

Efeitos comportamentais e neurotóxicos do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* em ratos

Behavioral and neurotoxic effects of *Brugmansia suaveolens* aqueous extract in rats

Odila Eli Dickel^I
Rosiane Borba de Aguiar^I
Laura Geracitano^{II}
José Maria Monserrat^{II}
Daniela Martí Barros^{III,*}

^I Mestre em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, BRASIL

^{II} Pesquisador Colaborador. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, BRASIL

^{III} Docente orientador. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Instituto de Ciências Biológicas e Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, CEP 96201-900, Rio Grande, RS, BRASIL

RESUMO - *Brugmansia suaveolens* é uma planta alucinógena de ampla distribuição na América do Sul, cuja atividade biológica é pouco conhecida. O presente trabalho buscou analisar os efeitos da administração oral do extrato aquoso bruto (EAB) de *Brugmansia suaveolens*, de forma aguda (um dia) ou crônica (21 dias), nas doses de 100 e 300mg/kg. Efeitos sobre o comportamento foram avaliados nas tarefas de esquivas inibitória, campo aberto, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris. Danos oxidativos a importantes biomoléculas hipocâmpais foram utilizados como parâmetros de neurotoxicidade. O tratamento agudo com EAB não afetou significativamente os resultados obtidos na esquivas inibitória, porém o tratamento crônico com a dose de 300mg/Kg induziu alterações na evocação da memória espacial no labirinto aquático. Ambas as doses do extrato interferiram no desempenho dos animais no labirinto em cruz elevado, revelando um significativo efeito ansiogênico e hipoquinésico, e o tratamento crônico aumentou significativamente o dano oxidativo a lipídios, bem como as quebras na molécula de DNA. Os resultados mostram que o extrato interferiu de forma significativa nos níveis de ansiedade, na atividade locomotora e na memória espacial, sendo que essa interferência pode ou não estar relacionada ao seu efeito pró-oxidante.

Palavras-chave: Plantas alucinógenas. Ansiedade. Memória espacial. Dano de DNA. Peroxidação lipídica. *Brugmansia suaveolens*.

ABSTRACT - *Brugmansia suaveolens* is a hallucinogenic plant with a wide distribution; however, there has been little study on its biological activities. This current study analyzed the effects of one day (acute) or 21 days of (chronic) oral administration of *Brugmansia suaveolens* aqueous extract (AEB) at 100 and 300 mg/kg doses. Cognitive performance was evaluated by step-down inhibitory avoidance, open-field, elevated plus-maze and Morris water maze tasks. DNA damage and lipid peroxidation in the rat hippocampus were evaluated by neurotoxicity studies. Results showed that AEB (acute treatment) had no significant effect on the inhibitory avoidance task, whereas chronic treatment (300mg/Kg) induced spatial memory impairment in the water maze task. Both extract doses interfered with the elevated plus-maze performance, revealing a strong anxiogenic effect. Oxidative DNA damage and lipid peroxidation in the hippocampus increased after 21 days of exposure. These results demonstrated that *Brugmansia* extract may alter anxiety levels, decrease locomotor activity, induce spatial memory impairment and increase oxidative damage in the hippocampus, which may or may not be related to a pro-oxidant activity.

Keywords: Hallucinogenic plants. Anxiety. Spatial memory. DNA damage. Lipid peroxidation. *Brugmansia suaveolens*.

INTRODUÇÃO

A trombeteira, *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae) é uma espécie oriunda da América do Sul, também chamada no Brasil de cartucheira (OLIVEIRA *et al.*, 1991). Os principais alcalóides de valor medicinal encontrados em *B. suaveolens* são membros da família dos tropanos principalmente escopolamina e hioscinamina, mas também atropina e hioscina (GRIFFIN & LIN, 2000; SCHENKEL *et al.*, 2004). Esses alcalóides inibem os receptores muscarínicos de acetilcolina e agem no sistema parassimpático. São utilizados na medicina para o tratamento de espasmos e para sedação, dentre outros procedimentos. O extrato da *Brugmansia* exibe efeitos propriedades antiespasmódico, antiasmático, anticolinérgico, narcótico e sedativo (ZAYED & WINK, 2004). Já foi demonstrado que o extrato aquoso bruto (EAB) pode afetar o sistema nervoso central (SNC), produzindo efeitos similares aos observados em alguns agentes psicotrópicos. Plantas contendo substâncias anticolinérgicas, como as do gênero *Brugmansia*, vêm sendo utilizadas há muitos séculos em medicamentos fitoterápicos, em cerimônias religiosas e como venenos (ISBISTER *et al.*, 2003).

Os efeitos sistêmicos da intoxicação por *B. suaveolens* são similares àqueles do envenenamento por atropina ou beladona (ISBISTER *et al.*, 2003). Havelius e Asman (2002) e Isbister e colaboradores (2003) descreveram vários efeitos clínicos de envenenamento por substâncias anticolinérgicas, dentre eles midríase, ressecamento bucal, delírios, vermelhidão cutânea, agitação/agressividade, redução dos sons intestinais, alucinações, taquicardia, retenção urinária e febre.

As flores e sementes de *B. suaveolens* são tradicionalmente utilizadas no sul do Brasil (Rio Grande do Sul, RS) como uma mistura aquosa, ingerida pelas suas propriedades

analgésicas por indivíduos que se encontram em algesia.

Intoxicações não intencionais são muito comuns, principalmente após a ingestão de folhas ou sementes (ISBISTER *et al.*, 2003) ou contato ocular acidental durante jardinagem (HAVELIUS & ASMAN, 2002).

Outro uso para essa planta, especialmente entre a população mais jovem, é a ingestão intencional ou consumo via cigarro para induzir alucinações (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Nencini e colaboradores (2006), ao estudar o EAB, relataram a afinidade com receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A} e 5-HT_{2C}) e dopaminérgicos (D1 e D2) e, associando resultados de trabalhos anteriores (CAPASSO & De FEO, 2002), sugeriram que o extrato pode atuar como antagonista dopaminérgico.

Alterações no equilíbrio de monoaminas como dopamina (DA) e serotonina (5-HT) foram implicadas na etiologia e/ou farmacoterapia de várias desordens mentais, assim, a interação do EAB com receptores monoaminérgicos poderia ser uma ferramenta útil no estudo ou até mesmo no tratamento de doenças neurológicas ou neurodegenerativas (NENCINI *et al.*, 2006).

