

**Estudo do potencial efeito neuroprotetor do extrato
etanólico obtido da planta medicinal *Combretum
leprosum* em modelo murino da doença de
Parkinson**

Lívia Silveira de Moraes

Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Farmacologia

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, julho de 2014

LÍVIA SILVEIRA DE MORAES

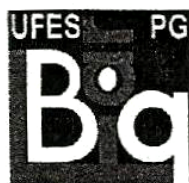
**Estudo do potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico e do
triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno obtidos da planta
medicinal *Combretum leprosum* em modelo murino da doença de
Parkinson**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do
Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau
de Mestre em Bioquímica e Farmacologia

Orientador: Prof.^a Dra. Cristina Martins e Silva

Co-orientador: Prof.^a Dra. Rita Gomes Wanderley Pires

Vitória, Julho de 2014



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA**

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos trinta e um dias do mês de julho de dois mil e quatorze, os membros da banca examinadora, Profa. Dra. Cristina Martins e Silva, orientadora, Profa. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires e o Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos reuniram-se para apreciação da dissertação de mestrado intitulada "Estudo do potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico obtido da planta medicinal *Combretum leprosum* em modelo murino da doença de Parkinson", de autoria da candidata Livia Silveira de Moraes, aluno do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, o(a) candidato(a) foi aprovada pela Comissão Examinadora. Foi concedido um prazo de noventa dias, para o(a) candidato(a) efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, em quatro vias impressas e uma digital, sob pena de não expedição do Diploma. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão.

Profa. Dra. Cristina Martins e Silva (UFES) - Orientadora

Profa. Dra. Rita Gomes Wanderley Pires (UFES) - Membro interno

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC) - Membro externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M827e Moraes, Livia Silveira de, 1989-
Estudo do potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico obtido da planta medicinal Combretum leprosum em modelo murino da doença de Parkinson / Livia Silveira de Moraes – 2014.
84 f. : il.

Orientador: Cristina Martins e Silva.
Coorientador: Rita Gomes Wanderley Pires.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Medicamentos fitoterápicos. 2. Fármacos Neuroprotetores.
3. Doença de Parkinson. I. Martins e Silva, Cristina. II. Pires, Rita Gomes Wanderley. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental do Departamento de Fisiologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio das seguintes instituições:

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)**
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me consolar, me ajudar e por ser minha companhia. Agradeço-te por saber que Tu cuidas de mim;

Aos meus pais e minha irmã Aline, por toda confiança, apoio e compreensão a mim dados para a realização deste mestrado, devo-lhes muito!

À minha orientadora, professora Cristina Martins e Silva, pela paciência, ensinamentos e por confiar em mim e no meu trabalho;

À minha co-orientadora, professora Rita Gomes Wanderley Pires, pela dedicação e ensinamentos;

Ao prof. Adair Roberto Soares, pela colaboração e por tornar este trabalho possível com o fornecimento do extrato;

Ao Willyan, pelo apoio incondicional, compreensão e paciência, além de inúmeras vezes me ajudar nos experimentos após sua entrada no LNMC. Te amo;

Aos companheiros do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC): Tassiane, Tamara, Lorena, Filipe, Bruna, Isabela, Agihane, Camila e Sâmia, por estarem sempre dispostas a ajudar e pelos bons momentos convividos;

Ao professor Alexandre Santos e Evaldo Pereira, pela imensa contribuição para a realização das análises por HPLC;

Ao Laboratório de Análise Biomolecular (LABIOM) e ao Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI);

Ao Laboratório de Neuromorfologia (Prof. Nyam, Viviane e Luciene), pelos valiosos ensinamentos;

E, finalmente, a todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram e incentivaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Doença de Parkinson	13
1.2 Características fisiopatológicas da doença de Parkinson.....	14
1.3 Núcleos da base e a doença de Parkinson	15
1.4 Etiologia da doença de Parkinson	19
1.5 Modelos experimentais da doença de Parkinson	21
1.5.1 Modelo parkinsoniano induzido pela toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP)	22
1.7 Tratamento farmacológico da doença de Parkinson	24
1.8 Novas estratégias farmacológicas para a doença de Parkinson: investigação do efeito neuroprotetor da planta medicinal <i>Combretum leprosum</i>	25
2 JUSTIFICATIVA	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivo geral:	32
3.2 Objetivos específicos:.....	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Animais.....	34
4.2 Desenvolvimento do modelo animal de doença de Parkinson e desenho experimental.....	34
4.3 Extrato etanólico (EE) de <i>C. leprosum</i>	35
4.4 Testes comportamentais	36
4.4.1 Avaliação da atividade locomotora	36
4.4.2 Teste de resistência de agarre (<i>wire hang</i>)	37
4.4.3 Teste de força de agarre (<i>grip test</i>)	37
4.4.4 Teste de escalada em haste vertical (<i>pole test</i>)	38
4.5 Dosagem dos níveis estriatais de DA e metabólitos por HPLC	39

4.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)	40
4.6.1 Extração de RNA total	41
4.6.2 Síntese de cDNA.....	42
4.6.3 Reação de PCR em tempo real.....	42
4.7 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS	45
5.1 Testes comportamentais	45
5.1.1 Atividade locomotora	45
5.1.2 Teste de resistência de agarre (<i>Wire hang</i>)	46
5.1.3 Teste de força de agarre (<i>Grip test</i>)	47
5.1.4 Teste de escalada em haste vertical (<i>Pole test</i>).....	48
5.2 Dosagem dos níveis estriatais de dopamina e metabólitos por HPLC	49
5.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	51
5.3.1 Análise da expressão gênica de componentes do sistema dopaminérgico na região mesencefálica.....	52
5.3.2 Análise de componentes do sistema dopaminérgico na região do estriado	54
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÕES	69
8 REFERÊNCIAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Secção horizontal do mesencéfalo

