



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS
MESTRADO FORA DE SEDE/UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

ADRIANA CAMPOS SASAKI

**EFEITO DO FLAVONÓIDE CASTICINA, EXTRAÍDO DE
CROTON BETULASTER, NA MORFOGÊNESE DO
SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro e
Universidade Federal da Bahia visando à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Morfológicas

RIO DE JANEIRO/SALVADOR

JULHO

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**EFEITO DO FLAVONÓIDE CASTICINA, EXTRAÍDO DE
CROTON BETULASTER, NA MORFOGÊNESE DO SISTEMA
NERVOSO CENTRAL**

ADRIANA CAMPOS SASAKI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Morfológicas/Mestrado Fora de Sede como pré-
requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Morfológicas

Orientadora: Flávia Carvalho Alcantara Gomes (UFRJ)

Co-orientadora: Sílvia Lima Costa (UFBA)

RIO DE JANEIRO/SALVADOR

Julho

2007

**Título: Efeito do Flavonóide casticina, Extraído de *Croton
betulaster*, na Morfogênese do Sistema Nervoso Central**

Autor: Adriana Campos Sasaki

Dissertação de mestrado submetida à avaliação pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ (Mestrado Fora de Sede UFRJ/UFBA), como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada por:

Prof. _____
Flávia Carvalho Alcantara Gomes – ICB/UFRJ
Orientadora

Prof. _____
Sílvia Lima Costa – ICS/UFBA
Co-Orientadora

Prof. _____
Vivaldo Moura Neto – ICB/UFRJ
Presidente da Banca

Prof. _____
Elisabete Freire Santos da Cunha – Faculdades Jorge Amado

Prof. _____
Jamary Oliveira Filho – ICS/UFBA

Prof. _____
Cláudia dos Santos Mermelstein - ICB/UFRJ
Revisora e Suplente

Rio de Janeiro/Salvador

2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Celular, do Departamento de Anatomia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da professora Flávia Carvalho Alcantara Gomes, e co-orientação da professora Sílvia Lima Costa, com auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

FICHA CATALOGRÁFICA

SASAKI, Adriana Campos

EFEITO DO FLAVONÓIDE CASTICINA, EXTRAÍDO DE *Croton betulaster*, NA MORFOGÊNESE DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL, RIO DE JANEIRO, UFRJ, 2007.

Tese de Mestrado

xiv, 100 pp.

1. Sistema Nervoso Central 2. Astrócitos 3. Interação Neurônio-Glia 4. Flavonóides 5. Casticina 6. Cultura de Células

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Ciências Biomédicas - ICB

II. Tese

*Aos meus pais,
que me ensinam a nunca desistir.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus o dom da vida e a saúde que tenho, permitindo-me chegar até aqui, e completar mais esta etapa.

O momento de agradecer é extremamente especial... Pessoas muito importantes participaram deste momento da minha vida; agradeço a todas elas:

Aos meus pais, Ivanice e Edmundo, pelo apoio incondicional, pelo estímulo e por sempre acreditarem no meu potencial; agradeço por vocês me proporcionarem chegar onde estou agora, sem esquecer que o mais importante é a simplicidade e a paz que temos dentro de nossas mentes; aos meus irmãos, Igor e Leandro, e minha cunhada Lívia, por estarem sempre participantes, sempre dispostos a ajudar de alguma maneira, por me apoiarem neste período e por me proporcionarem momentos de descontração. A Igor e Lívia, obrigada pela leitura do texto e por suas contribuições. Amo muito todos vocês;

Ao meu querido esposo, Claudio, por tudo que compartilha comigo, pelo estímulo, pelo amor, pela compreensão dos meus momentos difíceis, das minhas ausências neste período, pela paciência nos momentos de sobrecarga onde o meu humor fica péssimo, pela ajuda imensurável que me deu em várias etapas deste trabalho e todos os dias, enfim, por me fazer feliz;

À minha orientadora, prof. Flávia Gomes, por absolutamente tudo, desde a aceitação do desafio de orientar uma aluna que não tinha experiência de laboratório, como pela paciência, pelo estímulo, pelo encorajamento, pela ajuda constante, por ter me proporcionado um aprendizado singular, numa área tão linda das Neurociências, o que me fez abrir a mente e enxergar muitas possibilidades de trabalho. Obrigada por ter acreditado em mim!;

À minha co-orientadora prof Sílvia Costa, por ter me recebido também no seu laboratório, por me estimular a refletir, pela paciência durante a realização deste trabalho;

À aluna de doutorado e amiga, Tânia Spohr, por toda a paciência que teve comigo nos vários momentos da construção deste trabalho, por toda a orientação que me dispensou em cada pequeno detalhe, pela presença constante em todos os momentos da elaboração, por me encorajar sempre e proporcionar o aprendizado que adquiri neste período. Agradeço por todo o apoio em vários momentos e especialmente nesta fase final, e sobremaneira, pela montagem das figuras. Agradeço também à sua família, por ter me recebido de braços abertos, em especial à sua mãe, Fernanda! Enfim, agradeço principalmente pela amizade que construímos neste período – os laços do coração às vezes são mais fortes que os laços de consagüinidade; você é uma irmã pra mim!!

Ao prof Vivaldo, pela oportunidade de crescimento e por ter acreditado em mim desde o início;

Ao prof Ramon El-Bachá, por ter aberto as portas do laboratório (LabNq/UFBA) pra mim desde o primeiro contato, por estar sempre disposto a ajudar e pelo incentivo;

A minha eterna professora, e amiga especial, Susana Vasconcelos, que sempre me estimulou desde a graduação, foi quem primeiro me despertou o interesse pela pesquisa, hoje devo parte desta conquista a você;

Às amigas: Aline Nobre e Karina Moita por terem me recebido no Rio de Janeiro de braços abertos;

A todo o grupo do Laboratório de Neurobiologia Celular/UFRJ, por ter me apoiado neste período e por tornar meus dias no laboratório sempre alegres, e

principalmente, pela amizade e pelo verdadeiro espírito de equipe que existe entre vocês: Aline Portela, Cristiane, Fernando, Ismael, Joice, Juliana, Rodrigo, Rômulo, Sr. Severino, Tânia e Vivian;

Aos amigos do Landic/UFRJ: Aline Fernades, Bruna, Daniel, Fábio e Gabriel pelo apoio e amizade;

A toda a equipe Laboratório de Neuroquímica (LabNq/UFBA), por todo o apoio e estímulo, especialmente a Alexandre, Ana Rita, Cleide, Dra Fátima, José Pinheiro, Vivian e Sandra;

Aos queridos amigos que de alguma forma me apoiaram e me deram suporte neste momento de muita sobrecarga, que compreenderam as minhas faltas e que torceram por mim, especialmente a Abrahão Baptista, Adriana Baraúna, Anna Cecília Araújo, Eduardo Vasconcelos, Cristiane Cavalcante, Elen Pinto, Eliana Brito, Kátia Avena, Kátia Sá, Luciana Oliveira, Sumaia Midlej, Helena Maia;

Aos meus sogros, Ana Lúcia e Tadao, por todo o carinho que têm comigo, pelo apoio e incentivo que sempre me dão e pela compreensão com minhas ausências;

A todos os meus colegas da turma do Mestrado, em especial à Andréa, Caroline, Cíntia, Deise, Eliana, Laise, Maria Clara e Mônica pelos momentos que compartilhamos e por toda ajuda nesse período;

Aos alunos que souberam compreender esse momento, que me estimularam e torceram por mim; agradeço em especial aos monitores Diana, Débora, Edilene, Êmyle, Jéssica, Manuella, Marcos e Vanessa;

Agradeço, por fim, aos meus pacientes por me estimularem sempre e pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar.

RESUMO

A utilização de flavonóides no tratamento de patologias do sistema nervoso central (SNC) ainda é bastante incipiente, em parte, pelo pouco conhecimento a respeito de suas ações nesse sistema.

Neste trabalho, investigamos a ação direta e indireta (via astrócitos) do flavonóide casticina, extraído de *Croton betulaster*, planta típica do estado da Bahia, na morfogênese neural *in vitro*, utilizando 3 paradigmas experimentais: 1) cultura de precursores neurais derivados de córtex cerebral de ratos Wistar de 14 dias embrionários (E14); 2) culturas de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos e 3) coculturas de astrócitos com precursores corticais. A análise da proliferação, diferenciação e morte celular foi feita por imunofluorescência para BrdU (Bromodeoxiuridina), β -tubulina III ou GFAP (proteína acídica fibrilar glial; marcador de neurônio e astrócito, respectivamente) e caspase-3 ativada, respectivamente.

Para análise do efeito direto, precursores foram mantidos por 24 horas simultaneamente em presença de 10 μ M de casticina e 1 μ g/ml de BrdU. Observamos um aumento de 70% na população β -tubulina III positivas acompanhado de uma redução de 50% na morte de neurônios, sugerindo um efeito neuroprotetor para a casticina.

Com o objetivo de estudar as ações da casticina na biologia astrocitária normal, analisamos por *Western blot* e imunofluorescência os níveis de GFAP em culturas tratadas por 1 e 10 μ M de casticina. Não observamos alterações significativas nos níveis dessa proteína nem da proliferação astrócitária, a julgar pelos níveis de incorporação de BrdU. Esses dados sugerem que embora a casticina seja um potente inibidor do crescimento tumoral glial, não interfere na proliferação de astrócitos normais, característica relevante para sua utilização como agente antitumorigênico.

Para analisar os efeitos indiretos de casticina, culturas de progenitores corticais E14 foram plaqueadas sobre monocamadas astrocitárias tratadas por 10 μ M de casticina. Nessas condições, observamos um aumento de 40% no número de neurônios. Ao contrário da ação direta, não observamos alteração na morte de neurônios, mas uma diminuição de 40% na morte de progenitores neuronais. Esse efeito foi mimetizado pela presença de meio condicionado de astrócitos tratados, sugerindo o envolvimento de fatores solúveis nesse evento.

Em conjunto, nossos dados demonstram que a casticina tem uma ação neuroprotetora, apontando para 2 diferentes mecanismos de ação: 1) direto, através da diminuição da morte neuronal; 2) indireto, através da indução da secreção de fatores solúveis astrocitários protetores para progenitores neurais. Nosso estudo abre perspectivas para a utilização desse flavonóide no tratamento de doenças neurodegenerativas e tumores do SNC, além de contribuir significativamente para o entendimento do papel das interações neuro-astrocitárias no desenvolvimento e patologias do SNC.

ABSTRACT

The use of flavonoids on the therapy of central nervous system (CNS) pathologies is still incipient, particularly due to the lack of data regarding their action in the brain.

In this work, we investigated the direct and indirect action (by astrocytes) of the flavonoid casticin, extracted from *Croton betulaster*, typical plant of the State of Bahia, in neural morphogenesis *in vitro*, by using 3 experimental paradigms: 1) neural precursors culture derived from cerebral cortex of 14-days Wistar rat embryos (E14); 2) astrocytes cultures derived from cerebral cortex of newborn rats and 3) cocultures of cortical precursors onto astrocytes monolayers. Proliferation, differentiation and cellular death were accessed by immunofluorescence for BrdU (Bromodeoxyuridine), β -tubulin III or GFAP (glial fibrillary acidic protein; neuron and astrocyte markers, respectively), and activated caspase-3, respectively.

In order to access casticin direct effect, precursors were kept for 24 hours in the presence of 10 μ M of casticin and 1 μ g/ml of BrdU, simultaneously. We observed a 70% increase in the number of β -tubulin III positive cells followed by a 50% decrease in neuronal death, thus suggesting a neuroprotector effect for casticin.

With the aim of study the action of flavonoid on normal astrocytes, we analyzed by Western blot and immunofluorescence assays, the GFAP levels of casticin-treated cultures (1 μ M or 10 μ M). We did not observe significant alterations in GFAP levels neither in astrocyte proliferation (measured by BrdU incorporation). These data suggest that although casticin is a powerful glial tumoral growth inhibitor, it does not affect normal astrocytes proliferation, which is an excellent characteristic for its use as antitumoral agent.

In order to analyse indirect effects (via astrocytes), precursors culture derived from E14 cerebral cortex were kept for 24 hours onto casticin-treated astrocyte monolayers. At this situation, we observed a 40% increase in the number of neurons. In contrast to the direct effect, we did not observe changes in neuronal death but a 40% decrease in the death of neural progenitors. This effect was reproduced by conditioned medium derived from flavonoid treated-astrocytes.

Together, our data demonstrate that casticin has a neuroprotector action, possibly by 2 different mechanisms: 1) direct, by decreasing neuronal death; 2) indirect, by inducing astrocytes to secrete soluble factors which decrease neural precursor's death. Our work might open new perspectives for the use of casticin in the treatment of neurodegenerative diseases and CNS tumors and greatly contributes to elucidate the role of neuro-astrocyte interactions in nervous system development and pathology.

ABREVIATURAS

AIDS- síndrome de imunodeficiência adquirida
AR- ácido retinóico
BHE- barreira hematoencefálica
BMP- proteína morfogenética do osso (do inglês *bone morphogenetic protein*)
BrdU - bromodeoxiuridina
BSA- soro albumina bovina (do inglês *bovine serum albumin*)
DAPI- 4',6-Diamidino-2-fenilindol (do inglês 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride)
DMEM- do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
DMEM-F12- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* suplementado com o nutriente F-12
DMSO- dimetilsulfóxido
DTT- ditioneitol (do inglês *dithiothreitol*)
E14- camundongos de 14 dias embrionários
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
EGF- fator de crescimento da epiderme (do inglês *epidermal growth factor*)
FGF- fator de crescimento do fibroblasto (do inglês *basic fibroblast growth factor*)
FI- filamento intermediário
FITC- fluoresceína
GFAP- proteína ácida fibrilar glial (do inglês *glial fibrillary acidic protein*)
GGF- fator de crescimento glial (do inglês *glial growth factor*)
GDNF- fator neurotrófico derivado de glia (do inglês *glial derived neurotrophic factor*)
MEC - matriz extracelular
MC- meio condicionado
MCCont- meio condicionado derivado de astrócitos controle
MCCast - meio condicionado derivado de astrócitos tratados por casticina
MSS- meio sem soro
NGF- fator de crescimento do nervo (do inglês *nerve growth factor*)
OMS- Organização Mundial da Saúde
PBS- salina tamponada por fosfato
SDS- sódio dodecilsulfato
SDS-PAGE- eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
SN- sistema nervoso
SNC- sistema nervoso central
TBS- salina tamponada com aminometilenotrimetanol (tris)
TGF- fator de crescimento transformante (do inglês *transforming growth factor*)
TGF α - fator de crescimento transformante tipo alfa (do inglês *transforming growth factor alpha*)
TGF β - fator de crescimento transformante tipo beta (do inglês *transforming growth factor β*)
TNF- fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)
TNF- α - fator de necrose tumoral tipo alfa (do inglês *tumor necrosis factor alpha*)
Tris- aminometilenotrimetanol
Wnt - do inglês *wingless*

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema ilustrando os diferentes tipos de células do sistema nervoso central: neurônios e células da glia	3
FIGURA 2: Interação neurônio-astrocítico.	9
FIGURA 3: Foto de <i>Croton betulaster</i> e Esquema ilustrando a fórmula estrutural da casticina	14
FIGURA 4: A casticina não influencia diretamente o número de células totais	30
FIGURA 5: A casticina não influencia a proliferação de progenitores	31
FIGURA 6: A casticina reduz a morte celular	32
FIGURA 7: A casticina aumenta o número total de neurônios	33
FIGURA 8: A casticina não induz a diferenciação de progenitores em neurônios	35
FIGURA 9: A casticina reduz a morte de neurônios	36
FIGURA 10: A casticina não altera a morfologia astrocitária	38
FIGURA 11: A casticina não promove alterações no padrão de distribuição de GFAP	39
FIGURA 12: A casticina não interfere nos níveis de expressão de GFAP	40
FIGURA 13: A casticina não interfere na proliferação de astrócitos	42
FIGURA 14: Astrócitos tratados por casticina promovem aumento no número de células corticais totais	45
FIGURA 15: Meio condicionado de astrócitos tratados por casticina promove aumento no número de células corticais totais	46
FIGURA 16: Astrócitos tratados por casticina reduzem a proliferação de precursores corticais	48
FIGURA 17: Astrócitos tratados por casticina reduzem a morte de precursores neurais	50
FIGURA 18: Meio condicionado de astrócitos tratados por casticina reduz a morte celular	51
FIGURA 19: Astrócitos tratados por casticina não alteram a morfologia neuronal	53
FIGURA 20: Astrócitos tratados por casticina aumentam a população neuronal	54
FIGURA 21: Astrócitos tratados por casticina não interferem na diferenciação neuronal	55
FIGURA 22: Astrócitos tratados por casticina não interferem na morte de neurônios	57
Figura 23. Modelo proposto para os mecanismos de ação do flavonóide casticina sobre as células do SNC	74

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
ABREVIATURAS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. As Células do Sistema Nervoso Central	2
1.1.1. Interações Neurônio-Astrócito	6
1.2. Os Flavonóides	11
1.2.1 Gênero <i>Croton</i>	12
1.2.2 O Flavonóide casticina	13
1.3. Flavonóides e o Sistema Nervoso	15
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	18
2.1 Geral	19
2.2 Específicos	19
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 O Flavonóide	21
3.2 Animais	21
3.3 Cultura Primária de Astrócitos	22
3.4 Cultura Secundária de Astrócitos	22
3.5 Tratamento pelo Flavonóide	23
3.6 Preparação de Meio condicionado Astrocitário	23
3.7 Culturas de Precursores Neurais e Cocultura	23
3.8 Ensaios de Proliferação	24
3.9 Imunofluorescência	25
3.10 Análise Quantitativa e Estatística	26
3.11 Extração de Proteínas Totais e <i>Western Blot</i>	26
3.12 Análise Densitométrica	27
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	28
4.1 Efeito Direto da Casticina sobre os Precursores Neurais	29
4.2 Efeito Direto da Casticina sobre a Biologia Astrocitária	37
4.3 Astrócitos Corticais Tratados pelo Flavonóide Casticina Aumentam o “Pool” de Células Precursoras	43
4.4 Astrócitos Corticais Tratados pelo Flavonóide Casticina Diminuem a Proliferação de Precursores Neurais	47
4.5 Astrócitos Corticais Tratados pelo Flavonóide Casticina Diminuem a Morte de Precursores Neurais	49
4.6 Astrócitos Corticais Tratados pelo Flavonóide Casticina Aumentam a População Neuronal	52
4.7 Astrócitos Corticais Tratados pelo Flavonóide Casticina Não Interferem na Morte de Neurônios	56
CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO	58
CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES	76
CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. AS CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O sistema nervoso central (SNC) é composto basicamente por dois tipos celulares: os neurônios e as células da glia (**Figura 1**). A glia foi inicialmente descrita, na primeira metade do século XIX, pelo patologista Rudolf Virchow, como um tecido conectivo do sistema nervoso (SN), conhecido como “cola neural” (Kimelberg, 2004). Durante muitos anos, estas células, posteriormente chamadas de neuroglia, foram deixadas em segundo plano e consideradas como acompanhantes passivos dos neurônios. Atualmente, propõe-se que as células gliais possam desempenhar, juntamente com os neurônios, uma série de funções relevantes no processamento das informações, garantindo o desenvolvimento e funcionamento do SNC (Gomes, & Rehen, 2004). As células da glia são as mais abundantes do SN de vertebrados, correspondendo a 65% nos roedores e 90% nos humanos (Kandel *et al.*, 2000). A glia subdivide-se em duas classes: a microglia e a macroglia (Golgi, 1885; Ramon y Cajal, 1911 *apud* Somjem, 1988; Tardy, 1991; Lent, 2001).

As células da *microglia* apresentam corpo celular pequeno e comportam-se como fagócitos que são normalmente mobilizados após infecções, lesões ou doenças neurodegenerativas. Sua origem é motivo de intensas discussões; porém, no momento, acredita-se que elas sejam provenientes de macrófagos que invadem o SN através dos vasos sanguíneos em algum momento do desenvolvimento (Lima *et al.*, 2001; Vilhardt, 2005). Suas funções estão relacionadas à fagocitose, inflamação e apresentação de antígenos constituindo, assim, defesa contra patógenos invasores (Aloisi, 2001). Estas células ainda podem secretar substâncias neurotróficas e ativar

astrócitos – facilitando a sobrevivência de neurônios – ou estar associadas a processos degenerativos como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Múltipla e à demência associada à Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Dickson *et al.*, 1993).

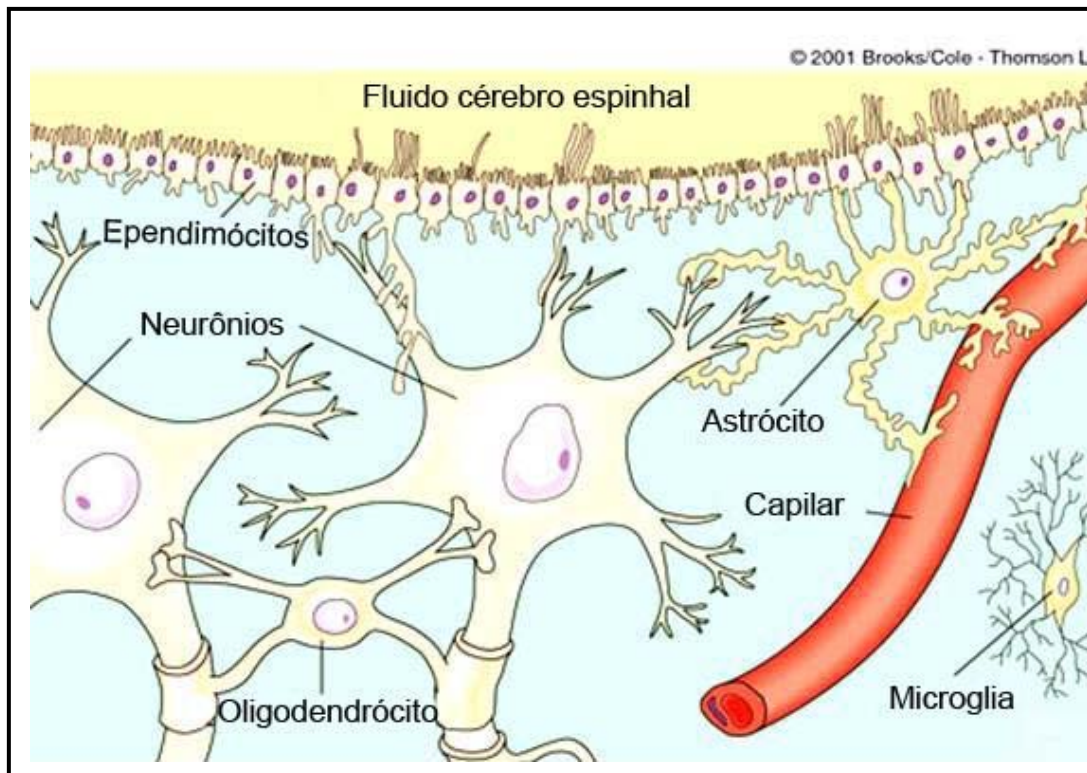


Figura 1. Esquema ilustrando os diferentes tipos de células do sistema nervoso central: neurônios e células da glia.

(Fonte: <http://www.colorado.edu/kines/Class/IPHY3430-200/image/gila.jpg>)

Os principais componentes da macroglia são os ependimócitos, oligodendrócitos e astrócitos (**Figura 1**). Os *ependimócitos* ou células ependimárias são células que revestem os ventrículos e o canal central da medula. Elas participam da produção do líquido ou líquido cérebro-espinhal, que preenche o espaço ventricular (Reichenbach & Robinson, 1995). Os *oligodendrócitos* são células

relativamente pequenas cujos prolongamentos envolvem os axônios dos neurônios formando assim a bainha de mielina do SNC (Kandel *et al.*, 2000; Lent, 2001).

A maior parte dos astrócitos do córtex cerebral origina-se de um tipo celular específico denominado *glia radial*. Presentes em algumas regiões do cérebro, transitoriamente, durante o desenvolvimento, a *glia radial* tem um papel crucial na construção do SN. Inicialmente identificada como a célula responsável por dar suporte à migração e posicionamento neuronal durante o desenvolvimento do córtex cerebral (Levitt & Rakic, 1980; Anton *et al.*, 1996; Gaiano *et al.*, 2000; Hartfuss *et al.*, 2001; Poluch & Juliano, 2007) hoje, sabe-se que estas células após o fim da migração neuronal dão origem não só aos astrócitos como à maior parte dos neurônios corticais, inclusive em humanos (Malatesta, 2000; Hartfuss *et al.*, 2001; Noctor *et al.*, 2002; Antony *et al.*, 2004; Mo *et al.*, 2007; Stipursky & Gomes, 2007). As recentes descobertas de que as células de glia radial são progenitoras tem colocado em discussão por diversos autores sua classificação como célula glial (Barres & Barde, 2000; Barres, 2003).

Os *astrócitos* são o tipo celular mais numeroso da família glial, representando cerca da metade de toda a população da glia (Kandel, 2000; Bear *et al.*, 2002; Tardy, 2002). Estas células estão envolvidas em diversos eventos no SNC como manutenção da homeostase do espaço extracelular, remoção de neurotransmissores da fenda sináptica, controle da concentração de íons no fluido extracelular (Bear *et al.*, 2002), e ainda contribuem ativamente para a resposta imune do SNC contra agentes químicos, infecciosos ou traumatismos (Letournel-Boulland *et al.*, 1994; Barres & Barde, 2000).

Os *astrócitos* são diferenciados morfologicamente em dois tipos: os protoplasmáticos e os fibrosos, encontrados respectivamente na substância branca e

na substância cinzenta. Em termos funcionais, não foram descritas diferenças marcantes entre os dois subgrupos celulares (Lent, 2001; Kriegstein & Götz, 2003; Kimelberg, 2004). Os astrócitos tendem a ter processos longos a partir do seu corpo celular, os quais podem aproximar-se dos espaços interneuronais, envolvendo sinapses, ou envolvendo os nodos de Ranvier, nos axônios (Cajal, 1995; Kandel *et al.*, 2000). Alguns dos prolongamentos dos astrócitos terminam em estruturas conhecidas como pés-terminais, em contato com a superfície dos neurônios com função de suprimento nutritivo dessas células, ou em contato com a superfície dos vasos sanguíneos do encéfalo, contribuindo juntamente com as células endoteliais destes vasos, para a formação da barreira hematoencefálica (BHE), essencial para a manutenção da integridade do SNC (Youdim *et al.*, 2004). Mais recentemente, a forte associação dos astrócitos aos vasos sangüíneos foi relacionada a um novo mecanismo de migração neuronal, denominada migração vasofílica. Nesse processo, neurônios localizados no bulbo olfatório de roedores utilizam vasos sangüíneos como guias para dispersão no bulbo. A interação entre os neurônios e os vasos é mediada pela matriz extracelular e os astrócitos perivasculares (Bovetti *et al.*, 2007).

Além das características morfofuncionais, os astrócitos podem ser identificados pela expressão de duas classes majoritárias de proteínas de filamento intermediário (FI): GFAP (proteína acídica fibrilar glial) e vimentina. Durante a astrocitogênese, observa-se a transição na expressão dos genes dessas proteínas de FI, de forma que vimentina, expressa em precursores astrocitários e astrócitos imaturos é gradativamente substituída por GFAP (Bignami & Dahl, 1989). Embora recentemente encontrada em outros tipos celulares, GFAP ainda tem sido reconhecida como um marcador majoritário de diferenciação astrocitária e de

astrócitos reativos (Eng *et al.*, 1971; Dahl & Bignami 1973). Esses últimos, caracterizados por acúmulo de filamentos ricos em GFAP e por intensa multiplicação, são característicos de resposta a lesões do SN. Nessas situações, os astrócitos podem formar uma cicatriz ao redor de locais lesionados no SNC, constituindo o fenômeno conhecido como astrogliose ou gliose reativa (Eng *et al.*, 1992; Aschner, 1998; Lent, 2001).