Espécies ativas de oxigênio (EAOs), geradas durante o processo metabólico normal ou após um insulto tóxico, levam a um estado de estresse oxidativo que contribui para a patogenicidade de certas doenças humanas ao danificar importantes biomoléculas (revisado por PERRY *et al.*, 2002). O cérebro é particularmente suscetível aos radicais livres uma vez que esse órgão gera uma quantidade superior dessas moléculas por grama de tecido quando comparado a qualquer outro órgão. Muitas substâncias que atuam sobre os sistemas neurotransmissores, alterando a atividade neuronal, podem gerar importantes mudanças no estado oxidativo das estruturas cerebrais, levando ao estabelecimento de um cenário antioxidante ou pró-oxidante, com

significativas implicações em doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer e Mal de Parkinson (revisado por PERRY *et al.*, 2002).

Uma vez que o metabolismo da dopamina inclui a liberação de H_2O_2 na via nigroestriatal e foi relacionado à produção de radicais hidroxil *in vivo*, distúrbios no transporte de dopamina deveriam ser considerados como evento crítico, pois a DA livre é uma fonte de formação de substâncias reativas intermediárias devido a seu potencial de auto-oxidação (CHIUEH *et al.*, 1993).

Apesar de alguns trabalhos mostrarem que o EAB afeta o sistema de neurotransmissores, poucas informações foram relatadas sobre suas propriedades anti- ou pró-oxidantes. O objetivo desse estudo foi avaliar os possíveis efeitos do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* sobre parâmetros comportamentais como a formação e evocação da memória em esQUIVA inibitória, sobre a ansiedade, atividade locomotora e memória espacial, bem como investigar a ação desse extrato sobre a peroxidação lipídica e o dano de DNA no hipocampo.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e esforços foram feitos para reduzir o número e o estresse dos animais utilizados. Salientamos que no momento da realização deste trabalho ainda não havia na Universidade Federal do Rio Grande (FURG) o Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA).

Animais e tratamentos

Ratos Wistar machos, 2-3 meses de idade ($285 \pm 10g$), foram condicionados cinco por gaiola com a água e comida *ad libitum*. Ciclos de 12/12h claro e escuro e temperatura na faixa de $23 \pm 1^\circ C$ foram mantidos constantes. Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos experimentais e todos os procedimentos comportamentais foram realizados em 08 e 14h.

Preparação do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens*

Flores frescas de *B. suaveolens* foram coletadas na cidade de Rio Grande (RS - Brasil) de outubro a março pela Bióloga Odila Eli Dickel e autenticadas por Clélia Pereira no Laboratório de Botânica e Zoologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade (FURG). Um espécime foi depositado no herbário da universidade sob o código 3861.

As flores foram secas sob a forma de exsiccatas em estufa à temperatura de $37^\circ C$, sendo conservadas durante 4 a 5 dias.

O processo de exsiccção foi renovado diariamente, para evitar a deterioração do material coletado. Após a secagem, o material foi armazenado em envelopes de papel-pardo em local seco. O EAB foi obtido através da decocção de 30g de flores secas da *B. suaveolens* em 300mL de água destilada durante 5 minutos. Um extrato de 40mg/g de água destilada foi obtido e utilizado para os estudos farmacológicos.

Desenho experimental

Os animais foram aclimatados durante 7 dias ao laboratório e ao operador responsável por seu manuseio. Dois protocolos de administração oral (gavagem) foram executados: agudo (um dia) e crônico (21 dias). O grupo controle (CTR) recebeu água destilada, enquanto os demais grupos receberam o extrato nas doses de 100mg/Kg/dia ou 300mg/Kg/dia (EAB 100 e EAB 300, respectivamente). Em todos os experimentos o número de animais por grupo foi semelhante ($n = 10$), sendo que os animais tratados de forma aguda foram, após um período de descanso, reutilizados para os testes crônicos.

Ao final dos testes comportamentais, os hipocampos foram dissecados e utilizados para os testes de peroxidação lipídica e dano de DNA.

Testes comportamentais

EsQUIVA inibitória

Os animais foram submetidos à esQUIVA inibitória como descrito em trabalhos prévios (Barros *et al.*, 2001; 2002). O aparelho de esQUIVA inibitória é composto por uma caixa medindo 25 x 25 x 50cm com uma plataforma de 2,5 x 7,0cm à esquerda. O assoalho da caixa é constituído por barras de metal de 1mm de diâmetro, distantes 1cm entre si. Na sessão de treino, os animais foram individualmente colocados na plataforma e, ao descer com as quatro patas, receberam um choque fraco (0,4mA por 2s). Em seguida foram retirados do aparato e devolvidos às suas gaiolas. Para avaliar a memória de curta duração (STM), 90min após do treino, os animais foram recolocados na plataforma do aparato e ficaram livres para explorar o ambiente por um tempo máximo de 180s. Na avaliação da memória de longo prazo (LTM), os animais retornaram ao aparato 24h após o treino e o procedimento foi idêntico ao descrito para a STM. A latência para descida da plataforma com as quatro patas foi registrada em todas as etapas do experimento.

No teste do protocolo de tratamento agudo, os animais receberam a infusão 15min antes da sessão de treino para avaliação dos possíveis efeitos do EAB na aquisição da memória de curto e longo prazo (STM e LTM, respectivamente). Para os animais sob tratamento crônico, a infusão do 21º dia também foi realizada 15min antes da sessão de treino, porém somente a LTM foi avaliada.

Campo aberto

Essa tarefa permite a avaliação das atividades locomotora e exploratória em um ambiente novo. O equipamento utilizado consiste de uma caixa de 40 x 50cm com o assoalho dividido em 12 quadrantes. Animais sob tratamento agudo e crônico foram individualmente colocados no quadrante anterior esquerdo e deixados para explorar a arena por 5 min (Barros *et al.*, 2001). Durante o período de exploração, o número de cruzamentos (de um quadrante para outro) e o número de vezes que o animal assumiu a posição bípede (“rearings”) foram registrados como medida das atividades locomotora e exploratória.

Labirinto em cruz elevado

Nessa tarefa um aparato em forma de cruz, elevado 70 cm acima do chão e constituído de uma região central (5 x 5 cm), dois braços abertos (50 x 10 x 2 cm) e dois braços fechados (50 x 10 x 2 cm) em posições opostas, permite avaliar se determinada substância afeta a mobilidade, locomoção ou comportamentos pró- e anticonflito (Barros *et al.*, 2000; 2001), além de ser um modelo bem estabelecido para estudos de ansiedade.