Figura 2: Circuito motor dos núcleos da base

Figura 3: Síntese e metabolismo da DA

Figura 4: Mecanismo de ação do MPTP

Figura 5: Partes aéreas de *Combretum leprosum*

Figura 6: Desenho experimental

Figura 7: Avaliação da atividade locomotora

Figura 8: Teste de resistência de agarre (*wire hang*)

Figura 9: Teste de força de agarre (*grip test*)

Figura 10: Teste da escalada em haste vertical (*pole test*)

Figura 11: Delimitação da região mesencefálica dissecada

Figura 12: Efeito do tratamento com EE na atividade locomotora

Figura 13: Efeito do tratamento com EE no *wire hang*

Figura 14: Efeito do tratamento com EE no *grip test*

Figura 15: Efeito do tratamento com EE no *pole test*

Figura 16: Efeito do tratamento com EE nos níveis estriatais de DA

Figura 17: Efeito do tratamento com EE nos níveis de DOPAC e HVA estriatais

Figura 18: Efeito do tratamento com EE no metabolismo estriatal da DA

Figura 19: Efeito do tratamento com EE na expressão do gene TH na região mesencefálica

Figura 20: Efeito do tratamento com EE na expressão do gene DAT na região mesencefálica

Figura 21: Efeito do tratamento com EE na expressão dos genes para os receptores D₁ e D₂ na região mesencefálica

Figura 22: Efeito do tratamento com EE na expressão do gene TH no estriado

Figura 23: Efeito do tratamento com EE na expressão dos genes para os receptores D₁ e D₂ no estriado

LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA Ácido desoxirribonucléico complementar
DA Dopamina
DAT Transportador de dopamina
DOPAC Ácido dihidroxifenilacético
DP Doença de Parkinson
EE Extrato etanólico
ERO's Espécies reativas de oxigênio
E+M Extrato + MPTP
E+S Extrato + salina
GPe Globo pálido externo
GPi Globo pálido interno
HVA Ácido homovanílico
MAO Monoamino oxidase
MPP⁺ 1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP 1-metil-4-fenil-1,2,3, 6-tetraidropiridina
qPCR Reação em cadeia da polimerase quantitativa
SNpc Substância negra *pars compacta*
SNpr Substância negra *pars reticulata*
STN Núcleo subtalâmico
TH Tirosina hidroxilase
TTHL 3 β ,6 β ,16 β -triidroxilup-20(29)-eno
V+M Veículo + MPTP
V+S Veículo + salina
VTA Área tegmental ventral

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo causado pela perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*, que afeta cerca de 1% das pessoas a partir dos 70 anos. Atualmente, o tratamento principal baseia-se na reposição dos níveis de dopamina (DA) com a administração de levodopa, que ameniza principalmente os distúrbios motores. Outros fármacos, como agonistas dopaminérgicos, são hoje utilizados concomitantemente à levopoda, mas ainda não são efetivos e não previnem o avanço da doença, além de desencadear diversos efeitos colaterais. Diante disso, existem esforços voltados para a descoberta e identificação de novas moléculas com atividade neuroprotetora, de origem natural, principalmente da biodiversidade da flora brasileira. A planta *Combretum leprosum* apresenta potencial medicinal vasto com amplo espectro de ação biológica, tais como anti-inflamatória, analgésica, anti-epilética, entre outras, porém, seu mecanismo de ação e seus efeitos neuroprotetores ainda não foram completamente elucidados. Neste estudo, exploramos o potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico (EE) de *C. leprosum* em um modelo murino da DP, utilizando a neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) i.p. na dose de 30 mg/Kg durante 5 dias consecutivos. Foi observada hiperlocomoção exacerbada após a injeção de anfetamina (2 mg/Kg) no grupo tratado com MPTP, efeito este prevenido pelo pré-tratamento com o EE na dose de 100 mg/Kg. O déficit de força muscular induzido pelo MPTP foi também prevenido pelo pré-tratamento oral com *C. leprosum*. No contexto bioquímico, o tratamento com EE não foi capaz de prevenir a depleção dopaminérgica induzida pelo MPTP no estriado. Mas, interessante, nossos dados sugerem que o tratamento com EE pode prevenir a depleção induzida pelo MPTP dos metabólitos dopaminérgicos, o ácido homovanílico (HVA) e o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), nesta mesma região. Adicionalmente, o tratamento com EE preveniu as alterações no metabolismo da DA induzidas pelo MPTP. No que tange a parte molecular, o tratamento com EE foi capaz de elevar a expressão do gene da tirosina hidroxilase (TH) na região mesencefálica dos animais. Embora exista tendência de que as diminuídas expressões do transportador de dopamina (DAT) e do receptor dopaminérgico D₂ nesta região causada pelo MPTP possam ser prevenidas pelo tratamento com EE, esse dado não foi estatisticamente significativo. Já no estriado, a expressão dos genes da TH, D₁ e D₂ não diferiu entre os grupos estudados. Nossos resultados evidenciam que o tratamento com o EE na dose de 100 mg/Kg previne alterações motoras e moleculares desencadeadas pelo MPTP, entretanto parcialmente revertendo as alterações bioquímicas. Dessa forma, nosso estudo evidencia um potencial terapêutico da *Combretum leprosum* na prevenção e tratamento da DP.

