da minha fé e esperança, erguendo-me muitas vezes pela oração.

Aos meus pais, Edson e Aleir, que colocaram meus sonhos como metas, realizando-os comigo.

Ao meu irmão Cassiano, por ser meu companheiro de vida, e pelos meus sobrinhos Gustavo e Eduardo

Ao meu namorado Cauan, por acompanhar meu progresso pessoal e profissional com incentivo, amor, companheirismo e respeito.

Aos amigos e parentes que são a extensão da minha primeira família, em especial minha amiga Carina e meus primos Caroline e Rafael.

Ao meu orientador, Prof. Aron, pelos grandes ensinamentos desde a graduação, e pela confiança no meu trabalho.

À co-orientadora, Prof. Ivana, pela sua extrema dedicação à pesquisa, e seus orientandos Alencar e Francine, que foram fiéis escudeiros na realização deste trabalho, bem como toda equipe do Laboratório de Biogenômica da Universidade Federal de Santa Maria.

À professora Valdete, pela disposição e boa vontade sempre que a solicitei.

À Universidade Federal de Santa Maria.

Às colegas de graduação que iniciaram a vida acadêmica comigo, e dividiram muitas dúvidas e trabalhos, em especial a colega Carolina Dalla Costa.

Às colegas de pós-graduação Lícia Cogo e Samantha Marques, na área da audição e equilíbrio.

Aos professores Antonio Marcos Vargas da Silva e Liliane de Freitas Bauermann por serem os primeiros a me orientarem em uma pesquisa, ainda na graduação, e desta mesma maneira, ao colega Robson Borba.

Aos alunos que orientei e ensinei, humildemente, na disciplina de docência orientada.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana, bem como aos professores do curso de Fisioterapia, por todos os ensinamentos que me foram transmitidos.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITOS DA VINCRISTINA E DO GUARANÁ EM CULTURA CELULAR DE CÉREBRO E CEREBELO DE CAMUNDONGOS NA VIABILIDADE CELULAR E METABOLISMO OXIDATIVO

AUTORA: CAROLINA FANTINEL VELOSO
ORIENTADOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA
CO-ORIENTADORA: IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ
Data e Local de Defesa: Santa Maria, 14 de março de 2014.

A vincristina é um quimioterápico utilizado no tratamento de vários tipos de neoplasias com grandes resultados clínicos, porém, seus efeitos incluem uma série de alterações do equilíbrio, como ataxia, tremores e neuropatia periférica. Estes danos estão provavelmente associados à intoxicação provocada pelo fármaco no sistema nervoso central e periférico. Há indícios de que o guaraná (*Paullinia cupana*) possui componentes capazes de produzir neuroproteção central. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da vincristina e do guaraná sobre a viabilidade celular e o metabolismo oxidativo no cérebro e no cerebelo de camundongos em cultura celular *in vitro*. As células foram incubadas por 24 e 72 horas em meio específico (DMEM) e tratadas com vincristina na concentração 0,009 μM para 24 horas e 0,0007 μM para 72 horas e com as concentrações de 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de guaraná. Após, realizou-se os testes MTT, Pico Green®, atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase e tióis (viabilidade celular); TBARS, diclorodihidrofloreceína e carbonilação de proteínas (metabolismo oxidativo). Os resultados indicaram que a vincristina pode causar efeitos citotóxicos em cerebelo e cérebro de camundongos e que o guaraná pode reverter essa citotoxicidade, principalmente nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave: Camundongos. Guaraná. *In vitro*. Sistema nervoso central. Viabilidade celular. Vincristina.

ABSTRACT

Master's Thesis
Post-Graduate Program in Human Communication Disturbances
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

EFFECTS OF VINCRISTINE AND GUARANA IN CELL CULTURE IN BRAIN AND CEREBELLUM ON CELL VIABILITY AND OXIDATIVE METABOLISM

AUTHOR: CAROLINA FANTINEL VELOSO
ADVISOR: ARON FERREIRA DA SILVEIRA
CO-ADVISOR: IVANA BEATRICE MANICA DA CRUZ
Date and Place of defense: Santa Maria, March 14th, 2014.

Vincristine is a chemotherapeutic agent used to treat various types of cancers with effective clinical outcomes. However, its effects include a number of disorders related to balance, such as ataxia, tremors and peripheral neuropathy. These damages are likely associated with poisoning by the drug in the central and peripheral nervous systems. There is evidence that guarana (*Paullinia cupana*) may have neuroprotective effects on the central nervous system. The aim of this study was to evaluate the effects of vincristine and guarana on cell viability and oxidative metabolism *in vitro* cell cultures of mice brain and cerebellum. The cells were incubated for 24 and 72 hours in a specific medium (DMEM) and treated with vincristine at a concentration 0.009 mM for 24 hours and 0.0007 mM for 72 hours and at concentrations of 10, 30, 100 and 300µg/m Lof guarana extract. Incubation was followed by MTT and Pico Green® tests and evaluation of catalase, superoxide dismutase and thiol activity (cell viability), as well as TBARS, protein carbonyls and dichlorodihydrofluorescein (oxidative metabolism). The results indicated that vincristine may cause cytotoxic effects in mice cerebellum and brain and that guarana may reverse this cytotoxicity in concentrations 100 e 300µg/mL.

Key-words: Cell survival. Central nervous system. Guarana. *In vitro*. Mice. Vincristine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Vincristina.....	12
2.2 Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>).....	14
2.3 Viabilidade Celular	16
2.4 Metabolismo oxidativo	16
3 ARTIGO 1 EFEITO PROTETOR DO GUARANÁ NA VIABILIDADE CELULAR E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO CÉREBRO E DO CEREBELO DE CAMUNDONGOS EM CULTURA CELULAR TRATADA COM VINCRISTINA.....	19
RESUMO	21
ABSTRACT	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS	24
RESULTADOS.....	26
DISCUSSÃO	27
CONCLUSÃO	30
ANEXOS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
4 ARTIGO 2 METABOLISMO OXIDATIVO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS EM CULTURA CELULAR TRATADA COM VINCRISTINA E GUARANÁ.....	43
RESUMO.....	45
ABSTRACT	46
INTRODUÇÃO	47
MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
RESULTADOS	49
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO.....	52
ANEXOS	53
REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS.....	59
5 DISCUSSÃO GERAL	61
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

O tratamento dos cânceres é um dos problemas mais desafiadores da medicina (CHABNER & ROBERTS, 2005). Os quimioterápicos antineoplásicos são bastante utilizados pois a terapia com estes medicamentos atinge igualmente as metástases disseminadas pelo corpo. Entretanto, há desvantagens importantes a serem consideradas principalmente aquelas relacionadas aos seus efeitos colaterais, pois em sua grande maioria estes medicamentos apresentam baixo índice terapêutico, ou seja, dose terapêutica muito próxima à dose tóxica (FUKUMASU, 2008).

O sulfato de vincristina (SV) é um quimioterápico antineoplásico utilizado no tratamento de leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, câncer de mama, câncer de pulmão de pequenas células, câncer epitelial de ovário, câncer cervical, câncer colorretal, linfomas de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin, rabdiossarcoma, sarcoma de Ewing, osteossarcoma, melanoma maligno, tumor de célula germinativa de ovário, e outros (ANVISA, 2008). Entre os seus efeitos colaterais estão descritos alterações do equilíbrio através de danos vestibulares por agressão ao oitavo nervo craniano, e as manifestações incluem dificuldades no equilíbrio, como tontura, nistagmo e vertigem (ANVISA, 2008) e neuropatia periférica (KRARUP-HANSEN *et al.*, 2007). Além disso, houve aumento de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) no tecido cerebral de ratos expostos ao SV, indicando associação do quimioterápico com estresse oxidativo (MARTINS *et al.*, 2011).

A crescente associação de alguns quimioterápicos com estresse oxidativo tem alertado as pesquisas para a busca de estratégias que visam a prevenção contra ação de radicais livres no tecido nervoso. Produtos naturais como o guaraná (*Paullinia cupana*), são fontes ricas em propriedades farmacológicas promissoras na inibição do processo oxidativo espontâneo devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, principalmente os taninos (BASILE *et al.*, 2005; MAJHENIC, KERGET & KNEZ, 2007).

Sabe-se também que quimioterápicos de diferentes classes, especialmente aqueles que cruzam a barreira hematoencefálica estão associados com relevante

neurotoxicidade (PELS *et al.*, 2003). O estudo de Wick *et al.* (2004) evidenciou que os quimioterápicos cisplatina, vincristina e topotecano reduziram a viabilidade celular de neurônios cerebelares. Neste estudo, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) preveniu a morte celular neuronal induzida pelos quimioterápicos.

Por outra via, estudos em humanos com diferentes doses de extrato do guaraná também sugerem melhores efeitos cognitivos, melhora no desempenho da memória secundária e aumento do estado de alerta. Sujeitos que receberam suplementação aguda com guaraná realizam tarefas cognitivas com maior velocidade (KENNEDY *et al.*, 2008).

Oliveira *et al.* (2011), realizaram estudo inédito sobre os potenciais benéficos do guaraná (*Paullinia cupana*) em desordens neurodegenerativas, a patogênese associada com disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, e demonstraram o efeito neuroprotetor do guaraná após tratamento com rotenona, uma substância utilizada como pesticida e classificada como citotóxica. Esta substância causa os sintomas do mal de Parkinson se injetada em ratos. O extrato de guaraná aumentou a viabilidade celular no tecido tratado com rotenona, sendo este resultado dose-dependente. Além disso, a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear foram significativamente reduzidos pela adição do extrato de guaraná, demonstrando o efeito neuroprotetor do guaraná (*Paullinia cupana*).

Grande parte dos estudos atuais com medicamentos, fármacos, agentes tóxicos e terapêuticos tem utilizado modelos experimentais *in vitro*. Estes modelos são ótimas ferramentas para se estudar de forma mais minuciosa alguns achados observados em modelos *in vivo*. Além disso, modelos *in vitro* tem a vantagem de se poder diminuir ao máximo as variáveis presentes em certas situações *in vivo*, bem como de oferecer a oportunidade de se estudar mecanismos de ação envolvidos em perguntas experimentais (FILHO, 2011).

As caracterizações de elementos celulares individuais e suas conexões sinápticas no cerebelo são essenciais para o entendimento da precisão e compreensão dos mecanismos de coordenação motora (HIRONO *et al.*, 2012).

A maior parte da energia necessária para a sobrevivência do tecido nervoso é proveniente da fosforilação oxidativa mitocondrial, uma importante fonte de radicais livres. Existem evidências de que danos oxidativos estão implicados na patogênese de diversos distúrbios neurodegenerativos (MIGLIORE & COPPEDÈ, 2009).

Em razão do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da vincristina e do guaraná sobre a viabilidade celular e o metabolismo oxidativo no cérebro e no cerebelo de camundongos em cultura celular *in vitro*

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vincristina

As quatro principais classes de compostos provenientes de plantas empregues na quimioterapia antineoplásica são: os alcaloides de vinca (vinblastina, vincristina, vinorelbina), as lignanas epipodofilotoxinas (etoposido, teniposido), os diterpenos de taxano (paclitaxel e docetaxel) e os alcaloides derivados da camptotecina (topotecano, irinotecano) (CHABNER & BRUNTON, 2005; DE VITA *et al.*, 2008).

A vincristina é um quimioterápico do tipo alcaloides da vinca, que atuam ligando-se às β -tubulinas inibindo a polimerização dos microtúbulos. Os representantes naturais, vinblastina e vincristina, dessa classe foram isolados das folhas da espécie *Catharanthus roseus*, antigamente chamada de *Vinca rosea* e popularmente conhecida como Vinca (BRANDÃO *et al.*, 2010). Comercializado pelo nome de Oncovin®, o sulfato de vincristina é o sal de um alcalóide obtido de uma planta florescente comum, a pervinca (*Vinca rósea* Linn), originalmente conhecida como leurocristina, também conhecida como LCR e VCR.

Em humanos, seu uso está especialmente indicado nos cânceres, principalmente no tratamento de leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma, tumor de Wilms, câncer de mama, câncer de pulmão de pequenas células, câncer epitelial de ovário, câncer cervical, câncer colorretal, linfomas de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin, rabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, osteossarcoma, melanoma maligno, tumor de célula germinativa de ovário, e outros (ANVISA, 2008) e sua aplicação é feita com diluição de 1 mg/ml, uma vez por semana e a dose semanal preconizada é de 1,4 mg/m³ corporal, podendo chegar a 2mg/m³ de área corporal (VERSTAPPEN *et al.*, 2005). A administração intratecal inadvertida de vincristina é universalmente fatal (HENNIPMAN *et al.*, 2009).

Na medicina humana, a vincristina é mais usada, e mostra-se mais efetiva, na oncologia pediátrica do que em adultos com câncer. Os tumores de crianças parecem ter um maior nível de sensibilidade ao medicamento, fazendo com que a

tolerância infantil a altas doses de vincristina seja melhor do que em pessoas de mais idade (GIDDING *et al.*, 1999).

Deve-se ter cuidado especial ao combinar sulfato de vincristina a outros agentes conhecidos por sua ototoxicidade, como os oncolíticos contendo platina. Com a administração contínua, tem sido relatados perda dos reflexos tendinosos profundos, pé caído, ataxia e paralisia. Podem ocorrer manifestações dos nervos cranianos, incluindo paresia isolada e/ou paralisia dos músculos controlados pelos nervos cranianos motores, na ausência de distúrbio motor. (ANVISA, 2008)

A DL₅₀ do sulfato de vincristina em camundongos é de 4,7 mg/kg por via intraperitoneal (IP) e 3 mg/kg por via intravenosa (IV). Em ratos, a DL₅₀ IP é de 1,2 mg/kg. Em ratas tratadas com uma injeção IP única de 0,25 a 0,35 mg/kg de sulfato de vincristina no nono dia de gravidez, ocorreu reabsorção fetal numa variação de 49% a 57% (controle: 6%) e 32% a 66% dos fetos sobreviventes apresentaram malformações. Ambos os testes *in vivo* e *in vitro* falharam ao demonstrar conclusivamente que o sulfato de vincristina é mutagênico (PFIZER, 2010).

Neste trabalho, a concentração escolhida para o sulfato de vincristina baseou-se em um estudo realizado por Wick *et al.* (2004), por tratar-se de um estudo *in vitro* que avaliou os efeitos do quimioterápico em 24 e 72 horas, em células cerebelares e astrócitos.

Os alcalóides da vinca são minimamente teratogênicos. Há relatos de casos esporádicos de algumas anomalias causadas pela vincristina, incluindo defeitos do septo atrial, hipoplasia renal, e pancitopenia (ARNON *et al.*, 2001; LESLIE, 2002; ANDREADIS *et al.*, 2004).

Embora acredite-se num efeito mais intenso nos neurônios periféricos (neuropatia) não foram encontrados estudos sobre o comprometimento de gânglios da raiz dorsal secundário aos efeitos da vincristina, efeito descrito em outros quimioterápicos, como a cisplatina (KRARUP-HANSEN *et al.*, 2007).

A vincristina pode ultrapassar a barreira hematoencefálica e penetrar o SNC, causando um aumento dose-dependente de peroxidação lipídica no estriado (MARTINS, 2008). Estudando a influência da vincristina no hipotálamo de coelhos, percebeu-se que os neurônios foram as primeiras células afetadas e de modo bastante severo. Observaram-se nos axônios lesados, degeneração das conexões

sinápticas e mudanças secundárias nas bainhas de mielina (MUZYLAŁ & MASLINSKA, 1992).

2.2 Guaraná (*Paullinia cupana*)

O guaraná (*Paullinia cupana*) é consumido na forma de pó há muitos anos. As tribos indígenas da Amazônia usavam as sementes do guaraná trituradas, torradas e compactadas na forma de bastões de consistência bastante dura, tirando deles o pó ou lascas para o consumo em bebidas ou alimentos. Era empregado como mitigador da fome por produzir uma ligeira anestesia nas fibras gástricas e como estimulante do sistema nervoso, tirando o sono e o cansaço dos guerreiros (MIRANDA & METZNER, 2010).

Atualmente, a cultura popular preconiza o uso do guaraná na forma de xaropes, chás, cápsulas ou pó diluído em sucos ou outras bebidas com um espectro muito amplo de efeitos, tais como anti-dispéptico; antidiarreico; anti-hemorrágico; afrodisíaco; estimulante; tônico cardiovascular; diurético, sendo indicado em diversos estados, incluindo blenorragia, leucorréia, hemorróidas, fadiga, enxaqueca, febre, cólica e nevralgia. No entanto, seu emprego mais frequente é como estimulante do sistema nervoso, contra a fadiga, cansaço físico e mental, bem como no combate à sonolência (MIRANDA & METZNER, 2010; CAMARGO, 2006).

A atividade antioxidante do guaraná está associada às elevadas concentrações de compostos fenólicos, como taninos, e a atividade anti-inflamatória à presença de saponinas. A presença de teobromina e a teofilina nas sementes do guaraná justificam o efeito broncoprotetor, atividade imunomodulatória e anti-inflamatória, além do melhoramento da circulação sanguínea e do retardo no envelhecimento precoce (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

O guaraná é encontrado em poucos estudos, que em sua maioria relatam efeitos estimulantes e melhora na capacidade cognitiva e desempenho físico (ESPINOLA *et al.*, 1997; KENNEDY *et al.*, 2004; HALLER *et al.*, 2005; KENNEDY *et al.*, 2008) e redução da agregação plaquetária (SANTOS *et al.*, 1989; BYDŁOWSKI *et al.*, 1988; BYDŁOWSKI *et al.*, 1991).

O conteúdo de cafeína do guaraná é significativamente maior (4 vezes) que o do café, 10 vezes maior do que o do chá, e 30 vezes maior do que o do cacau (EDWARDS *et al.*, 2005). Além disso, as sementes de guaraná são constituídas por polissacarídeos, como amido, celulose, pectina, mucilagens, proteínas e óleo (SIMÕES *et al.*, 2003; HEARD *et al.*, 2006).

A ação da cafeína prevalece no sistema nervoso central. Ela atua unindo-se a receptores adenosínicos, o que aumenta o estado de alerta do indivíduo e promove assim uma melhora na associação de ideias e nas atividades intelectuais, maior resistência ao cansaço e sensação de bem-estar (MORAES *et al.*, 2003; KUSKOSKI *et al.*, 2004; TFOUNI *et al.*, 2002; CALDAS, 2008).

A produção brasileira anual de sementes de guaraná é de cerca de 3 mil toneladas, sendo que a maior parte (70 a 80%) é usada na preparação de refrigerantes e bebidas energéticas. Parte (15%) das sementes também é industrializada na forma de bastão e o restante é utilizado na produção de pós, extratos e xaropes, vendidos diretamente no mercado brasileiro (MAGNA *et al.*, 2003; SIMÕES *et al.*, 2003; EDWARDS *et al.*, 2005; PAGLIARUSSI *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos, o guaraná foi aprovado como suplemento alimentar e também é utilizado como aromatizante natural de bebidas (CARLSON e THOMPSON, 1998; HULBERT *et al.*, 1998).