Sob luz vermelha, um rato foi colocado na plataforma central do labirinto voltado para um dos braços abertos. Durante 5min, dois observadores registraram o número de vezes que o animal entrou em cada tipo de braço, o número de vezes em que o animal ficou na posição bípede (“rearings”) e o tempo que o animal passou com as quatro patas dentro de cada tipo de braço.

Labirinto aquático de Morris

O procedimento adotado foi descrito anteriormente (AGUIAR *et al.*, 2006). Em um tanque circular, localizado em uma sala contendo dicas visuais, foi colocado 70cm de água (24±1°C) e uma plataforma submersa para a realização do treinamento (dias 1 a 5). Diariamente, cada animal foi submetido a 5 sessões consecutivas com intervalos de 70s. A cada sessão, o quadrante de partida foi modificado, porém a plataforma foi fixada em apenas um dos quadrantes. Foi permitido que cada animal nadasse por 120s ou até que encontrasse a plataforma e saísse da água. O tempo decorrido para o animal encontrar a plataforma (latência) foi registrado por um sistema de vídeo automatizado (EthoVision®, NOLDUS) para posterior análise. No dia do teste, a plataforma foi removida e os animais puderam nadar livremente durante 90s. O tempo de permanência no quadrante da plataforma foi utilizado como parâmetro de avaliação de retenção.

Animais sob tratamento agudo receberam o EAB apenas no dia do teste (30min antes) enquanto os sob tratamento crônico receberam o extrato 30 min antes do início das sessões de treinamento e no mesmo período no dia do teste.

Avaliação dos efeitos neurotóxicos

Peroxidação lipídica

O protocolo para determinar a peroxidação de lipídicos (LPO) foi descrito anteriormente (AGUIAR *et al.*, 2008). Hipocampus extraídos dos animais tratados aguda e cronicamente foram homogenizados em metanol, centrifugados a 1.000g durante 10min à 4°C e os sobrenadantes utilizados para as dosagens. A análise baseia-se na formação de um complexo entre os lipídios peroxidados (5µL), o FeSO₄ (1mM) e o corante xylenol orange (1mM) em meio ácido (H₂SO₄ - 250mM). Após um período de incubação (5h) à temperatura ambiente, as amostras foram analisadas em leitora de microplaca (ELx 800, Biotek ELx 800, Winooski, VT, USA) à 550nm. Os resultados foram expressados em relação ao padrão de Hidroperóxido de Cumeno (CHP; 0,1mM; Sigma) em equivalentes de CHP por miligrama de tecido fresco.

Eletroforese alcalina (Ensaio Cometa)

O dano a moléculas de DNA foi avaliado através do Ensaio Cometa descrito por Tice *et al.* (2000) com pequenas modificações. Hipocampus foram dissecados e homogeneizados em tampão fosfato (PBS). Aliquotas (0,3 µL) foram diluídas em agarose de baixo ponto de fusão e adicionadas em lâminas cobertas por agarose com ponto de fusão regular. As células foram, então lisadas (2,5 M NaOH, 0,1 M EDTA, 0,01 M Tris, 1% sodium sarcocinate, 1% Triton X-100, and 10% dimethyl sulfoxide, pH 10.0) por uma noite e colocadas em solução de eletroforese por 30min para o desenrolamento do DNA. Em seguida, foi realizada a eletroforese durante 35min a 25V e 280mA. Por fim, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M, pH 7,5), coradas (Sybr Gold; Molecular Probes) e analisadas em microscópio de epifluorescência (Zeiss Axioplan, 400x)

O dano foi medido em 50 células aleatoriamente selecionadas em duplicatas, considerando 5 graus de dano (0: não danificado a 4: completamente danificado). Os escores finais foram calculados multiplicando-se o número do grau com sua frequência.

Análise estatística

Quando os pré-requisitos de homogeneidade da análise de variância foram atingidos, a análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via, seguida do teste a posteriori Newman-Keuls. Nos casos em que os pré-requisitos não foram verificados, os dados foram analisados por métodos não-paramétricos (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney). Para todas as análises foi considerada significância de 5%.

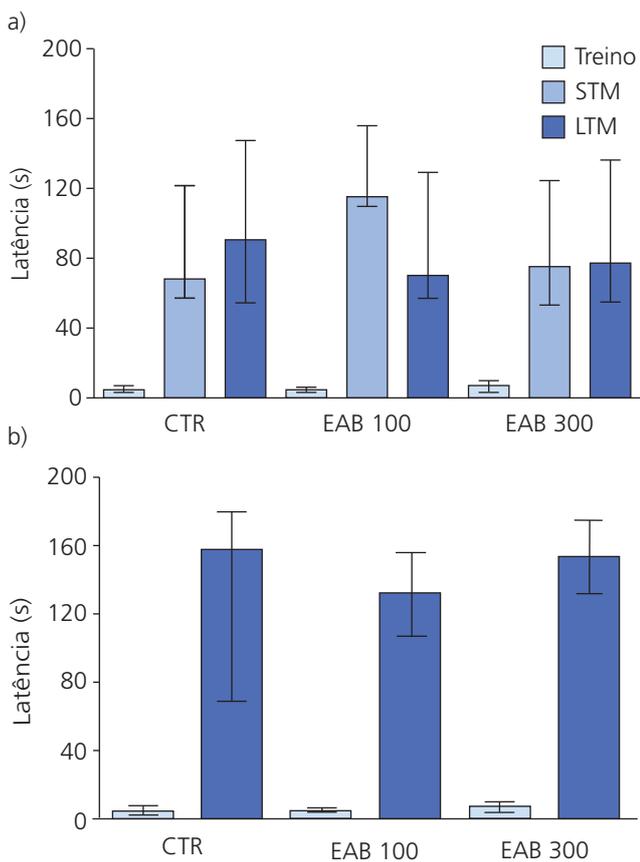


Figura 1. Efeito do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens*, administrado 15 min. pré-treino, na tarefa de esquiwa inibitória. EAB100 (100 mg/Kg); EAB 300 (300 mg/Kg). Valores expressados como mediana e intervalos interquartis. (a) Resultados do tratamento agudo. (b) Resultados do tratamento crônico. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