Palavras chave: *Combretum leprosum*; Medicamentos fitoterápicos; Neuroproteção; Doença de Parkinson

ABSTRACT

The Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disturbance caused by neuronal loss of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, affecting by 1% in people >70 years of age. Currently, the main treatment is based on the replacement of the dopamine levels (DA) with administration of levodopa, which mitigates especially the motor impairment. Other drugs, such as dopamine agonists, are now used concomitantly with levodopa but they are not effective and do not prevent disease progression, besides triggering several side effects. Thus, there are efforts focused on the discovery and identification of new molecules with neuroprotective activity of natural origin, especially of the biodiversity of flora. The plant *Combretum leprosum* has vast medicinal potential with a wide spectrum of biological action, such as anti-inflammatory, analgesic, antiepileptic, among others, but its mechanism of action and its neuroprotective effects have not been fully elucidated. In this study, we explored the potential neuroprotective effect of ethanol extract (EE) of *C. leprosum* in a murine model of PD, using the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) i.p. at a dose of 30 mg/kg for 5 consecutive days. Exacerbated hyperlocomotion was observed after injection of amphetamine (2 mg/kg) in the group treated with MPTP, an effect prevented by pretreatment with EE at a dose of 100 mg/kg. The deficit in muscle strength induced by MPTP was also prevented by pretreatment with *C. leprosum*. In biochemical context, treatment with EE was not able to prevent MPTP-induced dopamine depletion in the striatum. However, interestingly, our data suggest that treatment with EE can prevent depletion of dopamine metabolites, homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), in the same region. In addition, treatment with EE prevented the alterations in the metabolism of MPTP-induced DA. Regarding the molecular part, treatment with EE was able to increase the expression of tyrosine hydroxylase (TH) gene in the midbrain region of the animals. Although there is a clear tendency that the lower expression of the dopamine transporter (DAT) and the dopamine D₂ receptor in this region caused by MPTP can be prevented by treatment with EE, this finding was not statistically significant. In the striatum, the expression of genes TH, D₁ and D₂ did not differ between groups. Our results show that treatment with EE at a dose of 100 mg/kg prevents motor and molecular alterations induced by MPTP, however partially reversing the biochemical changes. Accordingly, our study demonstrates the therapeutic potential *Combretum leprosum* in the prevention and treatment of PD.

Keywords: *Combretum leprosum*; phytotherapeutic medicine; neuroprotection; Parkinson's disease

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na população mundial (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013), e foi originalmente descrita em 1817 pelo médico inglês James Parkinson em seu trabalho intitulado “Essay on the Shaking Palsy” (Parkinson, 1817, republicado em 2002). Além desta referência, nenhum outro médico de país ocidental descreveu previamente o complexo de sintomas dessa desordem. Para Pan-Montojo et al. (2014), a prevalência da doença no início do século 19 era extremamente baixa, e um aumento dramático dos casos de DP ocorreu em paralelo à revolução industrial.

A incidência da DP varia amplamente no mundo, abrangendo entre 1.5 a 22 casos por 100.000 pessoas (WIRDEFELDT et al., 2011). A DP apresenta distribuição universal e atinge todos os grupos étnicos e classes socioeconômicas, sendo que sua incidência e prevalência aumentam com a idade (KANDEL; SQUIRE, 2003). Estudos restritos à população idosa (acima de 55 ou 65 anos) reportaram taxas de incidência entre 410 a 529 casos por 100.000 pessoas (BENITO-LEON et al., 2004; DE LAU et al., 2004). No Brasil, a doença afeta 3.3% dos indivíduos acima de 64 anos de idade (BARBOSA et al., 2006).

O diagnóstico da DP é clínico, e se baseia na presença dos sinais cardinais: tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural (PEZZOLI; ZINI, 2010; DE LAU; BRETELER, 2006; DORSEY et al., 2007). Embora a DP seja diagnosticada classicamente pelo início insidioso dessas manifestações motoras, o conceito de doença de Parkinson pré-motora tem se tornado cada vez mais aceito (LANGSTON, 2006; HAWKES, 2008). Há evidências crescentes de que a disfunção olfativa, alterações do sono, a denervação simpática cardíaca, constipação, depressão e dor podem ocorrer anteriormente ao início dos sinais motores da DP (O'SULLIVAN, 2008).

1.2 Características fisiopatológicas da doença de Parkinson

A DP é patologicamente definida pela degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) (OLANOW et al., 2009) (Figura 1). Tal perda neuronal leva a redução do conteúdo de DA em sua principal eferência, o estriado (JÁIDAR et al., 2010), sendo esta associada aos déficits motores da DP. Em humanos, os sintomas não aparecem antes que ocorra a morte de 50-60% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc e uma depleção de aproximadamente 80-85% do conteúdo de DA estriatal (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Isto acontece porque, em uma fase inicial do processo de degeneração neuronal, ocorre um fenômeno compensatório estriatal, em que há um aumento na atividade neuronal e/ou uma maior sensibilidade dos receptores dopaminérgicos (BLUM et al., 2001).



Figura 1: Secção horizontal do mesencéfalo. Paciente controle (esquerda) e paciente com DP (direita), mostrando a perda da pigmentação da SNpc na DP.

FONTE:

A DP também é caracterizada pela presença de agregados altamente insolúveis das proteínas α -sinucleína, parkina e ubiquitina, chamados corpos de Lewy e neuritos de Lewy, que se acumulam no citoplasma neuronal ou em processos neuríticos, respectivamente (BLANDINI et al., 2000; ELBAZ; TRANCHANT, 2007; HAGAN et al., 1997; KORCZYN, 1995). Estas estruturas não são específicas para a DP, podendo ser encontradas na doença de Alzheimer, na demência com corpos de Lewy e ocasionalmente em pessoas saudáveis de idade avançada (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Estas inclusões são amplamente distribuídas no sistema nervoso central, sendo associadas à morte neuronal

(WAKABAYASHI et al. 2007), além de também serem observadas no sistema nervoso periférico de pacientes com a doença (BLUM et al., 2001). O parkinsonismo, termo utilizado para designar a presença dos sinais e sintomas de tremor, bradicinesia, rigidez muscular e instabilidade postural, pode ocorrer na ausência de corpos de Lewy, como nos casos de DP familiar ou em parkinsonismo induzido por drogas (DAVIS et al., 1979; LANGSTON et al., 1999; NUYTEMANS et al., 2010).

A disfunção dopaminérgica é a principal característica fisiopatológica da DP, e é responsável pela geração dos sintomas motores da doença. Esta disfunção envolve a via nigroestriatal, componente dos núcleos da base. Estes núcleos são responsáveis pelo controle da atividade motora por meio da regulação de impulsos neuromotores, auxiliando o planejamento e a execução de movimentos sequenciados, como a marcha (FREUND, 2002).