Alguns estudos já evidenciam os efeitos antioxidantes *in vitro* do *Paullinia cupana* na inibição do processo oxidativo espontâneo devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, principalmente os taninos. (BASILE *et al.*, 2005; MAJHENIC, KERGET & KNEZ, 2007).

Mattei *et al.* (1988), observaram 50% de redução na peroxidação lipídica em sistema homogenato de cérebro de ratos, mesmo na presença de baixas concentrações de extrato de guaraná liofilizado.

O guaraná, quando testado como protetor de fibroblastos expostos ao sódio nitroprussiato, reverteu a toxicidade deste, principalmente em baixas concentrações (<5 mg), o que diminuiu a mortalidade celular, peroxidação lipídica, danos ao DNA e estresse oxidativo celular, bem como o aumento dos níveis de SOD. Estes resultados demonstram que o guaraná tem um efeito antioxidante sobre metabolismo em situações de níveis de óxido nítrico celular mais elevados. (BITTENCOURT *et al.*, 2013).

2.3 Viabilidade Celular

A alta concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerada pelo estresse oxidativo pode danificar muitas moléculas importantes para a homeostase do nosso organismo, como, as proteínas, os lipídios e o DNA. Como consequência disso, muitas comorbidades podem ser desenvolvidas pelo fato de alterar a viabilidade e funcionalidade celular. Os quimioterápicos cisplatina, vincristina e topotecano reduziram a viabilidade celular de neurônios cerebelares (WICK *et al.*, 2004).

Ensaio de citotoxicidade em cultivos celulares são amplamente usados em estudos toxicológicos *in vitro*. O teste da redução do metiltetrazólio (MTT) e o da incorporação do vermelho neutro (VN) são os ensaios mais comumente empregados para a determinação de citotoxicidade ou viabilidade celular após a exposição a substâncias potencialmente tóxicas (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006). O ensaio do MTT é baseado no protocolo primeiramente descrito por Mossmann (1983), no qual o MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo), um sal tetrazólio amarelo e solúvel, é convertido a formazan, um produto insolúvel de cor púrpura, após a clivagem do anel tetrazólio pela succinato de hidrogenase dentro da mitocôndria. O formazan é impermeável para as membranas celulares, desta forma, ele se acumula nas células saudáveis, e pode ser quantificado por espectrofotometria. Portanto, o ensaio do MTT informa sobre a funcionalidade mitocondrial. Já o ensaio do VN (C15H17CIN4) está baseado no protocolo inicial descrito por Borenfreund & Puerner (1984) e determina a acumulação do corante vermelho neutro nos lisossomos de células viáveis e não prejudicadas, refletindo a viabilidade lisossomal.

2.4 Metabolismo oxidativo

Estresse oxidativo corresponde a evento resultante do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de espécies reativas [do oxigênio (ROS) ou do nitrogênio (RNS)]. Tal desequilíbrio resulta na oxidação de importantes

biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA). Substâncias oxidantes e antioxidantes são gerados em um cenário de reações de óxido-redução, onde a oxidação implica em ganho de elétron e a redução, em perda. Visto que a geração e a ação de substâncias oxidantes e antioxidantes dependem desse sistema de óxido-redução, muitos autores têm atualmente usado o termo desequilíbrio do sistema redox para se referir ao estresse oxidativo (POLI *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo é responsável por várias ações deletérias no nosso organismo, como peroxidação de lipídios, carbonilação de proteínas e até danos ao DNA das células, ou seja, causa danos moleculares às estruturas celulares, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais de vários tecidos e órgãos (ZOPPI *et al.*, 2003).

Os radicais livres produzidos pelo organismo tem alta reatividade e meia vida curta (VOSS, P. & SIEMS, 2006). Por este motivo, sua determinação *in vivo* não é viável. Em contrapartida os lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, após serem modificados pelas espécies reativas, tem uma meia vida maior, o que os torna marcadores ideais do estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Para este estudo serão utilizados os marcadores: malondialdeído (indicador de peroxidação lipídica), proteínas carboniladas, espécies reativas ao oxigênio (ROS).

Um produto bem conhecido da peroxidação lipídica é o malondialdeído (MDA), o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Com isso, altos níveis de MDA indicam um aumento de peroxidação lipídica (KASHYAP *et al.*, 2005). Para sua determinação os métodos utilizados são: determinação de malondialdeído (MDA) seja pelo método TBARS ou pela cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ISISÓRIO, 2003). A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é o processo através do qual as ROS atacam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos das membranas das células, desintegrando-as e permitindo a entrada dessas espécies na estruturas intracelulares (COLPO, 2007).

Algumas modificações protéicas podem não ocasionar perda de função ou alterações estruturais em proteínas e são, muitas vezes, uma maneira de o organismo defender-se do ataque oxidativo. Neste caso, proteínas com ação antioxidante sofrem oxidação reversível. Por outro lado, modificações irreversíveis de proteínas podem levar a danos estruturais com inativação e perdas funcionais

das mesmas. A carbonilação é uma modificação protéica irreversível e não enzimática. Esse é um biomarcador muito usado para avaliar danos oxidativos nas proteínas, e reflete danos celulares ocasionados pelas espécies reativas (STADTMAN & LEVINE, 2000).

As ROS podem ser formadas a partir de fontes exógenas como fumo, radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos, agrotóxicos ou de fontes endógenas (MALAVÉS, 2003).

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos, e nesse grupo estão incluídos os radicais livres. Radical livre (RL) é definido como qualquer átomo, molécula ou conjunto de átomos com um elétron não emparelhado ocupando uma órbita externa. Entretanto, existem as espécies reativas que são compostos igualmente reativos quanto os radicais livres, mas que não possuem elétron não-pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres (VANCINI *et al.*, 2005).

Para combater a alta produção de ROS e evitar o estresse oxidativo, o corpo utiliza um efetivo sistema de defesa antioxidante. Segundo Barreiros, David e David (2006), antioxidante é uma substância capaz de diminuir ou inibir a oxidação mesmo presente em baixas concentrações em relação ao seu substrato. Desta forma, estes compostos protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam a oxidação das macromoléculas ou estruturas celulares.

O grupo não-enzimático contém grande número de compostos capazes de prevenir danos oxidativos da interação direta ou indireta com ROS, entre os quais citam-se a glutathiona reduzida (GSH) (sintetizada pela célula), e os carotenóides, tocoferóis (vitamina E), polifenóis e ácido ascórbico (vitamina C) (provenientes da dieta) (GRANOT & KOHEN, 2004).

3 ARTIGO 1

EFEITO PROTETOR DO GUARANÁ NA VIABILIDADE CELULAR E NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO CÉREBRO E DO CEREBELO DE CAMUNDONGOS EM CULTURA CELULAR TRATADA COM VINCRISTINA

Protector effect of guarana in viability cell and enzymatic activity of brain and mice's cerebellum in cell culture treated with vincristine

Carolina Fantinel Veloso¹, Alencar Kolinski Machado², Francine Carla Cadoná³, Ivana Beatrice Manica da Cruz⁴ e Aron Ferreira da Silveira⁵.

¹Fisioterapeuta. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. carolveloso_fisio@yahoo.com.br

²Biomédico. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. alencarkolinski@yahoo.com.br

³Bióloga. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. fran.cine.bio@hotmail.com

⁴Bióloga. Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pós-doutora pela University of California, Davis-USA. ibmcruz@hotmail.com

⁵Médico Veterinário. Professor-Doutor Titular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria e orientador do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM. Santa Maria – RS, Brasil. aronfer@gmail.com

Dados do Responsável:

Carolina Fantinel Veloso

Endereço: Travessa Medianeira, 41/306. Bairro: Nossa Senhora da Medianeira
Santa Maria – RS. CEP: 97015-050

Telefone: 55- 91351218

E-mail: caroveloso_fisio@yahoo.com.br

Fonte de auxílio: CAPES

Declaro não existir conflito de interesse neste manuscrito.

RESUMO

O guaraná (*Paullinia cupana*) tem sido estudado recentemente como protetor do sistema nervoso central. Por outro lado, a vincristina é um quimioterápico largamente utilizado, e seu uso está associado a sinais de ataxia cerebelar, neuropatia periférica, agressão do oitavo nervo, entre outros. Estes sintomas sugerem prováveis danos ao sistema nervoso periférico e ao sistema nervoso central. A avaliação da viabilidade celular e da atividade enzimática em culturas celulares é uma maneira eficaz de avaliar a toxicidade do fármaco, bem como uma provável proteção do guaraná nestas células. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor do guaraná na viabilidade celular e na atividade enzimática do cérebro e do cerebelo de camundongos cultivados *in vitro* e tratados com vincristina. A pesquisa experimental iniciou com as culturas de células em meio DMEM, devidamente tratadas com a vincristina nas concentrações de 0,009 μM para 24 horas e 0,0007 μM para 72 horas e com as concentrações de 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de guaraná. A viabilidade celular foi avaliada pela redução de MTT a formazan, o teste de quantificação de DNA dupla fita livre no meio extracelular foi realizado pelo reagente PicoGreen, a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase seguiu protocolos anteriores, e o conteúdo total de tióis foi determinado numa reação dos grupos tióis com 5,5 ditióbis (ácido nitro-benzóico) (DTNB). Os resultados demonstraram que as concentrações mais elevadas do guaraná (100 $\mu\text{g/mL}$ e 300 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram efeito protetor no SNC, quando associadas ao uso da vincristina, em relação ao MTT e ao Pico Green®. Houve redução da atividade da SOD no cérebro de camundongos (24 e 72 horas) e aumento da atividade da catalase na presença de algumas concentrações de guaraná. As análises dos tióis não foram significativas. Conclui-se, que o guaraná tem ação protetora no SNC em determinadas concentrações, evitando assim a toxicidade produzida pelo fármaco vincristina neste tecido.

Palavras-chave: Camundongos. Guaraná. *In vitro*. Sistema nervoso central. Sobrevivência celular. Vincristina.

ABSTRACT

Guarana (*Paullinia cupana*) has recently been studied as a protector of the Central Nervous System. In contrast, vincristine is a widely used chemotherapeutic agent and its use is associated with signs of ataxia, peripheral neuropathy and aggression of the eighth nerve, among other disturbances. These symptoms suggest potential damage to the peripheral nervous system and central nervous system. The assessment of cell viability and enzymatic activity in cell cultures is an effective way to evaluate the toxicity of the drug, as well as the potential protective effect of guarana on these cells. Thus, the aim of this study was to evaluate the protective effect of guarana on cell viability and enzyme activity of the brain and cerebellum of mice cell culture treated with vincristine. Experimental research began with cell cultures in DMEM, properly treated with vincristine at concentrations of 0.009 mM for 24 hours and 0.0007 mM for 72 hours and at concentrations of 10, 30, 100 and 300 µg/mL of guarana extract. Cell viability was assessed by MTT formazan reduction. Quantification of DNA in the free extra cellular medium was carried out using double-sided tape and Pico Green reagent. Superoxide dismutase and catalase activity were in accordance with previous protocols and total thiol content was determined in the action of thiol groups with 5,5-dithiobis (nitro-benzoic acid; DTNB). The results of the MTT and Pico Green® tests showed that higher concentrations of guarana (100 µg/mL and 300 µg/mL) had a protective effect on the CNS, when associated with the use of vincristine. There was a decrease in SOD activity in mice brain (24 and 72 hours) and increased catalase activity in the presence of certain concentrations of guarana. Results for thiols were not significant. In conclusion, guarana was shown to have a protective effect on the CNS at certain concentrations, thus reducing the toxicity produced by the drug vincristine in this tissue.

Key-Words: Central nervous system. Cell survival. Guarana. *In vitro*. Mice. Vincristine.

INTRODUÇÃO

O sulfato de vincristina (SV) é o sal de um alcalóide obtido de uma planta florescente comum, a pervinca, utilizado largamente no tratamento de leucemias e linfomas. Seu uso pode produzir sintomas semelhantes ao da ataxia cerebelar sendo eles: alterações do equilíbrio através de danos vestibulares por agressão ao oitavo nervo craniano, tontura, nistagmo e vertigem. Com a administração contínua, tem sido relatada perda dos reflexos tendinosos profundos, pé caído, ataxia e paralisia. Podem ocorrer manifestações dos nervos cranianos, incluindo paresia isolada e/ou paralisia dos músculos controlados pelos nervos cranianos motores, na ausência de distúrbio motor. (ANVISA, 2008) Estes sintomas sugerem prováveis danos ao sistema nervoso periférico e ao sistema nervoso central.

Por outro lado, a crescente associação de alguns quimioterápicos com estresse oxidativo (EO), que é gerado por um desbalanço entre o sistema antioxidante e pró-oxidante, tem alertado as pesquisas para a busca de estratégias que visam a prevenção contra ação de radicais livres no tecido nervoso. Produtos naturais como o guaraná (*Paullinia cupana*), são fontes ricas em propriedades farmacológicas promissoras na inibição do processo oxidativo espontâneo devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos, principalmente os taninos (BASILE *et al.*, 2005; MAJHENIC, KERGET & KNEZ, 2007).

A alta concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerada pelo EO pode danificar muitas moléculas importantes para a homeostase do nosso organismo, como, as proteínas, os lipídios e o DNA. Como consequência disso, muitas comorbidades podem ser desenvolvidas pelo fato de alterar a viabilidade e funcionalidade celular.

O estudo de Wick *et al.* (2004), evidenciou que os quimioterápicos cisplatina, vincristina e topotecano reduziram a viabilidade celular (VC) de neurônios cerebelares. A VC é o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade em culturas *in vitro*, onde a toxicidade pode ser evidenciada com a técnica de redução do MTT a cristais de formazan por enzimas mitocondriais.

Dessa maneira, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor do guaraná na viabilidade celular e na atividade enzimática do cérebro e do cerebelo de camundongos tratados com vincristina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biogenômica do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), de forma que foram cultivadas células de cérebro e cerebelo de seis camundongos machos e saudáveis destinados a descarte.

Os cérebros e cerebelos obtidos foram isolados e macerados mecanicamente com o auxílio de lâminas em placa de *petri* contendo meio de cultivo celular *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM), com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) suplementado com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e 1% de antifúngico anfotericina B. Logo em seguida, o material foi filtrado e centrifugado, com posterior ressuspensão celular em meio de cultura e plaqueamento em placas estéreis de 24 poços. As células foram cultivadas por 24 horas em condições ideais de cultivo celular (37°C e 5% de saturação de CO₂) antes dos devidos tratamentos para estabilização do material.

Após o período de incubação inicial, as amostras foram devidamente tratadas com o SV nas concentrações de 0,009 µM para 24 horas e 0,0007 µM para 72 horas (WICK et.al., 2004) e as mesmas amostras expostas às concentrações de 10, 30, 100 e 300µg/mL de extrato de guaraná (*Paullinia cupana*). O EG foi produzido a partir do pó de guaraná em um extrato hidro-alcoólico, com base na pequena solubilidade de guaraná em pó a partir dos meios convencionais de álcool e água (70:30) a 100 ml de fluido de extração preparado a uma concentração de 300 mg / mL. Após 21 dias de extração, a preparação foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi isolado. (CARLSON & THOMPSON, 1988. FERREIRA & NOGUEIRA, 2000)As células foram expostas aos tratamentos 24 e 72 horas, posteriormente foram realizados testes experimentais para avaliação da VC, da taxa total de espécies reativas de oxigênio (EROS) e os possíveis danos proteicos.

Assim, os dois grupos de estudo foram identificados conforme a concentração do EG)em 10, 30, 100 e 300µg/mL, e ainda, os grupos que receberam o SV possuem a legenda 10 + V, 30 + V, 100 + V, 300 + V e V. Sendo V o correspondente a concentração do SV para 24 e 72 horas.

Para avaliação do efeito dos tratamentos sob a viabilidade das células de cérebro e cerebelo de camundongos, foi realizado o ensaio MTT, conforme Dave e colaboradores (2012), baseando-se no uso do reagente 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-

2,5-diphenyl tetraoliumbromide (MTT), o qual é reduzido enzimaticamente a nível mitocondrial a cristais de formazan de coloração azul-violácea. Dessa forma, quanto maior a viabilidade celular, maior é a absorvância adquirida a 560nm

Além disso, foi também efetivado o teste de quantificação de DNA dupla fita livre no meio extracelular, utilizando o reagente PicoGreen®, conforme Ahn e colaboradores (1996), o qual é um corante fluorescente que possui alta afinidade pelo DNA dupla fita. Logo, quanto maior a fluorescência obtida, maior o índice de morte celular, caracterizado pelo rompimento de membranas e liberação do DNA dupla fita ao meio que as contém.

A atividade da catalase (CAT) foi dosada utilizando o método de Aebi (1984). A mistura de reação consistiu em 50 mM de tampão fosfato de pH 7,0 e peróxido de hidrogenio 30 mM. A cultura celular foi diluída em concentração 1:20, preparado pela adição de 50 mM de tampão de fosfato de pH 7,0, imediatamente antes de executar o ensaio da enzima. A reação foi, então, iniciada por adição de 1 ml de H₂O₂ a 30 mM. A absorvância foi medida a um comprimento de onda de 240 nm, e a unidade da enzima CAT foi definida como a quantidade de enzima que liberta a metade do oxigenio a partir da solução de peróxido de H₂O₂ durante 30 segundos à temperatura ambiente. A atividade da enzima foi expressa em unidades por mg de proteína (U / mg de Hb ou mg de proteína). A proteína no citosol da cultura de células foi determinada utilizando o método de Bradford (1976).

Atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida por um ensaio indireto baseado na reação competitiva entre SOD e cloreto nitrobluetetrazolium (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A taxa de aumento na absorvância a 560 nm indica a redução de cloreto de azul de formazan nitrobluetetrazolium por superóxido, que são gerados pelo sistema de oxidase de xantina. A reação enzimática foi iniciada pela adição de xantina oxidase. A atividade da enzima foi expressa em unidades por mg de proteína (U / mg de Hb ou mg de proteína) (SPITZ & OBERLEY, 1989)

O conteúdo total de tióis (TT) foi determinado numa reação dos grupos tióis com 5,5 ditióbis (ácido nitro-benzóico) (DTNB), gerando um derivado de coloração amarela. A leitura do conteúdo de tióis foi realizada em um espectrofotômetro, com comprimento de onda de 412 nm e expressa em DTNB/mg de proteína (AKSENOV & MARKESBERIA, 2001).

Os dados foram normalmente distribuídos e os tratamentos foram expressos como percentagem (%) do grupo de controle. Portanto, os dados foram submetidos

a uma análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos. A experiência foi realizada em quintuplicado e os resultados são expressos como a média e desvio padrão. Os testes estatísticos foram realizados utilizando Graph Pad Prism Software.

RESULTADOS

Nas análises da cultura celular após incubação por 24 horas, identificou-se valores elevados de viabilidade celular observado pelo teste do MTT, nas células cerebrais expostas ao EG, nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$), em comparação com o controle negativo. Já no cerebelo dos camundongos, houve um aumento da VC nas seguintes concentrações: 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,01$), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$), quando comparadas ao controle negativo. Quando associadas ao SV, as concentrações 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostraram um aumento significativo na viabilidade celular tanto no cérebro quanto no cerebelo (**Figura 1**).