RESULTADOS

Esquiwa inibitória

Os resultados foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (Figuras 1a e 1b). A latência registrada na sessão de treino para todos os grupos ficou em torno de 7.1 (5.2/9.4) e não foi significativamente diferente entre os mesmos ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis), o que indica que os animais estavam em condições semelhantes para as sessões de teste. Não foram encontradas diferenças significativas nas latências dos animais tratados com o EAB (100 e 300 mg/Kg), em relação ao controle, nos testes de STM e LTM ($p > 0,05$; Figura 1a). Para os animais tratados cronicamente, também não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$; Figura 1b)

Campo aberto

Os resultados dessa tarefa estão mostrados na tabela 1 (média \pm SEM). Animais sob tratamento agudo com o EAB não demonstraram alterações significativas no número de

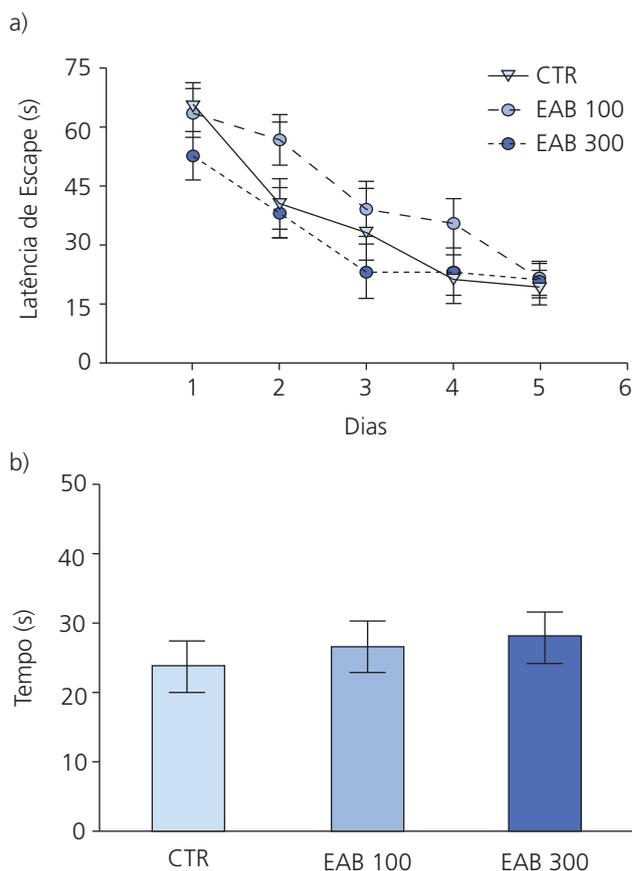


Figura 2. Efeito do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* na tarefa do labirinto aquático. (a) Resultados do tratamento agudo durante o período de treinos, sem administração do EAB. O tempo de latência para encontrar a plataforma reduziu significativamente entre o primeiro e o quinto dias para todos os grupos ($p < 0,05$). (b) Resultados para o teste de evocação com administração do EAB 30min. pré-teste. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$).

cruzamentos e “rearings” quando comparados ao controle. Em contrapartida, o grupo tratado cronicamente com o EAB 300 apresentou uma significativa redução no número de cruzamentos e “rearings” quando comparado ao grupo controle e ao grupo EAB 100 ($p < 0,05$).

Labirinto em Cruz Elevado

Os resultados do total de entradas (braços abertos e fechados), entrada e percentagem de tempo nos braços abertos e “rearings” estão na tabela 2 (média \pm SEM). Animais tratados de forma aguda com ambas as doses de EAB apresentaram uma redução no número de entradas e percentagem de tempo despendido nos braços abertos, o que indica um efeito ansiogênico do extrato sobre os animais. Já o grupo EAB 300 apresentou uma redução também no número total de entradas, o que pode ser interpretado como redução na atividade locomotora (corroborando os resultados encontrados no teste de campo aberto).

Tabela 1. Efeito da administração aguda e crônica do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* na tarefa de campo aberto.

Grupo	Cruzamentos		"Rearings"	
	Agudo	Crônico	Agudo	Crônico
CTR	80,20 ± 6,19	29,60 ± 7,40	40,60 ± 4,02	14,20 ± 4,31
EAB 100	65,70 ± 6,19	21,90 ± 6,67	29,40 ± 4,02	14,50 ± 3,63
EAB 300	63,20 ± 6,19	8,70 ± 3,63* ²	29,10 ± 4,02	6,00 ± 2,60* ²

EAB 100 (100 mg/Kg); EAB 300 (300 mg/Kg). Dados expressados como média ± SEM (n=10 por grupo). *Indica diferença significativa entre os grupos tratados e o controle. ²Indica diferença significativa quando comparado a EAB 100. p < 0,05

Tabela 2. Efeito da administração aguda e crônica do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* na tarefa de labirinto em cruz elevado.

Grupo	Tratamento agudo			
	Entradas totais	Entradas nos braços abertos	Tempo nos braços abertos (%)	"Rearings"
CTR	12,00 ± 1,96	7,80 ± 1,28	47,20 ± 2,55	14,40 ± 1,44
EAB 100	10,00 ± 1,40	3,40 ± 0,72 *	16,03 ± 3,64 *	19,50 ± 2,19
EAB 300	8,80 ± 0,63 *	3,00 ± 0,49 *	17,73 ± 4,67 *	16,40 ± 1,72
Grupo	Tratamento crônico			
	Entradas totais	Entradas nos braços abertos	Tempo nos braços abertos (%)	"Rearings"
CTR	12,60 ± 1,17	6,80 ± 0,97	34,67 ± 3,42	14,00 ± 2,49
EAB 100	8,70 ± 0,63*	3,70 ± 0,45*	19,87 ± 2,89*	14,40 ± 1,61
EAB 300	9,10 ± 1,10*	4,10 ± 0,57*	18,97 ± 3,48*	14,10 ± 1,55

EAB 100 (100 mg/Kg); EAB 300 (300 mg/Kg). Dados expressados como média ± SEM (n=10 por grupo). *Indica diferença significativa entre os grupos tratados e o controle. p < 0,05.

Labirinto Aquático

Na tabela 3, pode-se notar a ausência de diferenças significativas na distância total percorrida quando se compara os grupos tratados com o respectivo controle, tanto para o tratamento agudo, quanto para o crônico. Todavia, pode se perceber que houve uma redução significativa na distância percorrida no primeiro e quinto dias de treinamento (p <

0,05), o que indica que todos os animais aprenderam efetivamente a localizar a plataforma. Além disso, a tabela 3 também mostra que a distância percorrida no teste de retenção foi a mesma para todos os grupos.