1.3 Núcleos da base e a doença de Parkinson

Os núcleos da base são um conjunto de neurônios constituído por: estriado (núcleo caudado e putâmen), globo pálido interno (GPi) e externo (GPe), núcleo subtalâmico (STN) e substância negra *pars compacta* (SNpc) e substância negra *pars reticulata* (SNpr) (NICHOLSON; PEREIRA; HALL, 2002) (Figura 2). Esses núcleos funcionam como um sistema colateral modulador, que regula o fluxo das informações provenientes do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinal (GOODMAN; GILMAN, 2012). A DA liberada pelos neurônios da SNpc no estriado exerce um papel crucial na coordenação da atividade dos núcleos da base (GRAYBIEL, 2005). O estriado também recebe inervação glutamatérgica excitatória de várias áreas do cérebro. A maioria dos corpos neuronais presentes no estriado são GABAérgicos e inervam os demais núcleos da base. Uma menor parte desses neurônios são interneurônios que têm como neurotransmissores a acetilcolina e a substância P (GOODMAN; GILMAN, 2012).

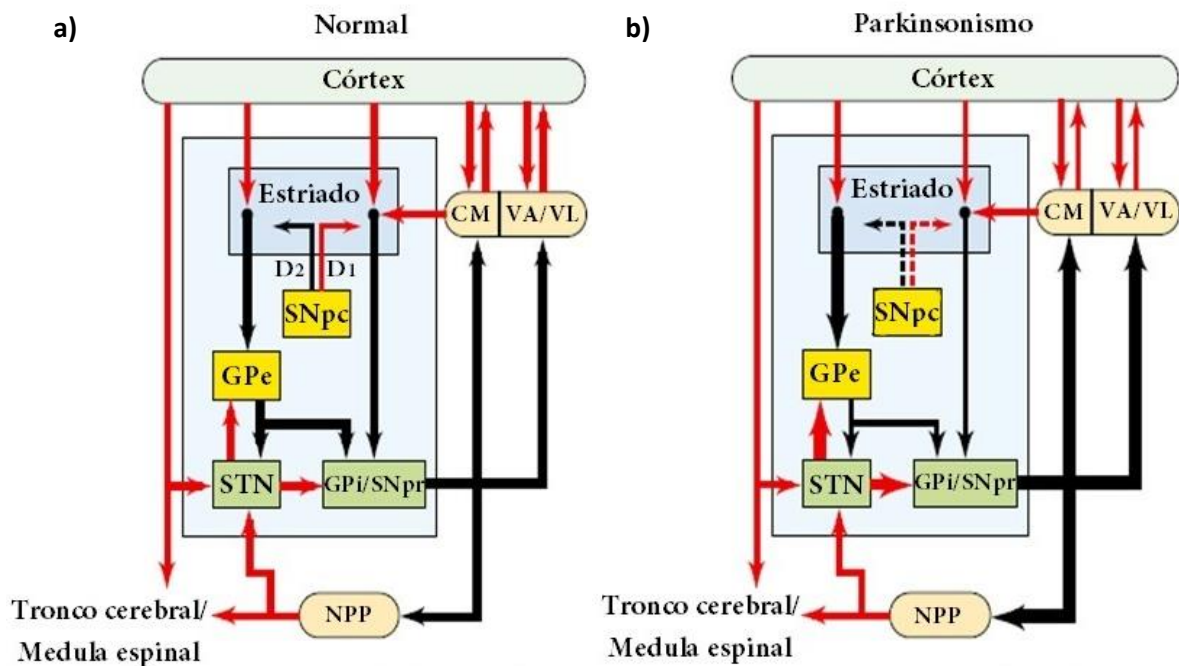


Figura 2: Circuito motor dos núcleos da base. Os núcleos da base regulam o fluxo das informações provenientes do córtex cerebral para os neurônios motores da medula espinal. A DA liberada pelos neurônios da SNpc no estriado exerce papel crucial na coordenação da atividade dos núcleos da base, através dos receptores D₁ e D₂. A inervação eferente do estriado estende-se ao longo de duas vias: a via direta, formada pelas projeções do estriado para o GPI e SNpr; e a via indireta, composta pelas projeções do estriado para o GPe, que por sua vez se projetam para o núcleo subtalâmico, gerando estímulos eferentes para o GPI e SNpr. Os estímulos dos gânglios da base fazem eferência para o tálamo (CM, VA e VL), que por sua vez gera estímulos excitatórios para o córtex. Na DP, devido a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, ocorre um predomínio da ativação da via indireta, resultando nos distúrbios motores clássicos da doença. Em a) o funcionamento em indivíduos normais, em b) funcionamento em indivíduos com DP. SNpc = substância negra *pars compacta*; SNpr = substância negra *pars reticulata*; GPe = globo pálido externo; GPI = globo pálido interno; STN = núcleo subtalâmico; NPP = núcleo pedunculopontino; CM, VA e VL = núcleos talâmicos: centro-mediano, ventral anterior e ventral lateral, respectivamente. Setas vermelhas: projeções excitatórias (glutamatérgicas); setas pretas: projeções inibitórias (GABAérgicas).

FONTE: MODIFICADO DE WICHMANN E DELONG, 1999.

A inervação eferente do estriado estende-se ao longo de dois trajetos diferentes, conhecidos como vias direta e indireta. A via direta é formada pelos neurônios estriatais que se projetam para o GPI e SNpr, resultando em uma menor inibição do tálamo e conseqüente aumento da atividade tálamo-cortical, que facilita o movimento. A via indireta é composta pelos neurônios estriatais que se projetam

para o GPe, que por sua vez se projetam para o núcleo subtalâmico, gerando estímulos eferentes para o GPi e SNpr, levando à redução da saída dos estímulos excitatórios do tálamo para o córtex cerebral, inibindo o movimento (GOODMAN; GILMAN, 2012).