Em 72 horas, a VC apresentou-se elevada no cerebelo, na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$) e no cérebro em todas as concentrações testadas, 10, 30, 100 e 300 ($p < 0,001$), em relação ao controle negativo. Na associação do EG com o SV, houve diferença significativa no cérebro nas seguintes concentrações: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$) e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$), já no cerebelo o mesmo foi encontrado apenas para a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$) (**Figura 2**).

Ao avaliarmos o ensaio do PicoGreen nas culturas de 24 horas, foram encontrados resultados significativos no cérebro nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$) no meio extracelular. Já no cerebelo o mesmo ocorreu nas concentrações de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,05$), 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$) e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,01$). O EG associado ao SV apresentou resultados significativos nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o cérebro e o cerebelo, mostrando um decréscimo de dsDNA no meio extracelular (**Figura 3**).

Em 72 horas, o EG reduziu os valores de Pico Green nas concentrações de 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no cérebro e no cerebelo ($p < 0,001$). Na associação do EG com O SV na amostra de cérebro pode-se observar que na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ houve aumento de dsDNA ($p < 0,001$) e na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,001$), redução dos valores. No cerebelo, na concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, houve redução do Pico Green (**Figura 4**).

O EG elevou a enzima CAT na concentração 100 µg/mL no cérebro ($p < 0,001$), e esta apresentou-se diminuída em todas as concentrações do EG no cerebelo ($p < 0,001$), em 24 horas. Os resultados em 72 horas para o cerebelo indicaram que a CAT assumiu valores elevados nas concentrações 30 e 100 µg/mL do EG, quando associadas ao SV ($p < 0,001$) (**Figuras 5 e 6**).

Houve diminuição da enzima SOD na cultura células do cérebro de camundongos, quando expostos ao EG nas concentrações 10, 30, 100 e 300 µg/mL ($p < 0,001$) em 24 horas, e nas mesmas concentrações do EG, associado ao SV, em 72 horas (**Figura 7**).

Nas análises dos tióis não houve resultados significativamente importantes (**Figuras 8 e 9**).

DISCUSSÃO

Os estudos em Fisioterapia tinham até pouco tempo a intenção de desvendar e propor terapias aos distúrbios secundários de equilíbrio produzidos pelos proprioceptores, que são receptores de movimento e posição localizados na periferia do organismo. Ficavam escassos, porém, os estudos dos componentes centrais do equilíbrio corporal: córtex cerebral, cerebelo, tálamo, aparelho vestibular (cóclea e labirinto). Com a aproximação cada vez mais frequente do Fisioterapeuta com o campo da Reabilitação Vestibular, o estudo e a preocupação com o controle do sistema nervoso central tomaram maior significado, tanto na identificação dos fatores lesivos, quanto nas propostas terapêuticas.

Os alcalóides de vinca como a vincristina induzem citotoxicidade pela interação com a tubulina. Os efeitos bioquímicos e biológicos sobre microtúbulos incluem competição pelo transporte intracelular de aminoácidos, inibição da purina, da síntese de proteínas de RNA e DNA, ruptura lipídica da membrana celular. (CHABNER & LONGO, 2005). Broyl *et al.* (2010), encontraram interação entre fatores genéticos relacionados com o câncer (mieloma) e o desenvolvimento de neuropatia periférica induzida por tratamento com vincristina.

A perturbação destas vias bioquímicas acaba por mediar a polineuropatia sensitivo-motora periférica, um efeito colateral dose-limitante da vincristina. Os efeitos neurotóxicos do SV incluem o bloqueio do transporte de axônio e degradação axonal subsequente (MOORE & PINKERTON, 2009).

Segundo Thibault *et al.* (2013), as camadas profundas da medula espinhal (III-IV), aumentaram sua atividade neuronal, tanto na ausência de estimulação periférica e, como resultado de estímulos mecânicos táteis após a vincristina, processo que estaria relacionado à dor neuropática. Outras investigações realizadas, utilizando a tecnologia de microensaios de DNA, descreveram um grande número de genes diferencialmente expressos em gânglios da raiz dorsal e no corno dorsal da medula após o tratamento com SV.

Outro estudo sobre neuropatia e alterações do SNC também relatou neuropatia periférica associada ao SV em dois dos oito pacientes estudados, referindo ainda que a hidrocefalia pode ser um problema associado à mudanças sutis da função neurológica (ALLEN *et al.*, 2010).

Embora Rodaski e Nardi (2006), relatem que o SV não apresenta uma boa penetração no SNC, o estudo de coorte de Deng *et al.* (2013), com 294 pacientes tratados com ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona, verificou que 19 (6,5%) dos sujeitos apresentaram envolvimento do SNC, e quatro pacientes (21,1%) desenvolveram doença do SNC 2 anos após o diagnóstico inicial. Também foi observado por Wick *et al.* (2004), que o topotecano, a cisplatina e a vincristina induziram morte celular em uma cultura de células granulares do cerebelo. Um dos mecanismos estabelecidos é a clivagem das caspases 3 e 9, bem como condensação da cromatina e encolhimento do núcleo.

Pelo fato de as células neuronais estarem vulneráveis a agentes estressantes e oxidantes, a investigação de substâncias protetoras é essencial. Assim, foi observado no trabalho de Bittencourt *et al.* (2013), em que o guaraná, um potente antioxidante, quando testado como protetor de fibroblastos expostos ao sódio nitroprussiato, reverteu a toxicidade deste, principalmente em baixas concentrações (<5 mg), o que diminuiu a mortalidade celular, LPO, danos ao DNA e EO celular, bem como o aumento dos níveis de SOD. Estes resultados demonstram que o guaraná, tem um efeito protetor sobre metabolismo em situações de EO elevados (BITTENCOURT *et al.*, 2013).

Já no trabalho do Fukumasu *et al.* (2006) foi analisado que em ratos, o EG, associado à N-nitrosodietilamina (DEN), apresentou um efeito de menor intensidade de fluorescência no ensaio cometa, ou seja, menor efeito genotóxico, quando comparada com o grupo de apenas DEN, e dessa maneira, mostrou-se como protetor do DNA em fígado de ratos (FUKUMASU *et al.*, 2006).

Nesse trabalho, os resultados indicaram um comprometimento das funções celulares neuronais normais em consequência da exposição ao SV e em determinadas concentrações do EG, pelo fato de ter ocorrido uma alteração da atividade das enzimas antioxidantes, redução da VC e aumento dos níveis de produção de EROs. No entanto, foi observado um efeito protetor do EG quando associado ao SV, pelo fato de ter revertido os efeitos danosos causados pelo fármaco.

Isso pode ser confirmado pela análise do teste do MTT, onde foram constatados aumentos da VC dose dependente tanto pelo uso isolado do EG quanto pela associação com o SV, o que mostra o seu efeito protetor. Tanto no cérebro quanto no cerebelo, as maiores taxas de viabilidade foram encontradas nas concentrações mais altas de guaraná (100 e 300 µg/mL), o mesmo ocorre na associação com o fármaco (Figuras 1 e 2).

Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira *et al.* (2013), quando testaram o guaraná como protetor do SNC, em adição da rotenona, um inseticida que, ao ser administrada em ratos, causa sintomas semelhantes ao Mal de Parkinson. Os resultados mostraram que a adição do EG aumentou significativamente a VC das células neuronais tratadas com rotenona, de uma forma dependente da dose.

O mesmo efeito protetor do EG pode ser observado nessa pesquisa através de teste do Pico Green, pois houve uma diminuição significativa do dsDNA, o que indica redução da apoptose, no meio extracelular nas concentrações de 100 e 300 µg/mL do guaraná em associação com a vincristina, quando comparado com o tratamento apenas com o fármaco. Porém, no cérebro e no cerebelo em 24 horas houve um aumento da concentração de dsDNA encontrada no meio extracelular, principalmente nas maiores concentrações do EG (Figuras 3 e 4).

Isso indica um efeito pró-oxidante do EG, quando usado isoladamente, pelo fato de que em altas concentrações possa ocorrer um desbalanço no sistema redutor, provocado pela alta concentração de antioxidantes, o que pode acarretar na inibição da proliferação celular por prevenir o estado transitório de oxidação e diminuir a adaptação ao estresse oxidativo EO. Pode ainda reduzir metais de transição livres que se tornam eficientes catalisadores do EO (FENECH, 2002). Já em associação ao fármaco SV, esse resultado não é encontrado, pois o nível de EO

está mais alto e o guaraná se liga a essas substâncias nocivas e não a moléculas importantes da célula.

As enzimas antioxidantes são as defesas naturais do organismo contra excessos de EROs. O EG pode atuar como uma *SODlike*, conforme resultados encontrados no trabalho de Suleiman (2013). Além do mais, foi verificado que em exposição ao guaraná houve uma redução da atividade da SOD no cérebro de camundongos, após incubações por 24 e 72 horas. (Figura 7) Já com relação a atividade da CAT, que atua removendo excesso de peróxido de hidrogênio, identificou-se aumento da atividade desta enzima em presença de algumas concentrações de EG, porém estes dados não foram conclusivos. (Figuras 5 e 6)

Ao avaliarmos os Tióis, que são indicadores indiretos da atividade da enzima glutathione peroxidase, não foram encontradas diferenças significativas (Figuras 8 e 9).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados nesse trabalho, podemos concluir que o sulfato de vincristina pode causar efeitos citotóxicos em cerebelo e cérebro de camundongos, ficando sua toxicidade evidente em todas as análises realizadas. Por outro lado, o extrato de guaraná não potencializa a oxidação celular, ao contrário, protege a célula contra os efeitos nocivos da vincristina, podendo reverter a citotoxicidade gerada pela vincristina em determinadas concentrações, principalmente nas de 100 e 300 µg/mL, onde constatamos o melhor efeito antioxidante do extrato de guaraná. Porém, alguns resultados ficaram inconclusivos quanto ao efeito dose-dependente, parecendo em alguns momentos não seguir um efeito gradual e ordenado de proteção, por isso há sugestão de estudos focados em determinação de doses terapêuticas do guaraná.

Esta ação protetora do extrato de guaraná ocorreu tanto para células do cérebro quanto para o cerebelo, parecendo ser mais efetiva no cérebro e nas primeiras exposições (24 horas).

Essas conclusões nos trazem indícios de que o guaraná pode ser associado ao uso deste quimioterápico, vincristina, para minimizar seus efeitos indesejáveis no sistema nervoso central, podendo ser um importante composto na terapia

preventiva, principalmente do que diz respeito aos efeitos neurológicos relacionados ao equilíbrio corporal.

ANEXOS

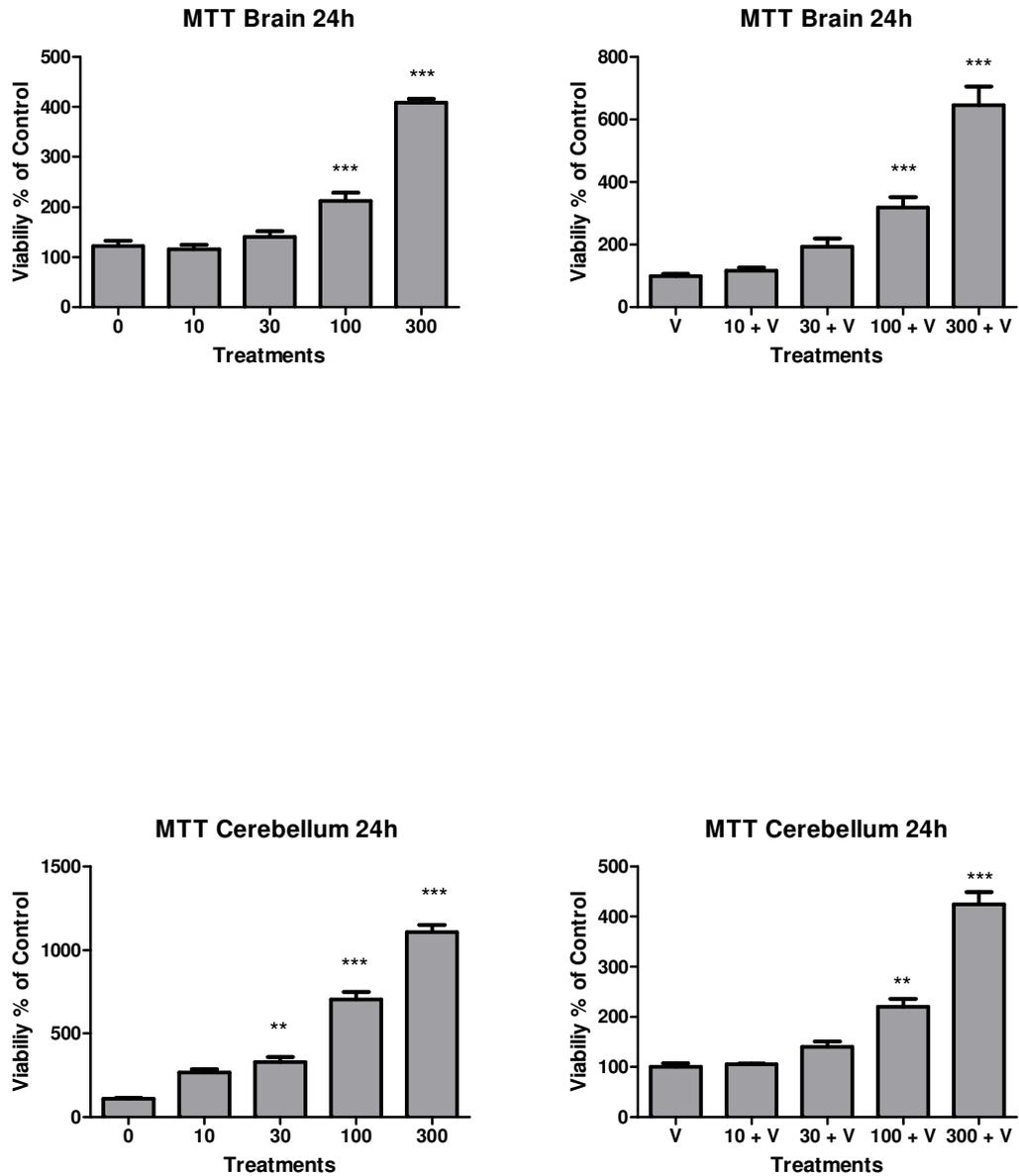


Figura 1 – Resultados do MTT nas culturas de cérebro e cerebelo em 24 horas, para o extrato de guaraná isolado e em associação com o sulfato de vincristina. Unidades de concentração $\mu\text{g/mL}$.

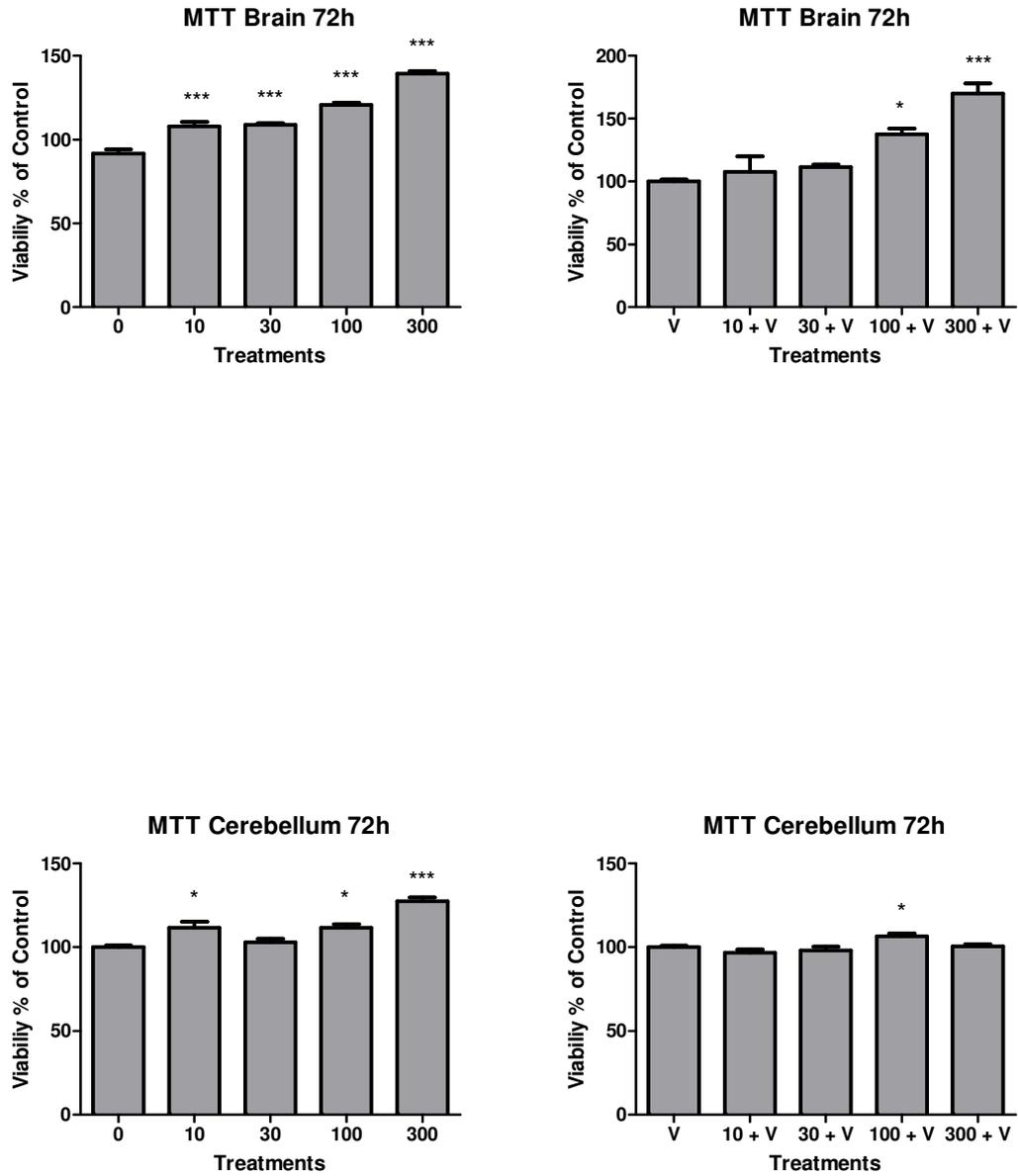


Figura 2 – Resultados do MTT nas culturas de cérebro e cerebelo em 72 horas, para o extrato de guaraná isolado e em associação com o sulfato de vincristina. Unidades de concentração µg/mL.