Desde sua descrição por Virchow, tem crescido substancialmente o interesse pelas células gliais. Diversos estudos têm mostrado que essas células participam ativamente de processos relevantes para o desenvolvimento e manutenção do SN, na maior parte das vezes atuando em conjunto com os neurônios na determinação da arquitetura morfo-fisiológica do SN. Atualmente, a glia está longe de ser considerada um mero coadjuvante no SN. As crescentes evidências das células de glia radial e astrócitos como candidatos potenciais a células-tronco neurais (Doestch *et al.*, 1999; Noctor *et al.*, 2002; Mo *et al.*, 2007), juntamente com diversas evidências da participação dos astrócitos na transmissão sináptica (Barres & Barde, 2000), ressaltam a relevância de se entender os mecanismos que modulam a interação entre as células gliais e as neuronais.

1.1.1. INTERAÇÕES NEURÔNIO-ASTRÓCITO

O desenvolvimento do SN é um processo regido pelo balanço entre o programa genético e fatores epigenéticos, resultado estes últimos das interações que as células fazem ao longo do seu desenvolvimento. Destas interações, as neuro-gliais estão dentre as que mais se destacam na morfogênese do SN. Essas interações desempenham papel importante em quase todas as etapas da organização da arquitetura cerebral, desde os estágios mais iniciais da neurogênese

ao estabelecimento final das conexões neurais incluindo processos como proliferação neuronal, migração, orientação axonal, mielinização, formação de sinapse, maturação glial e sinalização neural (Pfrieger & Barres, 1997; Fróes *et al.*, 1999; Lim & Alvarez-Buylla, 1999; Gomes *et al.*, 1999a; 1999b; 2001; de Sampaio e Spohr *et al.*, 2002; Hatten, 2002; Rouach *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002).

O conjunto de dados atualmente disponível aponta para uma dependência mútua entre neurônios e astrócitos para o estabelecimento do padrão de organização final necessário à arquitetura e função cerebral (Pfrieger & Barres, 1997; Fróes *et al.*, 1999; Lim & Alvarez-Buylla, 1999; Gomes *et al.*, 1999a; 1999b; 2001; De Sampaio e Spohr *et al.*, 2002; Hatten, 2002; Rouach *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002). Dados *in vitro* indicam que neurônios modulam a forma, proliferação e diferenciação de astrócitos cerebelares (Hatten, 1985; Swanson *et al.*, 1997). Recentemente, nosso grupo demonstrou que neurônios corticais modulam a diferenciação astrocitária através da secreção do fator de crescimento transformante beta 1 (TGF- β 1) (Gomes *et al.*, 1999; De Sampaio e Spohr *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2005).

Durante o desenvolvimento, os astrócitos auxiliam a proliferação e sobrevivência neuronais, o crescimento axonal e a eficiência sináptica (Priefger & Barres, 1997; Gomes *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2002; Gomes & Rehen, 2004; Martinez & Gomes, 2002; 2005). Sabe-se hoje que existe neurogênese no SN intacto de mamíferos adultos, porém é restrita a poucas regiões (Temple & Alvarez-Buylla, 1999; Gage, 2000; Temple, 2001; Rakic, 2002). Acredita-se que a capacidade neurogênica dessas regiões esteja, em parte, associada a certos sinais provenientes de astrócitos de regiões específicas do SNC, a exemplo do hipocampo (Song *et al.*, 2002). Lim & Alvarez-Buylla (1999) demonstraram que o suporte astrocitário é fundamental, como

microambiente neurogênico, para as células da zona subventricular (camada proliferativa), contribuindo para a sua diferenciação em neurônios no SN adulto.

Os astrócitos representam praticamente metade do número total de células, no cérebro de um mamífero adulto, e promovem suportes estrutural, metabólico e trófico para os neurônios (Banker, 1980). As células astrocitárias produzem a maioria dos componentes da matriz extracelular (MEC) no SNC incluindo a fibronectina e laminina que estão fortemente envolvidas na determinação da polaridade neuronal e crescimento axonal (Chamak & Prochiantz, 1989; Costa *et al.*, 2002).

Mais recentemente, Lie e colaboradores (2005) identificaram a expressão de muitos membros da família *wnt*, incluindo *wnt3*, em astrócitos hipocampais adultos. Esta molécula faz parte de uma ampla família de fatores de crescimento, constituídos de glicoproteínas secretadas que desempenham papéis essenciais no desenvolvimento embrionário e fetal (Gordon & Nusse, 2006). Além disso, os autores sugerem que a sinalização deste fator é o principal regulador da neurogênese hipocampal no adulto e pode estar relacionada a funções do hipocampo. Um outro fator descrito possivelmente envolvido com a neurogênese é o ácido retinóico (AR), o qual, segundo Környei e colaboradores (2007), tem ações complementares às ações do *wnt* na regulação da neurogênese.

Os astrócitos constituem a principal fonte de fatores tróficos importantes para a sobrevivência neuronal. Essas células secretam uma série de fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento da epiderme (EGF), fator de necrose tumoral (TNF), TGF- β etc) e elementos de MEC (**Figura 2**), tanto em situações fisiológicas como patológicas do SN (Garcia-Abreu *et al.*, 1995; Trentin *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1999a; Martinez & Gomes, 2002; 2005).

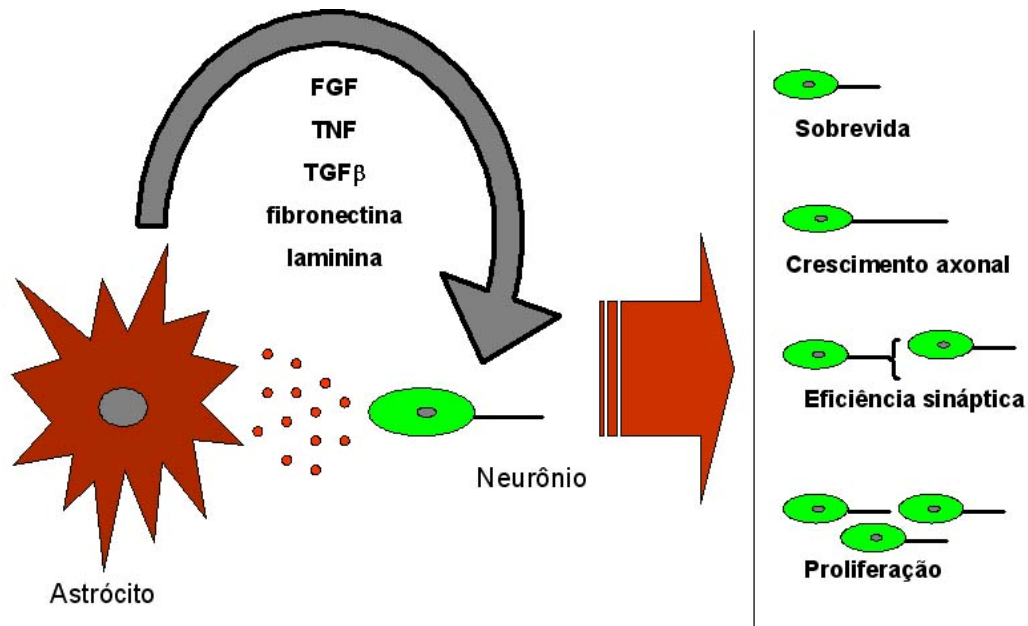


Figura 2. *Interação neurônio-astrocyte.* As células astrócitárias secretam uma série de fatores de crescimento (FGF, TNF, TGF β) e elementos de matriz extracelular (fibronectina, laminina) importantes para a sobrevivência e o funcionamento neural.

Uma das funções mais marcantes dos astrócitos durante o desenvolvimento do SNC refere-se à proteção contra neurotoxicidade do neurotransmissor excitatório, glutamato. Esse mecanismo é mediado pela secreção de membros da família TGF- β pelos astrócitos em resposta ao excesso de glutamato no ambiente (Bruno *et al.*, 1998).

O funcionamento adequado dos circuitos neurais requer a formação de uma grande quantidade de contatos sinápticos. De longa data sabe-se que os astrócitos atuam nas atividades sinápticas seja pela manutenção da concentração de íons no meio extracelular ou pela remoção de neurotransmissores da fenda sináptica após sua liberação (Kandel *et al.*, 2000). Atualmente, no entanto, evidências apontam para outras participações ativas da glia neste processo. O número total de sinapses não é uma propriedade intrínseca do neurônio, mas pode ser profundamente regulado por sinais extrínsecos. Na ausência de glia, neurônios em cultura apresentam apenas

uma limitada habilidade de formar sinapses, já em presença de astrócitos, existe a formação de sinapses estruturalmente maduras e funcionais (Ullian *et al.*, 2001). Além da sinaptogênese, hoje se sabe que os astrócitos também influenciam o crescimento axonal, guiando-o tanto durante o desenvolvimento do SN, quanto na recuperação após lesões, mesmo em adultos (Garwood *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2002; Nadarajah, 2003). Diversos trabalhos evidenciam que o contato com a célula glial ou fatores solúveis derivados da glia auxiliam ativamente no controle da formação e no funcionamento das sinapses durante o desenvolvimento e nos organismos adultos (Ullian *et al.*, 2001; Nägler *et al.*, 2001; Christopherson *et al.*, 2005). Mais ainda, as células gliais têm-se revelado importantes moduladores da plasticidade neural adulta, dando suporte ao aprendizado e à memória (Ullian *et al.*, 2001).

Embora muitos fatores de crescimento ajam diretamente nos neurônios, várias moléculas agem, indiretamente, via células gliais, especialmente através dos astrócitos (para revisão ver Gomes *et al.*, 2001; Gomes & Rehen, 2004). O fato de astrócitos poderem ser mediadores de compostos que induzam a neurogênese, tanto durante o desenvolvimento, quanto no cérebro adulto, abre grandes perspectivas para o papel dessas células em procedimentos de terapia celular. A descoberta de compostos capazes de induzir a diferenciação e sobrevivência neuronais, assim como a elucidação de seus mecanismos de ação (direto ou via astrócito), poderá representar um salto qualitativo na terapia de doenças neurodegenerativas. Nesse cenário, uma das substâncias que vêm sendo mais explorada recentemente são os flavonóides, compostos cujas ações no SN, embora não completamente elucidadas, parecem representar importantes promissores no tratamento de diversos tumores do sistema nervoso e doenças neurodegenerativas (Schmitt-Schillig *et al.*, 2005).

1.2. Os FLAVONÓIDES

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular, hidrossolúveis, presentes nos vacúolos das células vegetais e representam o maior grupo de compostos fenólicos naturais, sendo o mais estudado dentre os metabólitos secundários (Raven *et al.*, 2001; Yunes & Calixto, 2001). São derivados de benzo-gama-pirona, os quais são estruturalmente constituídos de 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto fundamental (Yokozawa *et al.*, 1997), possuindo uma estrutura comum, caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (Yunes & Calixto, 2001). Esses compostos estão amplamente distribuídos no reino vegetal, geralmente na forma solúvel de heterosídeos, presentes em todas as angiospermas (plantas que produzem flores e frutos). Sendo assim, os flavonóides fazem parte obrigatoriamente da dieta humana (Yunes & Calixto, 2001). O consumo diário destes compostos está em torno de 23 mg/dia dos quais a maior parte representada pela quercetina, especialmente devido à ingestão de alimentos como o chá preto, cebolas, frutas (como a maçã) e o vinho (Hertog, 1996; Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Mais de quatro mil compostos flavonóides distintos são descritos e subdivididos em classes como: flavanóis, flavanonas, antocianinas e flavonas (Yunes & Calixto, 2001).

O termo “flavonóide” deriva do latim *flavus* que significa amarelo. Os grupos flavonóis e flavonas, no entanto, são incolores e a classe das antocianinas possui substâncias que variam no espectro de coloração do verde ao azul (Yunes & Calixto, 2001; Raven *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2003).

Nos vegetais, os flavonóides desempenham funções como bloqueio da radiação ultravioleta extrema permitindo a passagem seletiva de luz nos comprimentos de onda importantes para a fotossíntese; nas flores, atuam como

sinais visuais atraindo animais polinizadores e regulam o crescimento vegetal (Yunes & Calixto, 2001; Raven *et al.*, 2001; Lopes *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, o interesse pelos efeitos farmacológicos e bioquímicos dos flavonóides tem crescido bastante, uma vez que membros dessa família isolados de diferentes plantas têm revelado uma variedade de efeitos biológicos também no reino animal. Esses efeitos incluem propriedades anti-bacterianas, anti-fúngicas e anti-viróticas (Hostettman *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1999; De Clercq, 2000; van der Watt & Pretorius, 2001); atividade anti-tumoral, especialmente contra câncer de mama, câncer de colo e leucemia (Richter *et al.*, 1999; Xiao *et al.*, 2001); atividade hepatoprotetora, anti-ulcerogênica, anti-oxidante, anti-hipertensiva, hipolipidêmica, anti-plaquetária, anti-alérgica, anti-inflamatória e anti-angiogênica (Fórmica & Regelson, 1995; Tan *et al.*, 2003).

Em humanos, devido à baixa solubilidade dos flavonóides agliconas em água, ao pouco tempo em que estas moléculas permanecem no fígado e ao seu baixo coeficiente de absorção, é praticamente impossível a intoxicação aguda pelo consumo de flavonóides, exceto em situações raras de alergia. Dessa forma, a margem de segurança para o uso terapêutico em humanos é muito grande o que facilita a sua utilização em processos terapêuticos (Grotz & Günter, 1971 apud Hvsteen, 2002).

1.2.1. GÊNERO *CROTON*

A família Euphorbiaceae, uma das maiores e mais diversas das famílias das angiospermas, possui mais de sete mil espécies distribuídas em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais sendo considerada uma das famílias representativas da região da Chapada Diamantina, no Nordeste brasileiro (Stannard,

1995). O gênero *Cróton* é considerado o segundo maior desta família, constituído por cerca de 700 espécies, 400 das quais são encontradas no Brasil (Bressan *et al.*, 1998). A estrutura bioquímica deste gênero tem sido bastante explorada e os estudos fitoquímicos efetuados têm conduzido ao isolamento de alcalóides, flavonóides, triterpenóides e uma grande variedade estrutural de diterpenóides (Farnsworth *et al.*, 1969; Pieters *et al.*, 1995; Bittner *et al.*, 1997; Lencina *et al.*, 2001; Palmeira Júnior, 2005; Santos *et al.*, 2005). Dentre as atividades farmacológicas do *Cróton* comprovadas em estudos experimentais destacam-se o seu potencial antiinflamatório (Falcão *et al.*, 2005), anti-ulcerogênico (Almeida *et al.*, 2002), antidiabético (Barbosa-Filho *et al.*, 2005), inibitório da enzima acetilcolinesterase (Barbosa-Filho *et al.*, 2006), entre outras (Otshudi *et al.*, 2000; Palmeira Júnior, 2005).

As plantas do gênero *Croton* biossintetizam principalmente, como metabólitos secundários, diterpenos e alcalóides (Charris *et al.*, 2000), mas também produzem triterpenos (Marciel *et al.*, 1998), sesquiterpenos, monoterpenos (Martins *et al.*, 2000), flavonóides (Guerrero *et al.*, 2002) e outros metabólitos. A espécie *Croton betulaster* (**Figura 3**) está presente na região da Chapada Diamantina, no estado da Bahia (Stannard, 1995). De extratos orgânicos das folhas de *Croton betulaster* já foram isolados terpenos, alcalóides, óleos essenciais, além dos flavonóides acacetina, gencuanina, pendulentina, e casticina (Barbosa, 1999; Barbosa *et al.*, 2003; 2004).

1.2.2. O FLAVONÓIDE CASTICINA

O flavonóide casticina (5,3'-dihidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona) (**Figura 3**) já foi isolado de plantas de diferentes gêneros, como por exemplo da *Viticis fructus*

(*Vitex rotundifolia*) (Kobayakawa *et al.*, 2004), *Achillea millefolium* (Haïdara *et al.* 2006), *Artemisia annua* (Han *et al.*, 2007) e da *Vitex agnus* (Hajdu *et al.*, 2007). Recentemente, este flavonóide foi isolado de extratos orgânicos de folhas de *Croton betulaster*, planta encontrada na região da Chapada Diamantina, no estado da Bahia (Barbosa, 1999; Barbosa *et al.*, 2003; 2004). Seu papel na inibição da proliferação e crescimento de linfócitos de camundongo já foi demonstrado (You *et al.*, 1998). Mais recentemente, Kobayakawa e colaboradores (2004) demonstraram o efeito inibitório da casticina na proliferação de células de carcinoma epidermóide humano (linhagens KB e A431).

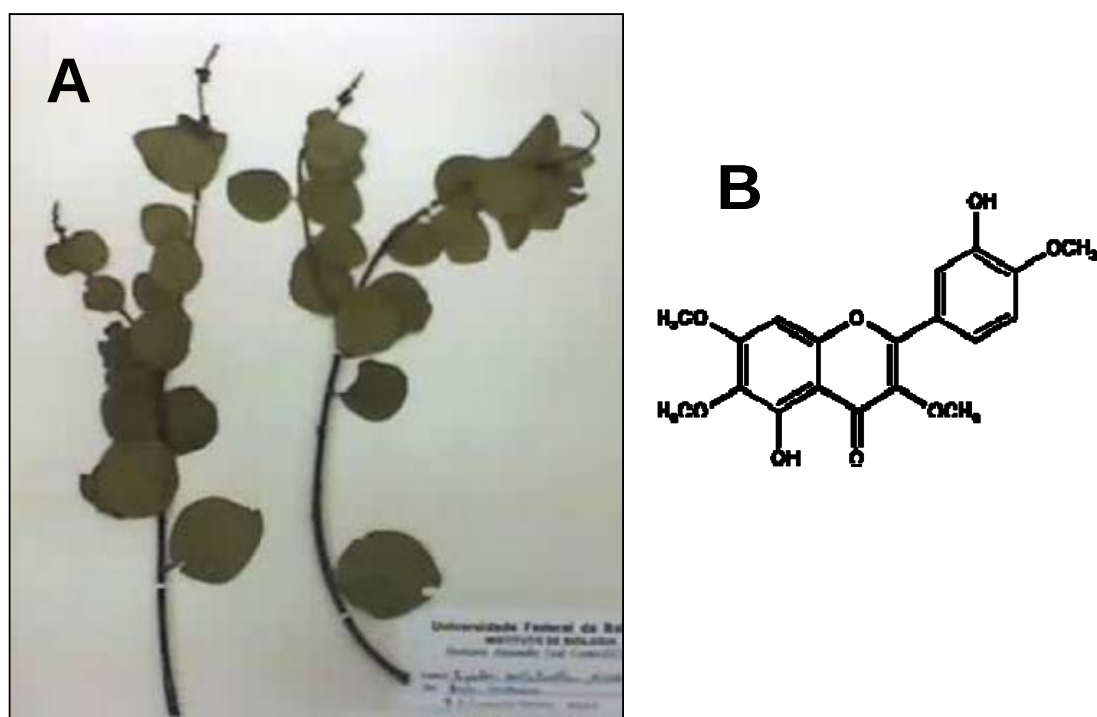


Figura 3. (A) Exsicata de *Croton betulaster*, catalogada sob n° 031762, no Herbário Alexandre Leal Costa (IB-UFBA). Fonte: Barbosa, 1999; Barbosa *et al.*, 2003; **(B)** Esquema ilustrando a fórmula estrutural da casticina (5,3'-dihidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona);

Fonte: http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/systematik/12_forml/casticin.htm

1.3. FLAVONÓIDES E O SISTEMA NERVOSO

Alguns estudos vêm demonstrando a influência de flavonóides sobre as células do SNC. A barreira hemato-encefálica (BHE) tem o importante papel de regular o acesso de moléculas polares e de macromoléculas circulantes na corrente sangüínea para o cérebro. Apesar de evidências da função neuroprotetora de alguns flavonóides (Schmitt-Schillig *et al.*, 2005), ainda pouco se sabe a respeito da capacidade destes compostos atravessarem a BHE. Aparentemente, alguns flavonóides como a epigallocatequina galato (Suganuma *et al.*, 1998), a naringenina (Peng *et al.*, 1998) e a hesperetina (Tsai & Chen, 2000) administrados por diferentes vias têm a capacidade de atravessar a BHE. Esses dados sugerem que o sistema nervoso possa ser alvo da ação desses compostos. Essa idéia pode ser reforçada por algumas evidências, por exemplo: 1) o flavonóide quercetina atua como agonista de receptores de adenosina no cérebro de humanos (Blardi *et al.*, 1999); 2) derivados sintéticos de flavonas ligam-se a receptores benzodiazepínicos (Viola *et al.*, 2000); 3) polifenóis naturais apresentam potente ação neuroprotetora para neurônios dopaminérgicos em cultura (Mercer *et al.*, 2005); 4) o flavonóide quercetina modula os níveis cerebrais de óxido nítrico num modelo de isquemia global (Shutenko *et al.*, 1999).

Ainda que vários estudos tenham demonstrado a capacidade de diferentes flavonóides em atravessar a BHE e exercerem um efeito neuroprotetor, Dajas e colaboradores (2001; 2003a) fazem uma comparação entre potencial antioxidante e neuroprotetor de alguns flavonóides, como a quercetina e boldina, em culturas de células e *in vivo*, chamando atenção para o fato de que *in vivo* a quercetina não foi capaz de proteger neurônios da substância *nigra* após indução de danos oxidativos,

o que provavelmente estaria associado à dificuldade dessas moléculas em atravessar a BHE.

Nos últimos anos, o Laboratório de Neuroquímica do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia tem estudado o papel de flavonóides extraídos de plantas nativas do estado Bahia e adotadas na Medicina Popular, no desenvolvimento de células do sistema nervoso *in vitro*. Investigou-se a ação do flavonóide rutina (extraído de *Dimorphandra mollis*), dos flavonóides acacetina, casticina, apigenina e pendulitina (extraídos de *Croton betulaster*) e do biflavonóide agatisflavona (extraído de *Caesalpinia pyramidalis*) em células gliais. Foi verificado que estes flavonóides inibem o crescimento de células gliais tumorais e induzem essas células à diferenciação do tipo astrocitária ou à apoptose (Silva *et al.*, 2002; 2004; Bahia *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006, 2007).

O uso terapêutico de plantas parece ser tão antigo quanto a própria espécie humana (Wilhelm Filho *et al.*, 2001) e a utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Akerlele, 1993 *apud* Veiga Júnior, 2005). No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Sampson *et al.*, 2000 *apud* Salatino *et al.*, 2007). Uma enorme variedade de plantas é usada na medicina popular no Brasil e em outros países (Hostettman *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1999; De Clercq, 2000; van der Watt & Pretorius, 2001). No Brasil, o uso de plantas medicinais e a automedicação, principalmente na região Nordeste, é bastante comum.

Embora a utilização dos flavonóides na terapia de diversos sistemas orgânicos seja bastante comum, sua utilização no tratamento de patologias do

sistema nervoso ainda é bastante incipiente. Isso se dá em parte graças ao pouco conhecimento a respeito de suas ações nesse sistema. Desta forma, fica clara a necessidade de se entender não só as ações como os mecanismos moleculares mediadores dos efeitos dos flavonóides no sistema nervoso central.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL:

Estudar os efeitos do flavonóide casticina na morfogênese neural *in vitro*.

2.2. ESPECÍFICOS:

- Analisar o papel do flavonóide casticina na proliferação e diferenciação astrocitária;
- Analisar o efeito direto do flavonóide casticina na morte, proliferação e diferenciação de precursores neurais do córtex cerebral;
- Analisar o papel dos astrócitos como mediadores dos efeitos do flavonóide casticina na morte, proliferação e diferenciação de precursores neurais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. O FLAVONÓIDE

O flavonóide casticina (5,3'-dihidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona) foi extraído de folhas de *Croton betulaster* (Euphorbiaceae), arbusto que ocorre largamente na região da Chapada Diamantina - Bahia, e caracterizado no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais (Instituto de Química/UFBa), segundo protocolo estabelecido por Barbosa (2004). A caracterização das moléculas puras foi realizada por ressonância magnética nuclear do ^{13}C e ^1H , além de espectro infravermelho, sendo as estruturas confirmadas por ressonância magnética nuclear do ^1H . O composto foi obtido sob a forma de pó e dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co) em soluções estoques de 20 mM que foram mantidas protegidas da luz à -20°C (Barbosa, 1999). A diluição final do reagente foi obtida no momento do tratamento diluindo-se a solução concentrada diretamente no meio de cultura. Foi utilizada a concentração final de 10 μM do flavonóide na maior parte dos experimentos. Em alguns experimentos, para a análise da morfologia astrocitária, as culturas foram tratadas com diferentes concentrações do flavonóide (1 μM e 10 μM).

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar recém-natos e embrionários de 14 dias (E14). Esses ratos foram manipulados de acordo com a Comissão de Avaliação do Uso de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, respeitando as normas e recomendações nacionais e internacionais.

3.3. CULTURA PRIMÁRIA DE ASTRÓCITOS

Astrócitos de córtex cerebral de ratos Wistar recém-natos foram extraídos livres das meninges e dissecados criteriosamente (Gomes *et al.*, 1999a). As estruturas cerebrais foram mantidas em PBS-glicose (tampão salina fosfato: 8% de NaCl; 5,36% de Na₂HPO₄; 0,4% KH₂PO₄ e 0,9% de KCl com glicose 0,6%) durante todas as etapas de dissecação e dissociação. A densidade de plaqueamento utilizada foi de 3x10⁵ células por poço de 16 mm de diâmetro e 3x10⁶ por garrafa de 25 cm², sendo ambos previamente tratados por poliornitina (1,5 µg/ml, Sigma). As células foram mantidas por aproximadamente 7 a 10 dias em meio de *Dulbecco's Modified Eagle* suplementado com o nutriente F-12 (DMEM-F12, Invitrogen Life Technologies), suplementado com glicose (33 mM, Merck), glutamina (2 mM, Calbiochem), bicarbonato de sódio (3 mM, Merck), penicilina/estreptomicina (0,5 mg/ml) e fungizona (2,5 µg/ml, Squibb) e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen Life Technologies), até a cultura atingir a semi-confluência, à 37°C, sob uma atmosfera úmida de 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Durante o cultivo e após atingirem a confluência, as culturas foram analisadas por microscopia de contraste de fase em microscópio ótico invertido Nikon TE300.

3.4. CULTURA SECUNDÁRIA DE ASTRÓCITOS

As culturas secundárias foram preparadas como descrito por Trentin *et al.*, 1998. Culturas primárias de córtex de ratos recém-natos após atingirem a confluência foram tripsinizadas e replaqueadas numa densidade de 150.000 células por poço (placa de 24 poços) em meio DMEM/F12 contendo 10% de soro fetal bovino por 24 horas quando então se procedeu ao tratamento por flavonóide.

3.5. TRATAMENTO PELO FLAVONÓIDE

Após atingirem a semi-confluência, as monocamadas astrocitárias primárias foram lavadas 3X com meio DMEM-F12 sem soro e tratadas por 10 μ M do flavonóide casticina por um período de 24 horas em ausência de soro fetal bovino. As culturas controle foram mantidas por tempo correspondente em presença de DMSO, em volume equivalente ao tratado ou apenas em presença de meio sem soro. Para efeito de comparação, todos os controles dos experimentos foram considerados aqueles em presença de DMSO. No caso das culturas secundárias, após 24 horas em DMEM/F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, as culturas foram lavadas em meio sem soro (MSS) e mantidas por mais 24 horas em ausência ou presença de 1 μ M e 10 μ M de casticina.

3.6. PREPARAÇÃO DE MEIO CONDICIONADO ASTROCITÁRIO

A preparação do meio condicionado (MC) de astrócitos foi procedida da seguinte forma: após o tratamento com 10 μ M de casticina como descrito anteriormente, o meio foi substituído por DMEM/F12 e a cultura mantida por mais 24 horas. Após esse período, o meio condicionado derivado tanto dos astrócitos tratados com a casticina (MC Casticina) quanto das culturas controle (MC Controle) foi recolhido, centrifugado a 1500 g por 10 minutos e então usado imediatamente ou armazenado em alíquotas a -70°C para o uso posterior.