A DA é sintetizada pelos neurônios dopaminérgicos pela hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA pela enzima tirosina hidroxilase (Figura 3). O composto L-DOPA sofre descarboxilação pela ação da DA descarboxilase formando DA, que é então estocada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2). Em resposta a um potencial de ação, a DA é liberada na fenda sináptica e liga-se a seus receptores pós e pré-sinápticos. A ação desse neurotransmissor é terminada pela recaptação ativa pelo transportador de dopamina (DAT) e a DA pode seguir então dois caminhos: ser novamente estocada em vesículas sinápticas ou ser degradada enzimaticamente. Os neurônios dopaminérgicos degradam a DA em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) pela ação da monoamina oxidase (MAO). O metabólito DOPAC difunde-se para fora das células dopaminérgicas onde pode ser convertido a ácido homovanílico (HVA) pela enzima catecol metiltransferase (COMT). Concomitantemente, parte da DA não recaptada é degradada por outras células, como as células da glia, que convertem o neurotransmissor em 3-metoxitiramina (3-MT) e este metabólito é oxidado pela MAO para formar HVA (ZABORSZKY; VADASZ, 2001).

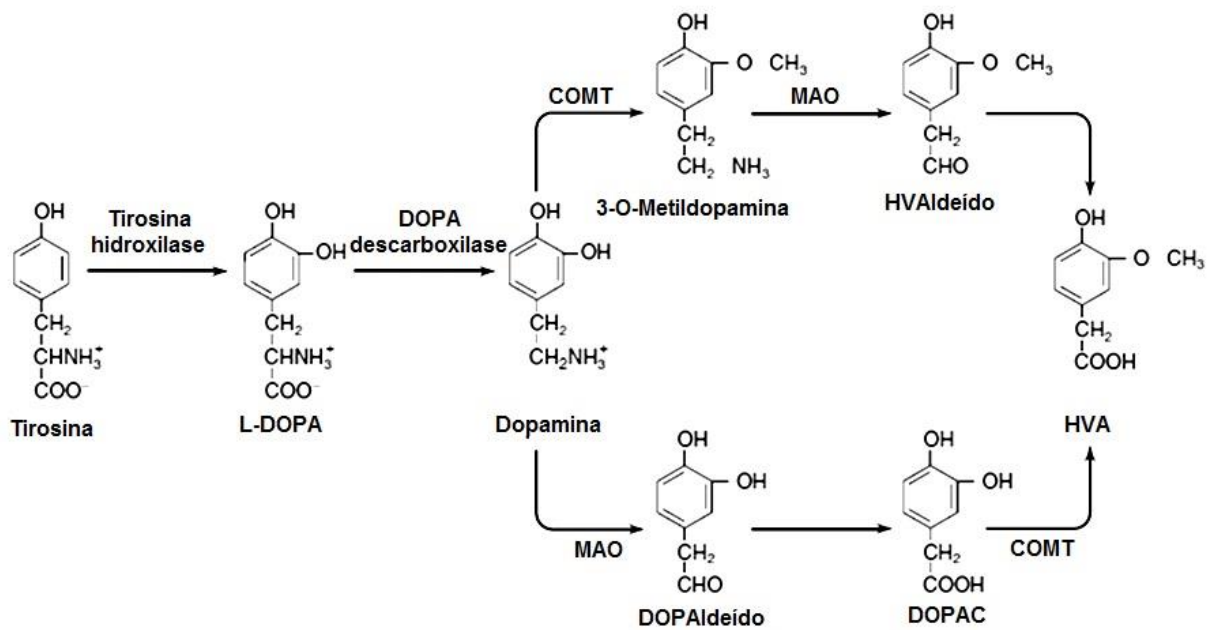


Figura 3: Síntese e metabolismo da DA. A DA é sintetizada pelos neurônios dopaminérgicos pela hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA pela enzima tirosina hidroxilase. O composto L-DOPA sofre descarboxilação pela ação da dopamina descarboxilase, formando DA. Os neurônios dopaminérgicos degradam a DA em ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) pela ação da monoamina oxidase (MAO). O metabólito DOPAC difunde-se para fora das células dopaminérgicas, podendo ser convertido a ácido homovanílico (HVA) pela enzima catecol metiltransferase (COMT). A DA que não foi recaptada é degradada por células da glia, que a convertem em 3-metoxitiramina (3-MT), que é posteriormente oxidado pela MAO para formar HVA.

A DA exerce um efeito diferenciado nas vias direta e indireta dos núcleos da base (GERFEN et al., 1990). A sinalização da DA é mediada por cinco receptores acoplados à proteína G (D_1 - D_5). Estes receptores são agrupados em 2 classes, baseado na proteína G à qual eles se acoplam: D_1 e D_5 (receptores *D₁-like*) estimulam as proteínas $G_{s/olf}$, enquanto D_2 , D_3 e D_4 (receptores *D₂-like*) estimulam G_0 e G_i (NEVE et al., 2004). Todos os cinco receptores são expressos no estriado, mas D_1 e D_2 são os mais abundantes (GERFEN; SUMEIER, 2011). Os neurônios estriatais que originam a via direta expressam principalmente o receptor excitatório D_1 , enquanto os que constituem a via indireta expressam predominantemente o receptor inibitório D_2 (Figura 2). O funcionamento normal da substância negra favorece a atividade da via direta, que deve ser facilitada para o córtex motor

suplementar que se torna ativo antes e durante os movimentos. A morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc na DP e a consequente ativação reduzida dos receptores dopaminérgicos no estriado geram alterações na atividade das vias, levando ao predomínio da via indireta. Ocorre, então, um aumento da atividade neuronal do GPi e SNpr, culminando com uma inibição excessiva do sistema tálamo-cortical. Além disso, essa redução na atividade dopaminérgica desencadeia a diminuição da atividade neuronal do GPe e desinibição do núcleo subtalâmico, que também resulta em inibição tálamo-cortical. Esta excessiva inibição do tálamo resulta em supressão do sistema cortical motor, gerando manifestações clínicas como acinesia, rigidez e tremor, enquanto que acometimentos axiais podem contribuir para as irregularidades de postura e marcha, devido às lesões de neurônios não dopaminérgicos como os serotoninérgicos e noradrenérgicos (NICHOLSON; PEREIRA; HALL, 2002).