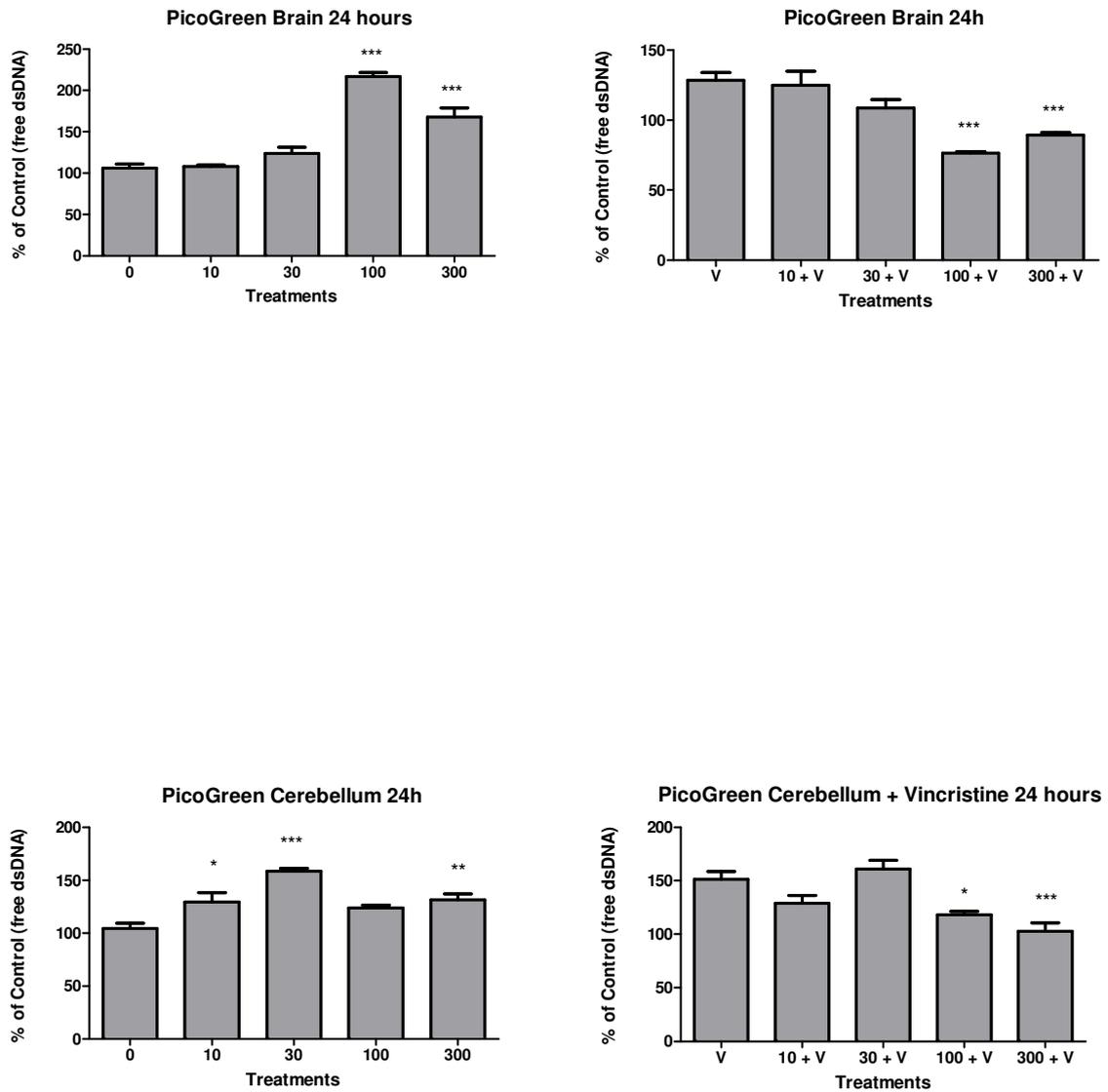


Figura 3 – Resultados do PicoGreen® nas culturas de cérebro e cerebelo em 24 horas, para o extrato de guaraná isolado e em associação com o sulfato de vincristina. Unidades de concentração $\mu\text{g}/\text{mL}$.

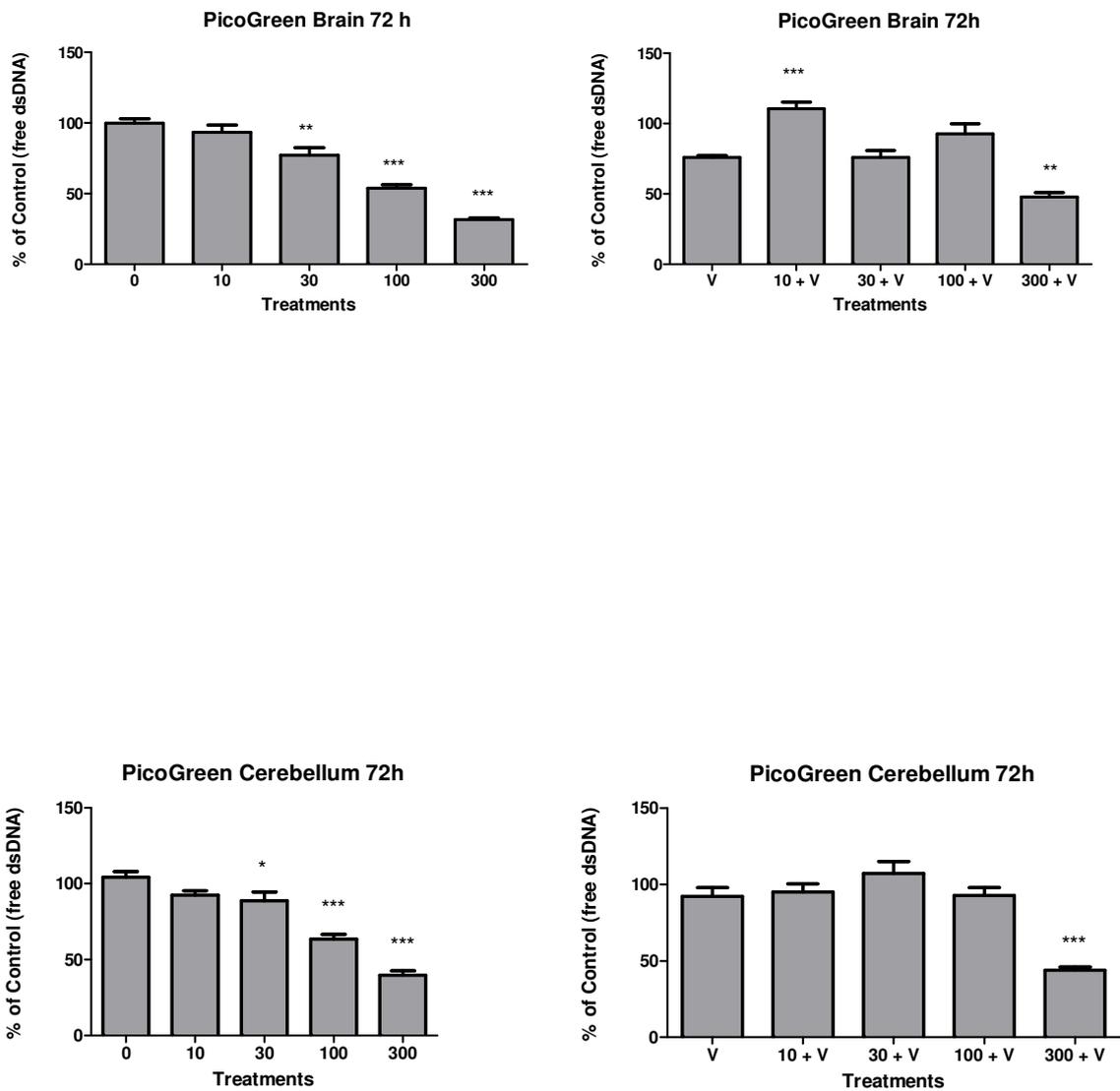


Figura 4 – Resultados do PicoGreen® nas culturas de cérebro e cerebelo em 72 horas, para o extrato de guaraná isolado e em associação com o sulfato de vincristina. Unidades de concentração µg/mL.

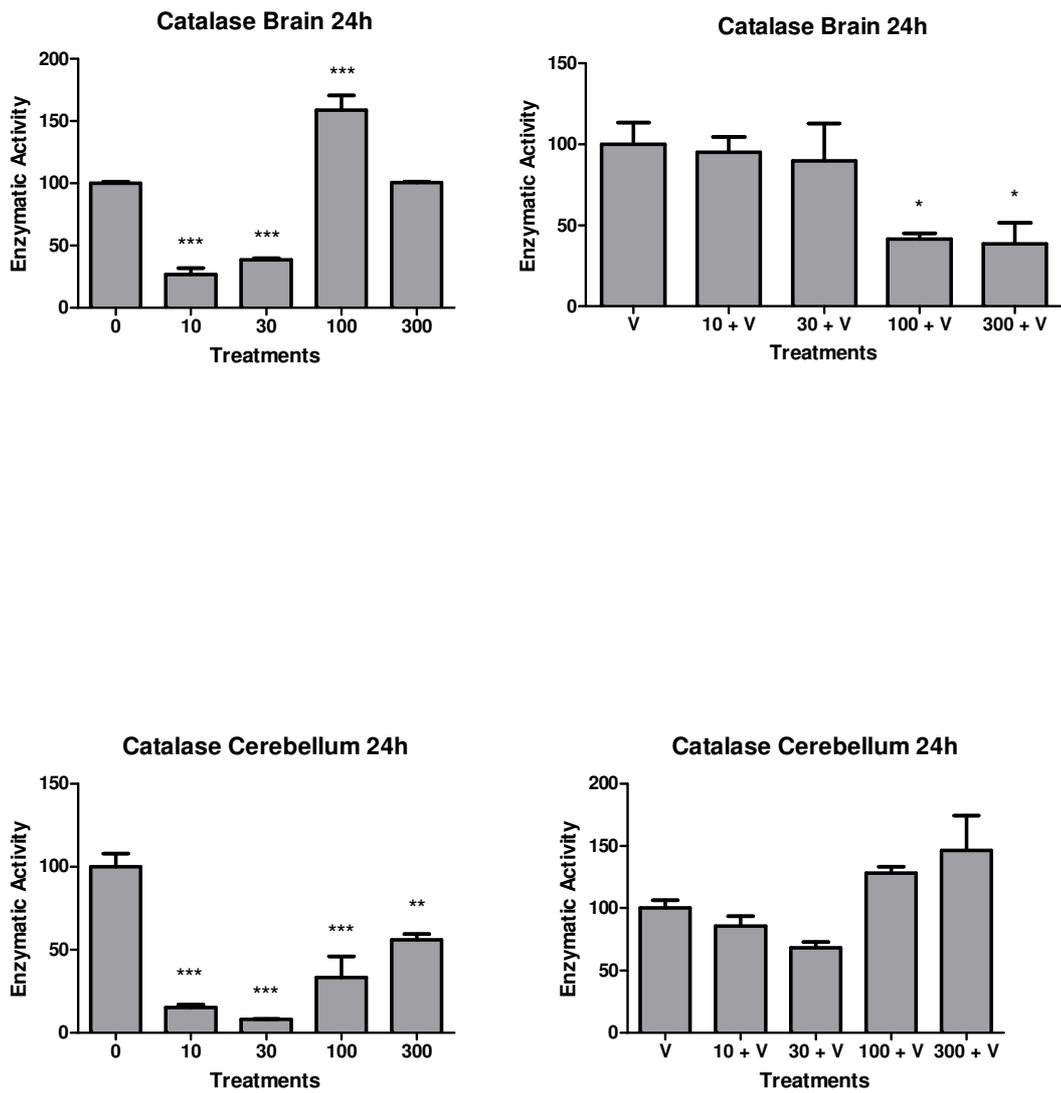


Figura 5 – Resultados da catalase nas culturas de cérebro e cerebelo em 24 horas.

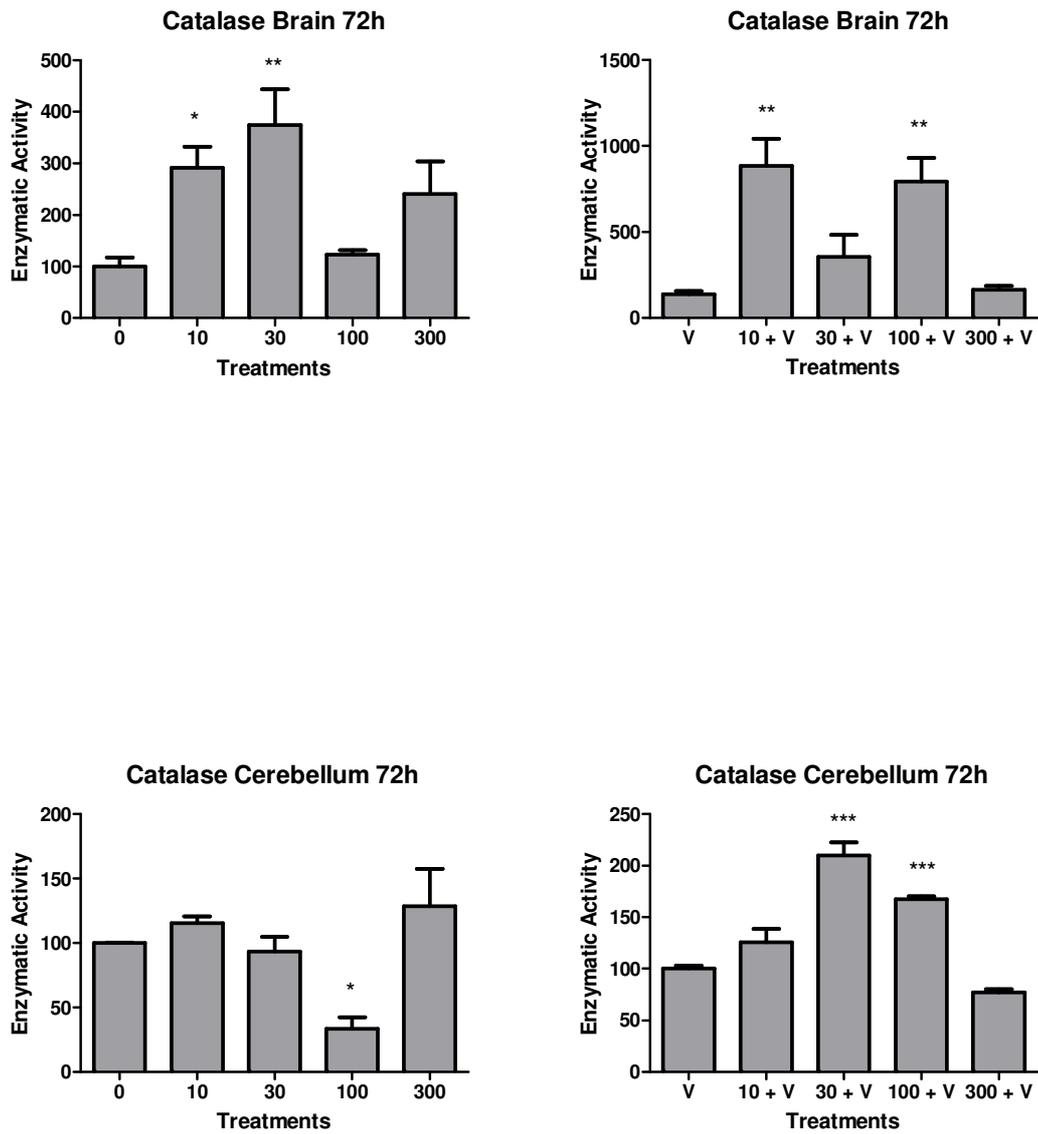


Figura 6 – Resultados da catalase nas culturas de cérebro e cerebelo em 72 horas.

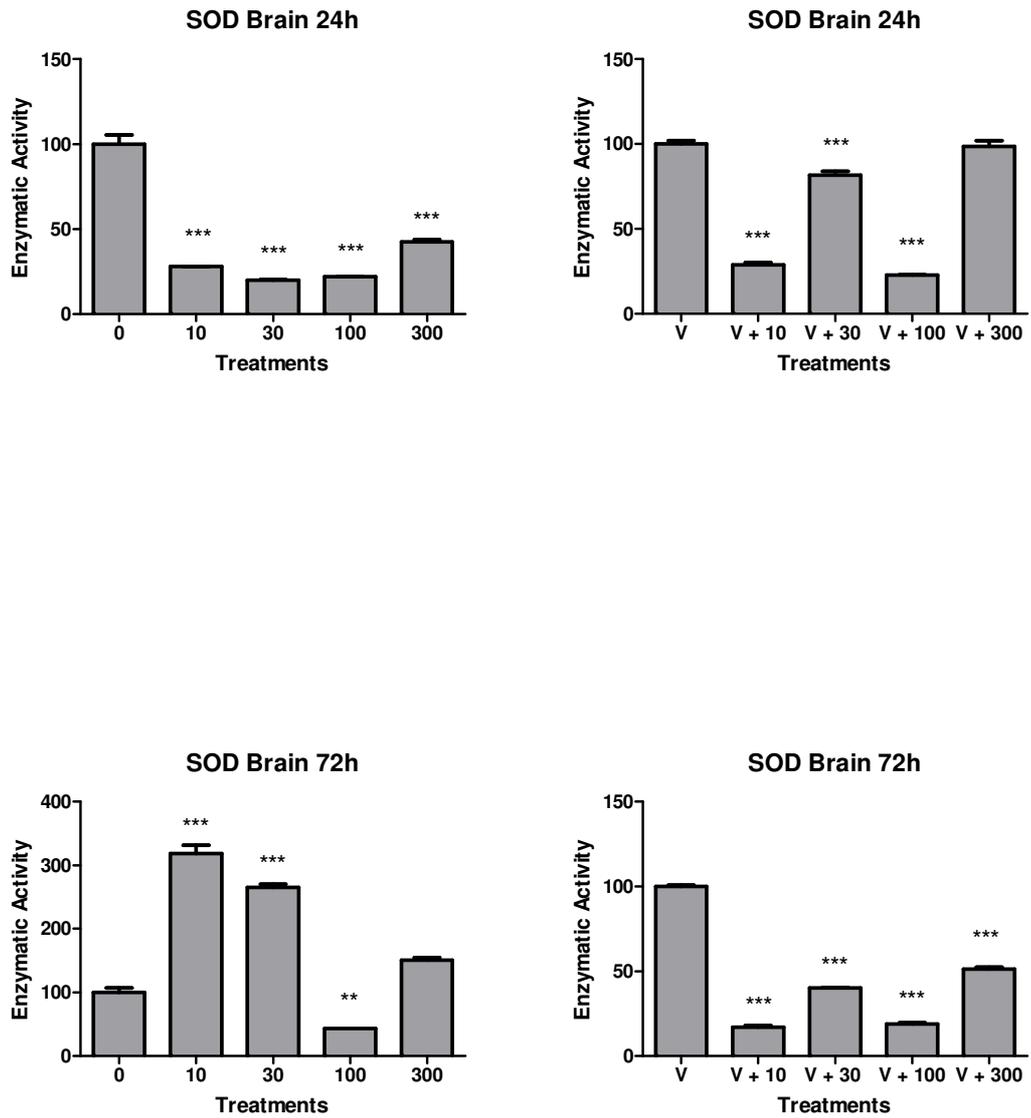


Figura 7 – Resultados da SOD na cultura de cérebro em 24 e 72 horas, para o extrato de guaraná isolado e em associação com o sulfato de vincristina. Unidades de concentração µg/mL.