3.7. CULTURA DE PRECURSORES NEURAIIS E COCULTURA

As culturas de precursores corticais foram preparadas a partir de córtex cerebral derivados de ratos Wistar com 14 dias embrionários (E14) (Sousa *et al.*,

2004). As células foram dissociadas e plaqueadas em lamínulas de vidro em placas de cultura de 24 poços com 16 mm, previamente tratadas por poliornitina (1,5 µg/ml, Sigma Chemical Co). A densidade de plaqueamento utilizada foi de 1×10^5 células por poço. As culturas foram mantidas por aproximadamente 24-48 horas em presença de meio DMEM-F12 (Invitrogen Life Technologies), à 37°C, sob uma atmosfera úmida de 5% de CO₂.

Para os ensaios de cocultura, os precursores neurais (5×10^4 /poço) foram plaqueados sobre monocamadas astrocíticas tratadas ou não por 10 µM de casticina, como descrito previamente. As coculturas foram mantidas por 24 horas em meio DMEM-F12 sem soro à 37°C, em atmosfera úmida de 5% de CO₂.

3.8. ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO

Para a análise da proliferação, utilizamos o análogo de timidina e marcador de proliferação celular, bromodeoxiuridina (BrdU) (Gomes *et al.*, 1999b). Culturas de precursores neurais, culturas secundárias de astrócitos e coculturas foram incubadas por 24 horas simultaneamente em presença de 1 µg/ml de BrdU (Sigma Chemical Co) e casticina. A adição das drogas foi feita 2 horas após o plaqueamento dos precursores com o objetivo de não interferir na adesão dessas células ao substrato. Posteriormente à incubação com BrdU, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%/sacarose 4% por 20 minutos, lavadas 2 vezes com H₂O e incubadas em solução de HCl 2N à 50°C por 5 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com tampão borato 0,1M, sendo que cada lavagem foi de 10 minutos, à temperatura ambiente. Após este procedimento, as células foram lavadas com PBS e processadas para imunofluorescência para BrdU. O restante da imunofluorescência se processou como descrito a seguir.

3.9. IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica de imunofluorescência utilizada foi a descrita por Gomes *et al.* (1999b). Após decorrido o tempo de tratamento das culturas, as células foram fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 4% (Reagen – Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, RJ) sacarose 4% (Nuclear – Casa da Química Ind. e Com. Ltda, Diadema, SP) e, em seguida, procedida a imunofluorescência. Após a fixação, as culturas foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas por 5 minutos em PBS Triton X-100 0,2%. Posteriormente, as células foram incubadas em PBS/BSA 5% por 1 hora e em seguida, com anticorpo primário diluído em PBS-BSA 1% por 12 horas, em câmara úmida à 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas 4 vezes com PBS e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente com anticorpos secundários, conjugados à fluoresceína (FITC) ou Cy3. Após a incubação com o anticorpo secundário, as células foram lavadas 4 vezes com PBS e incubadas com DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) (Sigma Chemical Co) por 10 minutos e montadas em lâmina de vidro, com N-Propil galato (Sigma Chemical Co) para visualização ao microscópio de epifluorescência Nikon TE 300. Para todas as reações, os controles negativos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos acima descritos, omitindo-se a adição de anticorpo primário.

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários: policlonal contra-GFAP (marcador astrocitário; DakoCytomation California Inc.; 1:200), monoclonal contra- β -tubulina III (marcador neuronal; Promega Corporation; 1:1000), policlonal contra-caspase-3 ativada (Asp 175) (marcador de morte celular; Cell Signaling; 1:100) e o policlonal contra-BrdU (marcador de proliferação; Upstate; 1:300). Foram utilizados os seguintes anticorpos secundários: contra-IgG de camundongo conjugado à Alexa 488 (Molecular Probes; 1:400); contra-IgG de coelho conjugado à

Alexa 546 (Molecular Probes; 1:1000) e contra-IgG de rato conjugado à Alexa 546 (Molecular Probes; 1:250).

3.10. ANÁLISE QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA

As células foram fotografadas a partir do microscópio de epifluorescência Nikon TE 300 e capturadas, para visualização no programa Adobe Photoshop CS versão 8.0.1. Foram quantificados dez campos por experimento, e os números foram lançados no programa Excel, onde foram feitas as análises estatísticas. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo Teste T e considerado significativo o valor de $p \leq 0,05$.

3.11. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E *WESTERN BLOT*

As células em cultura foram lavadas 5 vezes com PBS gelado e então, raspadas em tampão de extração de proteína (EDTA 2 mM, DTT 2 mM, benzamidina 1 mM, pepstatina 1 mM, leupeptina 1 mM e TBS). Posteriormente, separou-se uma alíquota para a dosagem de proteína e as amostras foram tratadas pelo seguinte tampão de amostra: 7,7% de DTT; 10% de SDS; 40% de Tris 1M pH 6,8; 50% de glicerol; azul de bromofenol. As amostras foram fervidas por 5 minutos e analisadas imediatamente por eletroforese em gel de poliacrilamida ou estocadas à -20°C.

A concentração de proteína na fração foi determinada pelo método de Bradford, tendo como padrão a soro albumina bovina (BSA). As determinações foram feitas em duplicatas e a absorbância foi medida a 595 nm. Paralelamente à dosagem de proteína das frações, foi feita curva padrão de BSA. A concentração de proteína em mg/ml foi determinada a partir de cálculos de regressão linear, baseados nos valores obtidos a partir da curva-padrão.

Aproximadamente 15 µg de proteína por *lane* foram submetidas à eletroforese em géis de acrilamida SDS-PAGE a 10% e separadas com correntes de cerca de 10 mA. Após a separação das proteínas pelo peso molecular, estas foram transferidas por aplicação de campo elétrico para uma membrana do tipo PVDF (Amersham/Pharmacia Biotech). Após a transferência, a membrana de PVDF foi incubada com TBS/BSA 5% (Tampão Tris Salina: Tris 20 mM e NaCl 137 mM com 5% de soro albumina bovina) por 1 hora, e então com o anticorpo primário à 4°C por 12 horas. Após este tempo, a membrana foi lavada com TBS/Tween 0,1% por no mínimo 30 minutos e então incubada com o anticorpo secundário por 1 hora e 45 minutos à 37°C. Após a lavagem do anticorpo secundário, a membrana de PVDF foi processada pelo método de quimioluminescência pelo luminol (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate/Pierce), que consiste na oxidação do luminol, reação catalisada pela peroxidase, em presença de peróxido de hidrogênio. As bandas correspondentes às proteínas foram captadas por um filme autorradiográfico e analisadas densitometricamente no programa Image J. Os anticorpos primários utilizados foram: monoclonal contra-GFAP (Dako Cytomation; 1:500), monoclonal contra-alfa tubulina (Sigma Chemical Co; 1:1000). Os anticorpos secundários utilizados foram contra-IgG de coelho e contra-IgG de camundongo conjugados à peroxidase (ambos da Amersham Biosciences; 1:3000) .

3.12. ANÁLISE DENSITOMÉTRICA

A análise densitométrica da banda de GFAP e de α -tubulina foi feita no programa Image J. A intensidade do sinal foi avaliada como quantidade de pixels. As bandas foram mensuradas pela razão entre as intensidades das bandas marcadas para GFAP e α -tubulina.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Neste trabalho, analisamos o efeito do flavonóide casticina, extraído de *Croton betulaster*, planta nativa do Semi-árido do estado da Bahia, sobre diferentes aspectos da morfogênese neural *in vitro*, especificamente a morte, proliferação e diferenciação de precursores neurais derivados do córtex cerebral de roedores. Em adição, analisamos 2 diferentes mecanismos de ação da casticina sobre esses precursores: 1) direto e 2) indireto, mediado por astrócitos.

4.1. EFEITO DIRETO DA CASTICINA SOBRE OS PRECURSORES NEURAI

Para verificarmos o efeito da casticina sobre os precursores neurais, culturas primárias de progenitores neurais derivados do córtex cerebral de animais com 14 dias embrionários foram tratadas por 10 μ M de flavonóide por 24 horas. Para análise da proliferação celular, os progenitores foram incubados em presença do análogo de timidina, BrdU (1 μ g/ml) por 24 horas, seguido de imunodeteção para esta molécula. A morte celular e diferenciação neuronal foram analisadas por imunofluorescência para caspase-3 ativada e para o marcador neuronal β -tubulina III, respectivamente.

Adotamos a concentração de 10 μ M, uma vez que foi verificado em estudo prévio que esta concentração é subtóxica e não mostra influência significativa na viabilidade e crescimento de linhagens de origem glial (Freitas *et al*, 2007). Além disso, outros estudos, utilizando diferentes flavonóides, naturais ou sintéticos, também utilizaram a concentração de 10 μ M (Sagara *et al*, 2004; Di Giovanni *et al*, 2005).

Como pode ser observado nas **Figuras 4 e 5**, a casticina não alterou o número de células totais (**Figura 4**) nem sua proliferação (**Figura 5**). No entanto, observamos uma diminuição de aproximadamente 50% no número de células marcadas para caspase-3 ativada, em culturas tratadas pelo flavonóide (**Figura 6**). Esses dados sugerem que a casticina possa ter um efeito protetor para células precursoras neurais do córtex cerebral, reduzindo a morte dessas células.

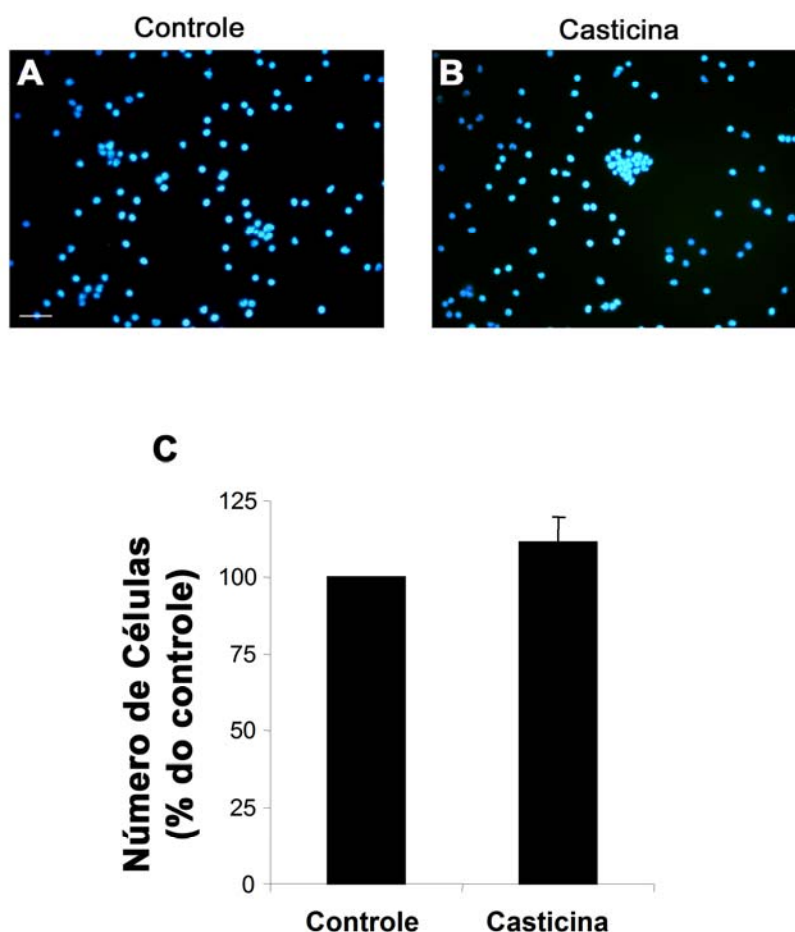


Figura 4. A casticina não influencia diretamente o número de células totais. Culturas de progenitores neurais foram preparadas a partir de córtex cerebral de ratos Wistar com 14 dias embrionários (E14). As células foram mantidas por 24 horas em presença de 10 μ M de casticina (**B**) ou do seu diluente DMSO (**A, Controle**). Posteriormente, o número de células foi quantificado através da marcação nuclear com DAPI (**C**). Não observamos diferença no número de células totais após o tratamento dos precursores com o flavonóide. A barra de calibração corresponde a 30 μ m.

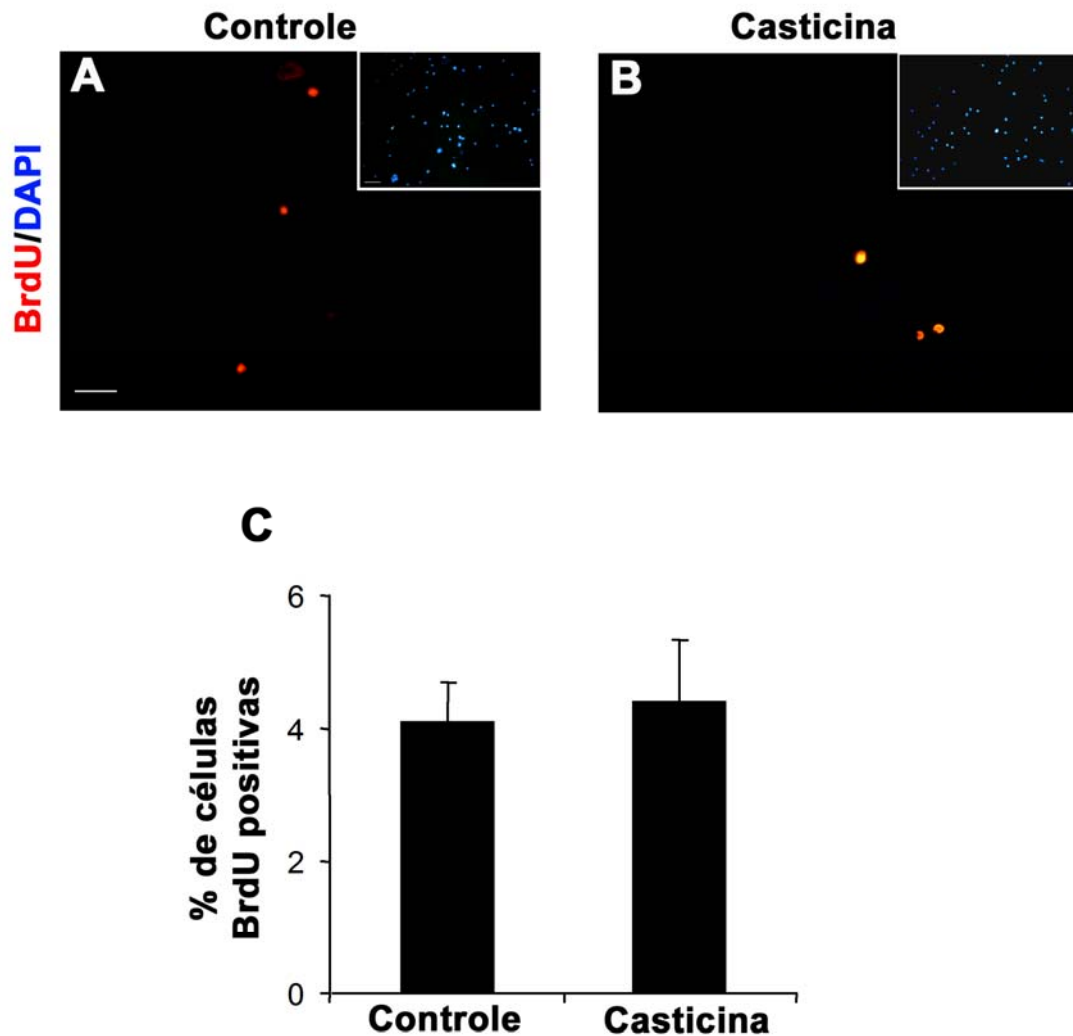


Figura 5. A casticina não influencia a proliferação de progenitores corticais. Culturas de progenitores foram preparadas a partir de córtex cerebral de ratos Wistar E14. As células foram mantidas por 24 horas simultaneamente em presença de 10 μ M de casticina (B) ou do seu diluente DMSO (A, Controle) e do análogo de timidina bromodeoxiuridina, BrdU (1 μ g/ml). Posteriormente, as células foram imunomarcadas para BrdU e o número de células BrdU positivas foi analisado (C). A casticina não influenciou a proliferação celular ($p > 0,05$). As barras de calibração correspondem a 30 μ m. Insets mostram marcação nuclear de DAPI nos campos correspondentes.

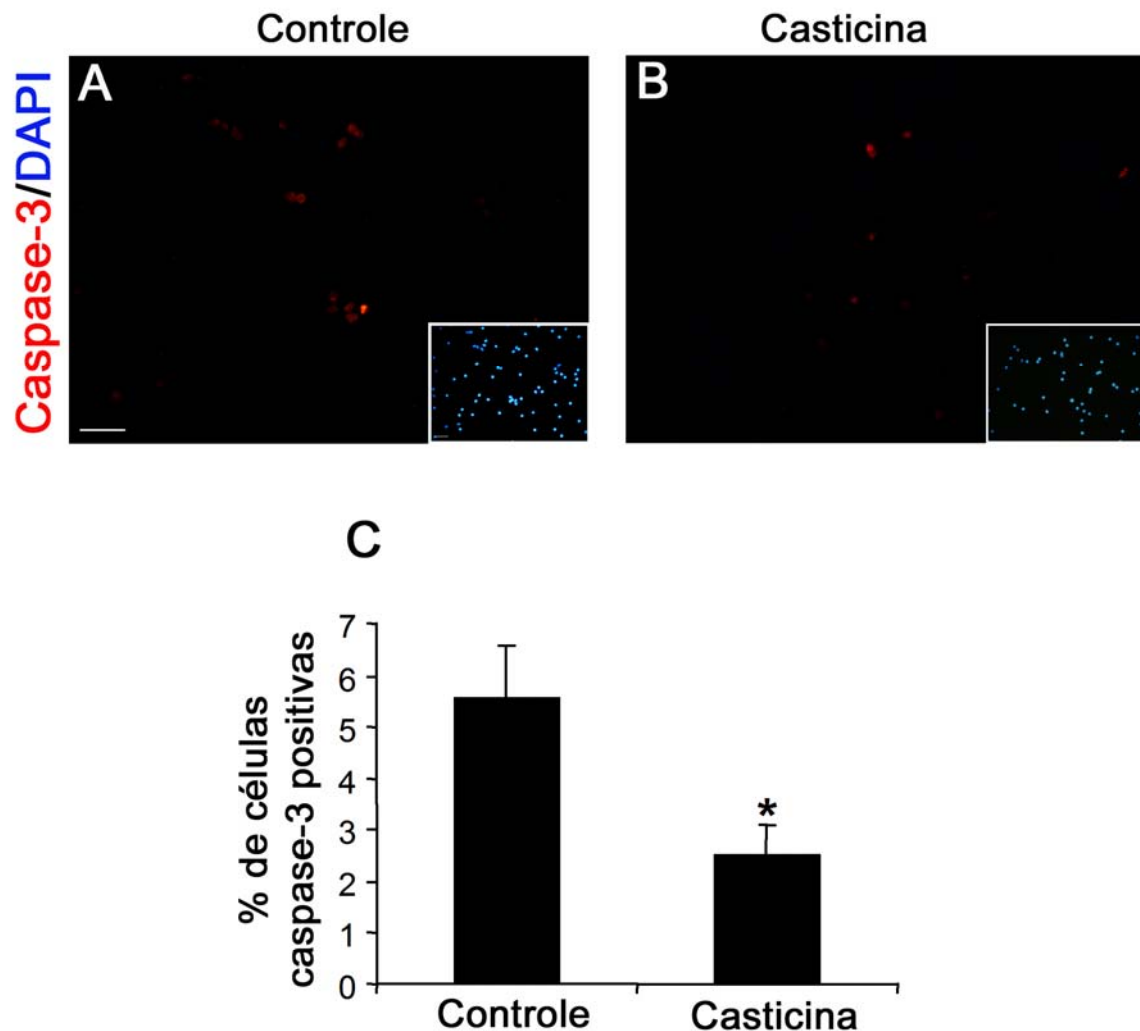


Figura 6. A casticina reduz a morte celular. Culturas de progenitores foram preparadas a partir de córtex cerebral de ratos Wistar E14. As células foram mantidas por 24 horas em presença de 10 μ M de casticina (**B**) ou do seu diluente, DMSO (**A**, **Controle**). Posteriormente, as culturas foram imunomarcadas para caspase-3 ativada e o número de células positivas para esse marcador foi analisado. Observamos redução de aproximadamente 50% da morte das células corticais após o tratamento pelo flavonóide (* $p < 0,005$) (**C**). As barras de calibração correspondem a 30 μ m (**A**). *Insets* mostram marcação nuclear de DAPI do campo correspondente.

Com o objetivo de analisar o potencial neurogênico dos flavonóides, culturas de progenitores neurais foram tratadas por casticina por 24 horas e as células marcadas para a proteína neuronal, β -tubulina III, analisadas. Como mostra a **Figura 7**, observamos um aumento de aproximadamente 70% no número total (absoluto) de neurônios em culturas de progenitores tratados pelo flavonóide.

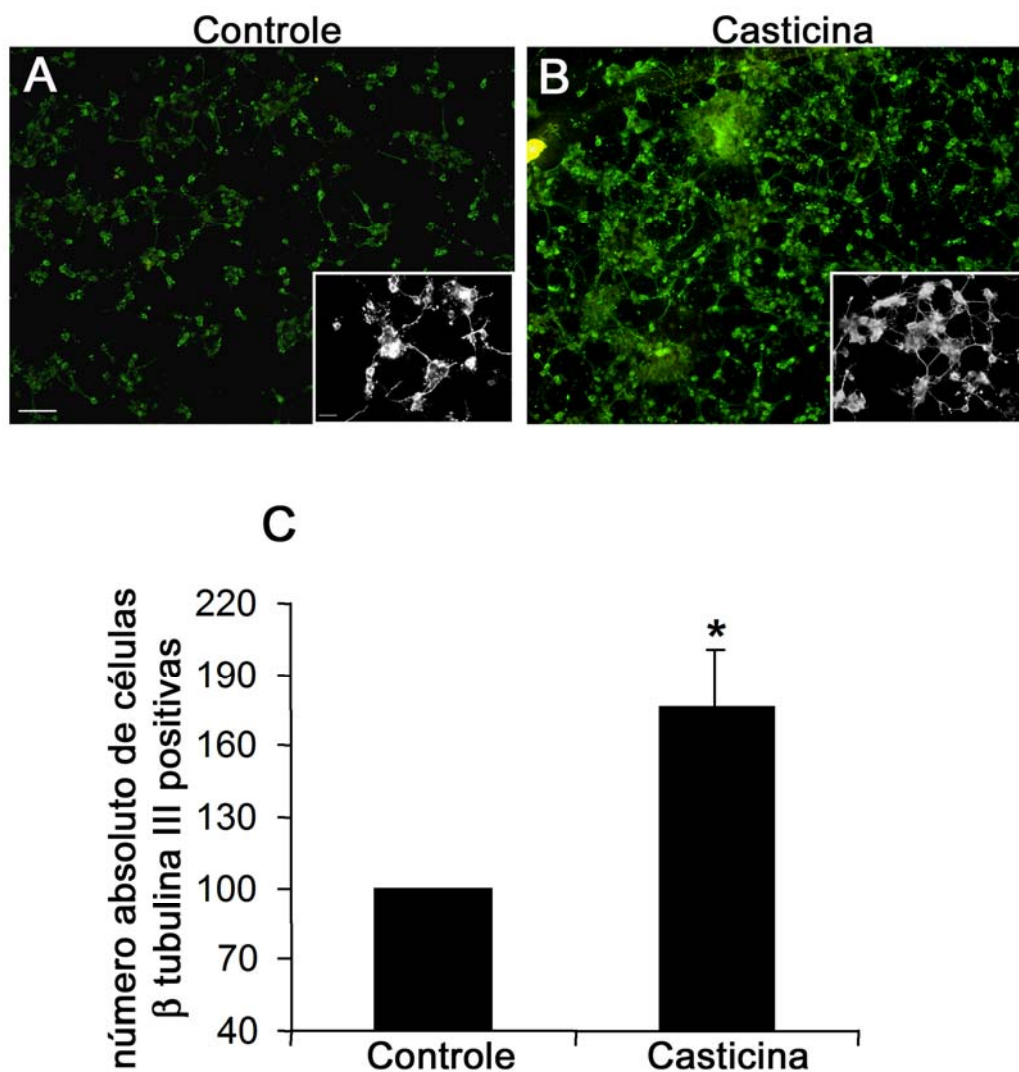


Figura 7. A casticina aumenta o número total de neurônios. Culturas de progenitores de córtex cerebral de ratos Wistar E14 foram mantidas por 24 horas em presença de 10 μ M de casticina (**B**) ou do seu diluente DMSO (**A**, **Controle**). As células foram imunomarcadas para β -tubulina III e quantificadas. O tratamento dos progenitores por casticina aumentou em aproximadamente 70% o número de neurônios (* $p < 0,05$) (**C**). A barras de calibração correspondem a 50 μ m (**A**) e 10 μ m (*inset* em **A**).

Diversos mecanismos têm sido propostos para uma determinada molécula promover neurogênese: 1) estimulando a proliferação de progenitores neuronais; 2) modulando a morte de precursores neuronais e/ou dos neurônios pós-mitóticos; 3) induzindo o comprometimento neuronal de progenitores (especificação). Como anteriormente observamos que a casticina não induziu a proliferação celular em culturas de progenitores (**Figura 5**) passamos analisar as hipóteses 2 e 3.

Com o objetivo de investigar o comprometimento neuronal dos progenitores corticais em resposta à casticina, o percentual de células expressando o marcador neuronal β -tubulina III foi analisado em culturas controle e tratadas pelo flavonóide. Como mostrado na **Figura 8**, apesar do aumento no número absoluto de neurônios não notamos diferença significativa no percentual de neurônios gerados em presença do meio controle ou de casticina (**Figura 8**). Esses dados sugerem que, embora a casticina aumente significativamente a população neuronal, esse efeito do flavonóide não está associado à indução da diferenciação de neurônios a partir de progenitores neurais.

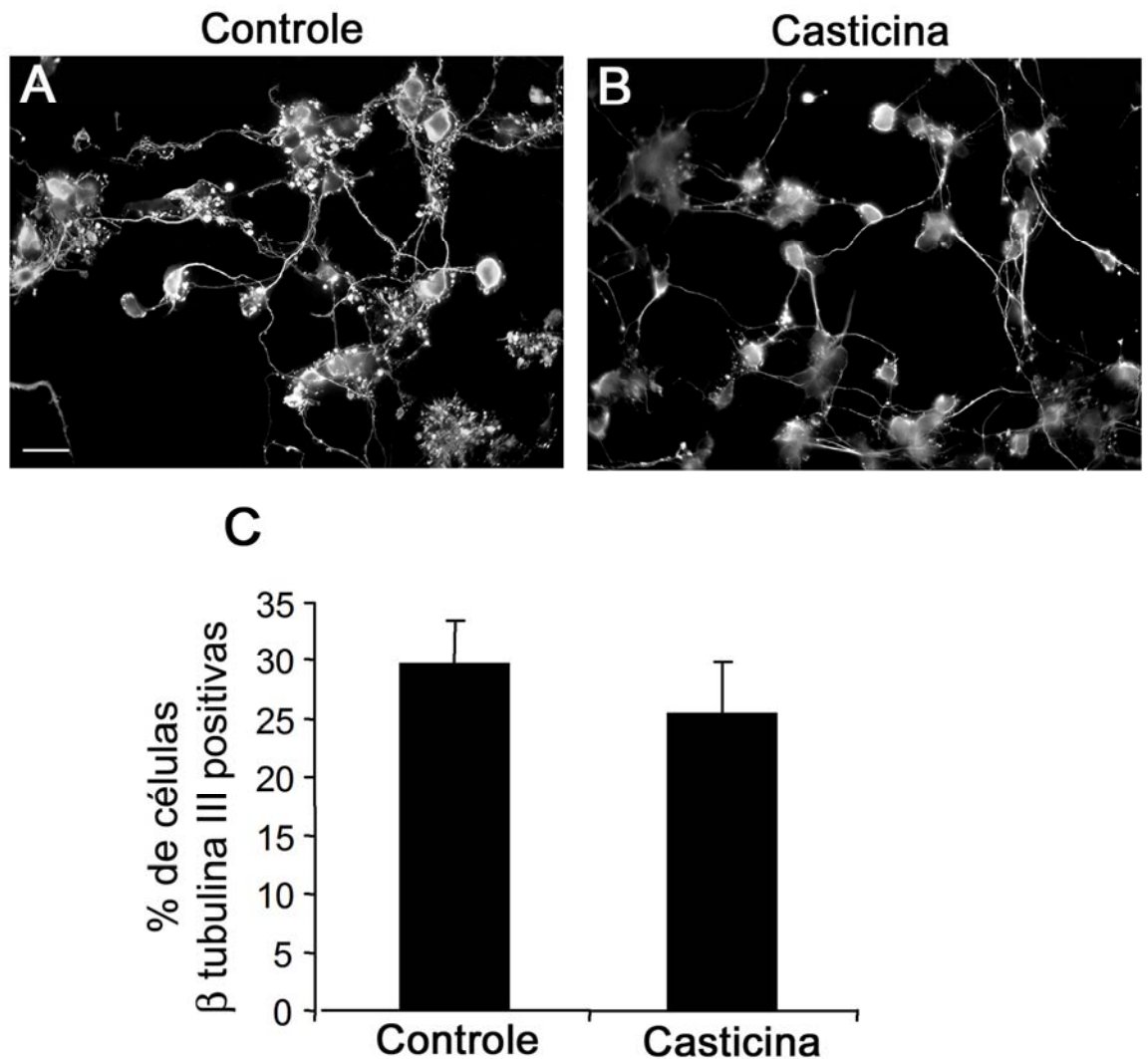


Figura 8. A casticina não induz a diferenciação de progenitores em neurônios. Culturas de progenitores de córtex cerebral de ratos Wistar E14 foram mantidas por 24 horas em presença de 10 μ M de casticina (**B**) ou do seu diluente DMSO (**A**, **Controle**). As células foram imunomarcadas para β -tubulina III e o número percentual de neurônios foi quantificado. Notar que o tratamento por casticina não influenciou a diferenciação de células precursoras em neurônios (* $p > 0,005$) (**C**). A barra de calibração corresponde a 20 μ m.