1.4 Etiologia da doença de Parkinson

A etiologia da DP esporádica é ainda pouco conhecida, mas admite-se que vários fatores independentes contribuam para o seu surgimento. Vários estudos afirmam que a DP possa ser desencadeada pelo envelhecimento, associado à disfunção mitocondrial e uma reduzida resposta ao estresse oxidativo, além da interação entre fatores ambientais e genéticos (PAN-MONTOJO et al., 2014).

A DP foi considerada por muito tempo uma doença não genética de origem esporádica, até a identificação, em 1997, de uma mutação no gene da alfa-sinucleína, que foi associada ao fenótipo de pacientes com DP (POLYMERPOULOS et al., 1997). Posteriormente, a descoberta de que a proteína alfa-sinucleína é o principal componente dos corpos de Lewy implicou na correlação deste gene à patofisiologia da DP (SPILLANTINI et al., 1997). Porém, o envolvimento de fatores genéticos no desenvolvimento da DP somente foi bem estabelecido após a identificação de pelo menos seis genes relacionados à doença: PINK1, PARK2, SNCA, LRRK2, PARK7 e ATP13A2 (CROSIERS et al. 2011; SUNDAL et al. 2012). Tem sido demonstrado que esses genes também desempenham um papel na forma esporádica da DP (LESAGE; BRICE, 2012). Além

disso, muitas anormalidades celulares presentes na forma esporádica, tais como disfunção mitocondrial e lisossomal, estresse oxidativo, excitotoxicidade, disfunção proteossomal, neuroinflamação e agregação proteica também estão associadas com mutações nos genes da DP familiar (YACOUBIAN; STANDAERT, 2009).

O dano oxidativo é muito frequente em desordens neurodegenerativas, incluindo a DP. O envolvimento do estresse oxidativo na DP é apoiado pela análise *post mortem* de cérebros de pacientes com a doença, que envolveu a avaliação de vários parâmetros, tais como oxidação do DNA e de proteínas, peroxidação lipídica e decréscimo dos níveis de glutathione reduzida (JENNER, 1998). Além disso, o sistema nervoso central é caracterizado por possuir órgãos com alta demanda energética; por isso, o persistente estresse oxidativo é um fator proeminente na patogênese da DP (CICCONE et al., 2013). Mais especificamente, a alta concentração de DA na via nigroestriatal é presumida ser essencial para a alta vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos ao estresse oxidativo. A DA, por si só, não exerce efeitos tóxicos diretos (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002), mas intermediários tóxicos derivados do seu catabolismo, como o peróxido de hidrogênio e quinonas reativas, podem contribuir para a facilitação dos mecanismos relacionados às vias patogênicas do estresse oxidativo na DP (JENNER, 2003; ANDERSEN, 2004). Neurônios dopaminérgicos mesencefálicos são também mais sensíveis ao estresse oxidativo devido à menor reserva mitocondrial comparada a outras populações neuronais (FENG; MAGUIRE-ZEISS, 2010).

Além da dopamina, outros neurotransmissores têm papel fundamental no funcionamento dos circuitos motores dos núcleos da base, como o ácido γ -aminobutírico (GABA), acetilcolina, substância P, glutamato, entre outros. O glutamato tem sido associado tanto à gênese da DP quanto à sua progressão (BLANDINI et al. 1996). Aventa-se que o disparo anormalmente elevado dos neurônios glutamatérgicos do STN na DP, que ocorre devido a maior atividade da via indireta, também pode contribuir para a geração dos sintomas motores, através do aumento da liberação de glutamato nas regiões de saída dos núcleos da base (GPi e SNpr) (HIRSCH et al., 2000; OBESO et al 2008). Apesar de o STN inervar preferencialmente a *pars reticulata* da substância negra, neurônios dopaminérgicos da *pars compacta* que contém receptores glutamatérgicos também recebem

moderada estimulação do STN (KITA; KITAI, 1987; CHATHA et al., 2000). Os efeitos dos glutamato na substância negra são mediados através dos receptores glutamatérgicos: N-metil-d-aspartato (NMDA), amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato, além de receptores metabotrópicos (CHOI, 1988; CHATHA et al., 2000). Estudos vêm demonstrando que os neurônios dopaminérgicos mesencefálicos são mais vulneráveis à excitotoxicidade glutamatérgica. A morte desses neurônios em culturas primárias foi proeminente em concentrações de glutamato a partir de 100 μ M, enquanto esse efeito tóxico somente afetou os neurônios não dopaminérgicos em concentrações superiores a 300 μ M. Interessantemente, a utilização de MK801, um antagonista de receptor NMDA, preveniu consideravelmente a morte de neurônios dopaminérgicos pelo glutamato e a morte foi completamente abolida quando o cálcio extracelular foi quelado por EGTA (ácido etilenoglicol tetracético) (IZUMI et al., 2009).

1.5 Modelos experimentais da doença de Parkinson

Para compreender a fisiopatogênese da DP e desenvolver novas terapias, é de grande importância que existam modelos relevantes da DP, permitindo que novos agentes farmacológicos e novas estratégias de tratamento sejam avaliados antes de serem testados clinicamente (BEAL, 2001; BETARBET, 2002).

