

ESTUDO HISTOLÓGICO DO EFEITO AGUDO DE EXTRATO DE *ANNONA CORIACEA* (ARATICUM) SOBRE O CÓRTEX FRONTAL DE RATOS WISTAR.

NASCIMENTO, Guilherme Nobre Lima¹; **SOUSA**, Rafael Pena²; **CUNHA**, Luiz Carlos¹; **AVERSI-FERREIRA**, Tales Alexandre²; **BOZINIS**, Marize Campos Valadares¹

¹ Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia/UFG;

² Instituto de Ciências Biológicas/UFG

e-mail do autor: glnln@hotmail.com

Palavras-chave: *Annona coriacea*, toxicologia, sistema neural, córtex cerebral.

INTRODUÇÃO

Fruto nativo do cerrado a *Annona coriacea*, popularmente conhecida como araticum, é amplamente consumido pela população e empregada no tratamento de processos inflamatórios (FAGUNDES, et al., 2005). Esta espécie apresenta características morfológicas como folhas simples, dispostas alternadamente em um mesmo plano, ao longo dos ramos e pela semelhança entre seus frutos (MANICA, et al., 2003). Um de seus principais constituintes são as acetogeninas que demonstraram ser substâncias com grande potencial citotóxico (ALALI et al., 1999; KOTAKE & OHTA, 2003; BERMEJO et al., 2005; MENESES DA SILVA, et al., 1996), observado nas células da medula óssea de camundongos (FAGUNDES, et al., 2005). De acordo com CHAMPY, et al., 2004 alguns trabalhos ainda relacionam as anonáceas com uma doença similar ao parkinsonismo atribuída as acetogeninas.

As principais funções associadas à vivência em sociedade, à razão, à inteligência e ao controle das outras atividades cerebrais estão associadas ao córtex frontal de humanos. Descobertas recentes em cérebros de aves e mamíferos demonstraram a formação de novos neurônios motores corticais no lobo frontal (ALVAREZ-BUYLLA & GARCIA-VERDUGO, 2002; GAGE, 2003). Como o córtex frontal é uma das regiões cerebrais mais importantes para a atividade mental e sua desorganização pode acarretar disfunções graves no comportamento, a análise dessa estrutura se torna importante para a verificação dos efeitos do extrato alcoólico dessa planta sobre essa região do sistema neural, objetivo deste trabalho.

O córtex cerebral é formado por 6 camadas horizontais de Brodmann (MARIN PADILLA, 1992) estratificados em cerca de 40 colunas responsáveis pelo controle motor do corpo além da compreensão e união das informações aferentes (AVERSI-FERREIRA & PENHA-SILVA, 2005). Qualquer dano a esta estrutura cortical, como diminuição da árvore dendrítica ou tamanho do soma, pode implicar em perdas motoras e cognitivas.

De acordo com KANDEL, 1985, todo comportamento é uma consequência do controle do Sistema Nervoso Central. A avaliação do comportamento de animais

expostos a drogas potencialmente neurotóxicas, é um modo de verificar funções cerebrais e de avaliar danos potenciais ao tecido neural.

O método de Golgi – Cox é o principal método para visualização da árvore dendrítica, axônio e corpo neuronal. Impregna apenas os neurônios sendo possível verificar possíveis alterações morfológicas destes. Nos neurônios e ramificações observa-se uma coloração negra escura. O tecido utilizado classicamente não sofre nenhuma fixação (ROSOKLIJA et al.2003) é diretamente imerso em solução de Golgi-Cox envolto em algodão ou gaze permanecendo nesta solução por pelo menos três semanas até se verificar completa impregnação. Essa solução foi introduzida primeiramente por Camilo Golgi em 1873, sofrendo várias mudanças durante estes longos anos (ROSOKLIJA et al.2003).

O araticum é um fruto típico de nossa região Centro-Oeste. Largamente consumido pela população e o alto potencial neurotóxico de seu principal componente, as acetogeninas. Foi estudada, neste trabalho, a ação do extrato bruto das sementes do araticum sobre o córtex cerebral de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 64 camundongos Swiss machos com idade entre 6 e 9 semanas, fornecidos pelo biotério da Indústria Química do Estado de Goiás (IQUEGO). Os animais foram agrupados em gaiolas plásticas de mesmas dimensões, locados em sala climatizada sob temperatura constante de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro - escuro de 12h. Foram alimentados com ração comercial padrão e água *ad libitum*.