Previamente, observamos uma diminuição na morte celular em culturas derivadas de córtex embrionário tratadas por casticina (**Figura 6**). Com o objetivo de identificar que tipo celular teve a morte reduzida, as culturas foram duplamente marcadas para caspase-3 ativada e β -tubulina III. Observamos que o tratamento por casticina reduz em, aproximadamente, 70% a morte de neurônios (**Figura 9**).

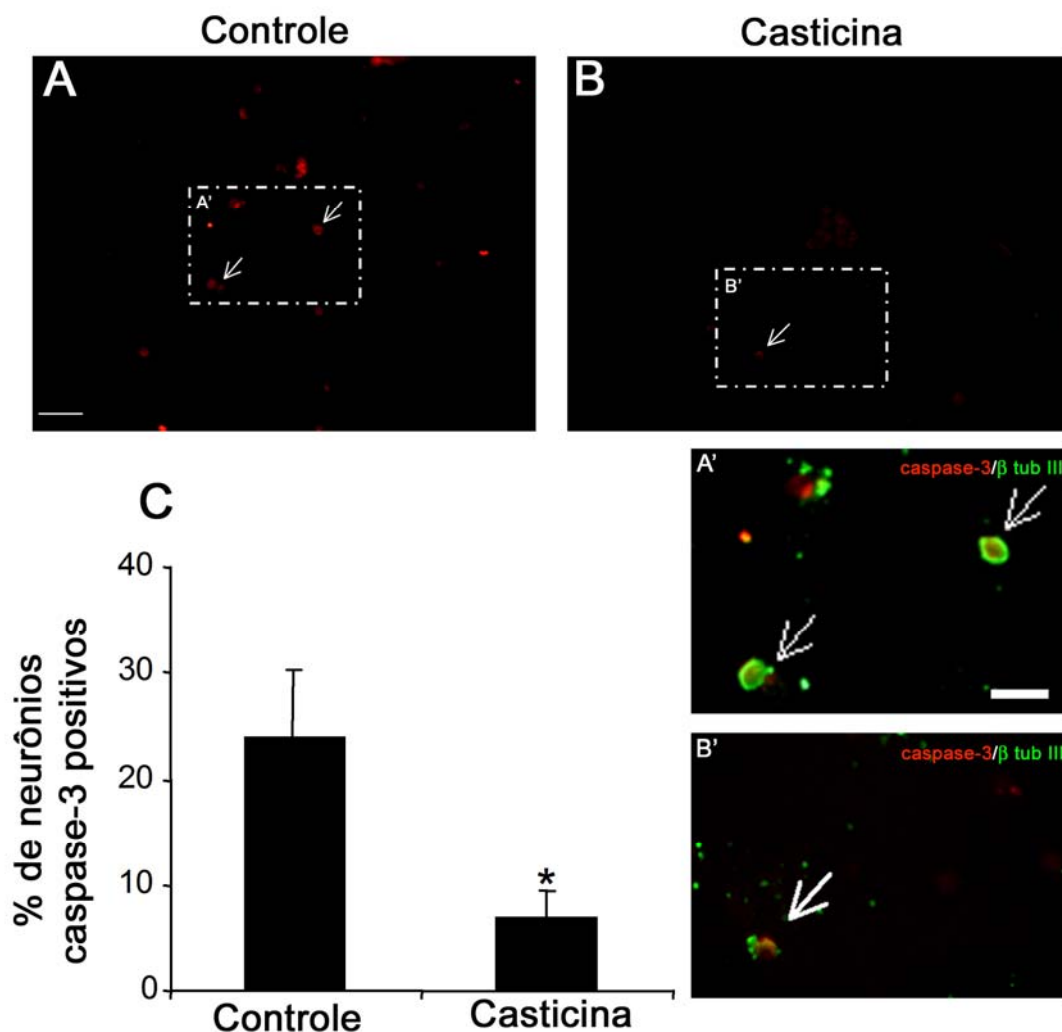


Figura 9. A casticina reduz a morte de neurônios. Culturas de progenitores de córtex cerebral de ratos Wistar E14 foram mantidas por 24 horas em presença de 10 μ M de casticina (**B**) ou do seu diluente DMSO (**A**, **Controle**). Posteriormente, as células foram imunomarcadas para β -tubulina III e caspase-3 ativada e o número de células duplamente marcadas foi analisado. A casticina reduziu em aproximadamente 70% a morte neuronal (* $p < 0,05$) (**C**). **A'** e **B'** mostram a dupla marcação (sobreposição) para β -tubulina III (em verde) e caspase (em vermelho) dos campos correspondentes (setas em **A** e **B**). As barras de calibração correspondem a 30 μ m (**A**) e 10 μ m (**A'**).

4.2. EFEITO DIRETO DA CASTICINA SOBRE A BIOLOGIA ASTROCITÁRIA

É sabido que os astrócitos possuem papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso, principalmente através das suas interações com os neurônios. Dessa forma, os flavonóides podem agir tanto diretamente nas células precursoras como também indiretamente, via células astrocitárias. Portanto, para verificarmos qual o papel dos astrócitos como mediadores da ação da casticina, investigamos primeiramente, qual o efeito direto deste flavonóide sobre a biologia astrocitária (diferenciação e proliferação).

Para analisar o efeito de casticina na diferenciação astrocitária utilizamos 2 abordagens experimentais: 1) análise da morfologia astrocitária e 2) análise dos níveis de expressão de GFAP, proteína de filamento intermediário majoritária do citoesqueleto de astrócitos maduros, por imunofluorescência e *Western blot*.

Para tanto, culturas secundárias de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos foram tratadas por 1 μ M e 10 μ M de casticina por 24 horas. Em estudos prévios, foi verificado que estas concentrações são subtóxicas e não mostraram influência significativa na viabilidade e crescimento de outras linhagens de origem glial (Freitas *et al.*, 2007). As células foram analisadas morfologicamente por contraste de fase e por imunofluorescência para GFAP. Como podemos observar na **Figura 10**, não houve mudanças morfológicas significativas nos astrócitos tratados por diferentes concentrações de casticina. A imunomarcacão para GFAP revelou uma ampla rede de filamentos intermediários se estendendo da região perinuclear através de todo o citoplasma, característico de células astrocitárias (**Figuras 10 e 11**). Não foram observadas diferenças significativas na intensidade de marcação para GFAP nem no padrão de distribuição dessa proteína nas diferentes condições.

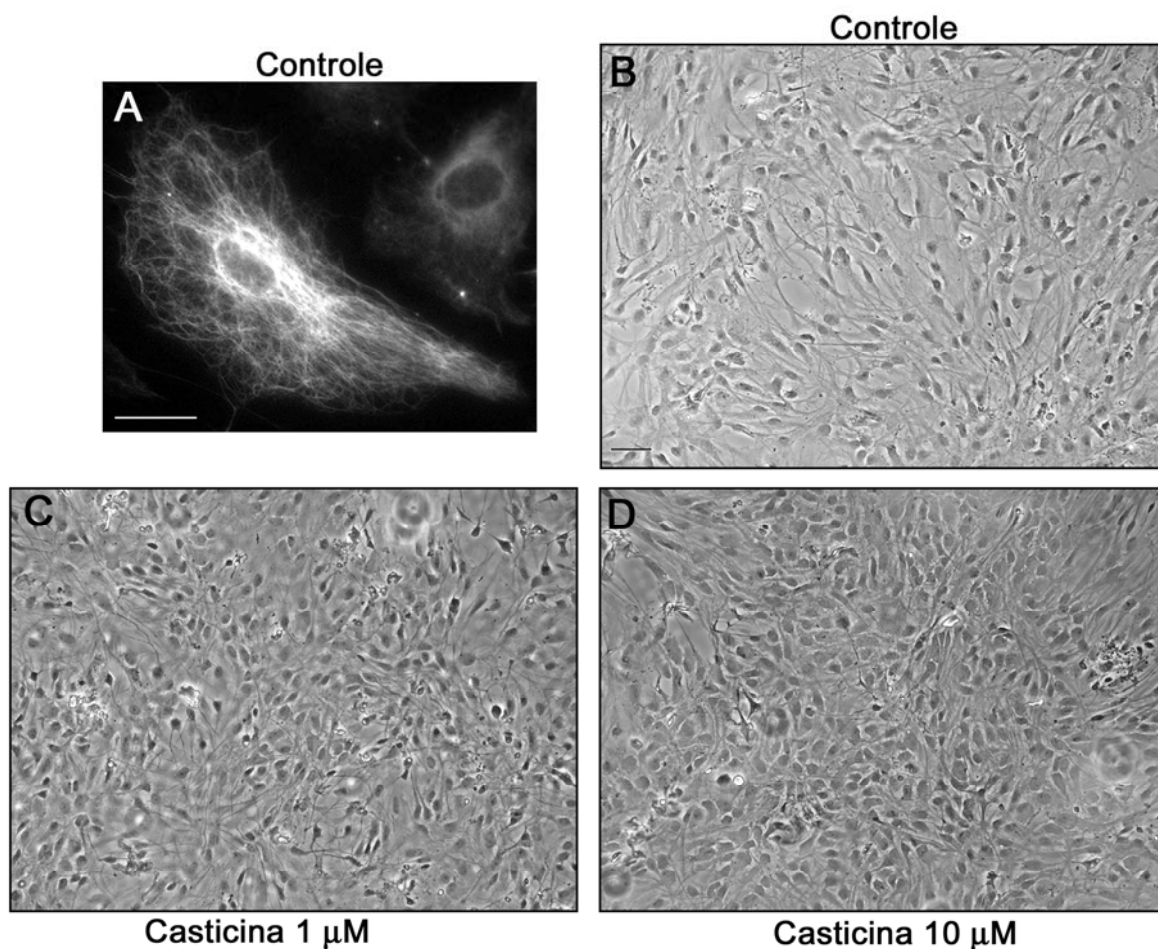


Figura 10. A casticina não altera a morfologia astrocitária. Culturas primárias de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos foram mantidas por 24 horas em meio controle (A,B) ou contendo diferentes concentrações de casticina (C,D). Após esse período, as culturas foram analisadas por microscopia de contraste de fase. Em A, astrócito imunomarcado para GFAP evidenciando a distribuição da rede de filamento intermediário por todo o citoplasma da célula. Não foram verificadas modificações morfológicas entre os grupos controle e tratado por casticina. As barras de calibração correspondem a 20 µm (A) e 50 µm (B).

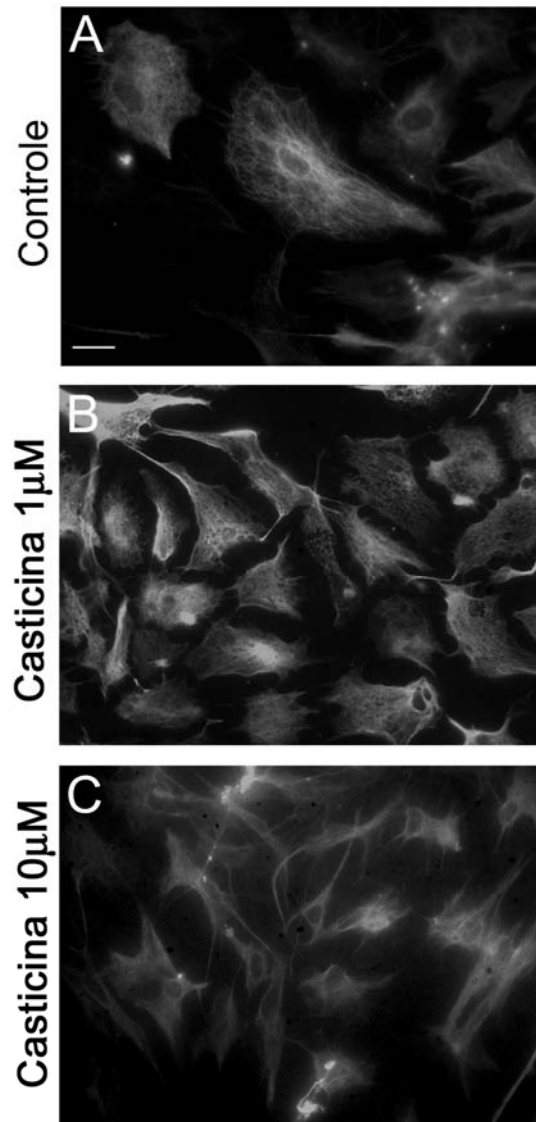


Figura 11. A casticina não promove alterações no padrão de distribuição de GFAP. Culturas secundárias de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos foram tratadas por diferentes concentrações de casticina (**B,C**) ou do seu diluente, DMSO (**Controle; A**) por 24 horas. Após este tempo, a monocamada foi fixada e imunomarcada para GFAP. A casticina não acarretou em mudança morfológica nestas células nem alterou o padrão de expressão de GFAP. A barra de calibração corresponde a 20 μm .

Os níveis de expressão de GFAP após 24 horas de tratamento por casticina foram verificados por *Western blot*. Para esse fim, culturas primárias de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos foram tratadas por 10 μ M de casticina por 24 horas e os extratos protéicos dessas culturas analisados por eletroforese seguida de imuno-reação para GFAP. Como pode ser observado na **Figura 12**, não identificamos diferenças nos níveis de GFAP (49 kDa) dos extratos de culturas primárias de astrócitos tratados por 10 μ M e controle, corroborando os dados da imunofluorescência para essa proteína.

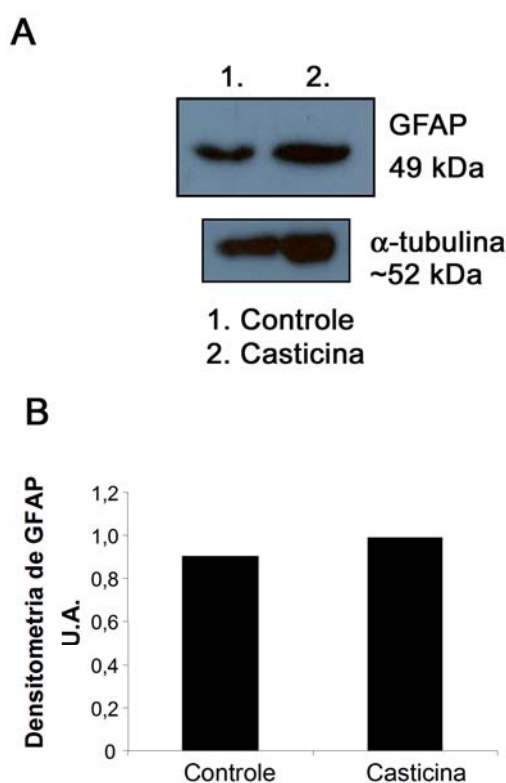


Figura 12. A casticina não interfere nos níveis de expressão de GFAP. Culturas primárias de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos foram preparadas e mantidas em presença de 10 μ M de casticina ou do seu diluente DMSO (Controle) por 24 horas. Após esse período, os níveis de GFAP foram analisados por *Western blot* para essa proteína (**A**). Análise densitométrica do gel em A (**B**).

Tem sido evidenciado na literatura o efeito inibitório da casticina sobre a proliferação de células tumorais (Kobayakawa *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). Não se sabe, no entanto, a cerca desse efeito sobre células gliais normais. Para investigarmos o papel da casticina na proliferação astrocitária, as culturas secundárias de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos foram mantidas em meio sem soro suplementado com 10 μ M de casticina ou apenas de seu diluente DMSO (Controle), por 24 horas, em presença do análogo de timidina, BrdU (1 μ g/ml). Em seguida, foi procedida a imunofluorescência para BrdU. Como pode ser observado na **Figura 13**, nessas condições aproximadamente 40% dos astrócitos incorporam BrdU, tanto em presença como ausência de casticina. Ao contrário do descrito para células tumorais, a casticina não parece modular a proliferação de astrócitos corticais *in vitro* (**Figura 13**).

Em conjunto nossos dados demonstram que o flavonóide casticina não modula a proliferação nem a diferenciação de astrócitos de córtex cerebral de ratos *in vitro*.

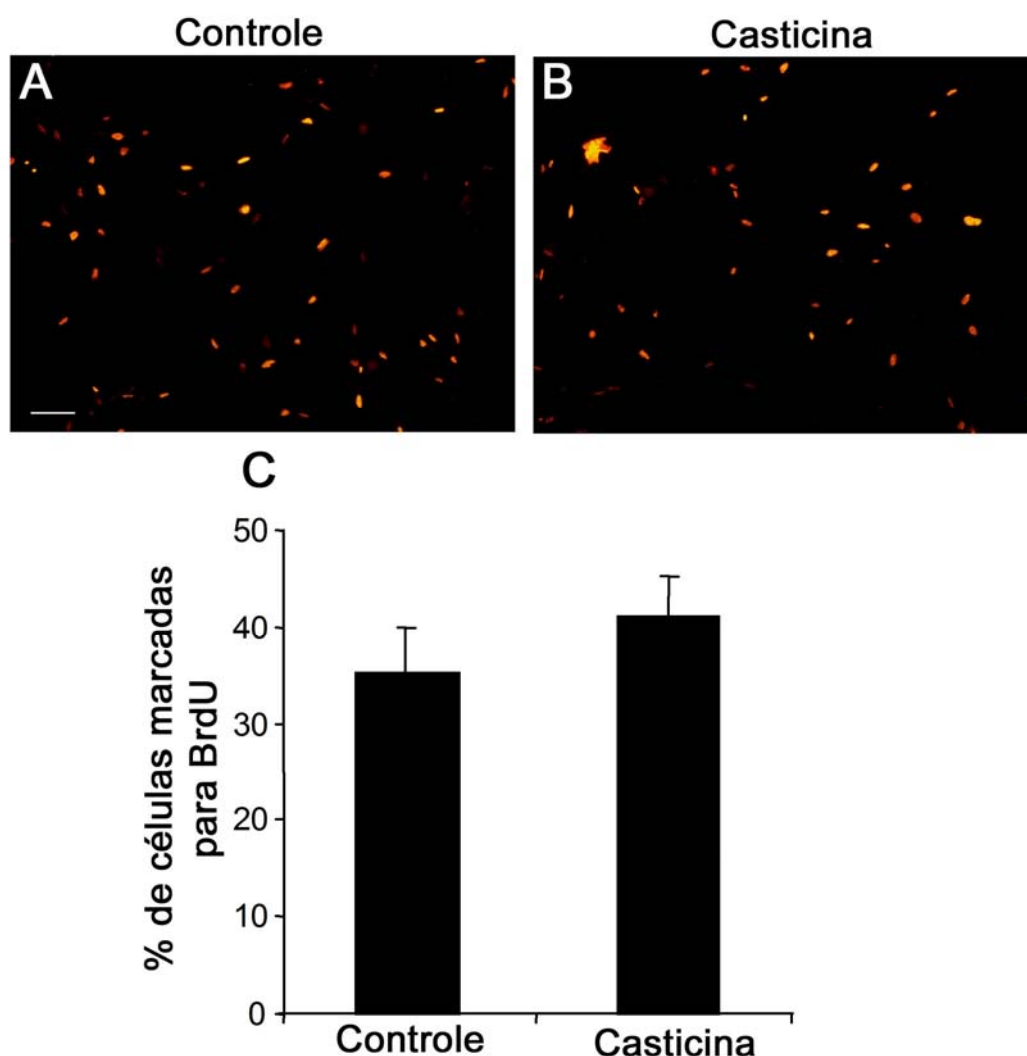


Figura 13. A casticina não interfere na proliferação de astrócitos. Culturas secundárias de astrócitos derivados de córtex cerebral de ratos neonatos foram mantidas simultaneamente em presença de 10 μ M de casticina (**B**) ou de concentração equivalente de seu diluente DMSO (**Controle, A**) e de 1 μ g/ml de BrdU, por 24 horas. Em seguida, as células foram imunomarcadas para BrdU e quantificadas. O tratamento dos astrócitos com a casticina não alterou a proliferação destas células ($p>0,05$) (**C**). A barra de calibração corresponde a 50 μ m.

4.3. ASTRÓCITOS CORTICAIS TRATADOS PELO FLAVONÓIDE CASTICINA AUMENTAM O “POOL” DE CÉLULAS PRECURSORAS

As interações neuro-astrocitárias têm papel fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso. O fato dos astrócitos poderem ser alvos para flavonóides nos levou a investigar o papel dessas células como possíveis mediadoras das ações da casticina na morfogênese neuronal. Para isso, precursores neurais derivados de ratos com 14 dias embrionários foram plaqueados sobre monocamadas astrocitárias tratadas por 10 μ M de casticina. Após 24 horas de cocultura, o número de progenitores foi avaliado.

Como pode ser observado na **Figura 14**, astrócitos tratados por casticina aumentaram em 50% o número de células totais. É importante lembrar que nessas condições os precursores neurais não entram em contato com o flavonóide, apenas com a monocamada astrocitária tratada por casticina.

Os astrócitos são a principal fonte de fatores tróficos solúveis e de moléculas da matriz extracelular (contato e solúveis) do sistema nervoso central (Garcia-Abreu *et al.*, 1995; Trentin *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1999a; Martinez & Gomes, 2002; 2005; Lie *et al.*, 2005; Környei *et al.*, 2007). Para verificarmos se haveria algum fator solúvel envolvido neste aumento do número total de células precursoras, realizamos experimentos com meio condicionado (MC) de astrócitos tratados pelo flavonóide. Para este experimento, culturas primárias de astrócitos de ratos neonatos, após atingirem a confluência, foram tratadas por 10 μ M de casticina por 24 horas. Após o tratamento, o meio com o flavonóide era retirado e substituído por MSS. O MC era recolhido após 24 horas. Este meio foi então utilizado para culturas de progenitores corticais como descrito anteriormente. É importante ressaltar que o MC não possui

flavonóide, apenas as moléculas e/ou fatores solúveis secretados pelos astrócitos em resposta ao tratamento por casticina.

Após 24 horas em presença de MC astrocitário, o número de células neurais foi analisado. Semelhante ao que ocorre em presença de astrócitos tratados por casticina, observamos um aumento de aproximadamente 30% na população celular total mantida em presença do meio condicionado por esses astrócitos (MC casticina) em comparação com aquelas mantidas em presença do meio condicionado por astrócitos não tratados (MC Controle) (**Figura 15**). No entanto, esse aumento é potencializado pelo contato com o astrócito (60% X 30% - comparar as **Figuras 14 e 15**), sugerindo que esse evento seja mediado não só por fatores solúveis como potencializado pelo contato celular.

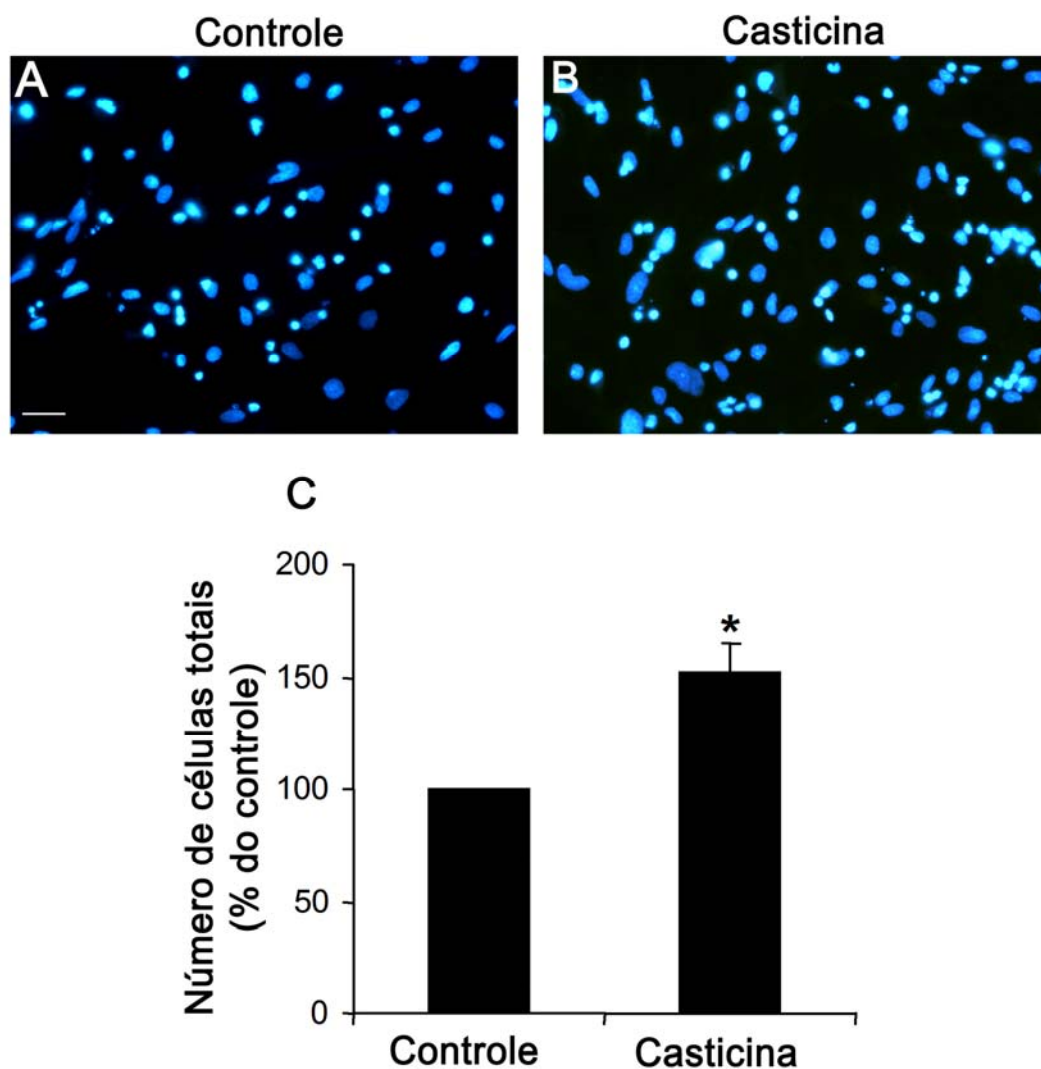


Figura 14. *Astrócitos tratados por casticina promovem aumento no número de células corticais totais.* Células de ratos Wistar E14 foram cultivadas sobre monocamadas astrocitárias controle (A) e tratadas por 10 μ M de casticina por 24 horas (B). Posteriormente, o número de células totais foi quantificado através da marcação nuclear com DAPI. O tratamento dos astrócitos com a casticina aumentou significativamente o número de células totais (* $p < 0,001$) (C). A barra de calibração corresponde a 30 μ m.