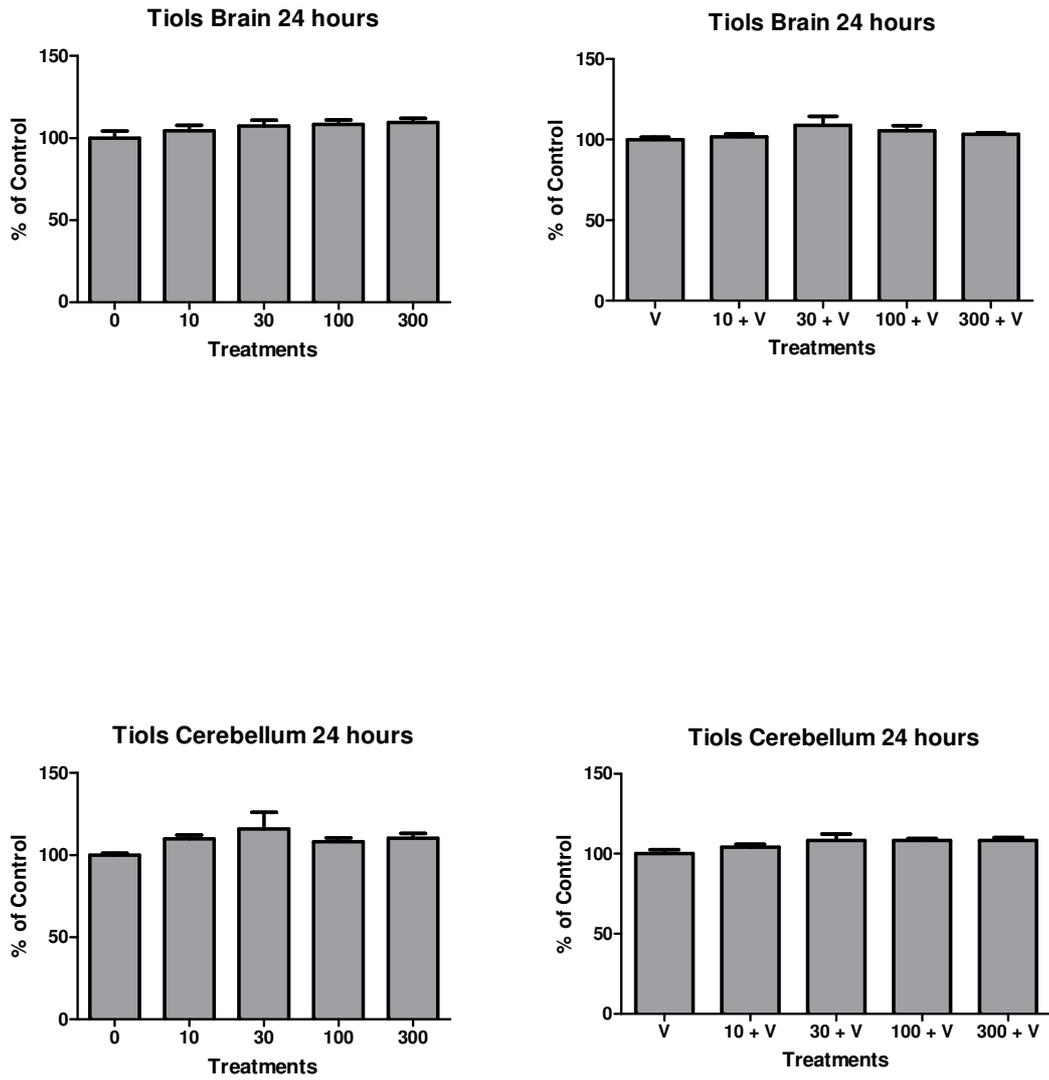


Figura 8 – Resultados dos tíols nas culturas de cérebro e cerebelo em 24 horas, para o extrato de guaraná isolado e em associação com o sulfato de vincristina. Unidades de concentração $\mu\text{g/mL}$.

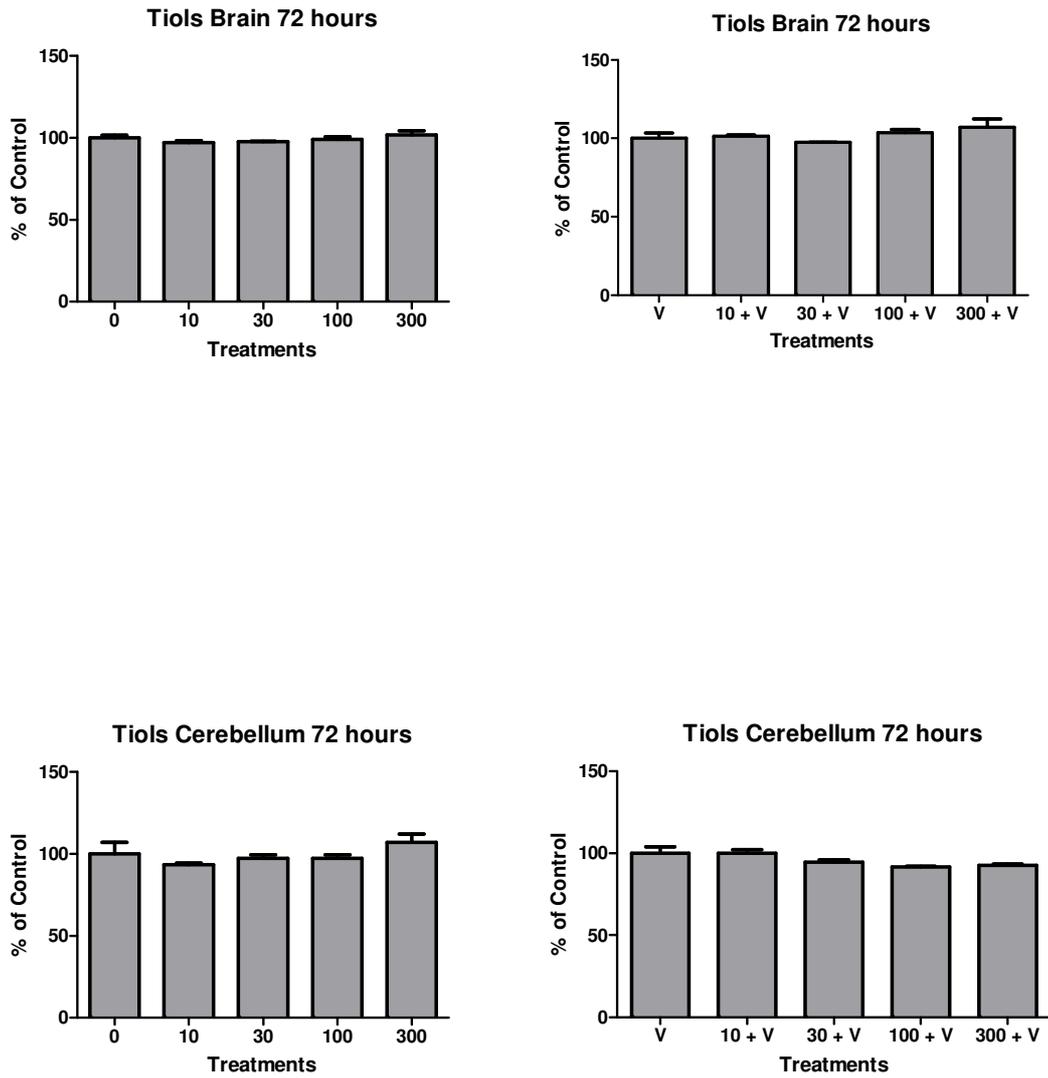


Figura 9 – Resultados dos tióis nas culturas de cérebro e cerebelo em 72 horas, para o extrato de guaraná isolado e em associação com o sulfato de vincristina. Unidades de concentração $\mu\text{g/mL}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol.** 1984; 105:121-126.

AHN, S. J.; COSTA, J.; EMANUEL, J. R. Pico Green quantification of DNA: effective evaluation of samples pré- or post-PCR. **Nucleic Acid Res.** 1996; 24:2623-2625.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett.** 2001; 302:141-145.

ALLEN, C. E.; FLORES, R.; RAUCH, R.; DAUSER, R.; MURRAY, J. C.; PUCCHETTI, D.; *et al.* Neurodegenerative central nervous system Langerhans cell histiocytosis and coincident hydrocephalus treated with Vincristine/cytosine arabinoside. **Pediatr Blood Cancer.** 2010; 54(3): 416–423.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25283-1-0\]](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25283-1-0]). PDF Acesso em maio de 2012.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELED, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol.** 2005; 102: 32-36.

BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E.; *et al.* The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chem Toxicol.** 2013; 53: 119–125.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 1976; 72:248–254.

BROYL, A.; CORTHALS, J. L. M.; JONGEN, B.; VAN DER HOLT, B.; KUIPER, R.; DE KNEGT, Y.; *et al.* Mechanisms of peripheral neuropathy associated with bortezomib and Vincristine in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a prospective analysis of data from the HOVON-65/GMMG-HD4 trial. **Lancet Oncol.** 2010; 11(11): 1057–1065.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxantines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **J. AOAC Int.** 1988; 81:691-701.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice.** 4. ed. Walters Kluwer, 2005.

DAVE, S.; NADAL, J. K.; NANDURI, R.; DKHAR, H. K.; KUMAR, A.; GUPTA, P. Inhibition of Adipogenesis and Induction of Apoptosis and Lipolysis by Stem Bromelain in 3T3-L1 Adipocytes. **PlosOne.** 2012; 7: 1-12.

DENG, L.; SONG, Y.; ZHU, J.; ZHENG, W.; WANG, X.; XIE, Y.; et.al. Secondary central nervous system involvement in 599 patients with diffuse large B-cell lymphoma: are there any changes in the rituximab era? **Int. J. Hematol.** 2013; 98 (6): 664-671.

FENECH, M. Micronutrients and genomic stability: a new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). **Food Chem Toxicol.** 2002; 40(8):1113-1117.

FERREIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry. **Talanta.** 2000; 51:1–6.

MAJHENIC, L.; KERGET, M. S.; KNEZ, Z. E. Antioxidant and antimicrobial activity for guarana seed extract. **Food Chem Toxicol.** 2007; 104:1258-1268.

MOORE, A.; PINKERTON, R. Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? **Pediatr Blood Cancer.** 2009; 53(7):1180–1187.

OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; GALEANO, P.; ROMERO, J. I.; HOLUBIEC, M. I.; BADORREY, M. S.; CAPANI, F.; ALVAREZ, L. D. Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. **Hum Exp Toxicol.** 2011; 30(9):1382-1391.

RODASKI, S.; NARDI, A. B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos.** 2. ed. Curitiba: Bio Editora, 2006. 308p

SPITZ, D. R.; OBERLEY, L. W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Anal Biochem.** 1989; 179:8-18.

SULEIMAN, L. A. M. **Estudo Clínico, Randomizado, Controlado por Placebo do Efeito da Suplementação de Guaraná em Marcadores Bioquímicos Associados à Aterosclerose.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

THIBAUT, K.; RIVALS, I.; M'DAHOMA, S.; DUBACQ, S.; PEZET, S.; CALVINO B. Structural and molecular alterations of primary afferent fibres in the spinal dorsal horn in Vincristine-induced neuropathy in rat. **J Mol Neurosci.** 2013; 51(3):880-892.

WICK, A.; WICK, W.; HIRRLINGER, J.; GERHARDT, E.; DRINGEN, R.; DICHGANS, J.; et al. Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: *in vitro* paradigm of differential neurotoxicity. **J Neurochem.** 2004; 91:1067–1074.

4 ARTIGO 2

METABOLISMO OXIDATIVO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS EM CULTURA CELULAR TRATADA COM VINCRISTINA E GUARANÁ

Oxidative Metabolism of Central Nervous System of mice in cell culture treated with Vincristine and guarana

Carolina Fantinel Veloso¹, Alencar Kolinski Machado², Francine Carla Cadoná³,
Veronica F Azzolin⁴, Ivana Beatrice Manica da Cruz⁵ e Aron Ferreira da Silveira⁶.

¹ Fisioterapeuta. Mestranda do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, Brasil. carolveloso_fisio@yahoo.com.br

²Biomédico. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. alencarkolinski@yahoo.com.br

³Bióloga. Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, Brasil. fran.cine.bio@hotmail.com

⁴Biomédica pelo Instituto Cenecista de Ensino Superior de Santo Ângelo. azzolinveronica@hotmail.com

⁵Bióloga. Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pós-doutora pela University of California, Davis-USA. ibmcruz@hotmail.com

⁶Médico Veterinário. Professor-Doutor Titular do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria e orientador do Programa de Pós-graduação em Distúrbios da Comunicação Humana da UFSM. Santa Maria – RS, Brasil. aronfer@gmail.com

Dados do Responsável:

Carolina Fantinel Veloso

Endereço: Travessa Medianeira, 41/306. Bairro: Nossa Senhora da Medianeira
Santa Maria – RS. CEP: 97015-050

Telefone: 55- 91351218

E-mail: caroveloso_fisio@yahoo.com.br

Fonte de auxílio: CAPES

Declaro não existir conflito de interesse neste manuscrito.

RESUMO

A peroxidação lipídica é considerada um evento fisiopatológico importante na toxicidade por fármacos, principalmente nos antineoplásicos como a vincristina. Produtos naturais como o guaraná (*Paullinia cupana*), são fontes ricas em propriedades farmacológicas promissoras na inibição do processo oxidativo espontâneo. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o metabolismo oxidativo do cérebro e cerebelo de camundongos tratados com guaraná e vincristina em cultura de células *in vitro*. A pesquisa experimental iniciou com as culturas de células em meio DMEM, devidamente tratadas com a vincristina nas concentrações de 0,009 μM para 24 horas e 0,0007 μM para 72 horas e com as concentrações de 10, 30, 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de guaraná. Os danos oxidativos em lipídios foram determinados a partir da formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido barbitúrico (TBARS), os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonilas baseados na reação com dinitrofenilhidrazina, e o teste da diclorofluoresceínadiacetato (DCFH-DA) foi realizado com o objetivo de ponderar a taxa total de EROs nos tratamentos. Os resultados indicaram o mesmo efeito do guaraná nos três testes: apresentou efeito pró-oxidante em determinadas concentrações, porém quando utilizado em associação com a vincristina promoveu a proteção celular. Portanto, conclui-se que o guaraná em conjunto com a vincristina não potencializa os efeitos nocivos às células, apresenta efeito hormese e reduz a produção de EROs, lipoperoxidação e oxidação de proteínas tanto no cérebro quando no cerebelo.

Palavras-chave: Camundongos. Estresse oxidativo. Guaraná. *In vitro*. Sistema nervoso central. Vincristina.

ABSTRACT

Lipid peroxidation is considered an important pathophysiological event in the toxicity of drugs, especially anticancerous agents such as vincristine. On the other hand, natural products such as guarana (*Paullinia cupana*) are often rich sources of pharmacological properties that can inhibit spontaneous oxidation. The objective of this study was to evaluate the oxidative metabolism of the brain and cerebellum of mice treated with guarana and vincristine using cultured cells *in vitro*. Experimental research began with cell cultures in DMEM, properly treated with vincristine at concentrations of 0.009 mM for 24 hours and 0.0007 mM for 72 hours and concentrations of 10, 30, 100 and 300 mg/ml of guarana extract. Oxidative damage in lipids were determined from the formation of reactive substances upon heating of barbituric acid (TBARS). Oxidative damage to proteins was measured by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine, and the test of dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA) was conducted in order to examine the overall rate of ROS in the treatments. The results showed the same effect of guarana in three tests: a pro-oxidant effect was shown at certain concentrations, but when used in combination with vincristine cellular protection was stimulated. Therefore, it was concluded that guarana in conjunction with vincristine did not induce adverse effects to the cells, but rather presented a hormesis effect and reduced the production of ROS, oxidation and peroxidation of proteins in the brain and cerebellum.

Key-words: Central nervous system. Guarana. *In vitro*. Mice. Oxidative stress. Vincristine.

INTRODUÇÃO

O quimioterápico vincristina e a longa exposição dos pacientes a este medicamento durante o tratamento pode causar distúrbios no Sistema Nervoso Central (SNC). As pesquisas ainda são escassas, mas em animais, houve aumento de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) no tecido cerebral de ratos expostos à vincristina, indicando associação do quimioterápico com estresse oxidativo (MARTINS *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo (EO), o qual é caracterizado pelo aumento da produção de oxidantes e/ou diminuição dos níveis de defesas antioxidantes, é um importante processo que tem sido relacionado à patogênese de algumas condições que afetam o SNC, tais como epilepsia, esclerose múltipla, demência e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (HALLIWELL, 2006; MANCUSO *et al.*, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Dessa maneira, as condições que afetam o SNC podem determinar desequilíbrios, tremores, falta de controle muscular, e assim prejudicar o equilíbrio corporal.

A LPO é considerada um evento fisiopatológico importante na toxicidade por fármacos, com os antineoplásicos, em diversas doenças, e em danos isquêmicos e traumáticos (BRAUGHLER *et al.*, 1987). O SNC é um tecido que possui inúmeras membranas e ácidos graxos, o que aumenta a vulnerabilidade dos constituintes da membrana lipídica aos danos oxidativos e a ação direta dos radicais livres. (VEDDER *et al.*, 1999).

Produtos naturais como o guaraná (*Paullinia cupana*), são fontes ricas em propriedades farmacológicas promissoras na inibição do processo oxidativo espontâneo (BASILE *et al.*, 2005; MAJHENIC, KERGET & KNEZ, 2007).

Sabe-se também que quimioterápicos de diferentes classes, especialmente aqueles que cruzam a barreira hematoencefálica estão associados com relevante neurotoxicidade (PELS *et al.*, 2003). Embora Rodaski & Nardi (2006), relatem que o sulfato de vincristina (SV) não apresenta uma boa penetração no SNC, o estudo de coorte de Deng *et al.* (2013), mostrou que pacientes que fizeram uso do SV apresentaram distúrbios do SNC após a quimioterapia.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o metabolismo oxidativo do cérebro e cerebelo de camundongos tratados com guaraná e vincristina em cultura de células *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado no Laboratório de Biogenômica do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), de forma que foram cultivadas células de cérebro e cerebelo de seis camundongos machos e saudáveis destinados a descarte.

Os cérebros e cerebelos obtidos foram isolados e macerados mecanicamente com o auxílio de lâminas em placa de *petri* contendo meio de cultivo celular *Dulbecco's modified eagle's medium* (DMEM), com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) suplementado com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e 1% de antifúngico anfotericina B. Logo em seguida, o material foi filtrado e centrifugado, com posterior ressuspensão celular em meio de cultura e plaqueamento em placas estéreis de 24 poços. As células foram cultivadas por 24 horas em condições ideais de cultivo celular (37°C e 5% de saturação de CO₂) antes dos devidos tratamentos para estabilização do material.