A figura 2a mostra os resultados do treinamento dos ratos tratados de forma aguda. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com EAB em relação

Tabela 3. Efeito da administração aguda e crônica do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* na distância total percorrida (em centímetros) no labirinto aquático.

Grupo	Treino (Dia 1)		Treino (Dia 5)	
	Agudo	Crônico	Agudo	Crônico
CTR	1147,90 ± 144,60	1255,99 ± 156,32	154,19 ± 21,55*	265,74 ± 30,18**
EAB 100	1669,64 ± 140,28	1081,46 ± 143,45	211,94 ± 21,55*	210,72 ± 24,64**
EAB 300	1579,86 ± 182,91	1237,84 ± 188,53	206,07 ± 33,58*	205,70 ± 26,47**
Teste de retenção				
Grupo	Agudo	Crônico		
CTR	1108,48 ± 134,54	1785,55 ± 320,02		
EAB 100	1345,69 ± 124,56	1744,41 ± 160,01		
EAB 300	1288,80 ± 124,56	1623,99 ± 202,40		

EAB 100 (100 mg/Kg); EAB 300 (300 mg/Kg). Dados expressados como média ± SEM (n=10 por grupo). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos nas sessões de treino (p > 0,05). *Indica diferença significativa entre os resultados do primeiro e quinto dia, dentro do mesmo tratamento agudo (p < 0,05). ** Indica diferença significativa entre os resultados do primeiro e quinto dia, dentro do mesmo tratamento crônico (p < 0,05).

ao controle dentro do mesmo dia de treinamento ($p > 0,05$), porém todos os grupos apresentaram uma redução na latência para encontrar a plataforma, indicando que o aprendizado da tarefa ocorreu em todos os animais. Também não foram encontradas diferenças no teste de retenção (fig. 2b) dos animais sob tratamento agudo.

Após o tratamento crônico, os animais passaram por um treinamento de reforço no labirinto (figura 3a) e foram novamente submetidos ao teste de retenção. A figura 3b mostra que o tratamento crônico, em ambas as doses de EAB, reduziu significativamente o tempo que os animais passaram no quadrante da plataforma no dia do teste de retenção ($p < 0,05$).

Efeitos neurotóxicos

A figura 4 mostra que os grupos tratados com ambas as doses de EAB, apresentaram um aumento significativo dos escores no Ensaio Cometa (EAB 100 = $135,6 \pm 13,5$; EAB 300 = $158,33 \pm 32,3$) quando comparados ao controle ($46,4 \pm 7,5$).

O mesmo resultado foi encontrado na análise da LPO. O EAB, em ambas as doses, promoveu um aumento significativo nos níveis de lipídios peroxidados (Figure 5), quando comparado aos valores do grupo controle (CTR = $551,3 \pm 78,5$; EAB 100 = $861,1 \pm 161,9$; EAB 300 = $2290,9 \pm 527,6$).

DISCUSSÃO

Brugmansia suaveolens é uma planta alucinógena de significativo interesse devido a sua ampla e histórica utilização em diferentes sociedades ao redor do mundo. Ainda assim, existe uma significativa escassez de informações disponíveis sobre respostas comportamentais e neurotóxicas induzidas pela ingestão de infusões dessa planta.

No presente trabalho, a tarefa de esquiwa inibitória foi utilizada para avaliar a memória de forte componente aversivo. Esse tipo de aprendizagem é modulada pelas vias serotoninérgicas e colinérgicas (BARROS *et al.*, 2001), sendo uma forma clássica de investigação do papel de neurotransmissores nos processos comportamentais (BARROS *et al.*, 2000; BARROS *et al.*, 2003).

A escopolamina, principal alcalóide tropânico encontrado nas porções aéreas de *B. suaveolens* (GRIFFIN & LIN, 2000; SCHENKEL *et al.*, 2004), já foi ligada a problemas de memória de trabalho, bem como das memórias de curta e longa duração (Barros *et al.*, 2001, 2002, 2003). Ainda assim, nossos resultados não demonstram qualquer efeito significativo do EAB sobre a memória aversiva quer seja no tratamento agudo, quer seja no tratamento crônico.

Considerando que o EAB é um extrato bruto, é coerente propor que seja composto por uma mistura de várias

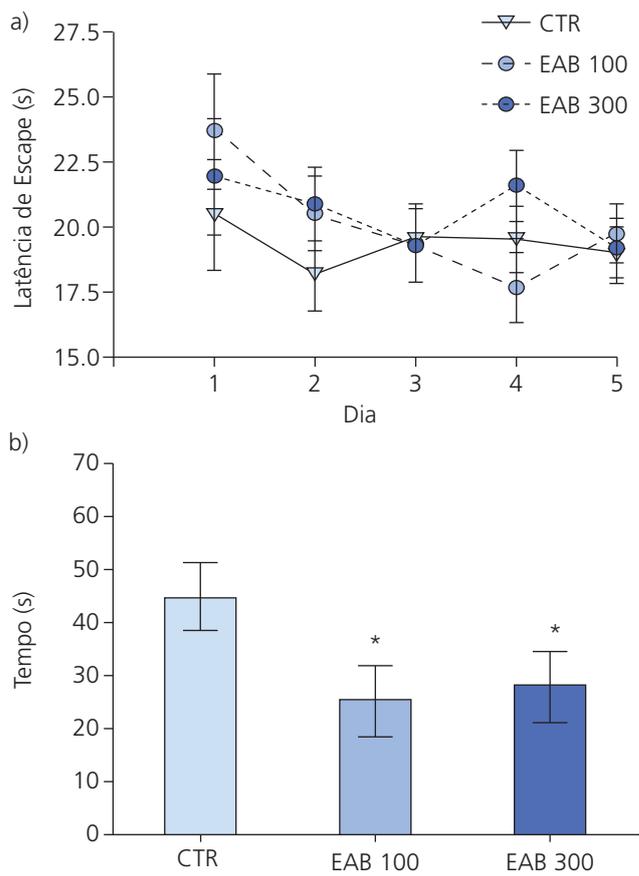


Figura 3. Efeito do extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* na tarefa do labirinto aquático. Resultados do tratamento crônico durante o período de treinos, com administração do EAB 30min. pré-treino. (a) Tempo de latência para encontrar a plataforma. (b) Resultados para o teste de evocação. * Diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