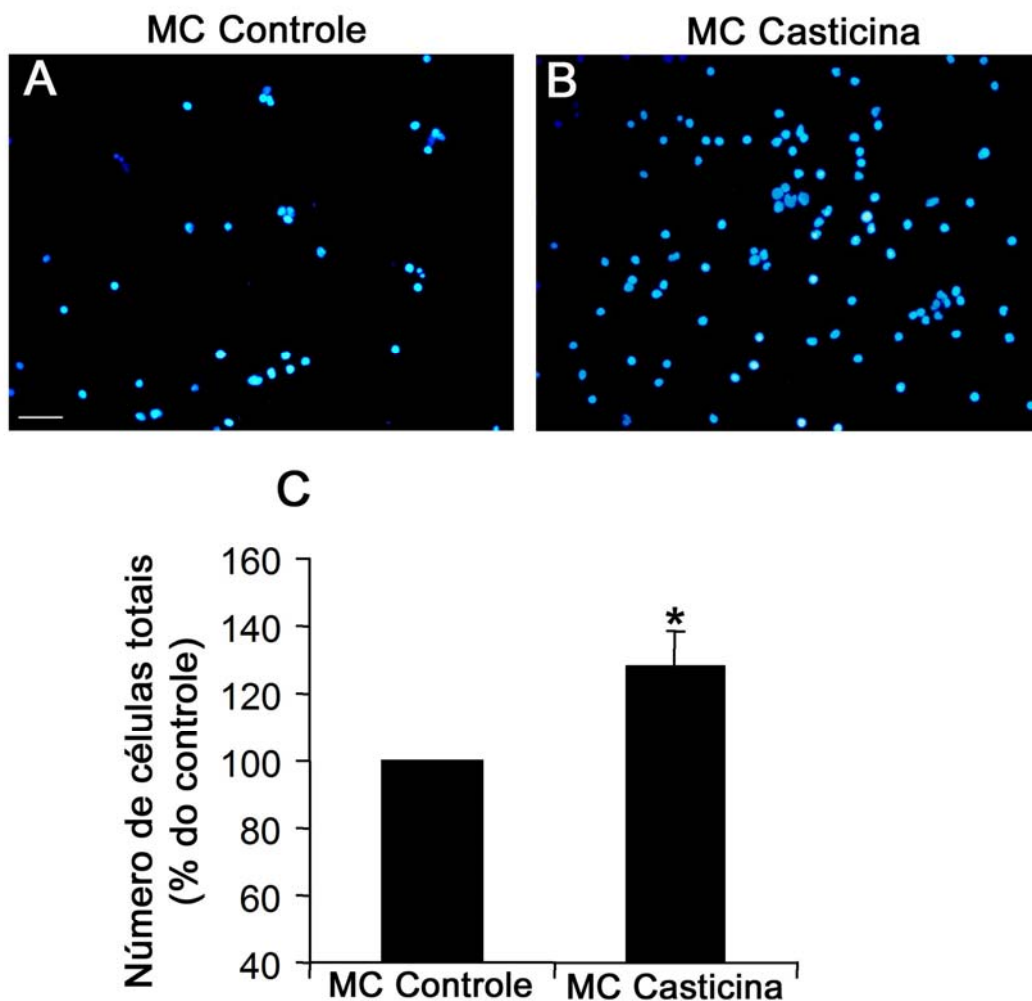


Figura 15. Meio condicionado de astrócitos tratados por casticina promove aumento no número de células corticais totais. Progenitores de córtex cerebral de ratos Wistar E14 foram cultivados em meio condicionado derivado de astrócitos não tratados (**A, MC Controle**) e tratados por 10 μ M de casticina por 24 horas (**B, MC Casticina**). As culturas foram mantidas por 24h, e em seguida, o número de células foi analisado através da marcação nuclear com DAPI. O tratamento dos precursores com meio condicionado de astrócitos tratados por casticina aumentou a população celular (* $p < 0,05$) (**C**). A barra de calibração corresponde a 30 μ m.

4.4. ASTRÓCITOS CORTICAIS TRATADOS PELO FLAVONÓIDE CASTICINA DIMINUEM A PROLIFERAÇÃO DE PRECURSORES NEURAI

Para verificar o efeito de astrócitos tratados por casticina sobre a proliferação de células precursoras, progenitores neurais derivados de córtex cerebral de ratos com 14 dias embrionários foram cultivados sobre monocamadas astrocitárias não-tratadas e tratadas por casticina, como descrito anteriormente. As coculturas foram mantidas por 24 horas em presença de 1 $\mu\text{g/ml}$ do análogo de timidina, BrdU, e após este período, foi procedida a imunodeteção desta molécula. Nas condições controle, aproximadamente 20% dos progenitores estão em fase proliferativa (**Figura 16**). Verificamos uma redução de aproximadamente 60% na proliferação dessas células quando mantidas sobre a monocamada astrocitária tratada por casticina (**Figura 16**).

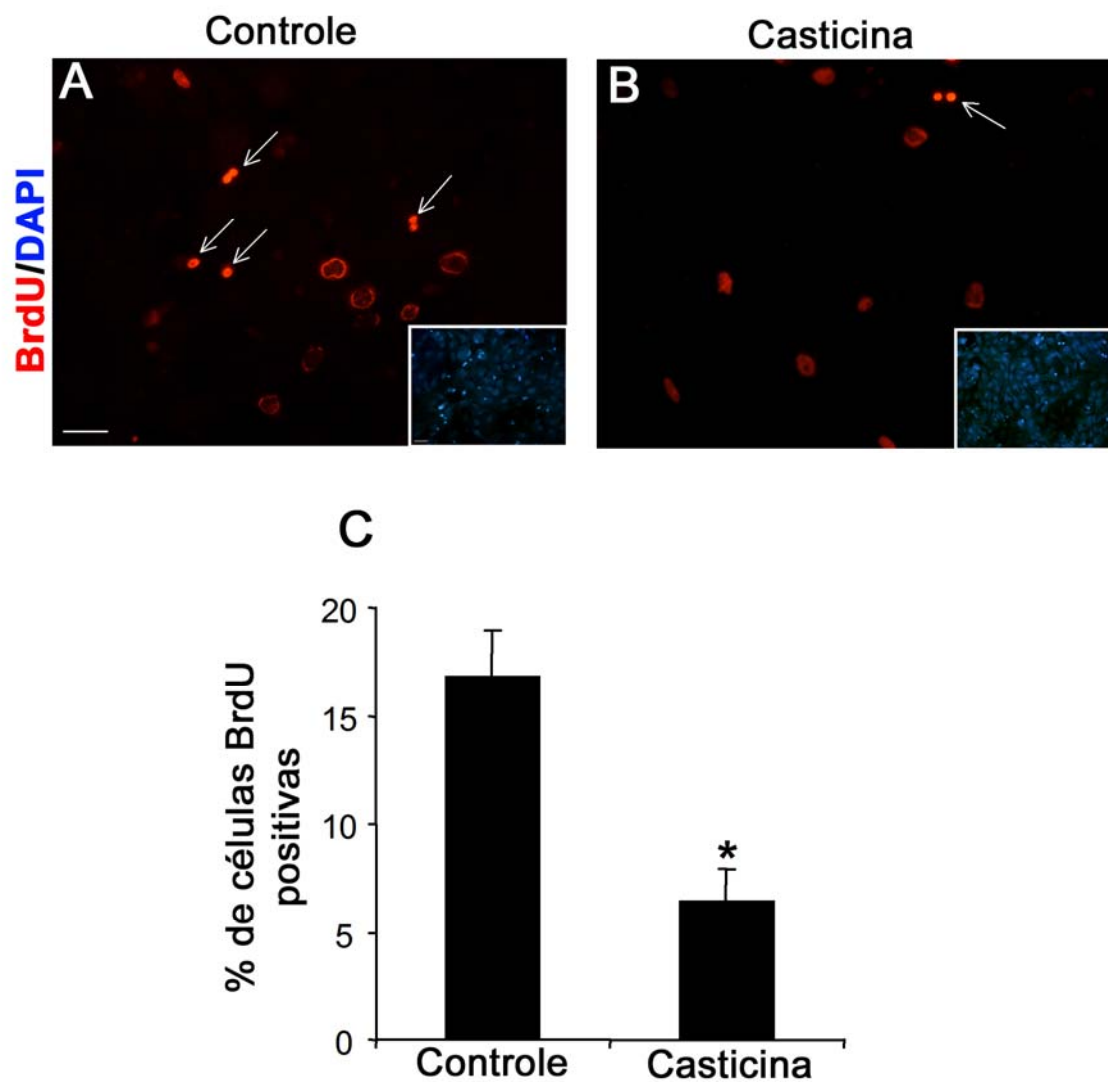


Figura 16. *Astrócitos tratados por casticina reduzem a proliferação de precursores corticais.* Progenitores do córtex cerebral de ratos Wistar E14 foram cultivados sobre monocamadas astrocitárias controle (A) e tratadas por 10 μ M de casticina por 24 horas (B) em presença de 1 μ g/ml de BrdU. Em seguida, as células foram imunomarcadas para BrdU e o número de células BrdU positivas foi analisado. O tratamento dos astrócitos com a casticina reduziu significativamente a proliferação celular (* $p < 0,01$) (C). As setas sinalizam núcleos de progenitores. Os núcleos maiores marcados para BrdU correspondem a núcleos de astrócitos em proliferação. Os insets mostram marcação nuclear com DAPI dos campos correspondentes. As barras de calibração correspondem a 30 μ m.

4.5. ASTRÓCITOS CORTICAIS TRATADOS PELO FLAVONÓIDE CASTICINA DIMINUEM A MORTE DE PRECURSORES NEURAI

Observamos previamente que astrócitos tratados por casticina aumentam o “pool” de precursores neurais (**Figura 14**), no entanto, contrariamente ao que se esperava, reduzem a sua taxa de proliferação (**Figura 16**). Dessa forma, investigamos se o aumento da população de progenitores era devido à diminuição da morte deste tipo celular. Para isso, precursores neurais derivados de córtex cerebral de ratos com 14 dias embrionários foram plaqueados sobre monocamadas astrocitárias tratadas por casticina e após 24 horas a morte celular foi analisada por imunofluorescência para o marcador de morte celular, caspase-3 ativada. Observamos que a monocamada astrocitária tratada por flavonóide reduz, em aproximadamente 40%, a morte celular total (**Figura 17**). Esse efeito foi mimetizado (e potencializado) pelo meio condicionado derivado de astrócitos tratados por casticina (MC casticina) que reduziu em 60% a morte celular (**Figura 18**).

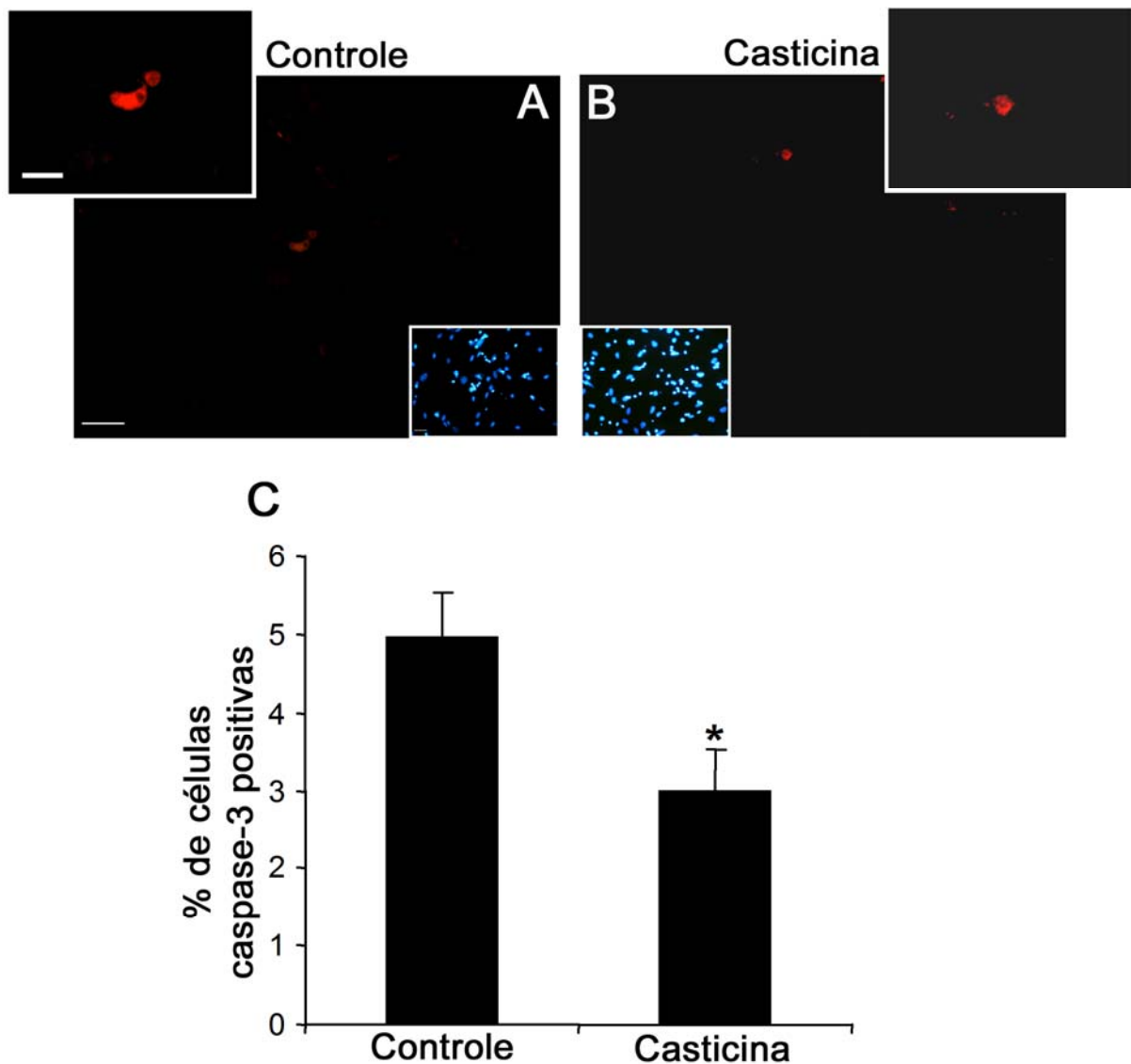


Figura 17. *Astrócitos tratados por casticina reduzem a morte celular.* Progenitores neurais de córtex cerebral de ratos Wistar embrionários (E14) foram cultivados sobre monocamadas astrocitárias controle (A) e tratadas por 10 μ M de casticina por 24 horas (B). Em seguida, as coculturas foram imunomarcadas para caspase-3 ativada e a morte celular quantificada. O tratamento dos astrócitos por casticina reduziu significativamente a morte de células corticais (* $p < 0,05$) (C). Os *insets* inferiores e superiores mostram marcação nuclear com DAPI e magnificação dos campos correspondentes, respectivamente. As barras de calibração correspondem a 30 μ m e 10 μ m (*insets*).

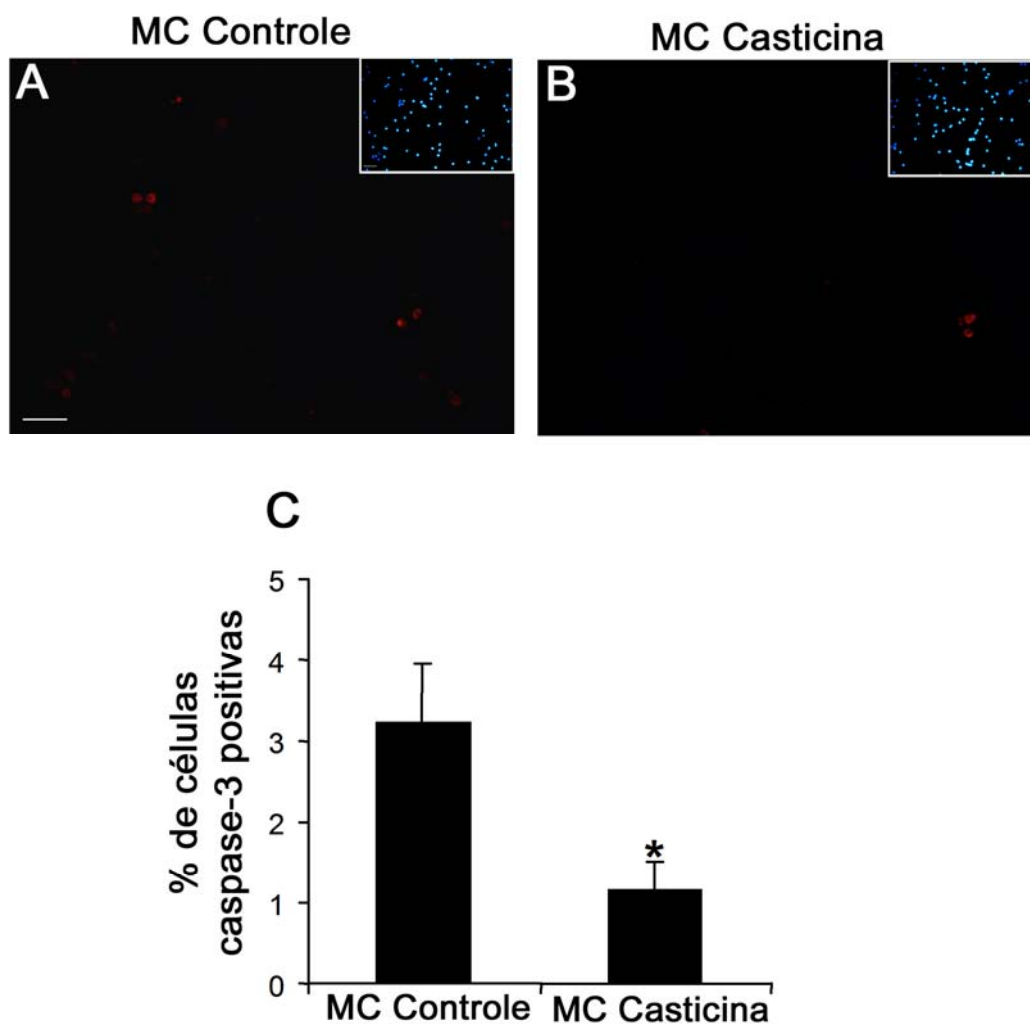


Figura 18. Meio condicionado de astrócitos tratados por casticina reduz a morte celular. Progenitores neurais corticais de ratos E14 foram cultivados em meio condicionado controle (**A, MC Controle**) e meio condicionado de astrócitos corticais tratados por casticina (**B, MC Casticina**). Após 24 horas, as células foram imunomarcadas para caspase-3 ativada e a morte celular quantificada. O tratamento dos precursores com meio condicionado de astrócitos tratados por casticina mostrou um efeito protetor sobre essas células, reduzindo significativamente sua morte (* $p < 0,05$) (**C**). Os *insets* mostram marcação nuclear com DAPI dos campos correspondentes. As barras de calibração correspondem a 30 μm .

4.6. ASTRÓCITOS CORTICAIS TRATADOS PELO FLAVONÓIDE CASTICINA AUMENTAM A POPULAÇÃO NEURONAL

Observamos previamente que a casticina diretamente não induz precursores neurais a adotarem um fenótipo neuronal (**Figura 8**). No entanto, diversas evidências demonstram que os astrócitos são potentes indutores da neurogênese (Song *et al.*, 2002; Környei *et al.*, 2007). Dessa forma, investigamos se astrócitos tratados por casticina induzem progenitores do córtex cerebral a adotarem um fenótipo neuronal. Com esse objetivo, progenitores corticais cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas e não tratadas por casticina foram imunomarcadas para β -tubulina III após 24 horas de cocultura. Como pode ser observado na **Figura 19**, os neurônios apresentam grande complexidade morfológica estendendo longos neuritos quando cultivados sobre ambas as monocamadas. Embora não tenhamos realizado uma análise morfométrica mais detalhada, a análise superficial da morfologia neuronal não revelou diferenças significativas entre os grupos controle e tratado (**Figura 19**).

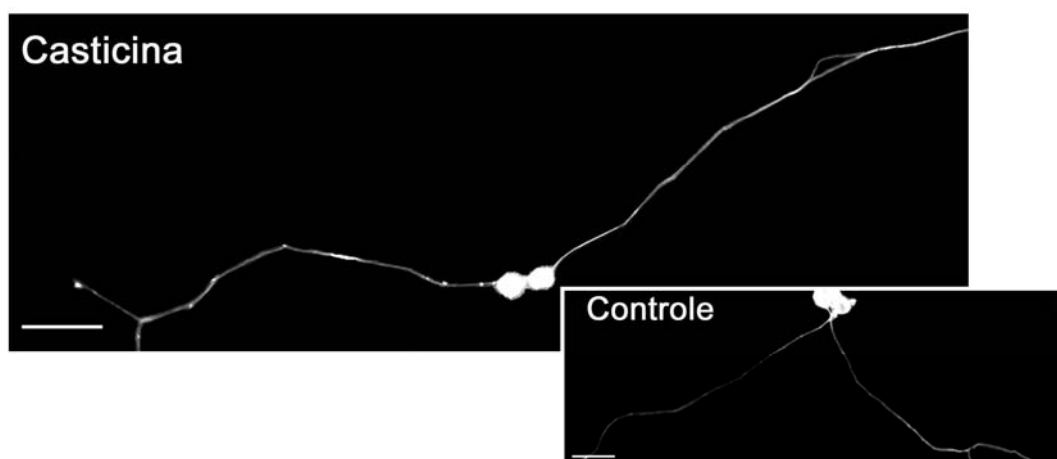


Figura 19. *Astrócitos tratados por casticina não alteram a morfologia neuronal.* Progenitores neurais de córtex cerebral de ratos Wistar E14 foram cultivadas sobre monocamadas astrocitárias tratadas por 10 μ M de casticina por 24 horas. Em seguida, as coculturas foram fixadas e imunomarcadas para β -tubulina III. Não foram observadas diferenças morfológicas nos neurônios cultivados sobre monocamadas controle ou tratadas por casticina. A barra de calibração corresponde a 30 μ m.

A quantificação do número de neurônios gerados sobre as monocamadas astrocitárias tratadas e não tratadas por casticina revelou um aumento de aproximadamente 40% no número total (absoluto) de neurônios cultivados sobre esta última (**Figura 20**). A análise do número de células marcadas para β -tubulina III revelou que aproximadamente 60% dos progenitores neurais adotam um fenótipo neuronal quando cultivados sobre astrócitos (**Figura 21**). Não observamos diferença significativa no percentual de neurônios cultivados sobre monocamadas controle ou tratadas por flavonóide (**Figura 21**). Esses dados sugerem que os astrócitos tratados por casticina não induzem progenitores neurais a adotarem um fenótipo neuronal já que o aumento absoluto no número de neurônios não foi acompanhado de um aumento no percentual de neurônios (comparar **Figuras 20 e 21**).

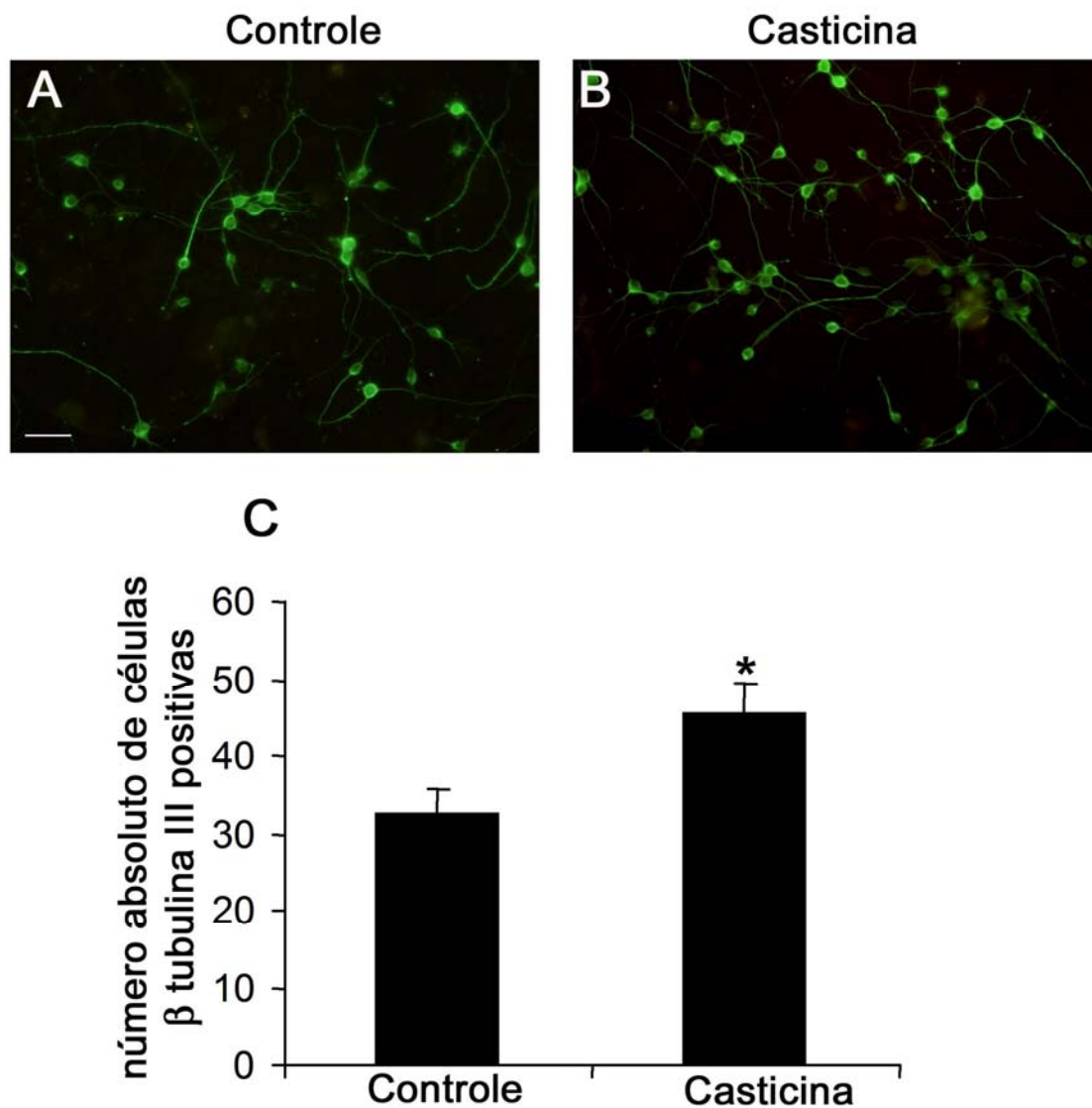


Figura 20. Astrócitos tratados por *casticina* aumentam a população neuronal. Células de ratos Wistar neonatos foram cultivadas sobre monocamadas controle (A) e tratadas por 10 μ M de casticina (B) por 24 horas. Em seguida, as coculturas foram fixadas e imunomarcadas para β -tubulina III. O tratamento dos astrócitos por casticina gerou um aumento de aproximadamente 40% no número absoluto de neurônios cultivados sobre astrócitos tratados pelo flavonóide (C) (* $p < 0,05$). A barra de calibração corresponde a 30 μ m.