O extrato de guaraná (EG) foi produzido a partir do pó de guaraná em um extrato hidro - alcoólico, com base na pequena solubilidade de guaraná em pó a partir dos meios convencionais de álcool e água (70:30) a 100 ml de fluido de extração preparado a uma concentração de 300 mg/mL. Após 21 dias de extração, a preparação foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi isolado (CARLSON & THOMPSON, 1988; FERREIRA & NOGUEIRA, 2000). As células foram expostas aos tratamentos 24 e 72 horas, posteriormente foram realizados testes experimentais para avaliação da viabilidade celular (VC), da taxa total de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os possíveis danos proteicos.

Assim, os dois grupos de estudo foram identificados conforme a concentração do EG em 10, 30, 100 e 300µg/mL, e ainda, os grupos que receberam o SV possuem a legenda 10 + V, 30 + V, 100 + V, 300 + V e V. Sendo V o correspondente a concentração do SV para 24 e 72 horas.

Após incubação dos grupos EG e EG associado ao SV, as amostras de cérebro e cerebelo foram submetidas a testes experimentais para avaliação da viabilidade celular, da taxa total de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os possíveis danos proteicos.

Com o objetivo de ponderar a taxa total de EROs nos devidos tratamentos, foi realizado o teste da diclorofluoresceínadiacetato (DCFH-DA), conforme Esposti *et al.*

(2002). Tal metodologia baseia-se na desacetilação do reagente via enzimas celulares esterases, formando a substância diclorodihidrofluoresceína (produto não fluorescente), que por sua vez, quando em contato com EROs, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), emite fluorescência no comprimento de onda de emissão de 525nm e quando excitada a 488nm.

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação de grupos carbonilas baseados na reação com dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonila foi determinado espectrofotometricamente (370nm), usando um coeficiente de 22.000 Molar⁻¹, e expresso em nmol/mg de proteína, como previamente descrito por Levine *et al.*, (1990).

Os danos oxidativos em lipídios foram determinados a partir da formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido barbitúrico (TBARS) o qual foi mensurado espectrofotometricamente (532nm), e expresso em nmol/mg de proteína, conforme descrito por Draper & Hadley (1990).

Os dados foram normalmente distribuídos e os tratamentos foram expressos como percentagem (%) do grupo de controle. Portanto, os dados foram submetidos a uma análise unidirecional da variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados significativos. A experiência foi realizada em quintuplicado e os resultados são expressos como a média e desvio padrão. Os testes estatísticos foram realizados utilizando Graph Pad Prism Software.

RESULTADOS

As análises da diclorodihidrofluoresceína em 24 horas mostraram valores de dano no cérebro menores em relação ao controle, tanto nas culturas tratadas com EG, 30 ($p < 0,01$), 100 ($p < 0,05$) e 300 ($p < 0,001$) como nas tratadas com EG e SV, 30+V ($p < 0,05$), 100+V ($p < 0,05$) e 300+V ($p < 0,001$). A diminuição do dano nas culturas de cerebelo também demonstraram significância, 10 ($p < 0,05$), 30 ($p < 0,01$) e 300 ($p < 0,001$), e todos os tratamentos com EG e SV reduziram o dano em relação ao tratamento controle com SV, sendo as concentrações 30+V, 100+V e 300+V bastante significantes ($p < 0,001$). **Figura 1.**

Em 72 horas, apenas foi significativo para a cultura de cerebelo, as concentrações expostas ao SV 100+V ($p < 0,05$) e 300+V ($p < 0,001$), e para a cultura de cérebro, 30+V ($p < 0,01$) e 300+V ($p < 0,01$). **Figura 2.**

As análises das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico demonstraram os seguintes resultados para as culturas de cerebelo em 24 horas: 10+V e 100+V ($p<0,05$) e 30+V e 300+V ($p<0,01$). Nas culturas tratadas apenas com EG, o resultado foi significativo apenas para a concentração 300 em 24 horas ($p<0,001$) e para a concentração 10 em 72 horas ($p<0,05$). Em relação às culturas de cérebro, apenas as concentrações de 24 horas: 10+V, 30+V, 100+V e 300+V apresentaram significância, nas análises do TBARS. **Figuras 3 e 4.**

No cerebelo, a carbonilação de proteínas apresentou valores de $p<0,001$ em todas as concentrações, com exceção da concentração 100 do EG que não foi significativa no cerebelo dos camundongos em 24 horas. Em 72 horas, todos os valores tiveram significância de $p<0,001$ no cerebelo. No cérebro, os resultados foram semelhantes para 24h, quando todos os valores de $p<0,001$, e a concentração 30+V não foi significativa. Houve também significância de $p<0,001$ para a maioria das concentrações, porém na concentração 10 e 300+V temos $p<0,01$, na concentração 100 temos $p<0,05$ **Figuras 5 e 6.**

DISCUSSÃO

Na pesquisa realizada por Martins *et al.* (2008), que utilizou os fármacos, vincristina e decanoato de nandrolona, revelou aumento de EROs no estriado quando os quimioterápicos foram utilizados isoladamente, e quando utilizados em conjunto, seus produtos finais se igualaram ao grupo controle. Porém, neste mesmo estudo, ao avaliar o córtex cerebral e hipocampo, os medicamentos utilizados em conjunto evidenciaram uma potencialização da ação do decanoato de nandrolona pela vincristina, indicando que a interação do SV com outras substâncias pode potencializar os danos em determinadas regiões do SNC. No cerebelo, nenhum dos medicamentos utilizados sozinhos apresentou aumento nos EROs (MARTINS *et al.*, 2011).

Nessa pesquisa os resultados do teste de DCFH-DA mostraram que o EG tem um efeito protetor quando utilizado em conjunto com o SV, pois diminuiu a produção de EROs tanto no cérebro quanto no cerebelo incubado por 24 e 72 horas. A concentração antioxidante mais eficaz foi a de 300 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, é possível observar um aumento dos níveis de ERO sem algumas concentrações do EG no

cérebro e no cerebelo incubados por 72 horas apenas com o guaraná. Isso ocorre pelo fato do guaraná apresentar o Efeito Hormese.

Compostos antioxidantes quando estudados *in vitro* ou *in vivo*, muitas vezes, podem apresentar o chamado Efeito Hormese. Esse fenômeno refere-se a uma curva em “U” ou “U invertido” dose resposta, ou seja, o mesmo composto pode apresentar diferentes resultados dependendo da sua concentração, por exemplo, em baixas concentrações um extrato pode desencadear uma ação antioxidante, em concentrações intermediárias não causar efeito ou ainda, em altas concentrações tornar-se tóxico (ZYCHLINSKY *et al.*, 1992).

O EG pode apresentar esse efeito pelo fato de ser constituído por muitos componentes antioxidantes, como, por exemplo, os polifenóis, os carotenóides, as catequinas e a cafeína. Como é salientado no trabalho de Halliwell & Gutteridge (1999), uma substância é considerada como antioxidante quando está em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, que previne ou atrasa a oxidação de substratos vulneráveis a ação dos EROs.

El-Agamey *et al.* (2004), mostraram que altas concentrações de carotenóides apresentaram efeitos pró-oxidantes, pois podem alterar as propriedades de membranas biológicas, influenciando a permeabilidade a toxinas. Isso ocorre pelo fato de que as células geralmente se encontram em um estado reduzido, mas uma pequena oxidação é necessária para manter algumas funções primordiais para a viabilidade celular.

No ensaio do TBARS, as concentrações de 30 e 300 µg/mL de EG quando utilizadas isoladamente, provocaram LPO no cerebelo após incubação por 24 horas. Porém em associação ao SV, o EG parece proteger a célula contra a LPO em todas as concentrações testadas tanto no cérebro quanto no cerebelo incubado por 24 horas, já em 72 horas houve a proteção somente no cérebro na concentração de 100 µg/mL.

Benchekroun e Robert (1992), publicaram pesquisas *in vitro* com culturas de células tumorais e doses citotóxicas do SV e não encontraram indícios de LPO. Porém, nessa pesquisa foram detectados danos lipídicos tanto nas células do cérebro quanto nas células do cerebelo de camundongos, expostas ao SV.

Nos resultados do teste da carbonilação de proteínas encontrados nessa pesquisa, podemos observar o mesmo efeito do guaraná visto no teste do TBARS e da DCFH-DA, ou seja, o EG apresentou efeito pró-oxidante em determinadas

concentrações, porém quando utilizado em associação com a vincristina promoveu a proteção celular. Esse fato pode ser visualizado na concentração de 10 e 100 µg/mL no cérebro incubado por 24 e 72 horas, respectivamente, e em todas as concentrações no cerebelo incubado por 24 horas, onde o EG gerou danos nas proteínas. No entanto, o EG em conjunto com a vincristina diminuiu a oxidação das proteínas na concentração de 100 µg/mL no cérebro incubado por 24 horas e em todas as concentrações no cerebelo incubado por 72 horas.

CONCLUSÃO

Por meio dos resultados encontrados nesse trabalho, pode-se concluir que o extrato de guaraná não potencializou os efeitos nocivos da vincristina, mas reduziu a produção de EROs, lipoperoxidação e oxidação de proteínas tanto no cérebro quanto no cerebelo. Esta proteção ocorre tanto na resposta aguda quanto na crônica, em 24 e em 72 horas, e quanto à concentração, pode ocorrer o efeito hormese, que seria explicado pelo alto nível de compostos oxidantes encontrados no extrato de guaraná, apresentando-se ocasionalmente como pró-oxidante.

Assim, cabe-nos ressaltar que, apesar de o guaraná ser um composto promissor na prevenção dos efeitos nocivos dos quimioterápicos no sistema nervoso central, em particular os efeitos da vincristina, devem ser realizados estudos determinantes de dose, concentração ou efeitos no organismo in vivo, para relacionar ainda os efeitos bioquímicos encontrados neste estudo com a sintomatologia e a prática clínica.

ANEXOS

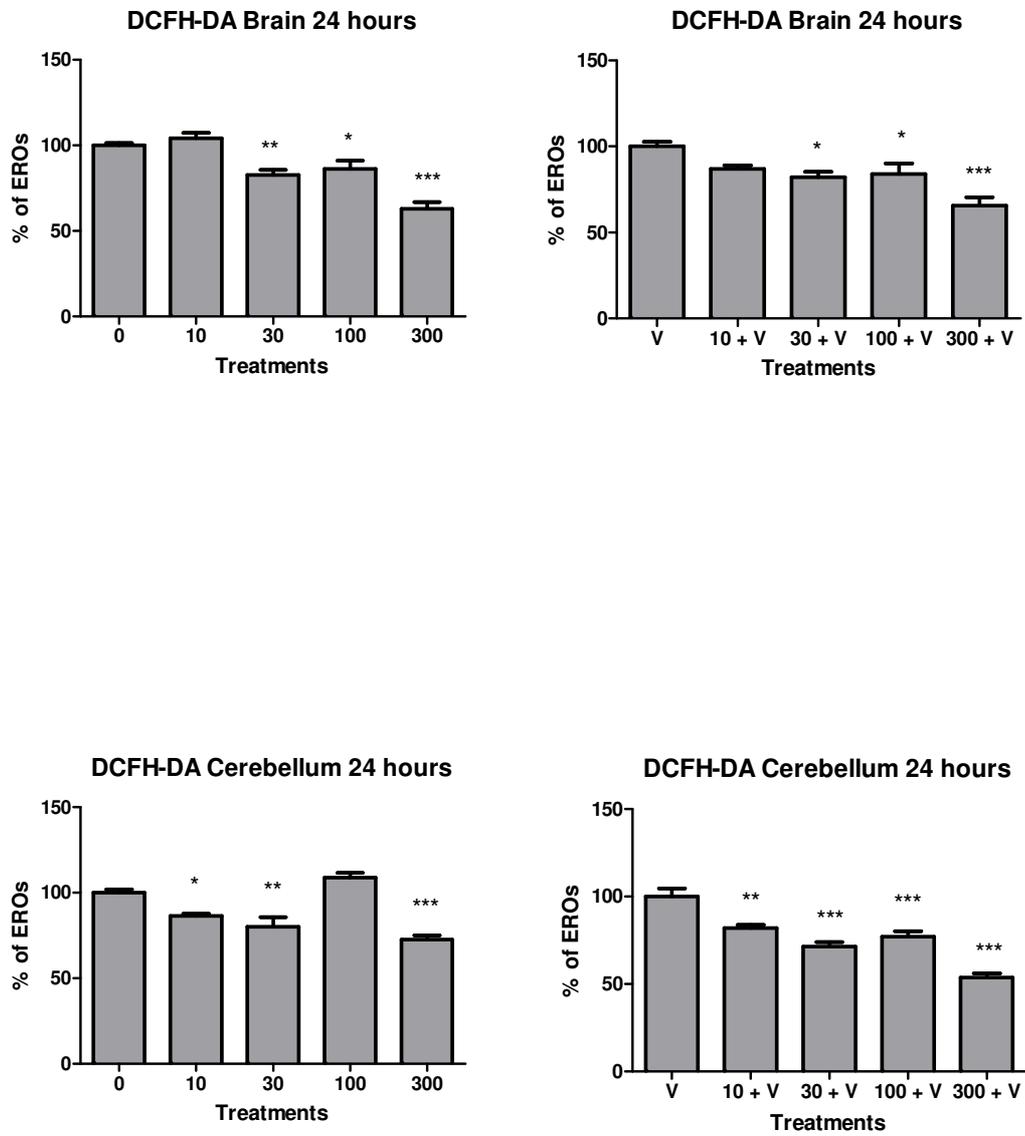


Figura 1 – Resultados da DCFH-DA no cérebro e cerebelo em 24 horas, nas culturas tratadas com extrato de guaraná isolado e associado a vincristina. Concentrações em µg/mL.

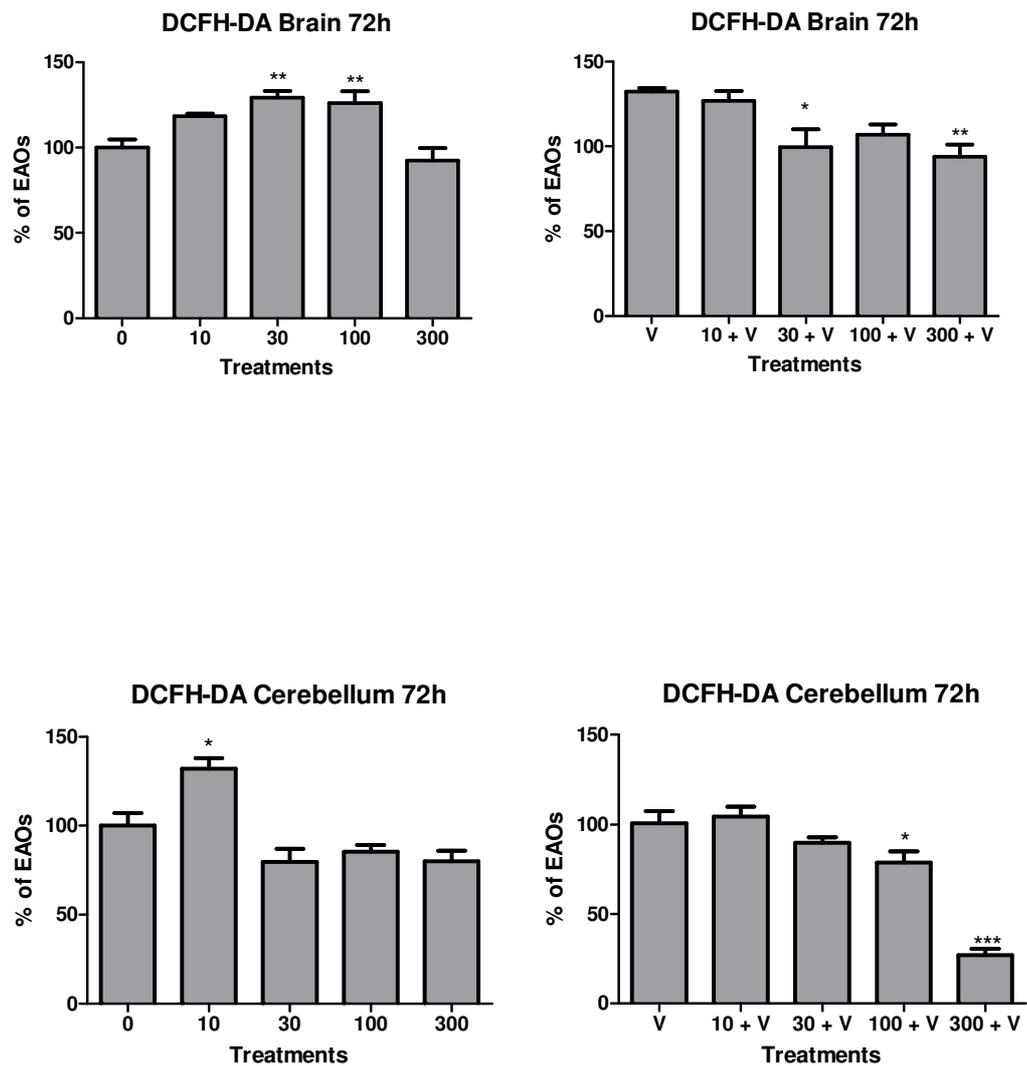


Figura 2 – Resultados da DCFH-DA no cérebro e cerebelo em 72 horas, nas culturas tratadas com extrato de guaraná isolado e associado a vincristina. Concentrações em µg/mL.