O primeiro modelo animal de DP descrito baseou-se na utilização de reserpina, um inibidor do transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), que leva à depleção de DA dos terminais nervosos pré-sinápticos (CARLSSON et al., 1957). Poucos anos após a publicação do modelo da reserpina, surgiram modelos utilizando toxinas com o objetivo de reproduzir a degeneração nigroestriatal, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Esta toxina, ministrada localmente através de estereotaxia, leva à perda de neurônios dopaminérgicos da SNpc pela formação de grandes quantidades de ERO's após sua infusão (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Outro modelo existente utiliza o lipopolissacarídeo (LPS), que é uma endotoxina encontrada na membrana externa das bactérias gram-negativas, que leva a ativação de vias sinalizadoras intracelulares, transcrição de genes geradores de ERO's e ao aumento da expressão de citocinas pro-inflamatórias (DAUER; PRZEDBORSKI,

2003). Semelhante ao modelo da 6-OHDA, a infusão de LPS na SNpc induz neurodegeneração dopaminérgica semelhante à observada na DP (LIMA et al., 2006). Outro modelo também bastante utilizado é o modelo de neurodegeneração induzido pela rotenona. Esse inseticida de amplo espectro se acumula no complexo mitocondrial e promove um aumento de ERO's no meio intracelular dos neurônios dopaminérgicos (CICCHETTI et al, 2009; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Um modelo sistêmico clássico de DP é baseado na administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), que tem seletiva toxicidade sobre os neurônios dopaminérgicos (BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

1.5.1 Modelo parkinsoniano induzido pela toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP)

A toxina MPTP é extensivamente utilizada como modelo experimental de DP em diferentes espécies animais, especialmente em camundongos (PRZEDBORSKI et al., 2004). Essa substância foi descoberta em 1982, quando um grupo de dependentes de drogas desenvolveram parkinsonismo severo (SHIMOHAMA et al., 2003). A droga utilizada por este grupo, que era vendida como uma nova “heroína sintética”, foi analisada e continha mais de 2,9% de MPTP, um produto de contaminação gerado durante sua síntese (LANGSTON et al., 1983). Mais tarde, foi demonstrado que o MPTP induzia síndrome parkinsoniana em primatas humanos e não-humanos, de forma praticamente indistinguível da DP do ponto de vista clínico e neuropatológico (LANGSTON; IRWIN, 1986).

O MPTP é uma neurotoxina lipossolúvel, fato que lhe confere grande capacidade de cruzar a barreira hematoencefálica (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Uma vez no encéfalo, seja por administração parenteral ou infusão direta na SNpc, o MPTP é oxidado a 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP⁺) pela enzima MAO-B presente nas células da micróglia, e esse intermediário é convertido a MPP⁺, provavelmente por oxidação espontânea (Figura 4). Como a molécula do MPP⁺ é polar, ela depende de carreadores de membrana plasmática para entrar nas células. Além disso, o MPP⁺ é um substrato de alta afinidade para o DAT dos neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Dentro dos

neurônios, o MPP^+ se acumula no interior da membrana mitocondrial, inibindo o complexo I da cadeia transportadora de elétrons e induzindo a morte por apoptose; conseqüentemente, os níveis estriatais de DA são depletados (SMEYNE; JACKSON-LEWIS, 2005). Este evento é complementado por estresse oxidativo e inflamação (VÁZQUEZ-CLAVERIE et al., 2009).

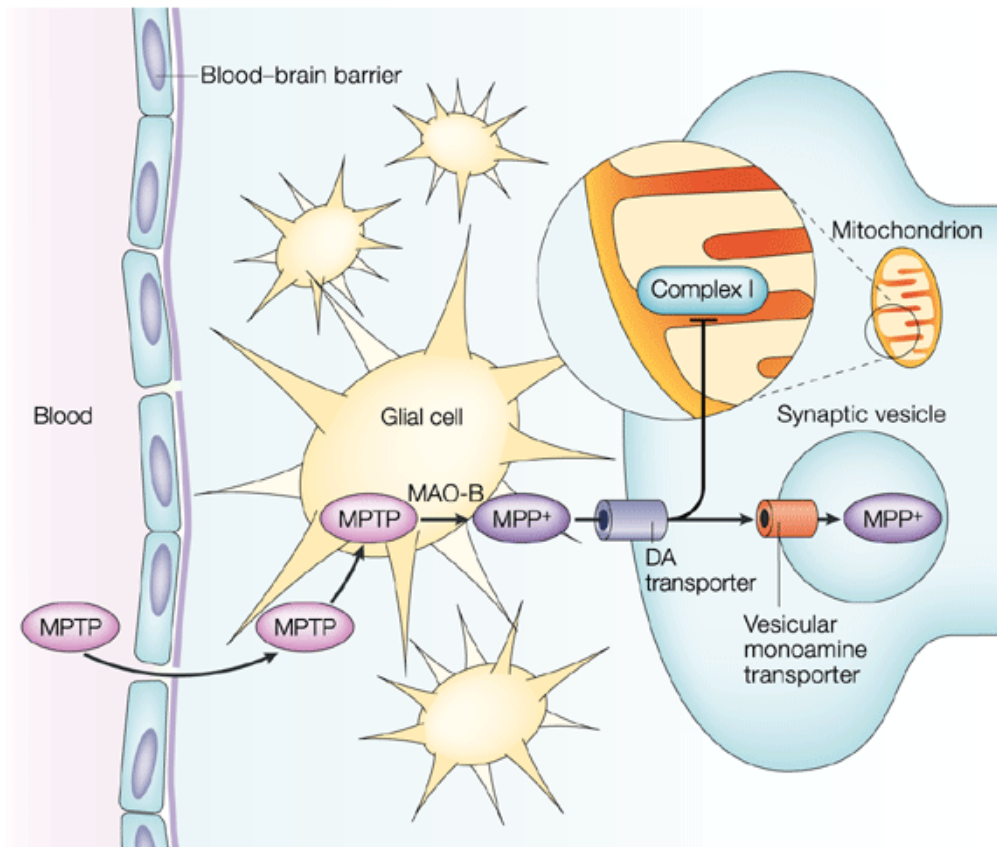


Figura 4: Mecanismo de ação do MPTP. O MPTP é uma toxina lipossolúvel, capaz de cruzar a barreira hematoencefálica. Após sua administração parenteral ou infusão direta na SNpc, o MPTP é oxidado a 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP⁺) pela enzima MAO-B presente nas células da micróglia, e esse intermediário é convertido a MPP⁺, provavelmente por oxidação espontânea. O MPP⁺ é um substrato de alta afinidade para o transportador de dopamina (DAT) dos neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal. Dentro dos neurônios, o MPP⁺ se acumula no interior da membrana mitocondrial, inibindo o complexo I da cadeia transportadora de elétrons e induzindo a morte por apoptose.