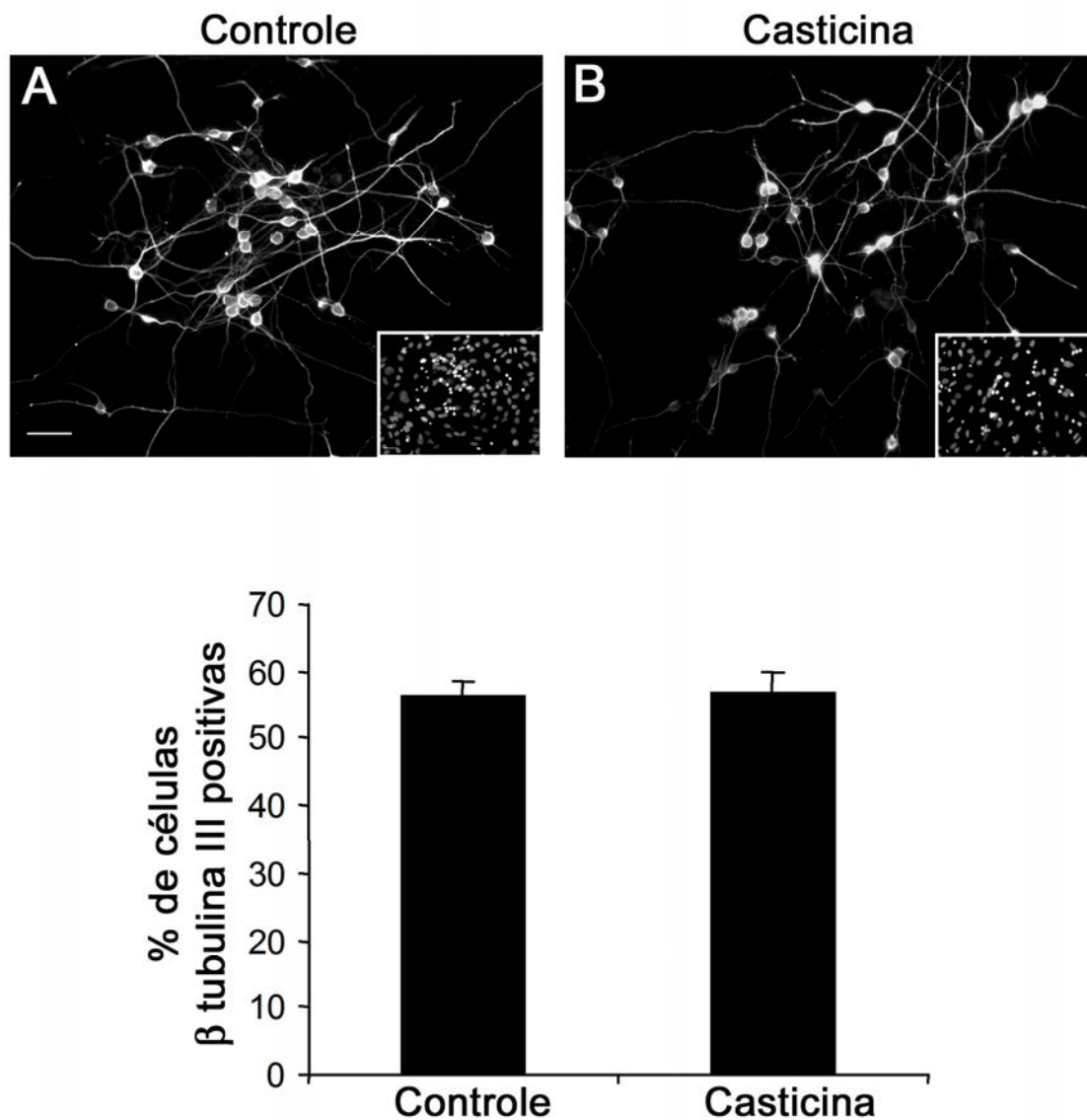


Figura 21. *Astrócitos tratados por casticina não interferem na diferenciação neuronal.* Progenitores neurais de córtex cerebral de ratos Wistar E14 foram cultivadas sobre monocamadas astrocitárias controle (A) e tratadas por 10 μ M de casticina por 24 horas (B). Em seguida, as coculturas foram fixadas e imunomarcadas para β -tubulina III. O tratamento dos astrócitos por casticina não influenciou o comprometimento neuronal dos precursores corticais ($p > 0,05$) (C). As barras de calibração correspondem a 30 μ m.

4.7. ASTRÓCITOS CORTICAIS TRATADOS PELO FLAVONÓIDE CASTICINA NÃO INTERFEREM NA MORTE DE NEURÔNIOS

Observamos que astrócitos tratados por casticina aumentam o número absoluto de neurônios, mas aparentemente, não induzem progenitores neurais a se tornarem neurônios nem induzem a proliferação de precursores. Desta forma, investigamos o potencial neuroprotetor dos astrócitos tratados por casticina. Para isso, progenitores neurais corticais E14 foram plaqueados sobre monocamadas astrocitárias tratadas por casticina e após 24 horas de cocultura, as células foram imunomarcadas concomitantemente para β -tubulina III e caspase-3 ativada. Como mostrado na **Figura 22**, a taxa de morte neuronal de neurônios mantidos sobre monocamadas dos dois grupos (controle e tratadas por flavonóide) foi muito semelhante, indicando que astrócitos tratados por casticina não interferem na morte de neurônios.

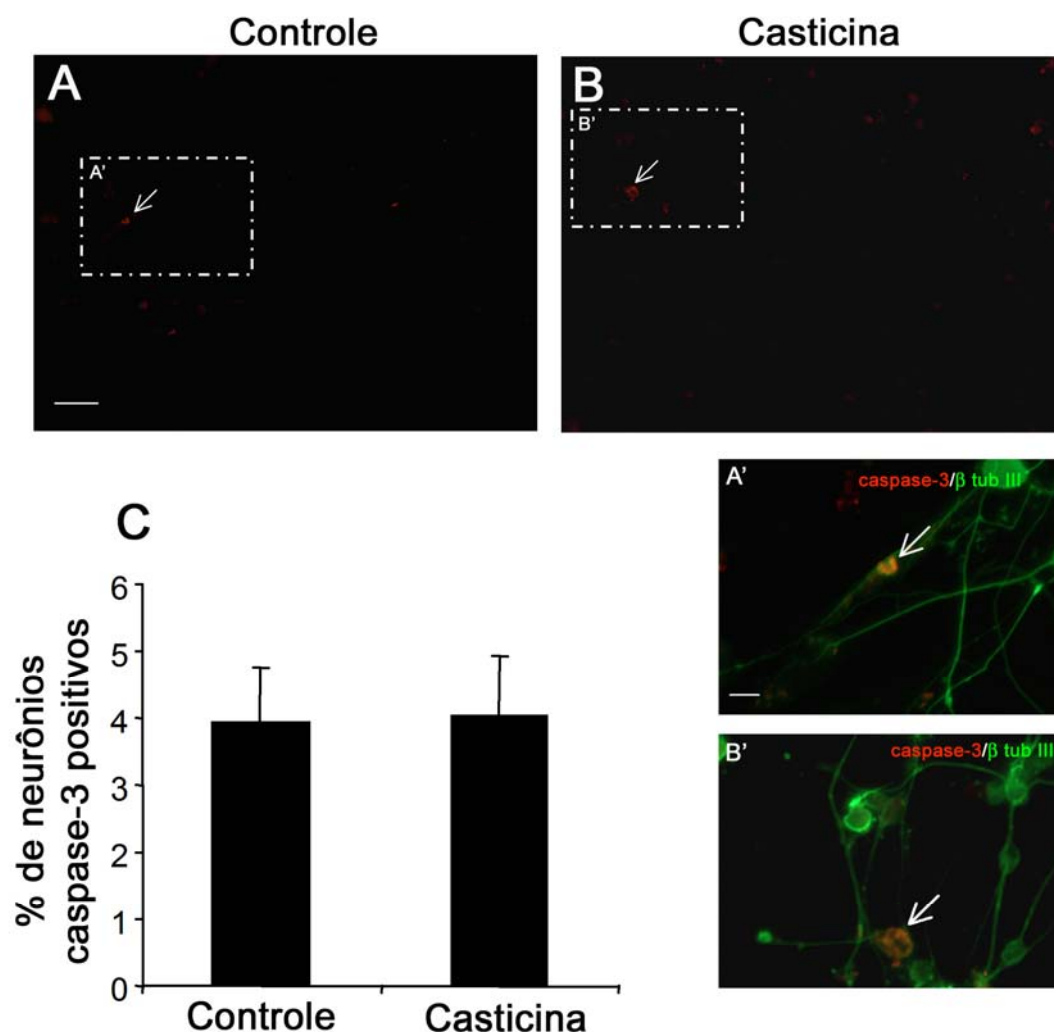


Figura 22. *Astrócitos tratados por casticina não interferem na morte de neurônios.* Células de ratos Wistar E14 foram cultivadas sobre monocamadas astrocitárias controle (A) e tratadas (B) por 10 μ M de casticina por 24 horas. Em seguida, as coculturas foram imunomarcadas para β -tubulina III e caspase-3 ativada (A, B), e as células duplamente marcadas quantificadas. A casticina não mostrou um efeito, mediado por astrócitos, na morte de neurônios ($p > 0,05$) (C). A' e B' mostram a dupla marcação (sobreposição) para β -tubulina III (em verde) e caspase (em vermelho) dos campos correspondentes (setas em A e B). As barras de calibração correspondem a 30 μ m (A) e 10 μ m (A').

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Nesta dissertação, analisamos a ação direta e indireta (via astrócito) do flavonóide casticina, extraído de *Croton betulaster*, na morfogênese do SNC. Utilizando um sistema de cultura primária de células neurais de roedores, demonstramos que este flavonóide possui um efeito protetor sobre células neuronais, promovendo uma redução da morte de neurônios de córtex cerebral *in vitro*. Esse efeito neuroprotetor é potencializado pela presença de astrócitos tratados por casticina ou do seu meio condicionado (MC). Nosso estudo poderá abrir grandes perspectivas para a utilização do flavonóide Castina no tratamento de doenças neurodegenerativas, além de contribuir significativamente para o entendimento do papel das interações neuro-astrocitárias durante o desenvolvimento e patologias do sistema nervoso.

As propriedades dos flavonóides têm sido objeto de vários estudos nas últimas décadas, porém a sua ação sobre as células do sistema nervoso ainda não está bem clara. A casticina foi inicialmente isolada da planta *Croton betulaster* em 1999 (Barbosa, 1999; Barbosa *et al.*, 2003), porém já existe na literatura a descrição deste flavonóide isolado de outras plantas como da *Achillea millefolium* (Falk *et al.*, 1975; Haïdara *et al.*, 2006), *Viticis fructus* (*Vitex rotundifolia*) (Kobayakawa *et al.*, 2004), *Artemisia annua* (Han *et al.*, 2007), *Vitex trifolia* (Zeng *et al.*, 1996) e *Vitex agnus* (Hajdu *et al.*, 2007). Poucos estudos, no entanto, exploraram o efeito biológico da casticina e, até o momento, não dispomos de dados referentes aos efeitos deste flavonóide, extraído de *Croton betulaster*, no SNC, especialmente no que se refere ao seu efeito nas células astrocitárias.

Neste trabalho, investigamos o papel dos astrócitos como mediadores da ação do flavonóide casticina na morfogênese de neurônios do córtex cerebral *in vitro*. Verificamos que astrócitos tratados pelo flavonóide casticina aumentam a população neuronal do córtex cerebral *in vitro*, provavelmente através da redução da morte de progenitores celulares. Diversas evidências nos levam a essas conclusões: 1) Embora o número absoluto de neurônios esteja aumentado nessas condições, a fração (percentual) de células que adota o fenótipo neuronal não está alterada sugerindo que o comprometimento neuronal de progenitores indiferenciados não seja o mecanismo de ação preferencialmente envolvido; 2) A proliferação celular não só não está aumentada como, surpreendentemente, é diminuída na presença de astrócitos tratados pela casticina, eliminando o envolvimento da proliferação neste evento; 3) O número de células marcadas para caspase-3 ativada, marcador de morte celular, está reduzido em presença de astrócitos tratados por casticina, no entanto, essas células não expressam o marcador neuronal β -tubulina III, sugerindo que astrócitos tratados pelo flavonóide reduzam a morte de precursores neuronais e não de neurônios pós-mitóticos.

O efeito neuroprotetor exercido pelos astrócitos tratados por casticina foi mimetizado pelo meio condicionado derivado dessas células, sugerindo que o flavonóide induza a secreção de fatores solúveis neuroprotetores pelos astrócitos. Diversas evidências têm mostrado que a glia participa ativamente de processos relevantes para o desenvolvimento e funcionamento do SN. Atualmente, esses estudos apontam para uma dependência mútua entre neurônios e astrócitos na organização estrutural e funcional do SN (Pfrieger & Barres, 1997; Fróes *et al.*, 1999; Lim & Alvarez-Buylla, 1999; Gomes *et al.*, 1999a;b; 2001; De Sampaio e Spohr *et al.*, 2002; Hatten, 2002; Rouach *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2002).

Os astrócitos são considerados a principal fonte de fatores tróficos no SN; secretam uma série de fatores de crescimento (FGF, EGF, TNF, TGF- β etc) e elementos de matriz extracelular, tanto em situações fisiológicas como patológicas do SN (Garcia-Abreu *et al.*, 1995; Trentin *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1999a; Martinez & Gomes, 2002; 2005), os quais participam como mediadores das interações neurônio-astrócito. É interessante que embora o meio condicionado astrocitário reduza a morte celular, observamos uma potencialização deste efeito protetor quando as células progenitoras eram cultivadas sobre monocamadas astrocitárias. Desta forma, embora um ou mais fator solúvel esteja envolvido, o contato celular potencializa esse efeito. Uma possibilidade é que um fator secretado em resposta ao flavonóide induza a síntese de componentes da matriz extracelular como laminina e fibronectina, sabidamente sintetizadas por astrócitos e envolvidas em diversos eventos do desenvolvimento do SNC (Garcia-Abreu *et al.*, 1995; Martinez & Gomes, 2002; 2005; Costa *et al.*, 2002; Tardy, 2002). Possivelmente, o menor índice de morte observado no grupo tratado com o flavonóide, em nosso estudo, se deve também à participação de proteínas de adesão e MEC, sintetizadas pelos astrócitos. A identidade desse fator deverá ser objeto de estudo futuramente.

O efeito neuroprotetor dos flavonóides parece estar relacionado com o potencial antioxidante desses compostos, tanto os naturais como os sintéticos. O Flavopiridol, um flavonóide sintético, mostrou efeito inibidor da morte de neurônios de córtex cerebral de ratos após isquemia cerebral (Di Giovanni *et al.*, 2005). Neste estudo, o efeito protetor foi relacionado à inibição do ciclo celular, reduzindo a expressão de proteínas como a p27, e reduzindo a expressão de caspase-3, este último também observado em nosso estudo, através da análise do número de células imunomarcadas para esta molécula. É importante ressaltar que no nosso estudo

observamos 2 efeitos diferentes da casticina na morte celular: diretamente, a casticina reduz a morte de neurônios e indiretamente, via astrócito, a Castina reduz a morte de progenitores neuronais. Isso sugere que a morte celular é inibida pela casticina via diferentes mecanismos que envolvem a ação direta do flavonóide sobre os neurônios pós-mitóticos e os efeitos indiretos sobre progenitores neuronais, através da estimulação da síntese e/ou secreção de fatores solúveis (e de contato) pelos astrócitos.

A morte de células neurais por estresse oxidativo contribui largamente para o desenvolvimento de várias condições patológicas, tanto vasculares, como as doenças cérebro vasculares (DCV), quanto degenerativas, como as doenças de Parkinson e de Alzheimer (Ishige *et al.*, 2001; Dajas *et al.*, 2003b; Kukongviriyapan *et al.*, 2007). Já foi demonstrado que alguns flavonóides protegem tanto linhagens de células neurais (células HT22) quanto culturas primárias de neurônios corticais da morte induzida por estresse oxidativo (Ishige *et al.*, 2001). Um dos flavonóides mais estudados quanto aos efeitos antioxidantes é a quercetina. Aparentemente, este composto inibe vias de proteínas cinases que levam à inflamação e/ou apoptose (Ishikawa *et al.*, 1999; Kobuchi *et al.*, 1999; Peet & Li, 1999; Uchida *et al.*, 1999; Yoshizumi *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003; Donnelly *et al.*, 2004). Espósito e colaboradores (2002) mostraram que os efeitos cardio e neuroprotetores dos flavonóides e, em especial, da quercetina são principalmente explicados pela habilidade de seqüestrar radicais livres. Recentemente, atividade anti-oxidante foi demonstrada para casticina constituinte do extrato do fruto de *Vitex agnus-castus* (casticina, vitexina and orientina) (Hajdu *et al.*, 2007).

Essa capacidade citoprotetora dos flavonóides deve estar associada à sua habilidade de ativação de moléculas intracelulares (cinases, fosfatases, promotores

gênicos), que por sua vez ativam componentes de cascatas intracelulares, promovendo a expressão de sinais de sobrevivência, especialmente em situações onde a apoptose é um importante componente da morte celular (Dajas *et al.*, 2003b). É possível que *in vivo*, o componente glial, represente um importante mediador dos efeitos neuroprotetores dos flavonóides. É importante ressaltar que nosso trabalho é pioneiro em demonstrar o efeito dos astrócitos como mediadores das ações dos flavonóides no desenvolvimento do sistema nervoso.

Apesar de muitos flavonóides serem considerados antioxidantes e candidatos em potencial para o desenvolvimento de drogas citoprotetoras, alguns autores afirmam que as ações dos flavonóides são consideradas complexas e paradoxais (Sasaki *et al.*, 2007). A quercetina e seus análogos, por exemplo, têm sido estabelecidos como úteis na proteção de várias células neuronais contra o estresse oxidativo (Middleton *et al.*, 2000; Bastianetto & Quirion, 2002), no entanto, recentemente, este flavonóide foi apontado como tendo um efeito citotóxico em células da linhagem PC12 indiferenciadas e diferenciadas em neurônios (Sasaki *et al.*, 2007). Esse efeito citotóxico pode, por outro lado, depender do grau de diferenciação da célula, já que em um outro estudo, a quercetina não se mostrou indutora de apoptose em células diferenciadas da mesma linhagem (Gagne *et al.*, 2003). Ao contrário do que encontramos, Spencer e colaboradores demonstram que em camundongos e administrando dosagens acima de 10 μ M, a quercetina induz morte celular em culturas primárias de córtex cerebral (Spencer *et al.*, 2003). Em estudo sobre o efeito da rutina, também em concentrações acima de 10 μ M foi verificado que este flavonóide induz ativação de células gliais (astrócitos e microglia) e induz a produção de $\text{TNF}\alpha$ e óxido nítrico (Silva *et al.*, 2007). Nossos resultados corroboram os dados que afirmam a atividade neuroprotetora dos flavonóides, porém

outros estudos são necessários para verificar se em outras doses a casticina pode ser tóxica para as células neurais.

A heterogeneidade das respostas celulares aos diferentes flavonóides deixa clara a necessidade de entendermos seus mecanismos de ação, dose efetiva e tipos celulares responsivos, antes que esses compostos possam ser usados efetivamente no controle de patologias do sistema nervoso. Esse cenário pode ser exemplificado pelas diferenças que observamos nos efeitos diretos e indiretos da casticina: enquanto a casticina reduz a morte de neurônios pós-mitóticos; sua ação em progenitores neurais é mediada pelos astrócitos corroborando com os dados de que a responsividade celular é um fator determinante nos efeitos desses compostos.

O desconhecimento sobre os mecanismos de ação dos flavonóides e sua possível utilização na terapia são agravados pela falta de conhecimento sobre a capacidade desses compostos em atravessar a barreira hemato-encefálica (BHE) (Schmitt-Schillig *et al.*, 2005). A BHE tem o importante papel de regular o acesso de moléculas polares e de macromoléculas circulantes na corrente sangüínea para o cérebro. Em relação à casticina, não há estudos sobre a permeabilidade da BHE a esse flavonóide. Pesquisas se fazem necessárias para verificar o potencial deste composto para atravessar a BHE, com destaque para os estudos *in vivo*, com injeção de casticina conjugada a fluorocromo e posterior análise da presença deste flavonóide no cérebro.

Além da sua ação neuroprotetora, tem sido conferido aos flavonóides uma possível ação anti-proliferativa em uma grande variedade de linhagens tumorais (Deschner *et al.*, 1991; Lipkin *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Esses compostos, naturais e sintéticos, vêm sendo estudados na esperança de se desenvolverem novas possibilidades terapêuticas para os diversos tipos de tumores.

No entanto, sabe-se que propriedades citotóxicas de drogas antineoplásicas podem afetar também células normais peritumorais, e assim faz-se importante estudar os efeitos desses compostos fenólicos em células normais.

Diversos estudos apontam efeitos anti-proliferativos de vários flavonóides inclusive a casticina (You *et al.*, 1998; Kobayakawa *et al.*, 2004; Haïdara *et al.*, 2006). Flavovopiridol tem sido apontado como um inibidor de Cdk1 e encontra-se em desenvolvimento clínico como agente anti-tumoral (Shapiro, 2004). A Vitexicarpina (3',5-dihidroxi-3,4',6,7-tetramethoxyflavona), isolada do fruto da *Vitex rotundifolia*, com mesma fórmula estrutural da casticina, mostrou efeito inibitório do crescimento e proliferação de linfócitos de ratos (You *et al.*, 1998) e mais recentemente, no estudo de Kobayakawa e colaboradores (2004), foi observado que a casticina, em baixas doses, inibe de forma importante a proliferação de células tumorais humanas, porém, não mostrou influência no crescimento de células normais.

Estudos vêm sendo desenvolvidos recentemente, testando a ação do flavonóide rutina, extraído de *Dimorphandra mollis*, dos flavonóides acacetina, casticina, apigenina e pendulitina, extraídos de *Croton betulaster*, e do biflavonóide agatisflavona, extraído de *Caesalpynia pyramidalis*, todas elas plantas nativas do estado da Bahia, sobre células de glioblastoma multiforme humano, da linhagem GL15. Esse tumor é o subtipo mais comum dos tumores cerebrais primários, caracterizado por sua alta capacidade proliferativa, alta agressividade e sobrevida curta dos pacientes (Kleihues & Cavenee, 2000). Os resultados apontam uma ação anti-proliferativa dos flavonóides sobre as células tumorais. Além da inibição do crescimento, os flavonóides induzem as células remanescentes à diferenciação ou à apoptose (Silva *et al.*, 2002; 2004; Bahia *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006; 2007).

Esses dados contrastam parcialmente com os nossos já que a casticina diretamente não inibiu a proliferação nem de precursores neurais nem de astrócitos de córtex cerebral de roedores. No entanto, observamos uma diminuição da proliferação de precursores neurais cultivados sobre monocamadas astrocitárias tratadas por casticina ou pelo meio condicionado derivado dessas células. Uma possibilidade é que a ação anti-proliferativa da casticina no SNC normal *in vivo* seja mediada pelos astrócitos, pelo menos no que se refere à sua ação nos progenitores neurais. Outra possibilidade é que as diferenças dos efeitos estejam associadas a diferenças nos estágios funcionais das células. As células GL-15 tumorais quando expostas aos flavonóides estavam em estágio “proliferativo” intenso (Silva *et al.*, 2002; 2004; 2007; Bahia *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006; 2007). Experimentos *in vivo* utilizando casticina deverão contribuir, no futuro, para o entendimento do papel da glia como mediadora das ações dos flavonóides no desenvolvimento do sistema nervoso.

Em relação ao efeito da casticina em astrócitos normais de córtex cerebral de roedores, não observamos inibição da proliferação deste tipo celular. Além disso, não foi observada a modulação da expressão da proteína de filamento intermediário, GFAP, nem alterações na morfologia astrocitária. Uma possível explicação é o fato de que a casticina possa ser, de fato, seletivamente mais tóxica para células tumorais em comparação com as normais. Essa explicação é reforçada pelo fato deste flavonóide não influenciar a proliferação de outros tipos celulares, normais humanos e de camundongos em doses de até 1 μM (Kobayakawa *et al.*, 2004).

Silva *et al.* (2007) demonstraram que a rutina numa concentração de 50 μM apresenta um efeito direto em células gliais *in vitro*, induzindo a ativação dos astrócitos, com alterações na sua morfologia. Foi observada contração dos corpos

celulares, com processos curtos e grossos. Esses achados foram associados ao incremento da expressão de GFAP, revelado por *Western blot*, caracterizando um quadro de reatividade astrogliol (astrogliose).

Esses dados diferem dos nossos, uma vez que no presente estudo não encontramos modificações morfológicas ou na expressão de GFAP em células astrocíticas. Não é possível, entretanto, fazermos uma comparação mais refinada visto que os flavonóides utilizados diferem na sua estrutura, e também na concentração utilizada. Porém, se o flavonóide casticina realmente não induz alterações morfológicas em células normais, isso nos leva a acreditar que este seja um forte candidato a compor drogas para o tratamento de neoplasias do SNC, no futuro. Um estudo mais sistemático do efeito de diferentes concentrações da casticina em astrócitos, no entanto, será necessário para verificarmos se em outras doses diferentes da que utilizamos neste trabalho, este flavonóide tem efeito similar ao da rutina.

Sendo a casticina realmente mais tóxica seletivamente para células oncogênicas, este composto tem o potencial para indicação como promissora opção terapêutica no tratamento de tumores. Necessário se faz, portanto, a investigação dos eventos citotóxicos e morfogênicos em células normais e tumorais, para melhor avaliação destas informações, ainda incipientes na literatura.

Neste trabalho, estudamos o efeito do flavonóide casticina na morfogênese neuronal *in vitro*: verificamos um aumento significativo no número absoluto de neurônios cultivados tanto em presença do flavonóide quanto em presença de monocamadas astrocíticas tratadas pelo flavonóide. Diversos mecanismos têm sido propostos para uma determinada molécula promover neurogênese: 1) estimulando a entrada de células no ciclo mitótico (mitogênese) ou, alternativamente;

2) promovendo a sobrevivência de precursores em divisão (trofismo); 3) modulando a morte de precursores neuronais e/ou dos neurônios pós-mitóticos; 4) induzindo o comprometimento neuronal de progenitores indiferenciados (especificação).

Embora em ambas as condições experimentais, cultura pura de neurônios e cocultura neurônio-astrócito, tenhamos observado um aumento da população neuronal, os mecanismos de ação do flavonóide parecem ser diferentes em ambas as condições. Observamos uma modulação da morte celular em ambas as condições, no entanto, enquanto a casticina diretamente possui efeito neuroprotetor analisado pela dupla marcação de β -tubulina III e caspase-3 ativada, esse flavonóide, indiretamente (via astrócitos), parece proteger outro tipo celular, provavelmente progenitores neuronais. Essa hipótese, no entanto, deverá ser analisada futuramente utilizando-se anticorpos contra a proteína de filamento intermediário, nestina, marcador de progenitores neurais e caspase-3 ativada.

Durante o desenvolvimento normal do SN de vertebrados, ocorre uma maciça morte da população neuronal originalmente gerada (Pettmann & Henderson, 1998). Essa morte natural é determinada pela privação de fatores neurotróficos produzidos em quantidades limitantes capazes de suportar a sobrevivência de diferentes populações neuronais. Essa idéia levou, nos anos de 1950, à formulação da Teoria Neurotrófica que prediz que os neurônios possuem um programa de morte natural que deve ser suprimido pela presença de fatores de crescimento.

Desde a descrição do NGF, por Rita Levi Montalcini em 1951, a primeira neurotrofina identificada, tem aumentado substancialmente o conhecimento acerca das neurotrofinas e fatores de crescimento envolvidos nos processos de neurogênese e gliogênese (Temple & Qian, 1995; Gross *et al.*, 1996; Bonni *et al.*, 1997; Connor & Dragunow, 1998; Greene *et al.*, 1998; Rajan & McKay, 1998). Muitos

desses fatores são derivados dos alvos innervados pelas células neuronais, dos próprios neurônios ou das células astrócitárias. Nos últimos anos, tem crescido o conhecimento sobre a participação de fatores derivados de glia na diferenciação e proliferação neurais. Choi-Lundberg e colaboradores (1997) relataram que injeção de GDNF (*glial derived neurotrophic factor*), na substância nigra *in vivo* aumenta a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo. Outro fator, a *neurturin*, também relacionado ao GDNF, está envolvido na sobrevivência de neurônios simpáticos em cultura (Kotzbauer *et al.*, 1996). Mais recentemente, outros fatores derivados de astrócitos foram associados à proliferação e sobrevivência neuronais. Nosso grupo descreveu que EGF, *fator de crescimento da epiderme*, secretado por astrócitos em resposta ao tratamento pelo hormônio da tireóide está envolvido na proliferação de precursores do cerebelo (Martinez & Gomes, 2002; 2005).