Annona coriacea

O material botânico foi colhido no cerrado das proximidades da cidade de Goiânia, Goiás. Foi preparada exsiccata do material, contendo caule, folhas, flores e frutos, para identificação botânica. Todos os reagentes, soluções e solventes foram de grau analítico com laudo de qualidade apresentado pelo fabricante. Os frutos foram colhidos tendo as sementes retiradas e colocadas em estufa de secagem ventilada durante uma semana a 40°C . Após a secagem total, as sementes foram trituradas para a preparação do extrato. Foram feitas três extrações alcoólicas da mesma massa triturada, sendo que a cada 100 g de massa das sementes trituradas, adicionou-se 500 mL de álcool etílico 70%. A mistura foi agitada mecanicamente por 5 h e logo em seguida foi filtrada. Os três filtrados foram misturados e levados para concentração do extrato em rota-evaporador onde foi recuperado o álcool usado.

Avaliação da atividade do extrato das sementes de *Annona coriacea*

Foram realizadas administrações diárias em um período de 4 dias por via oral em diferentes concentrações do extrato (12,5; 25; 50 e 100 mg/Kg). O extrato foi diluído em Tween 80 e salina estéril [1:10] obtendo-se ao final um volume total de 0,2 mL da solução, sendo os grupos divididos da seguinte forma:

Grupo Padrão: não recebeu nenhum tratamento

Grupo Controle: recebeu os solventes da droga (Tween 80 + Salina)

Grupo Experimental – I: receberam 12,5 mg/Kg

Grupo Experimental – II: receberam 25 mg/Kg

Grupo Experimental – III: receberam 50 mg/Kg

Grupo Experimental – IV: receberam 100 mg/Kg

Após vinte e quatro horas do último tratamento, todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e então foram retirados os encéfalos os quais foram seccionados os hemisférios direito e esquerdo, um foi embebido em solução de Golgi - Cox e o outro em etanol 70% para protocolo em H.E., e posterior tratamento.

Tratamento dos Tecidos

Um dos hemisférios cerebrais foi embebido em solução de Golgi-Cox preparada utilizando soluções aquosas de:

Sol. A - Dicromato de potássio 5% (p/V)

Sol. B - Cloreto de mercúrio 5% (p/V)

Sol. C - Cromato de potássio 5% (p/V)

Os hemisférios permaneceram nesta solução por 3 semanas logo após sendo tratados em uma bateria de desidratação (etanol; etano / éter [1:1], etanol / acetona [1:1], acetona) e impregnação (parafina I, II, III e inclusão) para obtenção dos blocos de parafina para corte em micrótomo.

O outro hemisfério permaneceu em fixação por 2 semanas e então foram levados a bateria de desidratação e impregnação para obtenção dos blocos de parafina para corte em micrótomo e posterior utilização da coloração de Hematoxilina – Eosina.

Foram obtidas de cada órgão, quatro lâminas com três cortes cada.