substâncias, algumas das quais já foram descritas em trabalhos prévios como os terpenóides, benzenóides, indol (KITE LEON, 1995) e alcalóides tropânicos (GRIFFIN & LIN, 2000; SCHENKEL *et al.*, 2004). O composto indol, identificado nas flores do gênero *Brugmansia*, é um composto orgânico, aromático, heterocíclico e volátil cujos derivados podem atuar como antagonistas serotoninérgicos (Zhou *et al.*, 2008). Um dos possíveis efeitos dos antagonistas serotoninérgicos é a atenuação dos efeitos amnésicos da escopolamina. Ao estudar os efeitos de antagonistas seletivos de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, Misane e Ögren (2003) mostraram que eles são capazes de reduzir o efeito amnésico induzido pela escopolamina no teste de retenção na tarefa de esquiwa inibitória. Considerando esses fatos, é possível sugerir que a interação dessas diferentes substâncias com importantes receptores que apresentam um papel fundamental no aprendizado de tarefas aversivas poderia resultar em efeitos não esperados como os encontrados no presente trabalho como a ausência de efeito significativo do extrato aquoso sobre as memórias de curto e longo prazo na tarefa de esquiwa inibitória.

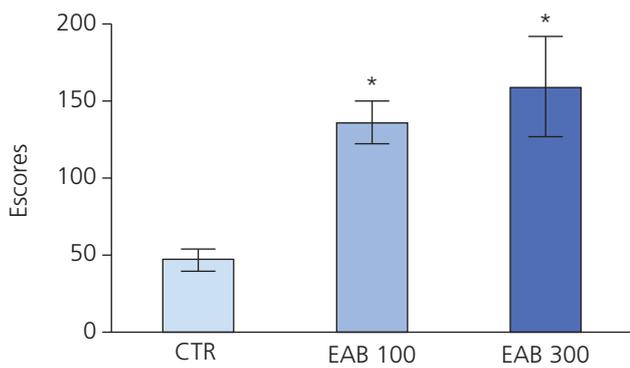


Figura 4. Efeito do tratamento crônico com o extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* sobre o dano em DNA em hipocampo. Valores expressos em média ± SEM. *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Em desacordo com dados de estudos com alcalóides tropânicos purificados (ZAYED & WINK, 2004), o presente trabalho encontrou uma redução significativa na atividade locomotora do grupo crônico EAB 300 no campo aberto. Esse resultado foi corroborado pela redução no número total de entradas verificadas no labirinto em cruz elevado para o mesmo grupo.

Antagonistas muscarínicos, como a escopolamina presente no EAB, possuem um conhecido efeito estimulatório sobre a atividade locomotora, mediado pelo aumento na liberação de acetilcolina (GOMEZA *et al.*, 1999; MIYAKAWA *et al.*, 2001). Entretanto, é importante lembrar que os EAB podem atuar sobre outros tipos de receptores como os dopaminérgicos D1 e D2 (NENCINI *et al.* 2006). A atividade locomotora requer uma ação coordenada de estruturas corticais e subcorticais e, dentre essas estruturas, a pars compacta da substância negra é a maior fonte de estímulos dopaminérgicos ascendentes para o estriado dorsal, cujos neurônios gabaérgicos expressam receptores de dopamina. A parte das diferenças nos mecanismos de transdução do sinal, a contribuição direta ou indireta via projeções estriatopálidais de diferentes receptores dopaminérgicos para a locomoção é geralmente considerada sinérgica e, hipoquinesia ou até mesmo aquinesia podem ser induzidas farmacologicamente por antagonistas de receptores tipo D1 ou tipo D2 (Cabib *et al.*, 1991). É provável que o efeito antagonista exercido pelo EAB sobre receptores dopaminérgicos esteja relacionado ao fato de o mesmo não ser purificado e, sim utilizado em seu estado bruto. Sob essa ótica, pode-se sugerir que as diferenças entre os resultados do presente trabalho e dos dados prévios estão relacionadas às interações entre as diversas substâncias que compõem o extrato aquoso bruto de *B. suaveolens* em comparação com estudos realizados com substâncias purificadas.

Além disso, a ausência de efeito da menor dose (100mg/Kg) reforça a hipótese de que numa mistura de diversas substâncias, nem sempre os efeitos individuais podem ser

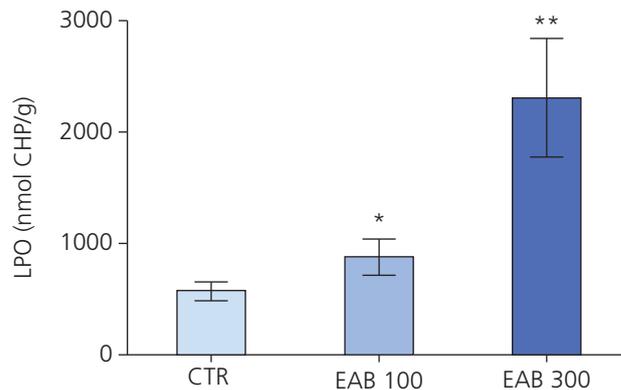


Figura 5. Efeito do tratamento crônico com o extrato aquoso de *Brugmansia suaveolens* sobre a peroxidação lipídica (LPO) em hipocampo. Valores expressos em média ± SEM. *Diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). **Diferença significativa entre os grupos expostos ao EAB ($p < 0,05$).

expressos, sendo necessário o estudo de diferentes valores para estabelecer um perfil mais realístico da atividade farmacológica de extratos botânicos.

Os resultados do teste no labirinto em cruz demonstram que, tanto no protocolo de tratamento agudo quanto no crônico, ambas as doses do EAB reduziram significativamente as entradas nos braços abertos, o tempo de permanência nos braços abertos e, para a dose de 300 mg/Kg, o número total de entradas. Esses resultados claramente sugerem que o EAB possui algum efeito ansiogênico. Vários alcalóides tropânicos, especialmente na escopolamina, já foram apontados como causadores de efeitos amnésicos e também ansiogênicos (File *et al.*, 1990). Considerando que essas substâncias atuam como inibidores muscarínicos (Zayed and Wink, 2004), podem atuar sobre o sistema serotoninérgico (Nencini *et al.*, 2006) e que ambos os sistemas já foram implicados em respostas ansiogênicas (File *et al.*, 2000), a presença de substâncias com atividade colinérgica e serotoninérgicas no EAB poderia justificar os resultados encontrados no presente, bem como em estudos publicados por outros autores.