Durante o desenvolvimento, as células interagem promovendo sua sobrevivência e funcionamento. Um dos processos mais importantes promovidos pelas interações neuro-gliais, na morfogênese do SN central e periférico, é a diferenciação celular, que é regida por fatores genéticos e epigenéticos. Acredita-se que esses processos são mediados por fatores solúveis, como fatores de crescimento e pelo contato direto entre as células, envolvendo moléculas de adesão (Gomes *et al.*, 2001). Porém acredita-se que isso dependa também das características das células da glia envolvidas. No estudo de Song e colaboradores (2002), verificou-se que astrócitos da medula espinhal adulta, uma das regiões consideradas como não-neurogênicas, não promoviam neurogênese a partir de células tronco adultas. No entanto, observou-se neste mesmo estudo que os astrócitos do hipocampo provêm um nicho para a neurogênese em adultos; sugerindo que possivelmente a capacidade de neurogênese deva estar, em parte,

associada a certos sinais fornecidos por uma regionalização dos astrócitos no SNC adulto. Lim & Alvarez-Buylla (1999) demonstraram que a neurogênese na zona subventricular germinativa do SN adulto depende de astrócitos presentes nessa mesma região. Acredita-se que os astrócitos apresentem um microambiente neurogênico em sua superfície celular com uma combinação de fatores de crescimento, elementos de matriz extracelular e moléculas de membrana (Lim & Alvarez-Buylla, 1999).

Alguns fatores derivados de glia têm sido descritos como participantes do processo da neurogênese. O ácido retinóico (AR) derivado da glia e outros fatores, como o Wnt, por exemplo, são alguns dos fatores que devem estar envolvidos neste processo (Lie *et al.*, 2005; Környei *et al.*, 2007). Estudos indicam que os astrócitos parecem ser importantes fontes do AR. Recentemente, foi demonstrado que astrócitos em cultura produzem AR suficiente para induzir o comprometimento fenotípico neuronal de células tronco. Não se sabe ainda, no entanto, se esse potencial é limitado a astrócitos dos nichos neurogênicos ou se astrócitos de regiões específicas do parênquima também sintetizam AR (Környei *et al.*, 2007). O Wnt é um outro fator que tem sido estudado. Acredita-se que ele, inclusive, possa ter ações complementares com as do AR, e juntos levam a uma determinação do fenótipo neuronal (Lie *et al.*, 2005; Környei *et al.*, 2007). A sinalização de Wnt foi identificada como uma via regulatória da neurogênese no hipocampo adulto, envolvida no controle do comprometimento celular com o fenótipo neuronal e com a proliferação de precursores comprometidos. O fato da inibição da sinalização de Wnt reduzir a neurogênese no hipocampo mostra que ela tem um papel primordial neste processo (Lie *et al.*, 2005).

No nosso trabalho, embora o número absoluto de neurônios seja aumentado por casticina ou astrócitos tratados pelo flavonóide, não observamos alterações no percentual de neurônios nas condições estudadas. Esses dados sugerem que casticina (direta ou indiretamente) não induza progenitores neurais a adotarem um fenótipo neuronal, diferentemente do que é sugerido para *Wnt* e AR.

As interações neuro-gliais desempenham papel importante em quase todas as etapas da organização da arquitetura cerebral, desde os estágios mais iniciais da neurogênese ao estabelecimento final das conexões neurais. Os eventos morfogenéticos que levam à formação do SN podem basicamente ser divididos em 5 etapas principais: 1) indução neural, processo pelo qual uma região do ectoderma se especifica em fenótipo neural; 2) geração de precursores neurais responsáveis pela neurogênese e gliogênese; 3) procura do alvo e estabelecimento das conexões neurais; 4) sinaptogênese e 5) refinamento das sinapses. Após o processo de neurogênese e migração, os neurônios devem ter a capacidade de procurar o seu alvo e estabelecer as conexões apropriadas. Para isto seus axônios são capazes de reconhecer pistas assimétricas durante sua trajetória. As células da glia têm sido exhaustivamente descritas como fontes de pistas assimétricas durante o direcionamento e crescimento axonal (Mason & Sretavan, 1997; Stoeckli & Landmesser, 1998). A formação de comissuras ou decussações, como o quiasma óptico e a placa do assoalho do SN, é dependente *in vivo* da interação entre a glia residente nestas regiões e axônios em crescimento.

Várias evidências *in vitro* corroboram os resultados *in vivo* e implicam os astrócitos na determinação da forma e polaridade neuronais, fundamentais no estabelecimento dos circuitos intercelulares específicos do SN (Qian *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1994; Garcia-Abreu *et al.*, 1995). Quando neurônios simpáticos são

cultivados *in vitro* em presença de células da glia, estendem axônios e dendritos, mas na sua ausência estendem apenas axônios. Essa indução dendrítica é devida à secreção de *bone morphogenetic protein* (BMP) pela célula glial (Prochiantz, 1995). Nesse trabalho, não analisamos a morfologia dos neurônios cultivados em presença de casticina e/ou astrócitos tratados por este flavonóide. É possível que, embora o flavonóide não induza o comprometimento de progenitores ao fenótipo neuronal, esteja envolvido na etapa mais tardia de maturação morfológica desta célula. *In vitro*, esse processo pode ser avaliado pelo índice de arborização e crescimento neurítico dessas células. Diversos trabalhos demonstram que fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular (MEC) sintetizados e secretados pelos astrócitos são potenciais moduladores da arborização neuronal (Garcia-Abreu *et al.*, 1995; Martinez & Gomes, 2002; 2005). Já é descrito na literatura que proteínas de matriz extracelular (MEC), como a fibronectina e a laminina, são importantes para o crescimento neurítico. Recentemente, Martinez & Gomes demonstraram que astrócitos tratados pelo fator de crescimento da epiderme (EGF) aumenta a extensão e arborização de neuritos de neurônios cerebelares *in vitro*. Esse mecanismo é mediado pela indução da síntese de fibronectina e laminina pelos astrócitos em resposta a EGF (Martinez & Gomes, 2002; 2005). Futuramente, deveremos analisar fatores de crescimento e componentes de MEC sintetizados e secretados pelos astrócitos e sua participação como mediadores das ações do flavonóide casticina.

Algumas características estruturais são apontadas como sendo determinantes para a atividade protetora da toxicidade glutamatérgica (Ishige *et al.*, 2001) e neurogênica (Sagara *et al.*, 2004) de alguns flavonóides. Para a atividade protetora, os requisitos estruturais são: a presença do grupamento hidroxila na posição 3 do anel C, um anel C insaturado e hidrofobicidade (Ishige *et al.*, 2001). No estudo de

Sagara e colaboradores (2004), todos os flavonóides com potencial para diferenciação possuíam um catecol no anel B (C3' e C4'), um anel C insaturado com um oxigênio na posição C4 e um grupo hidroxil na posição C7 no anel A. A casticina (5,3'-dihidroxi-3,6,7,4'-tetrametoxiflavona) possui duas das características compatíveis com a atividade protetora: é um flavonóide lipofílico (Hoberg *et al.*, 2001) e possui insaturação do anel C. Quanto aos requisitos para o potencial de diferenciação, este flavonóide possui apenas um anel C insaturado com um oxigênio na posição C4. Isso pode sugerir, despretensiosamente, que a casticina tenha maior potencial protetor que de diferenciação.

As interações neurônio-astrócito têm-se mostrado extremamente importantes em vários aspectos da morfogênese do SN. Nossos dados corroboram outros dados na literatura, que indicam a interdependência entre estas células na mediação de eventos como a proliferação celular e a morte. Nossos dados mostram, de forma pioneira, a ação da casticina sobre a morfologia do sistema nervoso central, em células normais do córtex cerebral de ratos. Como podemos observar na representação esquemática da **Figura 23**, a casticina não modula eventos como a proliferação, a expressão de GFAP ou a morfologia astrocitária. No entanto, por mecanismos ainda desconhecidos, a casticina atua sobre aspectos funcionais dos astrócitos de forma a tornar essas células mediadoras da ação do flavonóide na morfogênese neuronal. Demonstramos que a casticina teve um efeito protetor, reduzindo a morte de precursores neurais (ação indireta, via astrócito) e reduzindo a morte de neurônios pos-mitóticos (ação direta) *in vitro* (**Figura 23**).

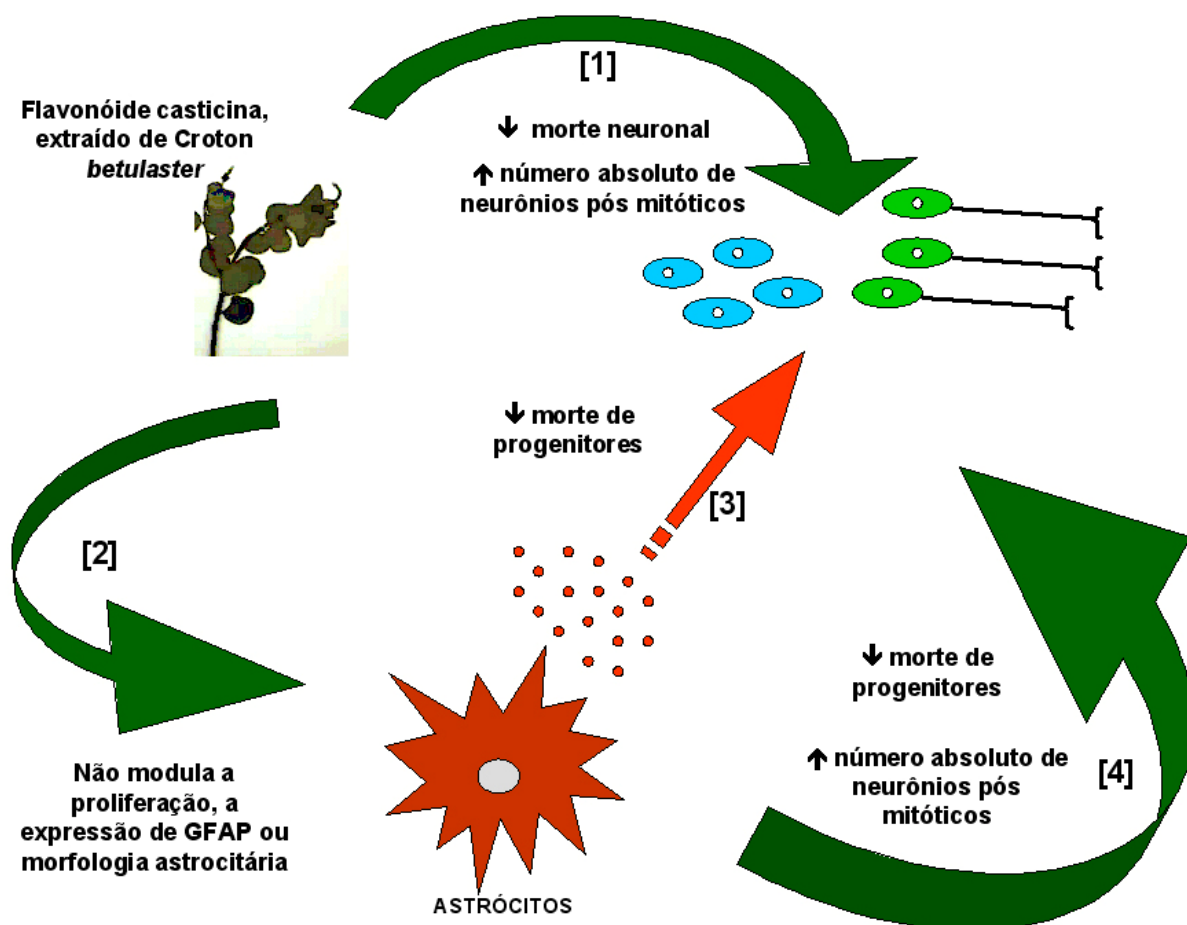


Figura 23. Modelo proposto para os mecanismos de ação do flavonóide casticina sobre as células do SNC. O flavonóide casticina, extraído de *Croton betulaster*, reduz a morte celular geral como efeito direto [1] sobre células de córtex cerebral embrionários, reduz a morte e aumenta o número absoluto de neurônios pós-mitóticos. Diretamente sobre os astrócitos [2], o flavonóide não modula a proliferação, a expressão de GFAP ou a morfologia deste tipo celular. Como efeito indireto, via astrócitos [4], promove redução da morte celular geral, o que é também observado como efeito dos fatores solúveis presentes no meio condicionado [3], e aumenta o número absoluto de neurônios pós-mitóticos [4].

Nosso trabalho tem grande relevância para o entendimento da fisiologia e desenvolvimento do sistema nervoso, pois é a primeira vez que se descreve a ação indireta de um composto flavonóide na morfogênese neuronal, via célula astrocitária. As substâncias administradas ao SN *in vivo* atuam não só diretamente sobre as células neuronais, mas também e inevitavelmente sobre as células gliais, em

especial astrócitos. Daí a importância de se verificar os efeitos de um determinado composto sobre os diversos tipos celulares do SNC. Nosso modelo tem a chance de mimetizar *in vitro* as relações celulares que acontecem no cérebro. Outro aspecto apontado neste trabalho é a questão da utilização de uma substância extraída de plantas nativas do nosso País. A utilização de um composto nacional para o desenvolvimento de drogas para uso terapêutico, sem dúvida, reduz os custos e a torna muito mais acessível à população. Embora ainda em fase inicial, nosso estudo poderá abrir grandes perspectivas para a utilização do flavonóide Castina no tratamento de doenças neurodegenerativas e tumorais, além de contribuir significativamente para o entendimento do papel das interações neuro-astrocitárias durante o desenvolvimento e patologias do sistema nervoso.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados podem ser assim resumidos:

EFEITOS DIRETOS DA CASTICINA SOBRE AS CÉLULAS NEURAIS:

- 1) Não altera o número de progenitores neurais;
- 2) Não altera a proliferação de progenitores neurais;
- 3) Reduz a morte celular;
- 4) Aumenta o número absoluto de neurônios embora não induza progenitores neurais a adotarem um fenótipo neuronal;
- 5) Reduz a morte neuronal;
- 6) Não altera a proliferação e diferenciação de astrócitos;

EFEITOS INDIRETOS DA CASTICINA SOBRE PROGENITORES NEURAIS:

- 1) Astrócitos tratados por casticina aumentam o número de células corticais totais;
- 2) Meio condicionado derivado de astrócitos tratados por casticina aumenta o número de células corticais totais;
- 3) Astrócitos tratados por casticina diminuem a proliferação de precursores;
- 4) Astrócitos tratados por casticina diminuem a morte de precursores;
- 5) Meio condicionado derivado de astrócitos tratados por casticina diminui a morte de progenitores totais;
- 6) Astrócitos tratados por casticina aumentam o número absoluto de neurônios embora não induza progenitores neurais a adotarem um fenótipo neuronal;
- 7) Astrócitos tratados por casticina não interferem na morte neuronal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.B.A.; Miotto A.M.; Nunes D.S.; Spadari-Bratfisch R.C.; Souza-Brito A.R.M. (2002) Mechanism of Antiulcerogenic Activity of Semi-Synthetic Crotonin Obtained from *Croton Cajucara Benth.* *Revista Brasileira de Farmacognosia* **12**:105-110.
- Aloisi, F. (2001) Immune Function of Microglia. *Glia* **36**:165-179.
- Anthony, T.E.; Klein, C.; Fishell, G.E; Heintz, N. (2004) Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of The Central Nervous System. *Neuron* **41**:881-890.
- Anton, E.S.; Cameron, R.S.; Rakic, P. (1996) Role Of Neuron-Glial Junctional Domain Proteins In The Maintenance And Termination Of Neuronal Migration Across The Embryonic Cerebral Wall. *Journal of Neuroscience* **16**:2283-2293.
- Aschner, M. (1998) Immune And Inflammatory Responses In The CNS: Modulation By Astrocytes. *Toxicology Letters* **28**:102-103:283-287.
- Bahia, M.V.; Correa, S.J.; David, J.M.; David, J.C.; El-Bachá, R.S.; Costa, S.L.; Silva, A.R.; Freitas, S.R.V.B. (2005) Efeitos de agathisflavonas isoladas de *Caesalpinia pyramidalis* sobre a viabilidade e proliferação de células de glioblastoma. In: 28a *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas.
- Banker, G.A. (1980) Trophic Interactions Between Astroglial Cells And Hippocampal Neurons In Culture. *Science* **209**:46-51.
- Barbosa, P.R. (1999) Flavonóides, Sesquiterpenos E Triterpenos Das Folhas De *Croton Betulaster* Müll. Arg. (Euphorbiaceae). 151f. Dissertação (Mestrado Em Química) – Instituto De Química, Universidade Federal Da Bahia, Salvador.

- Barbosa, P.R.; Fascio, M.; Martins, D.; Guedes, M.L.S.; Roque, N.F. (2003) Triterpenes Of *Croton Betulaster* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics And Ecology*, **31**: 307-308.
- Barbosa, P.R.; Martins, D.; Fascio, M.; Roque, N.F. (2004) Benzoyl-Methylpolyols From *Croton* Species (Euphorbiaceae). *Arkivoc* 95-102.
- Barbosa-Filho, J.M.; Medeiros, K.C.P.; Diniz, M.F.F.M.; Batista, L.M.; Athayde-Filho, P.F.; Silva, M.S.; Cunha, E.V.L.; Almeida, J.R.G.S.; Quintans-Júnior, L.J. (2006) Natural Products Inhibitors Of The Enzyme Acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **16**: 258-285.
- Barbosa-Filho, J.M.; Vasconcelos, T.H.C.; Alencar, A.A.; Batista, L.M.; Oliveira, R.A.G.; Guedes, D.N.; Falcão, H.S.; Moura, M.D.; Diniz, M.F.F.M.; Modesto-Filho, J. (2005). Plants And Their Active Constituents From South, Central, And North America With Hypoglycemic Activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **15**: 392-413.
- Barres, B. (2003) What Is A Glial Cell? *Glia* **43**:4-5.
- Barres, B.; Barde, Y. (2000). Neuronal And Glial Cell Biology. *Current Opinion In Neurobiology* **10**: 642-648.
- Bastianetto, S.; Quirion, R. (2002) Natural Extracts As Possible Protective Agents Of Brain Aging. *Neurobiology of Aging* **23**: 891-897.
- Bear, M.F.; Connors, B.W.; Paradiso, M.A. (2002) Coord. Trad. Jorge Alberto Quillfeldt *Et Al.* Neurônios E Glia. In: *Desvendando O Sistema Nervoso*. 2 Ed. Porto Alegre: Artmed. 22-49.
- Bignami, A.; Dahl, D. (1989) Vimentin-GFAP Transition In Primary Dissociated Cultures Of Rat Embryo Spinal Cord. *International Journal Of Developmental Neuroscience* **7**:343-357.

- Bittner, M.; Silva, M.; Aqueveque, P.; Kufer, J.; Jakupovic, J.; Murillo, R. (1997) Alkaloids And Other Constituents From *Croton Chilensis*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. **42**:223-228.
- Blardi, P; De Lalla, A; Volpi, L; De Perri, T. (1999) Stimulation Of Endogenous Adenosine Release By Oral Administration Of Quercetin And Resveratrol In Human. *Experimental and Clinical Research*. **25**:105-110.
- Bonni, A.; Sun, Y.; Nadal-Vicens, M.; Bhatt, A.; Frank, D.A.; Rozovsky, I.; Stahl, N.; Yancopoulos, G.D.; Greenberg, M.E. (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* **278**:477-483.
- Bovetti, S.; Bovolin, P.; Perroteau, I.; Puche, A.C. (2007) Subventricular zone-derived neuroblast migration to the olfactory bulb is modulated by matrix remodelling. *European Journal of Neuroscience* **25**:2021-2033.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
- Bressan, F.A.; Bernardes, M.S.; Campos, E.B.; Morais, A.A. (1998) Benzoyl-methylpolyols from *Croton* species (Euphorbiaceae). 21^a Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Química, Poços De Caldas, MG. Pn-016.
- Bruno, V.; Battaglia, G.; Casabona, G.; Copani, A.; Caciagli, F.; Nicoletti, F. (1998) Neuroprotection By Glial Metabotropic Glutamate Receptors Is Mediated By Transforming Growth Factor- β . *Journal of Neuroscience* **18**:9594-9600.
- Cajal, S.R. (1995) Histology Of The Nervous System Of Men And Vertebrates. Oxford: University Press, Oxford, England P. 59-97.

- Chamak, B.; Prochiantz, A. (1989) Influence Of Extracellular Matrix Proteins On The Expression Of Neuronal Polarity. *Development* **106**:483-491.
- Charris, J.; Dominguez, J.; De La Rosa, C.; Caro, C. (2000) (-)-Amuronine From The Leaves Of *Croton Flavens L.* (Euphorbiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **28**:795-797.
- Cho, E.J.; Yokozawa, T.; Rhyu, D.Y.; Kim, H.Y.; Shibahara, N.; Park, J.C. (2003) The inhibitory effects of 12 medicinal plants and their component compounds on lipid peroxidation. *The American Journal Of Chinese Medicine* **31**:907-917.
- Choi-Lundberg, D.L.; Lin, Q.; Chang, Y.N.; Chiang, Y.L.; Hay, C.M.; Mohajeri, H.; Davidson, B.L.; Bohn, M.C. (1997) Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* **275**:838-841.
- Christopherson, K.S.; Ullian, E.M.; Stokes, C.C.; Mallowney, C.E.; Hell, J.W.; Agah, A.; Lawler, J.; Mosher, D.F.; Bornstein, P.; Barres, B.A. (2005) Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins That Promote CNS Synaptogenesis. *Cell* **120**:421-433.
- Connor, B.; Dragunow, M. (1998) The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. *Brain Research Reviews* **27**:1-39.
- Costa, SL; Planchenault, T; Charriere-Bertrand, C; Mouchel, Y; Fages, C; Juliano, S; Lefrançois, T; Barlovatz-Meimon, G; Tady, M. (2002) Astroglial Permissivity For Neurotic Outgrowth In Neuron-Astrocyte Co-Cultures Depends On Regulation Of Laminin Bioavailability. *Glia* **37**:105-113.
- Dahl, D.; Bignami, A. (1973) A Immunocytochemical And Immunofluorescence Studies Of The Glial Fibrillary Acidic Protein In Vertebrates. *Brain Research* **61**:279-293.

- Dajas, F.; Costa, G.; Abin-Carriquiry, J.A.; McGregor, R.; Urbanavicius, J. (2001) Involvement of nicotinic acetylcholine receptors in the protection of dopamine terminals in experimental parkinsonism. *Functional Neurology* **16**:113-123.
- Dajas, F.; Rivera, F.; Blasina, F.; Arredondo, F.; Echeverry, C.; Lafon, L.; Morquio, A.; Heizen, H. (2003a) Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotoxicity Research* **5**: 377-384.
- Dajas, F.; Rivera-Megret, F.; Blasina, F.; Arredondo, F.; Abin-Carriquiry, J.A.; Costa, G.; Echeverry, C.; Lafon, L.; Heizen, H.; Ferreira, M.; Morquio, A. (2003b) Neuroprotection By Flavonoids. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research* **36**:1613-1620.
- De Clercq, E. (2000) Current Lead Natural Products For The Chemotherapy Of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Medicinal Research Reviews*. **20**:323-349.
- De Sampaio e Spohr, T.C.L.; Martinez, R.; Da Silva, E.F.; Neto, V.M.; Gomes, F.C (2002) Neuro-Glia Interactions Effects On Gfap Gene: A Novel Role For Transforming Growth Factor Beta 1. *European Journal of Neuroscience* **16**:2059-2069.
- Deschner, E.E.; Ruperto, J.; Wong, G.; Newmark, H.L. (1991) Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis* **12**:1193-1196.
- Di Giovanni, S.; Movsesyan, V.; Ahmed, F.; Cernak, I.; Schinelli, S.; Stoica, B.; Faden, A.I. (2005) Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:8333-8338.

- Dickson, D.W.; Lee, S.C.; Mattiace, L.A.; Yen, S.H.; Brosnan, C. (1993) Microglial And Cytokines In Neurological Disease, With Special Reference To Aids And Alzheimer's Disease. *Glia* **7**:75-83.
- Doetsch, F.; Caille, I.; Lim, D.A.; Garcia-Verdugo, J.M.; Alvarez-Buylla, A. (1999) Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells In The Adult Mammalian Brain. *Cell* **97**:703-716.
- Donnelly, L.E.; Newton, R.; Kennedy, G.E.; Fenwick, P.S.; Leung, R.H.; Ito, K.; Russell, R.E.; Barnes, P.J. (2004) Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *American Journal Of Physiology - Lung Cellular And Molecular Physiology* **287**:L774-783.
- Eng, L.F.; Vanderhaeghen, J.J.; Bignami, A.; Gerstl, B. (1971) An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Research* **28**:351-354.
- Eng, L. F.; Yu, A.C.; Lee, Y.L. (1992) Astrocytic Response To Injury. *Progress In Brain Research* **94**:353-365.
- Esposito, E.; Rotilio, D.; Di Matteo, V.; Di Giulio, C.; Cacchio, M.; Algen, S. (2002) A Review Of Specific Dietary Antioxidants And The Effects On Biochemical Mecanisms Related To Neurodegenerative Processes. *Neurobiology Of Aging* **23**:719-735.
- Falcão, H.S.; Lima, I.O.; Santos, V.L.; Dantas, H.F.; Diniz, M.F.F.M.; Barbosa-Filho, J.M.; Batista, L.M. (2005) Review Of The Plants With Anti-Infl Ammatory Activity Studied In Brazil. *Revista Brasileira De Farmacognosia* **15**:381-391.
- Falk, A.J.; Smolenski, S.J.; Bauer, L.; Bell, C.L. (1975) Isolation and identification of three new flavones from *Achillea millefolium* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **64**:1838-1842.