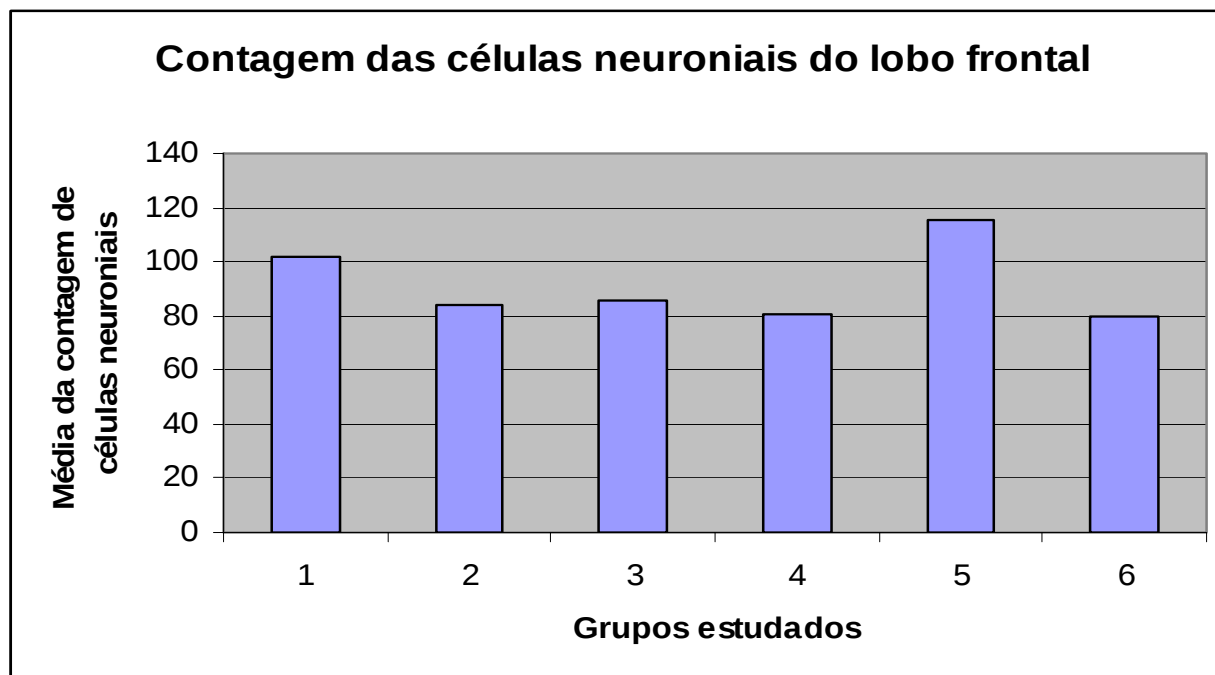
Análise das lâminas

Através de microscópio de luz (Olympus CX41) foi feito à contagem das células em aumento de 100X.

Etograma

Para análise do comportamento, foi utilizado um etograma baseado em RODRIGUES, 1999. Foi observada uma semana sem tratamento algum para obtenção do comportamento padrão e então durante todo o tratamento.

RESULTADOS



($F=0,043$; $F - \text{tabelado}=2,439$)

Legenda - 1: grupo padrão; 2: grupo controle; 3: grupo experimental-I; 4: grupo experimental-II; 5: grupo experimental-III; 6: grupo experimental-IV

DISCUSSÃO

Os estudos preliminares até o presente momento da contagem de células de um número limitado de lâminas, não demonstraram alterações significativas sobre o lobo frontal, indicando uma possível proteção da barreira hemato-encefálica, no entanto maiores estudos precisam ser realizados para verificar os efeitos desse extrato em concentrações maiores. A literatura estatística específica indica que se o valor de F for inferior a 1, testes mais robustos poderiam indicar heterogeneidade entre os grupos (VIEIRA, 2004; CENTENO, 1999)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J Nat Prod.*, 62, 504-40, 1999.

AVERSI-FERREIA, T.A., PENHA – SILVA N. Efeitos do etanol sobre a migração neuronal na formação do neocórtex cerebral. *Biosc J.* 21 (1), 151-157, 2005.

ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosc.*, 22, 629-634, 2002.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Nat Prod Rep.* 22, 269-303, 2005.

CENTENO, A. J. (Coord.).Curso de Estatística Aplicada à Biologia. Goiânia: CEGRAF/UFG, 1999.

CHAMPY, P.; HOGLINGER, G.U.; FEGER, J.; GLEYE, C.; MILLER, R.H.; LAURENS, A.; GUERINEAU, V.; LAPREVOTE, O.; MEDJA, F.; LOMBES, A.; MICHEL, P.P.; LANNUZEL, A.; HIRSCH, E.C.; RUBERG, M. Annonacin. A lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem.* 88, 63-9. 2004

FAGUNDES, F.A.; OLIVEIRA, L.B.; CUNHA, L.C.; VALADARES, M.C. *Revista Eletrônica de Farmácia* vol. 2 (1), 24-29, 2005.

GAGE, F.H. A auto-recuperação do cerebral. *Scientific American Brasil*, 17, 40-47, 2003.

MANICA, I.; ICUMA, I.; JUNQUEIRA, K. *Frutas Anonáceas: Tecnologia de Produção, Pós-Colheita e Mercado*. São Paulo: Editora: Cinco Continentes, 2003.

KOTAKE, Y.; OHTA, S. MPP+ analogs acting on mitochondria and inducing neurodegeneration. *Curr Med Chem.*, 10, 2507-16, 2003.

MARIN-PADILLA M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics : a unifying theory. *J. comp. neurol.* 321(2), pp. 223-240, 1992.

MENESES DA SILVA, E.L.; ROBLLOT, F.; MAHUTEAU, J.; CAVE, A. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriacea*. *Nat Prod.* 59, 528-30. 1996

ROSOKLIJA, G.; MANCEVSKI, B.; ILIEVSKI, B.; PERERA, T.; LISANBY, S.H.; COPLAN, J.D.; DUMA A.; SERAFIMOVA, T.; DWORK, A.J. Optimization of Golgi methods for impregnation of brain tissue from humans and monkeys. *J Neurosci Methods* 131, 1–7, 2003.

VIEIRA, S. *Bioestatística: tópicos avançados*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2004