Além dos parâmetros aversivos, locomotores e relacionados à ansiedade, a memória de referência espacial também foi avaliada. Os animais foram treinados no labirinto aquático e mesmo após um intervalo de 21 dias suas latências permaneceram baixas (figura 3a), o que indica o efetivo aprendizado. Contudo, apenas os animais sob tratamento crônico mostraram uma redução significativa no tempo de permanência no quadrante da plataforma, o que indica um prejuízo da memória como relatado em outros trabalhos (Bertran *et al.*, 2001). É importante ressaltar que é pouco provável que a redução no tempo de permanência na plataforma esteja relacionada a um problema de atividade locomotora, uma vez que as distâncias totais percorridas não foram diferentes entre os grupos. O labirinto aquático é uma tarefa capaz de refletir a aquisição e retenção da

memória de forma praticamente independente do desempenho locomotor do animal. Nessa tarefa a latência para encontrar a plataforma poderia ser influenciada pelas habilidades motoras do animal, porém é mais provável que isso resultasse num aumento ao invés de uma redução no tempo levado para encontrar a plataforma durante os treinos. Além disso, a distância percorrida não é afetada pelas habilidades motoras e sua redução ao longo das sessões de treino reflete quase fielmente os aspectos cognitivos do teste.

Além de seu efeito sobre o comportamento, o extrato aquoso bruto de *Brugmansia suaveolens* também foi capaz de desencadear efeitos neurotóxicos. O hipocampo é uma estrutura classicamente envolvida na atenção e na memória e o estresse oxidativo vem sendo implicado no declínio cognitivo observado no envelhecimento em animais e humanos (Palmer, 1999).

Níveis elevados de LPO no cérebro, associados a alterações comportamentais observadas no presente estudo, relembram alguns cenários clínicos como a demência que também é caracterizada pelos elevados níveis de LPO (Palmer, 1999). Da mesma forma, o cérebro de pacientes com doença de Alzheimer (AD) já foi identificado como mais propenso ao desafio oxidativo (Palmer, 1999). El-Sherbiny e colaboradores (2003) demonstraram que animais tratados com escopolamina apresentaram uma elevação nos subprodutos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído, concomitantemente a uma redução na concentração dos principais antioxidantes como a glutathiona.

Como mencionado na sessão de Introdução, o alcalóide presente em maior concentração em *B. suaveolens* é a escopolamina. O fato de que não somente elevados níveis de LPO, como também de dano de DNA terem sido registrados após o tratamento crônico com o EAB sugere que esse extrato possui o potencial para induzir danos a macromoléculas de importância biológica além das estudadas no presente trabalho, ação essa que pode cedo ou tarde alterar parâmetros comportamentais.

Finalmente, ainda que um nível significativo de dano tenha sido encontrado no hipocampo de animais tratados com EAB, não é possível afirmar que os resultados encontrados se correlacionam diretamente com os resultados das análises comportamentais. Para o labirinto em cruz elevado e para o labirinto aquático, essa relação poderia ser verdadeira, uma vez que os grupos EAB 100 e EAB 300 tratados cronicamente se diferenciaram do grupo controle. Porém, é importante notar que o valor de LPO foi significativamente maior para o grupo EAB 300 e essa diferença entre tratamentos não ficou refletida nos estudos comportamentais, onde os resultados de ambas as doses foram muito similares.

Na tarefa de campo aberto essa relação não pode nem mesmo ser sugerida, uma vez que somente a dose mais alta provocou uma alteração significativa em relação ao grupo

controle. É mais provável que os resultados comportamentais devam ser atribuídos a alterações na neurotransmissão que poderia ou não ser afetadas pelo aumento do estresse oxidativo nas células do hipocampo.

Em uma revisão sobre as interações entre os sistemas serotoninérgicos e colinérgicos no sistema nervoso central, Cassel e Jeltsch (1995) relataram que uma modificação combinada em ambos os sistemas prejudica o desempenho de animais no labirinto aquático somente quando a administração de drogas era feita antes das sessões de treino e que esse efeito não era identificável em ratos treinados sem a administração de drogas. Esses autores também sugeriram que a escopolamina apresenta maior potencial de interferência na memória durante o período de aquisição da informação (ou seja, quando aplicada antes do treino) do que quando aplicada no momento da avaliação da retenção (pré-teste). Considerando esses dados o protocolo agudo adotado no presente trabalho, com administração do AEB após cinco dias consecutivos de treinamento, reforçaria a afirmação de trabalhos prévios uma vez que não foram encontradas diferenças significativas.

Considerando que o extrato aquoso da *B. suaveolens* pode apresentar quantidades significativas do antagonista serotoninérgico indol, um tratamento crônico com esse extrato poderia desencadear uma depleção de dopamina potencializando, assim, os efeitos cognitivos do bloqueio de receptores muscarínicos (pela ação da escopolamina, por exemplo) como o prejuízo à memória (CASSEL & JELTSCH, 1995) semelhante ao encontrado para algumas tarefas no presente trabalho.

CONCLUSÃO

É interessante notar que a administração de drogas pode fomentar interações sinápticas complexas em uma ou várias regiões cerebrais, bem como modificar os sistemas de neurotransmissores. Considerando as propriedades farmacológicas da *Brugmansia suaveolens*, bem como seu efeito alucinógeno, é de grande relevância o esclarecimento de sua ação sobre a memória, o comportamento e a fisiologia do tecido nervoso.

No presente trabalho, o extrato aquoso bruto de *Brugmansia suaveolens* mostrou possuir ação hipoquinésica, bem como ansiogênica e amnésica em ratos, além de promover o estresse oxidativo e a neurotoxicidade. Esses resultados corroboram a hipótese de que os alcalóides tropânicos, principais componentes da *B. suaveolens*, podem afetar a sinalização celular e induzir o dano oxidativo, sugerem que esses compostos podem agir diretamente nos processos cognitivos e na ansiedade e mostra, ainda, ser possível que a interação dos diferentes compostos influencie de forma desigual as várias via de memória, requisitadas nas diferentes tarefas comportamentais.