- Farnsworth, N.R.; Blomster, R.N.; Messmer, W.M.; King, J.C.; Persinos, G.J.; Wilkes, J.D. (1969) A Phytochemical And Biological Review Of The Genus *Croton*. *Lloydia* **32**:1-28.
- Fórmica, J.V.; Regelson, W. (1995) Review Of The Biology Of Quercetin And Related Bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology* **33**:1061–1080.
- Freitas, S.R.V.B.; Pitanga, B.P.S.; Souza, C.S.; Silva, A.R.; El-Bachá, R.S.; Barbosa, P.R.; Costa, S.L. (2006) O flavonóide pendulitina, extraído de *Croton betulaster*, inibe o crescimento, induz modificações fenotípicas em células de glioblastoma multiforme humano. In: *XIX SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL*, v. XIX, Salvador.
- Freitas, S.R.V.B.; Souza, C.S.; Carvalho, G.S.; Azevedo, C.O.; Meyer, R.; Barbosa, P.R.; TARDY, M.; El-Bacha, R.S.; Costa, M.F.D.; Nascimento, I.L.O.; Costa, S.L. (2007). Flavonoids Extracted From *Croton Betulaster* Induce Growth Inhibition Of GI-15 Glioblastoma Cells And Regulate Secretion Of The Angiogenic Cytokine TGF-Beta. In: *XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular/ 10Th IUBMB Conference*, Salvador. Anais da XXXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular/ 10Th IUBMB Conference. v. 1.
- Fróes, M.M.; Correia, A.H.; Garcia-Abreu, J.; Spray, D.C.; Campos De Carvalho, A.C.; Neto, M.V. (1999) Gap-Junctional Coupling Between Neurons And Astrocytes In Primary Central Nervous System Cultures. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **96**:7541-7546.
- Gage, F. H. (2000) Mammalian Neural Stem Cells. *Science* **287**:1433-1438
- Gagne, B.; Gelinas, S.; Bureau, G.; Lagace, B.; Ramassamy, C.; Chiasson, K.; Valastro, B.; Martinoli, M.G. (2003) Effects of estradiol, phytoestrogens, and

- Ginkgo biloba extracts against 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress. *Endocrine* **21**:89-95.
- Gaiano, N.; Nye, J.S.; Fishell, G. (2000) Radial Glial Identity Is Promoted By Notch 1 Signaling In The Murine Forebrain. *Neuron* **26**:395-404.
- Garcia-Abreu, J.; Moura Neto, V.; Carvalho, S.I.; Cavalcante, L.A. (1995) Regionally Specific Properties Of Midbrain Glia: I. Interactions With Midbrain Neurons. *Journal Of Neuroscience Research* **40**:471-477.
- Garwood, J.; Schnädelbach, O.; Clement, A.; Scütte, K.; Bach, A.; Faissner, A. (1999) Dsd-1 Proteoglycan Is The Mouse Homolog Of Phosphacan And Displays Opposing Effects On Neurite Outgrowth Dependent On Neuronal Lineage. *Journal Of Neuroscience* **19**:3888-3899.
- Golgi, C. (1885-1886) Sulla Fina Anatomia Della Sistema Nervosa. *Rivista Sperimentale Di Freniatria E Medicina Legale Delle Alienazioni Mentali* **11**:72-123.
- Gomes, F.C.; Garcia-Abreu, J.; Galou, M.; Paulin, D.; Moura Neto, V. (1999a) Neurons Induce GFAP Gene Promoter Of Cultured Astrocytes From Transgenic Mice. *Glia* **26**:97-108.
- Gomes, F.C.; Paulin, D.; Moura Neto, V. (1999b) Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP): Modulation By Growth Factors And Its Implication In Astrocyte Differentiation. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research* **32**:619-631.
- Gomes, F.C.; Sousa, V. De O.; Romão, L. (2005) Emerging Roles For TGF-Beta1 In Nervous System Development. *International Journal Of Developmental Neuroscience* **23**:413-424.
- Gomes, F.C.; Rehen, S.K. (2004) Role Of Neuron-Glia Interactions In Nervous System Development: Highlights On Radial Glia And Astrocytes. *Advances In Molecular And Cell Biology* **31**:97-126.

- Gomes, F.C.; Spohr, T.C.; Martinez, R.; Moura Neto, V. (2001) Cross-Talk Between Neurons And Glia: Highlights On Soluble Factors. *Brasilian Journal Of Medical and Biological Research* **34**:611-620.
- Gordon, M.D.; Nusse, R. (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:22429-22433.
- Greene, J.M.; Li, Y.L.; Yourey, P.A.; Gruber, J.; Carter, K.C.; Shell, B.K.; Dillon, P.A.; Florence, C.; Duan, D.R.; Blunt, A.; Ornitz, D.M.; Ruben, S.M.; Alderson, R.F.; (1998) Identification and characterization of a novel member of the fibroblast growth factor family. *European Journal of Neuroscience* **10**:1911-1925.
- Gross, J.; Ungethum, U.; Andreeva, N.; Heldt, J.; Priem, F.; Marschhausen, G.; Altmann, T. (1996) Glutamate-induced efflux of protein, neuron-specific enolase and lactate dehydrogenase from a mesencephalic cell culture. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* **34**:305-310.
- Guerrero, M.F.; Puebla, P.; Carron, R.; Martin, M.L.; San Roman, L. (2002) Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *The Journal Of Pharmacy And Pharmacology* **54**:1373-1378.
- Haidara, K.; Zamir, L.; SHI, Q.W.; Batist, G. (2006) The Flavonoid Casticin Has Multiple Mechanisms Of Tumor Cytotoxicity Action. *Cancer Letters* **242**:180-190.
- Hajdu, Z.; Hohmann, J.; Forgo, P.; Martinek, T.; Dervarics, M.; Zupko, I.; Falkay, G.; Cossuta, D.; Mathe, I. (2007) Diterpenoids And Flavonoids From The Fruits Of *Vitex Agnus-Castus* And Antioxidant Activity Of The Fruit Extracts And Their Constituents. *Phytotherapy Research* **21**:391-394.

- Han, X.; Ma, X.; Zhang, T.; Zhang, Y.; Liu, Q.; Ito, Y. (2007) Isolation Of High-Purity Casticin From *Artemisia Annua* L. By High-Speed Counter-Current Chromatography. *Journal of Chromatography A* **1151**:180-182.
- Hartfuss, E.; Galli, R.; Heins, N.; Götz, M. (2001): Characterization Of CNS Precursor Subtypes And Radial Glia. *Developmental Biology* **229**:15-30.
- Hatten, M.E. (1985) Neuronal Regulation Of Astroglia Morphology And Proliferation In Vitro. *The Journal of Cell Biology* **100**:384-396.
- Hatten, M.E. (2002) New Directions In Neuronal Migration. *Science* **297**:1660-1663.
- Hvsteen, B.H. (2002) The Biochemistry And Medical Significance Of The Flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**:67-202.
- Hertog, M.G. (1996) Epidemiological Evidence On Potential Health Properties Of Flavonoids. *The Proceedings of the Nutrition Society* **55**:385-397.
- Hoberg, E.; Meier, B.; Sticher, O. (2001) Quantitative High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Casticin in the Fruits of *Vitex agnus-castus*. *Pharmaceutical Biology* **39**: 57-61.
- Hostettman, K.; Marston, A.J.; Wolfender, L.; Maillard, M. (1995). Screening for Flavonoids and Related Compounds in Sequential Isolation of Bioactive Compounds. *Akademiai, Kiahó: Budapest* P. 35-52.
- Ishige, K.; Schubert, D.; Sagara, Y. (2001) Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radical Biology & Medicine* **30**:433-446.
- Ishikawa, Y.; Sugiyama, H.; Stylianou, E.; Kitamura, M. (1999) Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear factor-kappaB. *Journal of the American Society of Nephrology* **10**:2290-2296.

- Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. (2000) Nerve Cells And Behavior. In: Principles Of Neuronal Science, 4 Ed. New York: Mcgraw Hill, P 5-35.
- Kimelberg, H.K. (2004) The Problem Of Astrocyte Identity. *Neurochemistry International* **45**:191-202.
- Kleihues, P.; Cavenee, W.K. (2000) Pathology and genetics – tumors of the nervous system. World Health Organization classification of tumors. IARC, Lyon, 314p.
- Kobayakawa, J.; Sato-Nishimori, F.; Moriyasu, M.; Matsukawa, Y. (2004) G2-M Arrest And Antimitotic Activity Mediated By Casticin, A Flavonoid Isolated From Vitis Fructus (*Vitex Rotundifolia* Linne Fil.). *Cancer Letters* **208**:59-64.
- Kobuchi, H.; Roy, S.; Sen, C.K.; Nguyen, H.G.; Packer, L. (1999) Quercetin inhibits inducible ICAM-1 expression in human endothelial cells through the JNK pathway. *The American Journal Of Physiology* **277**: 403-411.
- Kornyei, Z.; Gocza, E.; Ruhl, R.; Orsolits, B.; Voros, E.; Szabo, B.; Vagovits, B.; Madarasz, E. (2007) Astroglia-Derived Retinoic Acid Is A Key Factor In Glia-Induced Neurogenesis. *The FASEB Journal* [Epub ahead of print].
- Kotzbauer, P.T.; Lampe, P.A.; Heuckeroth, R.O.; Golden, J.P.; Creedon, D.J.; Johnson, E.M. Jr.; Milbrandt, J. (1996) Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature* **384**:467-470.
- Kriegstein, A.; Götz, M. (2003). Radial Glia Diversity: A Matter Of Cell Fate. *Glia* **43**:37-43.
- Kukongviriyapan, U.; Luangaram, S.; Leekhaosong, K.; Kukongviriyapan, V.; Preeprame, S. (2007) Antioxidant and vascular protective activities of *Cratoxylum formosum*, *Syzygium gratum* and *Limnophila aromatica*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **30**:661-666.

- Lencina, C.; Pires, V.S.; Gosmann, G.; Taketa, A.T.C.; Schenkel, E.P. (2001) Tilirosídeo Em *Croton Gnaphalii* Ball. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **11**:89-93.
- Lent, R. Cem Bilhões De Neurônios: Conceitos Fundamentais De Neurociência. São Paulo: Atheneu, P. 66-95, 2001.
- Letournel-Boulland, M.L.; Fages, C.; Rolland, B.; Tardy, M. (1994). Lipopolysaccharides (Lps) Up-Regulate The Il-1-Mrna And Downregulate The Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) And Glutamine Synthetase (Gs)-Mnas In Astroglial Primary Culture. *European Cytokine Network* **5**:51-56.
- Levitt, P.; Rakic, P. (1980) Immunoperoxidase Localization Of Glial Fibrillary Acidic Protein In Radial Glial Cells And Astrocytes Of Developing Rhesus Monkey Brain. *The Journal Of Comparative Neurology* **193**:815-840.
- Lie, D.C.; Colamarino, S.A.; Song, H.J.; Desire, L.; Mira, H.; Consiglio, A.; Lein, E.S.; Jessberger, S.; Lansford, H.; Dearie, A.R.; Gage, F.H. (2005) Wnt Signalling Regulates Adult Hippocampal Neurogenesis. *Nature* **437**:1370-1375.
- Lim, D.A.; Alvarez-Buylla, A. (1999) Interaction Between Astrocytes And Adult Subventricular Zone Precursors Stimulates Neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:7526-7531.
- Lima, F.R.S.; Gervais, A.; Colin, C.; Izembart, M.; Moura Neto, V.; Mallat, M. (2001) Regulation Of Microglial Development: A Novel Role For Thyroid Hormone. *Journal of Neuroscience* **21**:2028-2038.
- Lima, L.R.P.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J. (2001) Bixin, Norbixin And Quercetin And Lipid Metabolism Effects In Rabbits. *Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science* **38**:196-200.

- Lipkin, M.; Reddy, B.; Newmark, H.; Lamprecht, S.A. (1999) Dietary factors in human colorectal cancer. *Annual Review of Nutrition* **19**:545-586.
- Lopes, R.M.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J.; Pinto, A.S. (2003) Flavonóides, Farmacologia De Flavonóides No Controle Hiperlipidêmico Em Animais Experimentais *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* (On Line). Disponível Na Internet Via Correio Eletrônico: <http://www.cib.org.br>, Brasil, P 18-22.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Brabo, S.N.; Silva, M.N. (1998) Terpenoids From *Croton cajucara*. *Phytochemistry* **49**:823-828.
- Malatesta, P.; Hartfuss, E.; Gotz, M. (2000) Isolation Of Radial Glial Cells By Fluorescent-Activated Cell Sorting Reveals a Neuronal Lineage. *Development* **127**:5253-5263.
- Martinez, R.; Gomes, F.C. (2005) Proliferation Of Cerebellar Neurons Induced By Astrocytes Treated With Thyroid Hormone Is Mediated By A Cooperation Between Cell Contact And Soluble Factors And Involves The Epidermal Growth Factor-Protein Kinase A Pathway. *Journal of Neuroscience Research* **80**:341-349.
- Martinez, R.; Gomes, F.C.A. (2002) Neuritogenesis Induced By Thyroid Hormone-Treated Astrocytes Is Mediated By Epidermal Growth Factor/Mitogen-Activated Protein Kinase-Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways And Involves Modulation Of Extracellular Matrix Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* **277**:49311-49318.
- Martínez-Flórez, S.; Gonzalez-Gallego, J.; Culebras, J.M.; Tunon, M.J. (2002) Flavonoids: Properties And Anti-Oxidizing Action. *Nutrición Hospitalaria* **17**:271-278.

- Martins, A.P.; Salgueiro, L.R.; Gonçalves, M.J.; Vila, R.; Tomi, F.; Adzet, T.; Cunha, A.P.; Canigual, S.; Casanova, J. (2000) Antimicrobial Activity And Chemical Composition Of The Bark Oil Of *Cróton Stellulifer*, an Endemic Species From S. Tomé E Príncipe. *Planta Médica* **66**:647-650
- Mason, C.A.; Sretavan, D.W. (1997) Glia, neurons, and axon pathfinding during optic chiasm development. *Current opinion in neurobiology* **7**:647-653.
- Mercer, L.D.; Kelly, B.L.; Horne, M.K.; Beart, P.M. (2005) Dietary Polyphenols Protect Dopamine Neurons From Oxidative Insults And Apoptosis: Investigations In Primary Rat Mesencephalic Cultures. *Biochemistry and Pharmacology* **69**:339-345.
- Middleton, E.Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C. (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* **52**:673-751.
- Miller, C.; Tsatas, O.; David, S. (1994) Dibutyryl cAMP, interleukin-1 beta, and macrophage conditioned medium enhance the ability of astrocytes to promote neurite growth. *Journal of Neuroscience Research* **38**:56-63.
- Mo, Z.; Moore, A.R.; Filipovic, R.; Ogawa, Y.; Kazuhiro, I.; Antic, S.D.; Zecevic, N. (2007) Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *Journal of Neuroscience* **27**:4132-41145.
- Nadarajah, B. (2003) Radial Glia And Somal Translocation Of Radial Neurons In The Developing Cerebral Cortex. *Glia* **43**:33-36.
- Nägler, K.; Mauch, D. H. Pfrieger, F.W. (2001) Glia-Derived Signals Induce Synapse Formation In Neurones Of The Rat Central Nervous System. *The Journal of Physiology* **533**:665-679.

- Noctor, S.C.; Flint, A.C.; Weissman, T.A.; Wong, W.S.; Clinton, B.K.; Kriegstein, A.R. (2002): Dividing Precursor Cells Of The Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological And Molecular Characteristics Of Radial Glia. *Journal of Neuroscience* **22**:31361-3173.
- Norton, W.T.; Aquino, D.A.; Hozumi, I.; Chiu, F.C.; Brosnan, C.F. (1992) Quantitative Aspects Of Reactive Gliosis. A Review. *Neurochemical Research* **17**:877-885.
- Otshudi, A.L.; Vercruysse, A.; Foriers, A. (2000) Contribution To The Ethnobotanica, Phytochemical And Pharmacological Studies Of Traditionally Used Medicinal Plants In The Treatment Of Dysentery And Diarrhoea In Lomela Area, Democratic Republic Of Congo (Drc). *Journal of Ethnopharmacology* **71**:411-423.
- Palmeira Júnior, S.F. (2005) Contribuição Ao Conhecimento Quimiotaxonômico Da Família Euphorbiaceae. Estudo Químico De Duas Espécies Do Gênero Cróton (C. Sellowii Baill. E C. Brasiliensis Muell. Arg.). Maceió, 317p. Tese De Doutorado – Programa De Pós-Graduação Em Química E Biotecnologia, Universidade Federal De Alagoas.
- Peet, G.W.; Li, J. (1999) IkappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:32655-32661.
- Peng, H.W.; Cheng, F.C.; Huang, Y.T.; Chen, C.F.; Tsai, T.H. (1998) Determination of Naringenin and Its Glucuronide Conjugate in Rat Plasma and Brain Tissue By High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of chromatography B, Biomedical Sciences and Applications* **714**:369-374.
- Pettmann, B.; Henderson, C.E. (1998) Neuronal cell death. *Neuron* **20**:633-647.
- Pfriege, F.W.; Barres B.A. (1997) Synaptic Efficacy Enhanced By Glia Cells In Vitro. *Science* **277**:1684-1686.

- Pieters, L.; De Bruyne, T.; Van Poel, B.; Vingerhoets, R.; Totte, J.; Van Den Berghe, D.; Vlietinck, A. (1995) In Vivo Wound Healing Activity Of Dragon's Blood (*Croton* spp.), A Traditional South American Drug, And Its Constituents. *Phytomedicine* **2**:17-22.
- Poluch, S.; Juliano, S.L. (2007) A normal radial glial scaffold is necessary for migration of interneurons during neocortical development. *Glia* **55**:822-830.
- Prochiantz, A. (1995) Neuronal polarity: giving neurons heads and tails. *Neuron* **15**:743-746.
- Qian, J.A.; Bull, M.S.; Levitt, P. (1992) Target-derived astroglia regulate axonal outgrowth in a region-specific manner. *Developmental Biology* **149**:278-294.
- Rajan, P.; McKay, R.D. (1998) Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *The Journal of Neuroscience* **18**:3620-3629.
- Rakic, P. (2002) Adult Neurogenesis In Mammals: An Identity Crisis. *The Journal of Neuroscience* **22**:614–618 .
- Raven, P.H.; Evert, R.F.; Eichorn, S.E. (2001) Biologia Vegetal, 6ª Edição, Ed. Guanabara-Koogan, Pp. 34-53.
- Reichenbach, A.; Robinson, S.R. (1995) Ependymoglia And Ependymoglia-Like Cells. In: Neuroglia, Kettenmann, H. & Ranson, B.R.; Oxford University Press. Cap. 4:58-84,
- Richter, M.; Ebermann, R.; Marian, B. (1999). Quercetin-Induced Apoptosis In Colorectal Tumour Cells: Possible Role Of EGF Receptor Signalling. *Nutrition And Cancer - An International Journal* **34**:88-99.
- Rouach, N.; Tence, M.; Glowinski, J.; Giaume, C. (2002) Costimulation Of N-Methyl-D-Aspartate And Muscarinic Neuronal Receptors Modulates Gap Junctional

- Communication In Striatal Astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:1023-1028.
- Sagara, Y.; Vanhnasy, J.; Maher, P. (2004) Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *Journal of Neurochemistry* **90**:1144-1155.
- Salatino, A.; Salatino, M.L.F.; Negri, G. (2007) Traditional Uses, Chemistry And Pharmacology Of *Croton* Species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18**:11-33.
- Sampson, J.H.; Phillipson, J.D.; Bowery, N.G.; O'Neill, M.J.; Houston, J.G.; Lewis, J.A. (2000) Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic compounds: indication of in vitro biological activity in receptor binding assays. *Phytotherapy Research* **14**:24-29.
- Santos, P.M.L.; Schripsema, J.; Kuster, R.M. (2005) Flavonóides O-Glicosilados De *Croton Campestris St.Hill.* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **15**: 321-325.
- Sasaki, M.; Nakamura, H.; Tsuchiya, S.; Horie, S.; Kashiwayanagi, M.; Saito, T.; Murayama, T. (2007) Quercetin-induced PC12 cell death accompanied by caspase-mediated DNA fragmentation. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **30**:682-686.
- Schmitt-Schillig, S.; Schaffer, S.; Weber, C.C.; Eckert, G.P.; Muller, W.E. (2005) Flavonoids And The Aging Brain. *Journal of Physiology and Pharmacology* **56**:23-36.
- Shapiro, G.I. (2004) Preclinical and clinical development of the cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol. *Clinical Cancer Research* **10**:4270s-4275s.

- Shutenko, Z.; Henry, Y.; Pinard, E.; Seylaz, J.; Potier, P.; Berthet, F.; Girard, P.; Sercombe, R. (1999) Influence Of The Antioxidant Quercetin In Vivo On The Level Of Nitric Oxide Determined By Electron Paramagnetic Resonance In Rat Brain During Global Ischemia And Reperfusion. *Biochemical pharmacology* 57:199-208.
- Silva, A.R.; Hughes, J.B.; Barreto, R.A.; Souza, J.S.; Costa, M.F.D., El-Bachá, R.S.; Veloso, E.; Tardy, M.; Freire, S.M.; Costa, S.L. (2002) The Flavonoid Rutin, Extracted From *Dimorphandra mollis*, Inhibits Proliferation And Stimulates Differentiation Of GL-15 Human Glioblastoma Cells. In: XVII Simpósio De Plantas Medicinais Do Brasil, Cuiabá-Mt. *Anais Do XVII Simpósio De Plantas Medicinais Do Brasil*.
- Silva, A.R.; Silva, V.D.A.; Freitas, S.R.V.B.; Souza, J.S.; Souza, C.S.; Hughes, J.B.; Barreto, R.A.; El-Bacha, R.S.; Barbosa, P.R.; Roque, N.F.; Costa, S.L. (2004) Effect of four flavonoid compounds isolated from *Croton betulaster* on viability and proliferation of glioblastoma cells.. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambú. *Resumos do XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular*.
- Silva, A.R.; Pinheiro, A.M.; Souza, C.S.; Freitas, S.R.V.B.; Vasconcellos, V.; Freire, S.M.; Velozo, E.S.; Tardy, M.; El-Bachá, R.S.; Costa, M.F.D.; Costa, S.L. (2007) The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF- α and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biology and Toxicology* DOI 10.1007/s10565-007-9017-y.
- Somjen, G.G. (1988) *Nervenkitt: Notes On The History Of The Concept Of Neuroglia. Glia* 1:2-9.

- Song, H.; Stevens, C.F.; Gage, F.H. (2002) Astroglia Induce Neurogenesis From Adult Neural Stem Cells. *Nature* **417**:39-44.
- Sousa, V. de O.; Romão, L.; Neto, V.M.; Gomes, F.C. (2004) Glial Fibrillary Acidic Protein Gene Promoter Is Differently Modulated By Transforming Growth Factor-Beta 1 In Astrocytes From Distinct Brain Regions. *European Journal of Neuroscience* **19**:1721-1730.
- Spencer, J.P.; Kuhnle, G.G.; Williams, R.J.; Rice-Evans, C. (2003) Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *The Biochemical Journal* **372**:173-181.
- Stannard, B.L. (Ed). (1995) Flora Of The Pico Das Almas. Great Britain: Royal Botanic Gardens. 853p.
- Stipursky, J.; Gomes, F.C.A. (2007) TGF- β 1/Smad Signaling Induces Astrocyte Fate Commitment *In Vitro*: Implications For Radial Glia Development. *Glia*. No prelo.
- Stoeckli, E.T.; Landmesser, L.T. (1998) Axon guidance at choice points. *Current Opinion in Neurobiology* **8**:73-79.
- Suganuma, M.; Okabe, S.; Oniyama, M.; Tada, Y.; Ito, H.; Fujiki, H. (1998) Wide Distribution Of [3h](-)-Epigallocatechin Gallate, A Cancer Preventive Tea Polyphenol, In Mouse Tissue. *Carcinogenesis* **19**:1771-1776.
- Swanson, R.A.; Liu, J.; Miller, J.W.; Rothstein, J.D.; Farrel, K.; Stein, B.A.; Longuemare, M.C. (1997) Neuronal Regulation Of Glutamate Transporter Subtype Expression In Astrocytes. *Journal of Neuroscience* **17**:932-940.
- Tan, W.F.; Lin, L.P.; Li, M.H.; Zhang, Y.X.; Tong, Y.G.; Xiao, D.; Ding, J. (2003) Quercetin, A Dietary-Derived Flavonoid, Possesses Antiangiogenic Potential. *European Journal of Pharmacology* **459**:255-262.
- Tardy, M. (1991) Astrocyte Et Homeostasie. Médecine. *Science* **8**: 799-804.

- Tardy, M. (2002) Role of Laminin Bioavailability In The Astroglial Permissivity For Neuritic Outgrowth. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **74**: 683-690.
- Temple, S.; Qian, X. (1995) bFGF, neurotrophins, and the control of cortical neurogenesis. *Neuron* **15**:249-252.
- Temple, S. (2001) The Development Of Neural Stem Cells. *Nature* **414**: 112–117.
- Temple, S.; Alvarez-Buylla, A. (1999) Stem Cells In The Adultmammalian Central Nervous System. *Current Opinion in Neurobiology* **9**:135–141.
- Trentin, A.G.; Rosenthal, D.; Moura Neto, V. (1995) Thyroid Hormone And Conditioned Medium Effects On Astroglial Cells From Hypothyroid And Normal Rat Brain: Factor Secretion, Cell Differentiation, And Proliferation. *Journal of Neuroscience Research* **41**:409-417.
- Trentin, A.G.; Gomes, F.C.; Lima, F.R.; Neto, V.M. (1998) Thyroid hormone acting on astrocytes in culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal.* **34**:280-282.
- Tsai, T-H.; Chen, Y-F. (2000) Determination Of Unbound Hesperetin In Rat Blood And Brain By Microdialysis Coupled To The Mitomycin C Induced DNA Damage. *Toxicol Letters* **151**:149.
- Uchida, K.; Shiraishi, M.; Naito, Y.; Torii, Y.; Nakamura, Y.; Osawa, T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *The Journal of Biological Chemistry* **274**:2234-2242.
- Ullian, E.M.; Sapperstein, S.K.; Christopherson, K.S.; Barres, B.A. (2001) Control Of Synapse Number By Glia. *Science* **291**:657-661.

- Van Der Watt, E.; Pretorius, J.C. (2001). Purification And Identification Of Active Antibacterial Components In *Corpobrotus Edulid* L. *Journal Of Ethnopharmacology* **76**:87-91
- Veiga Junior, V.F.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. (2005) Medicinal Plants: Safe Cure? *Química Nova* **28**:519-528.
- Vilhardt, F. (2005) Microglia: Phagocyte And Glia Cell. *The International Journal Of Biochemistry And Cell Biology* **37**:17-21.
- Viola, H.; Wolfman, C.; Marder, M.; Goutman, J.D.; Bianchin, M.; Wasowski, C.; Calvo, D.J.; Izquierdo, I.; Paladini, A.C.; Medina, J.H. (2000) 6-Chloro-3'-Nitroflavone Is A Potent Ligand For The Benzodiazepine Binding Site Of The Gaba(A) Receptor Devoid Of Intrinsic Activity. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **65**:313-320.
- Wang, L.; Matsushita, K.; Araki, I.; Takeda, M. (2002) Inhibition of c-Jun N-terminal kinase ameliorates apoptosis induced by hydrogen peroxide in the kidney tubule epithelial cells (NRK-52E). *Nephron* **91**:142-147.
- Wilhelm Filho, D.; Torres, M.A.; Tribess, T.B.; Pedrosa, R.C.; Soares, C.H. (2001) Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acara (*Geophagus brasiliensis*). *Brazilian journal of medical and biological research* **34**:719-726.
- Wood, J.E.; Munro, M.H.G.; Blunt, J.W.; Perry, N.B.; Walker, J.R.L.; Ward, J.M. (1999). Biologically Active Compounds From *Ozothammus Leptophyllus*. *New Zeland Journal Of Botany* **37**:167-174.
- Xiao, G.H.; Jeffers, M.; Bellacosa, A.; Mitsuuchi, Y.; Vande Woude, G.F.; Testa, J.R. (2001). Anti- apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the osphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
98:247-252.

- Yang, K. ; Lamprecht, S.A ; Liu, Y.; Shinozaki, H.; Fan, K.; Leung, D.; Newmark, H.; Steele, V.E.; Kelloff, G.J.; Lipkin, M. (2000). Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis* **21**:1655-1660.
- Yokozawa, T.; Dong, E.; Liu, Z.W.; Shimizu, M. (1997). Antioxidant Activity Of Flavones And Flavonols *In Vitro*. *Phytotherapy Research* **11**:446-450.
- Yoshizumi, M.; Tsuchiya, K.; Kirima, K.; Kyaw, M.; Suzaki, Y.; Tamaki, T. (2001) Quercetin inhibits She- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c- Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultures rat aortic smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* **60**:656-665.
- You, K.M.; Son, H.W.; Kang, S.S.; Kim, H.P. (1998) Vitexicarpin, A Flavonoid From The Fruits Of Vitex Rotundifolia, Inhibits Mouse Lymphocyte Proliferation And Growth Of Cell Lines In Vitro, *Planta Médica* **64**:546-550.
- Youdim, K.A.; Kaiser, M.Z.; Begley, D.J.; Rice-Evans, C.A.; Abbott, N.J. (2004) Flavonoid Permeability Across An In Situ Model Of The Blood-Brain Barrier. *Free Radical Biological And Medicine* **36**:592-604.
- Yunes, R.A.; Calixto, J.B. (2001) Flavonóides Antioxidantes De Plantas Medicinais E Alimentos: Importância E Perspectvas Terapêuticas. In: Plantas Medicinais Sob A Ótica Da Química Medicinal Moderna. Ed Argos, 321-331.
- Zeng, X.; Fang, Z.; Wu, Y.; Zhang, H. (1996) Chemical constituents of the fruits of Vitex trifolia L. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **21**:167-168.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)