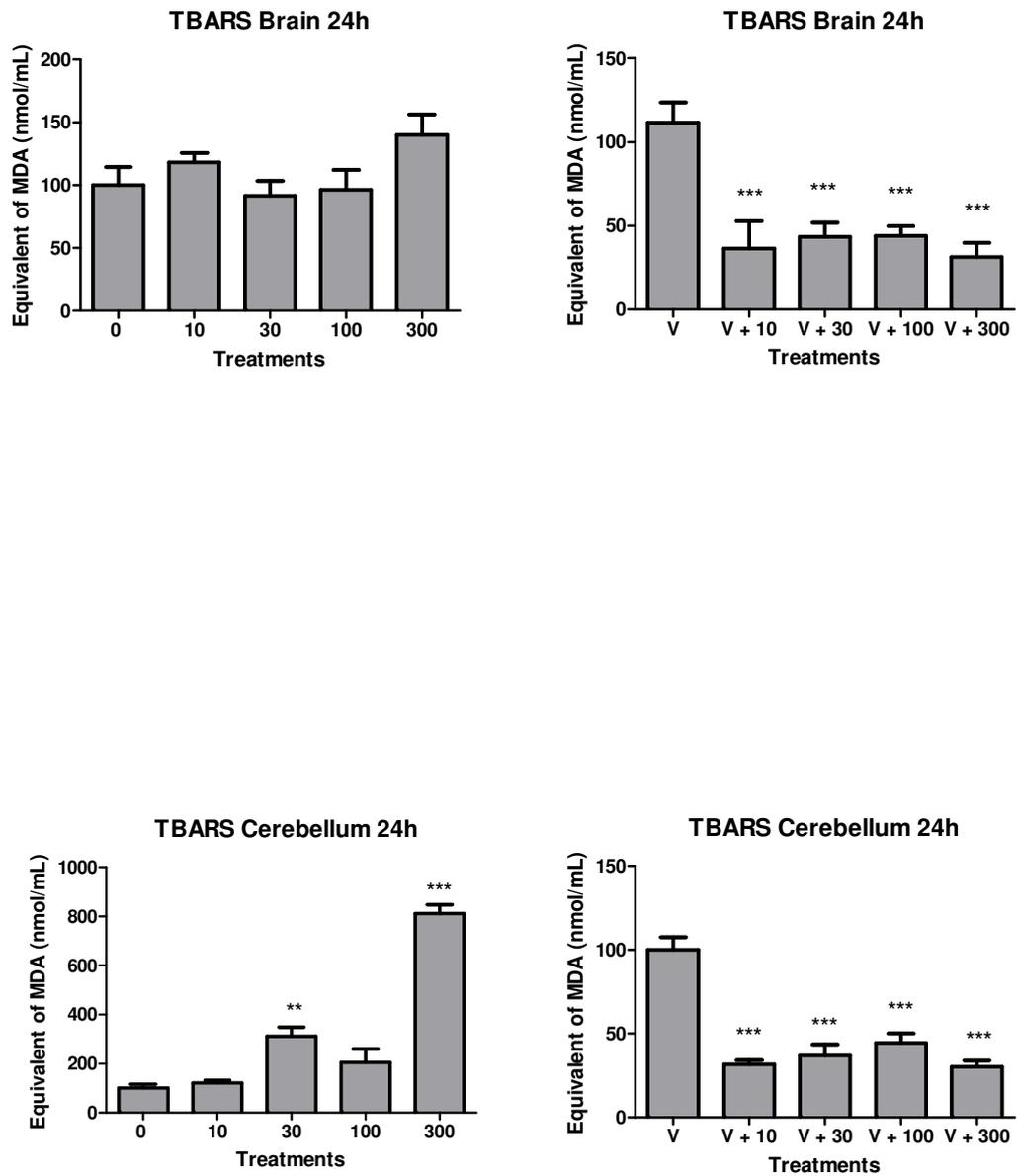


Figura 3 – Resultados do TBARS no cérebro e cerebelo em 24 horas, nas culturas tratadas com extrato de guaraná isolado e associado a vincristina. Concentrações em $\mu\text{g/mL}$.

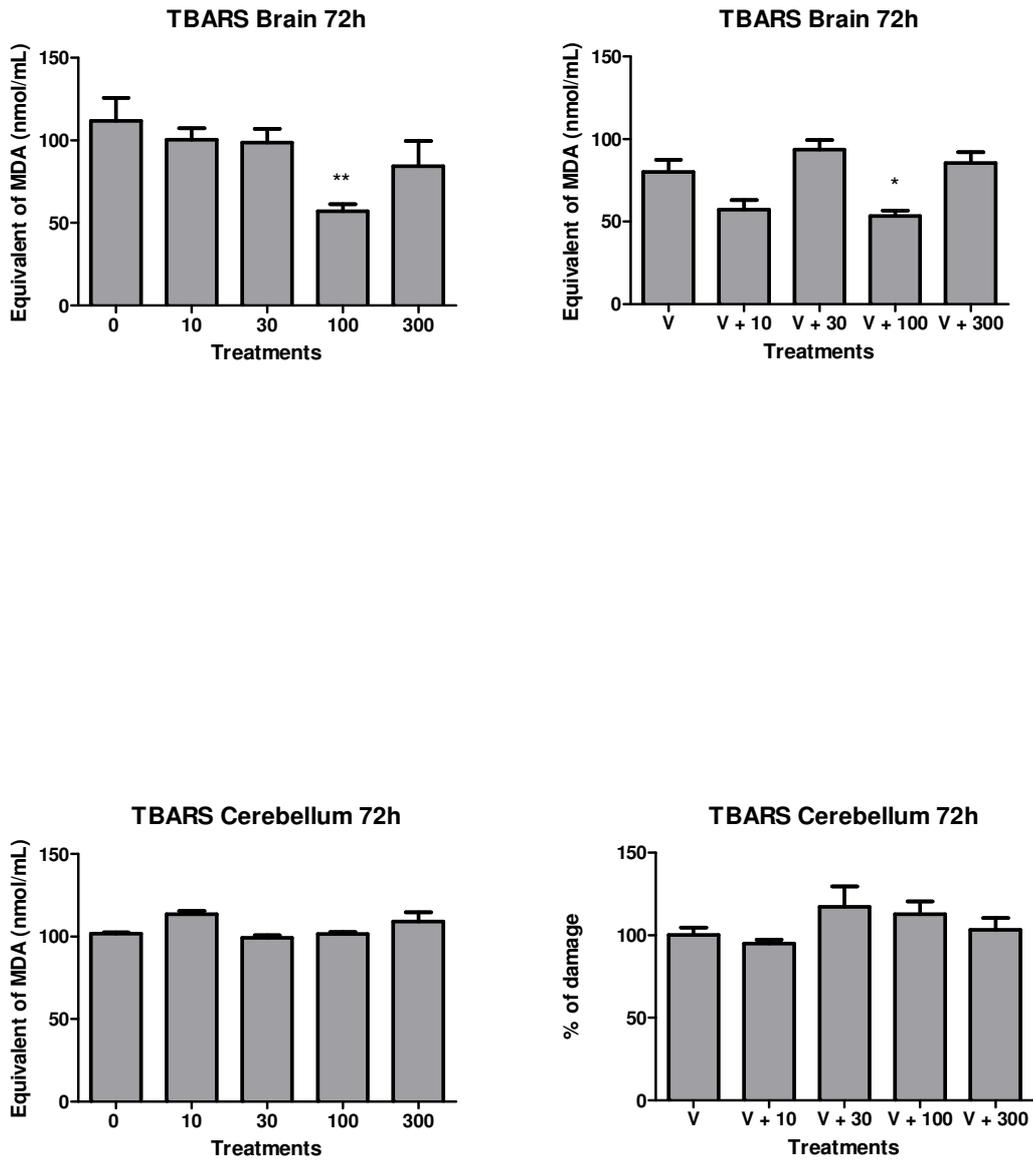


Figura 4 – Resultados do TBARS no cérebro e cerebelo em 72 horas, nas culturas tratadas com extrato de guaraná isolado e associado a vincristina. Concentrações em µg/mL.

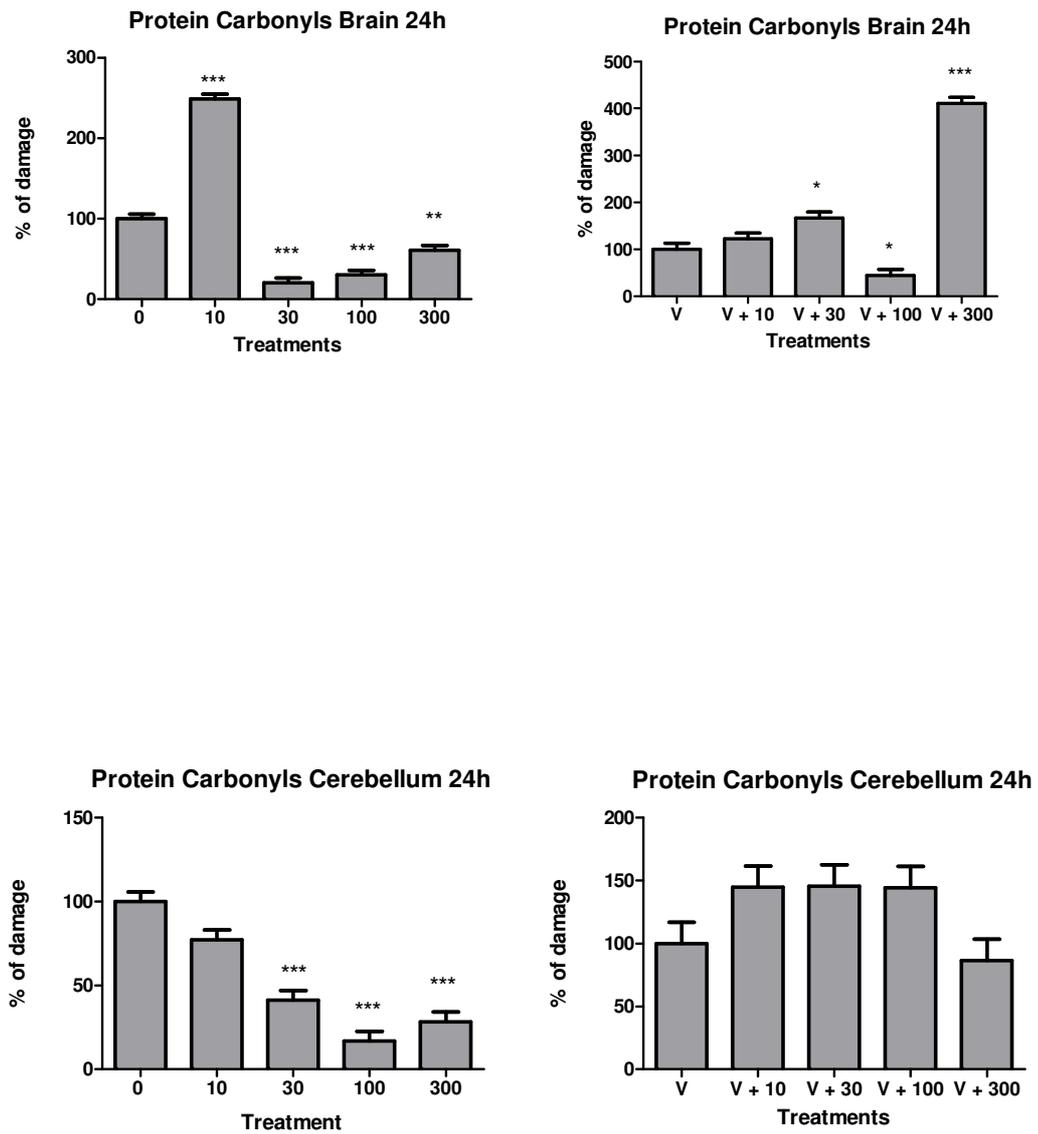


Figura 5 – Resultados da carbonilação de proteínas no cérebro e cerebelo em 24 horas, nas culturas tratadas com extrato de guaraná isolado e associado a vincristina. Concentrações em $\mu\text{g/mL}$.

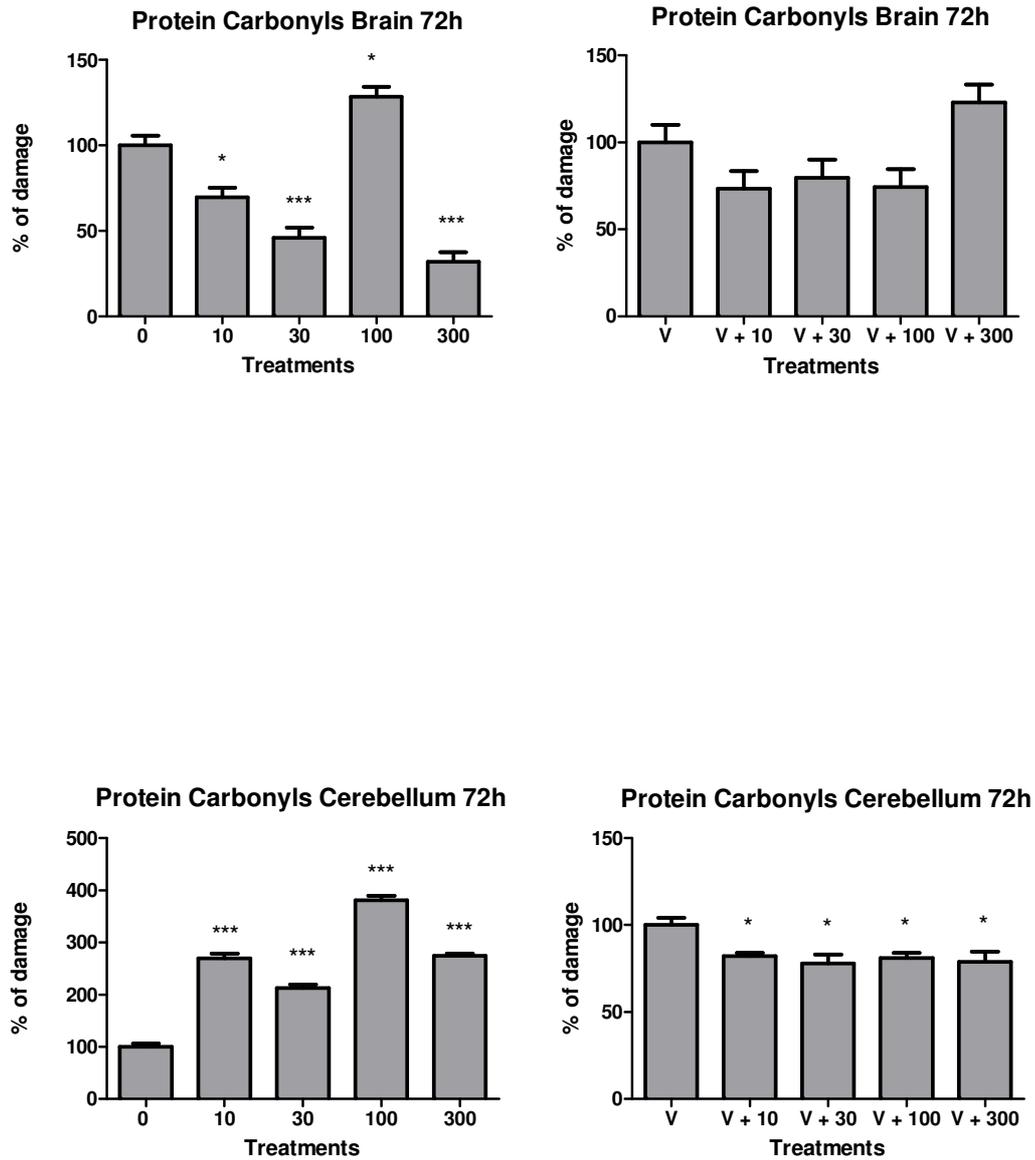


Figura 6 – Resultados da carbonilação de proteínas no cérebro e cerebelo em 72 horas, nas culturas tratadas com extrato de guaraná isolado e associado a vincristina. Concentrações em µg/mL.

REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELED, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanolextract from *Paullinia cupana* Mart. **J Ethnopharmacol.** 2005; 102:32-36.
- BRAUGHLER, J. M.; PREGENZER, J. F.; CHASE, R. L.; DUNCAN, L. A.; JACOBSEN, E. J.; McCALL, J. M. Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. **J Biol Chem.** 1987; 262 (22):10438-10440.
- BENCHEKROUN, M. N.; ROBERT, J. Measurement of doxorubicin-induced lipid peroxidation under the conditions that determine cytotoxicity in cultured tumor cells. **Anal Biochem.** 1992; 201(2):326-330.
- CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxantines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **J. AOAC Int.** 1988; 81:691-701.
- DENG, L.; SONG, Y.; ZHU, J.; ZHENG, W.; WANG, X.; XIE, Y.; *et al.* Secondary central nervous system involvement in 599 patients with diffuse large B-cell lymphoma: are there any changes in the rituximab era? **Int. J. Hematol.** 2013; 98 (6): 664-671.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.** 1990; 186:421-431.
- EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILIP, D. M.; TRUSCOTT, T. G.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Arch. Biochem. Biophys.** 2004; 430(1), 37-48.
- ESPOSTI, M. D. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. **Methods.** 2002; 26:335-340.
- FERREIRA, E. C.; NOGUEIRA, A. R. A. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry. **Talanta.** 2000; 51:1-6.
- FUKUMASU, H.; AVANZO, J. L.; HEIDOR, R.; SILVA, T. C.; ATROCH, A.; MORENO, F. S.; DAGLI, M. L. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food Chem Toxicol.** 2006; 44(6):862-867.
- HALLER *et al.* Short-term metabolic and hemodynamic effects of ephedra and guarana combinations. **Clinical, Pharmacology & Therapeutics.** 2005; 77(6):560-571.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 5. ed., Claredon Press: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem.** 2006; 97:1634-1658.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and Medicine**, 4. ed., Oxford: Oxford University Press, 2007.

LEVINE, R. L.; GALARD, D.; OLIVIER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENTE, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content inoxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 1990; 186:464-478.

MAJHENIC, L.; KERGET, M. S.; KNEZ, Z. E., Antioxidant and antimicrobial activity for guarana seed extract. **Food Chem.** 2007; 104:1258-1268.

MANCUSO, M.; COPPEDE, F.; MIGLIORE, L.; SICILIANO, G.; MURRI, L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. **J Alzheimers Dis.** 2006;10:59-73.

MARTINS, D. B.; LOPES, S. T. A.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; SCHMATZ, R.; CORREA, M.; STEFANELLO, N.; SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V.; VEIGA, A. P. M. Peroxidação lipídica em ratos tratados com sulfato de vincristina e decanoato de nandrolona. **Arq Bras Med Vet Zootec**, 63, 1, 2011.

OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; GALEANO, P.; ROMERO, J. I.; HOLUBIEC, M. I.; BADORREY, M. S.; CAPANI, F.; ALVAREZ, L. D. G. *Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity, **Hum Exp Toxicol.** 2011; 30(9):1382-1391.

PELS, H.; SCHMIDT-WOLF, I. G.; GLASMACHER, A.; *et al.* Primary central nervous system lymphoma: results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy. **J. Clin. Oncol.** 2003; 1:4489–4495.

RODASKI, S.; NARDI, A. B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. 2. ed. Curitiba: Bio Editora, 2006. 308p.

VEDDER, H.; ANTHES, N.; STUMM, G.; WÜRZ, C.; BEHL, C.; KRIEG, J. C. Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. **J Neurochem**, 1999; 72(6):2531-2538.

ZYCHLINSKY, A.; PREVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J., *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages, **Nature.** 1992; 358:167-169,

5 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo teve como um de seus objetivos avaliar a viabilidade celular de cérebro e cerebelo de camundongos em cultura de células tratadas com EG e SV. Os resultados indicaram um comprometimento das funções celulares neuronais normais em consequência da exposição ao SV e em determinadas concentrações do EG, pelo fato de ter ocorrido uma alteração da atividade das enzimas antioxidantes, redução da VC e aumento dos níveis de produção de EROs. No entanto, podemos observar um efeito protetor do guaraná quando associado à vincristina, pelo fato de ter revertido os efeitos danosos causados pelo fármaco. Isso pode ser confirmado pela análise do teste do MTT, onde foi encontrado aumento da VC dose dependente tanto pelo uso isolado do EG quanto pela associação com o SV, o que mostra o seu efeito protetor.

O estudo de Wick *et al.* (2004), evidenciou que além da vincristina, os quimioterápicos cisplatina e topotecano também reduziram a VC de neurônios cerebelares.