AGRADECIMENTOS

Daniela Martí Barros e José Maria Monserrat são bolsistas de produtividade do CNPq. Agradecemos ao CNPq, à

CAPES (programa PRODOC) e à FAPERGS pelo apoio financeiro, ao curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada (FURG) pelo apoio logístico e ao Dr. Paulo C. Abreu pelo uso do microscópio de epifluorescência.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, R.B. DE; DICKEL O.E.; CUNHA, R.W. *et al.*. Estradiol valerate and tibolone: Effects on memory. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 85: 689 – 696, 2006
- AGUIAR, R.B. DE; DICKEL O.E.; CUNHA, R.W. *et al.*. Estradiol valerate and tibolone: effects upon brain oxidative stress and blood biochemistry during aging in female rats. *Biogerontology*, 9(5): 285 – 298, 2008.
- BARROS, D.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. & IZQUIERDO I. Pharmacological findings contribute to the understanding of the main physiological mechanisms of memory retrieval. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*, 2: 81-94, 2003.
- BARROS, D.M.; IZQUIERDO, L.A.; MELLO E SOUZA, T.; *et al.*. Molecular signaling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial avoidance learning in rats. *Behavioural Brain Research*, 114: 183-192, 2000.
- BARROS, D.M.; PEREIRA, P.; MEDINA, J.H. & IZQUIERDO, I. Modulation of working memory and long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. *Behavioural Pharmacology*, 13: 163-167, 2002.
- BARROS, D.M.; SOUZA, T.M.E.; DE DAVID, T. *et al.*. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D-1, beta-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behavioural Brain Research*, 124: 1 – 7, 2001.
- BERTRAN, F.; LEHMANN, O. & GALANI, R. *et al.*. Effects of MDL 73005 on water-maze performances and locomotor activity in scopolamine-treated rats. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 68: 647 – 660, 2001.
- CABIB, S.; CASTELLANO, C.; CESTARI, V. *et al.*. D1 and D2 receptor antagonists differently affect cocaine-induced locomotor hyperactivity in the mouse. *Psychopharmacology*, 105: 335 – 339, 1991.
- CAPASSO, A. & DE FEO, V. Central nervous system pharmacological effects of plants from northern Peruvian Andes: *Valeriana adscendens*, *Iresine herbstii* and *Brugmansia arborea*. *Pharmaceutical Biology*, 40: 274 – 293, 2002.
- CASSEL, J-C. & JELTSCH, H. Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: Cognitive implications. *Neuroscience*, 69: 1 – 41, 1995.
- CHIUEH, C.C.; MIYAKE, H. & PENG, M.T. Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanisms involved in MPTP-induced parkinsonism. In: NARABAYASHI, H. (Org.). *Advances in Neurology*, vol. 60. Raven Press, New York, 1993. pp. 251 - 258.
- EL-SHERBINY, D.A.; KHALIFA, A.E.; ATIAM, A.S. & ELDENSHARY, E.E.D. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced amnesic dose of scopolamine. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 76: 525 – 533, 2003.
- FILE, S.E.; MABBUTT, P.S. & TOTH, E. A comparison of the effects of diazepam and scopolamine in two positively reinforced learning tasks. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, 37(4): 587 – 592, 1990.
- GOMEZA, J. ZHANG, L. KOSTENIS, E. *et al.*. Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 10483 – 10488, 1999.
- GRIFFIN, W.J. & LIN, G.D. Chemotaxonomy and geographical distribution of tropane alkaloids. *Phytochemistry*, 53: 623 – 637, 2000.

- HAVELIUS, U. & ASMAN, P. Accidental mydriasis from exposure to Angel's trumpet (*Datura suaveolens*). *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 80: 332 – 335, 2002.
- ISBISTER, G.K.; OAKLEY, P.; DAWSON, A.H. & WHYTE IM. Presumed Angel's trumpet (*Brugmansia*) poisoning: clinical effects and epidemiology. *Emergency Medicine*, 15(4): 376 – 382, 2003.
- KITE, G.C. & LEON, C. Volatile compounds emitted from flowers and leaves of *Brugmansia candida* (Solanaceae). *Phytochemistry*. 40: 1093 – 1095, 1995.
- MIYAKAWA, T.; YAMADA, M.; DUTTARROY, A. & WESS, J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *The Journal of Neuroscience*, 21: 5239 – 5250, 2001.
- MISANE, I. & ÖGREN, S.O. Selective 5-HT1A Antagonists WAY 100635 and NAD-299 Attenuate the Impairment of Passive Avoidance Caused by Scopolamine in the Rat. *Neuropsychopharmacology*, 28: 253 – 264, 2003.
- NENCINI, C.; CAVALLO, F.; BRUNI, G.; et al.. Affinity of *Iresine herbstii* and *Brugmansia arborea* extracts on different cerebral receptors. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 352 – 357, 2006.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. & AKISUE, M.K. Farmacognosia. Atheneu Editora: Rio Janeiro. 1991; 95 p.
- OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P. & COSTA, F.B. Plantas tóxicas. Conhecimento e prevenção de acidentes. Editora Holos, Ribeirão Preto. 2003, pp. 34 - 37.
- PALMER, A.M. The activity of the pentose phosphate pathway is increased in response to oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 106: 317 – 328, 1999.
- PERRY, G.; TADDEO, M.A.; NUNOMURA, A. et al.. Comparative biology and pathology of oxidative stress in Alzheimer and other neurodegenerative diseases: beyond damage and response. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 133: 507 – 513, 2002.
- SCHENKEL, E.P.; ZANINNIN, M.; MENTZ, L.A.; et al.. Plantas tóxicas. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.) et al.. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004.
- TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. et al.. Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206 – 221, 2000.
- ZAYED, R. & WINK, M. Induction of Tropane Alkaloid Formation in Transformed Root Cultures of *Brugmansia suaveolens* (Solanaceae). *Zeitschrift für Naturforschung*, 59: 863 – 867, 2004.
- ZHOU, D.; ZHOUA, P.; EVRARDA, D.A. et al.. Studies toward the discovery of the next generation of antidepressants. Part 6: Dual 5-HT1A receptor and serotonin transporter affinity within a class of arylpiperazinyl-cyclohexyl indole derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 6707 – 6723, 2008.

Recebido em: 31/05/2010

Revisado em: 30/03/2010, 23/11/2010 e 24/01/2010

Aceito em: 10/02/2010

Correspondência:

Dra. Daniela Martí Barros
Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada
Av. Itália, km 8, s/nº
Cx. Postal, 474
CEP 96201-900 Rio Grande – RS – Brazil
Telefone/Fax: 53 32336848
53 32336850
E-mail: barrosdm@yahoo.com.br