Quanto ao guaraná, Bittencourt *et al.* (2013), mostraram que quando testado como protetor de fibroblastos expostos ao sódio nitroprussiato, reverteu a toxicidade deste, principalmente em baixas concentrações (<5 mg), o que difere um pouco deste trabalho, onde tanto no cérebro quanto no cerebelo, as maiores taxas de viabilidade são encontradas nas concentrações mais altas de guaraná (100 e 300 µg/mL), o mesmo ocorre na associação com o fármaco.

Ainda para Bittencourt *et al.* (2013), o guaraná diminuiu a mortalidade celular, LPO, danos ao DNA e EO celular, bem como o aumento dos níveis de SOD. Estes resultados demonstraram que o EG, tem um efeito antioxidante sobre metabolismo em situações de níveis de óxido nítrico celular mais elevados. Na presente pesquisa, houve redução da atividade da SOD no cérebro de camundongos (24 e 72 horas) e aumento da atividade da CAT na presença de algumas concentrações do EG.

Além da viabilidade celular, foi avaliado o metabolismo oxidativo, pois há indícios de aumento de LPO no tecido cerebral de ratos expostos ao SV, indicando associação do quimioterápico com EO (MARTINS *et al.*, 2011). Autores referem que a interação da vincristina com outras substâncias pode potencializar os danos em

determinadas regiões do SNC (MARTINS *et al.*, 2011). Nessa pesquisa os resultados do teste de DCFH-DA mostraram que o EG tem um efeito protetor quando utilizado em conjunto com o SV, pois diminuiu a produção de EROs tanto no cérebro quanto no cerebelo incubado por 24 e 72 horas. A concentração antioxidante mais eficaz foi a de 300 µg/mL. No entanto, é possível observar um aumento dos níveis de EROs em algumas concentrações do EG no cérebro e no cerebelo incubados por 72 horas. Isso ocorre pelo fato do guaraná apresentar o Efeito Hormese.

Esse fenômeno refere-se a uma curva em “U” ou “U invertido” dose resposta, ou seja, o mesmo composto pode apresentar diferentes resultados dependendo da sua concentração, por exemplo, em baixas concentrações um extrato pode desencadear uma ação antioxidante, em concentrações intermediárias não causar efeito ou ainda, em altas concentrações tornar-se tóxico (ZYCHLINSKY *et al.*, 1992).

No ensaio do TBARS as concentrações de 30 e 300 µg/mL do EG, quando utilizadas isoladamente, provocaram LPO no cerebelo após incubação por 24 horas. Porém em associação ao SV, o guaraná parece proteger a célula contra a LPO em todas as concentrações testadas tanto no cérebro quanto no cerebelo incubado por 24 horas, já em 72 horas houve a proteção somente no cérebro na concentração de 100 µg/mL.

Benchekroun e Robert (1992), publicaram pesquisas *in vitro* com culturas de células tumorais e doses citotóxicas de vincristina e não encontraram indícios de LPO. Porém, nessa pesquisa foram detectados danos lipídicos tanto nas células do cérebro quanto nas células do cerebelo de camundongos, expostas ao SV.

Nos resultados do teste da carbonilação de proteínas encontrados nessa pesquisa, podemos observar o mesmo efeito do EG visto no teste do TBARS e da DCFH-DA, ou seja, o guaraná apresentou efeito pró-oxidante em determinadas concentrações, porém quando utilizado em associação com o SV promoveu a proteção celular. Esse fato pode ser visualizado na concentração de 10 e 100 µg/mL no cérebro incubado por 24 e 72 horas, respectivamente, e em todas as concentrações no cerebelo incubado por 24 horas, onde o EG gerou danos nas proteínas. No entanto, o guaraná em conjunto com a vincristina diminuiu a oxidação das proteínas de 100 µg/mL no cérebro incubado por 24 horas e em todas as concentrações no cerebelo incubado por 72 horas.

Assim, percebe-se que o tanto o efeito pró-oxidante como o neuroprotetor desencadeado pelo EG no SNC, é dose dependente, e que em algumas análises

como MTT, Pico Green e TBARS, parece ter melhor resposta em concentrações elevadas do guaraná. As pesquisas futuras neste campo poderão elucidar melhor este efeito dose dependente, certificando em quais concentrações o EG se torna mais eficaz na proteção de células nervosas a certos medicamentos, como os quimioterápicos, e deverão incluir a pesquisa do Efeito Hormese.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados nesse trabalho, podemos concluir que, em relação à viabilidade celular, o sulfato de vincristina pode causar efeitos citotóxicos em cerebelo e cérebro de camundongos, ficando sua toxicidade evidente em todas as análises realizadas. Por outro lado, o extrato de guaraná não potencializa a oxidação celular, ao contrário, protege a célula contra os efeitos nocivos da vincristina, podendo reverter a citotoxicidade gerada pela vincristina em determinadas concentrações, principalmente nas de 100 e 300 µg/mL, onde constatamos o melhor efeito antioxidante do extrato de guaraná.

Porém, alguns resultados ficaram inconclusivos quanto ao efeito dose-dependente, parecendo não seguir um efeito gradual e ordenado de proteção, por isso há sugestão de estudos focados em determinação de doses terapêuticas do guaraná.

Esta ação protetora do extrato de guaraná ocorreu tanto para células do cérebro quanto para o cerebelo, parecendo ser mais efetiva no cérebro e nas primeiras exposições (24 horas).

Essas conclusões nos trazem indícios de que o guaraná pode ser associado ao uso deste quimioterápico, vincristina, para minimizar seus efeitos indesejáveis no sistema nervoso central, podendo ser um importante composto na terapia preventiva, principalmente do que diz respeito aos efeitos neurológicos relacionados ao equilíbrio corporal.

Além disso, pode-se concluir que o extrato de guaraná não potencializou os efeitos nocivos da vincristina, mas reduziu a produção de EROs, lipoperoxidação e oxidação de proteínas tanto no cérebro quanto no cerebelo. Esta proteção ocorre tanto na resposta aguda quanto na crônica, em 24 e em 72 horas, e quanto à concentração, pode ocorrer o efeito hormese, que seria explicado pelo alto nível de compostos oxidantes encontrados no extrato de guaraná, apresentando-se ocasionalmente como pró-oxidante.

Assim, cabe-nos ressaltar que, apesar de o guaraná ser um composto promissor na prevenção dos efeitos nocivos dos quimioterápicos no sistema nervoso central, em particular os efeitos da vincristina, devem ser realizados estudos

determinantes de dose, concentração ou efeitos no organismo in vivo, para relacionar ainda os efeitos bioquímicos encontrados neste estudo com a sintomatologia e a prática clínica.

Estudos e conhecimento dos efeitos destes dois compostos, vincristina e extrato de guaraná, na clínica e na vida dos sujeitos submetidos a quimioterapia, e seus efeitos sobre o equilíbrio corporal, seriam extremamente importantes para o início de uma medicina de prevenção dos distúrbios relacionados ao quimioterápico,. e, ao incluir nesta medicina preventiva, extratos naturais como o de guaraná, que são de custo baixo, grande oferta para compra e fácil preparação, seria possível atender a uma ampla população.

Dessa maneira, surge com este trabalho um indício de terapêutica fácil, de baixo custo e objetiva, quanto aos distúrbios provocados no SNC (e também SNP) de sujeitos expostos à quimioterapia por sulfato de vincristina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREADIS, C.; CHARALAMPIDOU, M.; DIAMANTOPOULOS, N.; CHOUCOS, N.; MOURATIDOU, D. Combined chemotherapy and radiotherapy during conception and first two trimesters of gestation in a woman with metastatic breast cancer. **Gynecol Oncol.** 2004; 95(1):252-55.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25283-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25283-1-0].PDF). Acesso em maio de 2012.

ARNON, J.; MEIROW, D.; LEWIS-RONESS, H.; ORNOY, A. Genetic and teratogenic effects of cancer treatments on gametes and embryos. **Hum Reprod Update.** 2001; 7(4):394-403.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, 2006; 29:113-123.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELED, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Jet hnopharmacol**, 2005; 102; 32-36.

BENCHEKROUN, M. N.; ROBERT, J. Measurement of doxorubicin-induced lipid peroxidation under the conditions that determine cytotoxicity in cultured tumor cells. **Anal Biochem.** 1992; 201(2): 326-330.

BITTENCOURT, L. S.; MACHADO, D. C.; MACHADO, M. M.; ALGARVE, T. D.; MARINOWIC, D. R.; RIBEIRO, E. E. *et al.* The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food Chem Toxicol.** 2013; 53:119-125.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J., "A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays", **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 1, pp. 7 - 9, 1984.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 6, 1359-1369, 2010.

BYDLOWSKI, S. P.; YUNKER, R. L.; SUBBIAH, M. T. R. A novel property of anaqueous guarana extract (*Paullinia cupana*). Inhibition of platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. **Braz J of Medical and Biol Res**. 1988; 21:535-538.

CALDAS, C. Grupo de pesquisa genoma do guaraná. **Revista Eletrônica de Jornalismo Científico**. Disponível em: <http://www.comciencia.br/comciencia/handler/php?section=3¬icia=400>. Acesso em [2012 Mar].

CAMARGO, M. C. R. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HCPA) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). **FoodSci. Technol**, 2006; 26(1): 230-234.

CARLSON, M.; THOMPSON, R. D. Liquid chromatographic determination of methylxanthines and catechins in herbal preparations containing guaraná. **Journal of AOAC International, Gaithersburg**, 1998; 81(4): 691-701.

CHABNER, B. A.; BRUNTON, L. L. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11. ed. Nova Iorque, McGraw-Hill, 2005, 1315–1403.

CHABNER, B. A.; ROBERTS, T. G. Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. **Nat Rev Cancer**. 2005, 5:65-72.

COLPO, E. **Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo em indivíduos suplementados com ferro e ácido ascórbico**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

DEVITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. Principles of Medical Oncology. In: DE VITA, V. T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S. A. Cancer: Principles and Practice of Oncology. 8. ed. Estados Unidos da América, Lippincott-Williams & Wilkin, 2008, 337-343.

EDWARDS, H. G. M.; FARWELL, D. W.; OLIVEIRA, L. F. C.; ALIA, J. M.; LE HYARIC, M.; AMEIDA, M. V. FT-Raman spectroscopic studies of guarana and some extracts. **Analytica Chimica Acta** 2005; 532:177-186.

ESPINOLA, E. B.; DIAS, R. F., MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **J Ethnopharmacol**. 1997, 55:223-229.

FILHO, A. J. M. Modelo *in vitro* de parkinsonismo experimental induzido por rotenona: investigação de mecanismo de ação, neuroproteção e morte celular. Tese. Belém, 2011. Disponível em: http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/2600/1/Tese_ModeloInVitroParkinsonismo.pdf. Acesso em junho de 2012.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A., "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride", **Toxicol. Lett.** 2006; 160 (2):171-177.

FUKUMASU, H. **Sobre os efeitos quimiopreventivos e antineoplásicos do guaraná, *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, em modelos experimentais in vivo e in vitro.** [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP; 2008.

GIDDING, C. E. M. *et al.* Vincristine revisited. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 1999, 29:267-287.

GRANOT, E. & R. KOHEN. Oxidative stress in childhood-in health and disease states. **Clin. Nutr.** 2004; 23: 3-11.

HEARD, C. M.; JOHNSON, S.; MOSS, G.; THOMAS, C. P. *In vitro* transdermal delivery of caffeine, theobromine, theophylline and catechin from extract of Guarana, *Paullinia cupana*. **International Journal of Pharmaceutics.** 2006; 317(1):26-31.

HENNIPMAN, B.; DE VRIES, E.; BOKKERINK, J. P.; BALL, L. M.; VEERMAN, A. J.; Intrathecal vincristine: 3 fatal cases and a review of the literature. **J Pediatr Hematol Oncol.** 2009; 31(11):816–819.

HIRONO, M.; SAITOW, F.; KUDO, M.; SUZULI, H.; YANAGAWA, Y.; YAMADA, M.; NAGAO, S.; KONISHI, S.; OBATA, K. Cerebellar Globular Cells Receive Monoaminergic Excitation and Monosynaptic Inhibition from Purkinje Cells. **Plos One.** 2012; 7(1).

HULBERT, G. J.; BISWAL, R. N.; MEHR, C. B.; WALKER, T. H.; COLLINS, J. L. Solid/liquid extraction of caffeine from guarana with methylene chloride. **Food Science and Technology International** 1998; 4(1): 53-58.

ISISÓRIO, M. S. Exercício e estresse oxidativo. **R. Min. Educ Fis.** 2003; 15(1): 70-86.

KASHYAP, M. K. *et al.* Different antioxidant status total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Mol. Cell. Biochem.** 2005; 277:89-99.

KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-MAUND, C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY, A. B. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite.** 2008; 50(2-3):506-513.

KENNEDY, D. O.; HASKELL, C. F.; WESNES, K. A.; SCHOLEY, A. B. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with Panax ginseng. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** 2004, 79:401-411.

KRARUP-HANSEN, A.; HELWEG-LARSEN, S.; SCHMALBRUCH, H.; KRARUP, C. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. **Brain.** 2007; 130:1076-1088.

KUSKOSKI, E. M.; ROSEANE, F.; GARCÍA, A. A.; TRONCOSO, G. A. M. Chemical and pharmacological properties of the fruit Guaraná (*Paullinia cupana*). **Vitae.** 2005; 12(2):45-52.

LESLIE, K. K. Chemotherapy and pregnancy. **Clin Obstet Gynecol.** 2002; 45(1):153-64. 18.

MAGNA, A.; SALOMÃO, A. A.; VILA, M. M. D. C.; TUBINO, M. Comparative Study of Two Spectrophotometric Reagents for Catechol Analysis in Guarana Seeds Powder. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** 2003; 14(1):129-132.

MAJHENIC, L.; KERGET, M. S.; KNEZ, Z. E. Antioxidant and antimicrobial activity for guarana seed extract. **Food Chem.** 2007; 104:1258-1268.

MALAVÈS, R. A. **Efecto del ejercicio físico agotador sobre el estrés oxidativo asociado al envejecimiento.** Tesis (Doctoral) Facultat de Ciències de L'Activitat Física I L' Esport Universitat de València. Espanha. 2003.

MARTINS, D. B.; LOPES, S. T. A.; MAZZANTI, C. M.; SPANEVELLO, R.; SCHMATZ, R.; CORREA, M.; STEFANELLO, N.; SCHETINGER, M. R.; MORSCH, V.; VEIGA, A. P. M. Peroxidação lipídica em ratos tratados com sulfato de vincristina e decanoato de nandrolona. **Arq Bras Med Vet Zootec,** 2011; 63,1.

MATTEI, R.; DIAS, R. F.; ESPINOLA, E. B.; CARLINI, E. A.; BARROS, S. B. M. Guarana (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity *in vitro*. **J Ethnopharmacol.** 1998; 60:111-116.

MIGLIORI, L.; COPPEDÈ, L. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutar. Res.** 2009; 674 (1-2):73-84.

MIRANDA, M. V., METZNER, B. S. *Paullinia cupana*: revisão da matéria médica. **Rev Homeop.** 2010; 73:1-17.

MORAES, M. L. L.; MICKE, G. A.; FUJIYA, N. M.; TAVARES, M. F. M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Rev. Anal.** 2003; (5):44-50.

MOSSMANN, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", **J. Immunol. Methods.** 1983; 65(1):55-63.

MUZYLAŁ, M.; MASLINSKA, D. Neurotoxic effect of vincristine on ultrastructure of hypothalamus in rabbits. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, 1992, 30(3):113-117.

OLIVEIRA, D. M.; BARRETO, G.; GALEANO, P.; ROMERO, J. I.; HOLUBIEC, M. I.; BADORREY, M. S.; CAPANI, F.; ALVAREZ, L. D. G. *Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity, **Hum Exp Toxicol.** 2011; 30(9):1382-1391.

PAGLIARUSSI, R. S.; BASTOS, J. K.; FREITAS, L. A. P. Fluid Bed Drying of Guarana (*Paullinia cupana* HBK) Extract: Effect of Process Factors on Caffeine Content. **AAPS Pharm SciTech**, 2006; 7(2):160-166.

PELS, H.; SCHMIDT-WOLF, I. G.; GLASMACHER, A. *et al.* Primary central nervous system lymphoma: results of a pilot and phase II study of systemic and intraventricular chemotherapy with deferred radiotherapy. **J. Clin. Oncol.** 2003; 21:4489-4495.

PFIZER, www.pfizer.com.br/arquivoPdf/VincizinaCS.pdf22/12/2010 - Acesso em 20 de dezembro de 2013.

POLI, G.; SCHAUR, R. J.; SIEMS, W. G. *et al.* 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Med Res Rev.** 2008; 28(4):569-631.

SANTOS, C. X.; TANAKA, L. Y.; WOSNIAK, J.; *et al.* Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. **Antioxid Redox Signal** 2009; 11(10):2409-2427.

SANTOS, S. R. *et al.* A monitorização plasmática das metilxantinas do guaraná e a importância na agregação plaquetária. **Rev. Soc. Toxicol.** 1989; 2(1):20-24.

SIMÕES, C. L. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.** 5. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2003. 821 p.

STADTMAN, E. R.; LEVINE, R. L. Protein oxidation. **Ann NY Acad Sci.** 2000; 899:191-208.

TFOUNI, S. A. V.; CAMARGO, M. C. R.; MENEGÁRIO, T. F.; TOLEDO, M. C. F. Contribuição do guaraná em pó (*Paullinia cupana*) como fonte de cafeína na dieta. **Rev Nutr Campinas.** 2002, 20(1):63-68.

VANCINI, R. L.; LIRA, C. A. B.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V. L. A. **Radical livre, estresse oxidativo e exercício.** São Paulo: Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício, Universidade Federal de São Paulo. 2005.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidante e marcadores de danos oxidativos em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova.** 2007, 30(5):1323-1338.

VERSTAPPEN, C. C. P.; KOEPPEN, S.; HEIMANS, J. J.; HUJIGENS, P. C.; SCHEULEN, M. E.; STRUMBERG, D. *et al.* Dose-related Vincristine-induced peripheral neuropathy with unexpected off-therapy worsening. **Neurology,** 2005; 64(6):1076-1077.

VOSS, P. & SIEMS, W. Clinical oxidation parameters of aging. **Free Radical Research.** 2006; 40:1339-1349.

WICK, A.; WICK, W.; HIRRLINGER, J.; GERHARDT, E.; DRINGEN, R.; DICHGANS, J.; WELLER, M.; SCHULZ, J. B. Chemotherapy-induced cell death in primary cerebellar granule neurons but not in astrocytes: *in vitro* paradigm of differential neurotoxicity, **J Neurochem.** 2004; 91:1067–1074.

ZOPPI, C. C.; ANTUNES-NETO, J.; CATANHO, F. O.; GOULART, L. F.; MOTTA, E.; MOURA, N.; VAZ DE MACEDO, D. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. Paul. Educ. Fís.** 2003; 17(2): 119-130.

ZYCHLINSKY, A., PREVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J., *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages, **Nature.** 1992; 358,167-169.