FONTE: VILA E PRZEDBORSKI, 2003

A principal limitação do modelo MPTP, que é compartilhada com os outros modelos neurotóxicos em geral, é que a lesão na SNpc não é acompanhada pela formação das inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy) (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). Apesar disso, ele continua sendo o mais completo modelo de degeneração nigroestriatal que pode ser estudado massivamente na pesquisa básica (HARE et al., 2013).

1.7 Tratamento farmacológico da doença de Parkinson

A prevalência da DP aumenta com a idade e estima-se que ela aumentará em paralelo com o aumento da idade média da população. A doença pode ter implicações significativas relacionadas com a saúde, sociais e financeiras, não só para o paciente e cuidador, mas também para o sistema de saúde.

A doença de Parkinson é uma síndrome associada a diferentes etiologias, por isso, há uma grande variação entre os indivíduos, envolvendo uma ampla faixa de sintomas motores e não motores. Atualmente, o tratamento principal baseia-se na reposição dos níveis de DA com a administração de levodopa, que ameniza principalmente os distúrbios motores (para revisão, ver STAYTE; VISSEL, 2014).

Em pacientes mais idosos a L-DOPA pode ser bem tolerada e utilizada como uma primeira linha de tratamento sintomático, entretanto para pacientes mais jovens inibidores da MAO são normalmente prescritos, tal como selegilina, ou agonistas da DA, como o ropinirol (ISAACSON; HAUSER, 2009). Ao longo do tempo, com a piora progressiva dos sintomas motores, o tratamento com a L-DOPA é eventualmente necessário e, dentro de poucos anos, os efeitos colaterais relacionados com o tratamento, tais como flutuações motoras e coreiformes ou discinesia induzida por L-DOPA emergem em cerca de um terço dos pacientes (MARSDEN; PARKES 1977; HAMETNER et al., 2010). Além disso, a levodopa pode ser transformada em DA periféricamente, podendo também causar efeitos colaterais como taquicardia, náuseas, depressão e insônia (POEWE 2006; FLOEL et al., 2008). Fármacos mais modernos são hoje administrados concomitantemente à levopoda, mas ainda não previnem o avanço da doença (STOCCHI 2009; ALBRECHT; BUERGER 2009). Isso destaca uma clara necessidade de novos tratamentos que possam retardar ou

interromper a progressão da doença e diminuir a incidência das discinesias. Embora existam fármacos muito promissores a atender esses requisitos, com base em estudos pré-clínicos, nenhum tratamento ainda foi considerado neuroprotetor para a doença na DP (STOCCHI, 2014).

1.8 Novas estratégias farmacológicas para a doença de Parkinson

Atualmente, existem grandes esforços voltados para a descoberta e identificação de novos compostos com atividade neuroprotetora de origem natural, principalmente da flora brasileira. Muitos desses compostos naturais apresentam potentes efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores. Um bom exemplo de efeito neuroprotetor de plantas da flora nacional vem dos estudos realizados com extratos etanólicos da planta *Cipura paludosa* e *Polygala paniculata* em modelos animais de neurotoxicidade por metil mercúrio (FARINA et al., 2005; LUCENA et al., 2007; LUCENA et al., 2010). Camudongos expostos a esse metal pesado por um período de duas semanas apresentam redução significativa na atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase nas regiões do córtex cerebral e cerebelo. Surpreendentemente, essa redução foi revertida quando os animais foram tratados com os extratos etanólicos destas plantas. A enzima glutathione peroxidase é extremamente importante para a eliminação de peróxidos endógenos, auxiliando na manutenção da integridade celular e está reduzida em pacientes que sofrem de DP (JENNER, 1993).

Os membros da família *Combretaceae* estão amplamente distribuídos entre as regiões tropicais e subtropicais, sendo encontrados na região norte do Brasil (FACUNDO et al., 1993). Essa família contém aproximadamente 600 espécies, das quais 370 são do gênero *Combretum* (MCGAW et al., 2001). As espécies pertencentes ao gênero *Combretum* apresentam potencial medicinal vasto com amplo espectro de ação biológica tais como: antibacteriana, antiprotozoária, anticâncer, citotóxica, analgésica, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antiviral (NABHA et al., 2000; MCGAW et al., 2001; GRIGGS et al., 2001; ASRES et al., 2001; ADNYANA et al., 2001; FYRQUIST et al., 2002; Ali et al., 2002; LIRA et al., 2002; OLAJIDE et al., 2003; CIRLA; MANN, 2003; NAM, 2003; MARTINI et al.,

2004). A espécie *Combretum leprosum* Mart. (Figura 5), popularmente conhecida como “mofumbo” ou “cipoaba” é utilizada na medicina popular para o tratamento de hemorragias e como um sedativo natural (PIETROVSKI et al., 2006). Nos últimos anos, um número crescente de estudos está sendo realizado a fim de identificar os mecanismos responsáveis pela ação terapêutica dessa planta.



Figura 5: Partes aéreas de *Combretum leprosum*.

FONTE: CNIP/APNE (2008)

A ação antinociceptiva do EE de *C. leprosum* foi investigada por Pietrovski et al. (2006). Foi demonstrado o potente efeito analgésico do EE desta planta sobre a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos. Animais tratados oralmente com o EE de *C. leprosum* uma hora antes da injeção de glutamato apresentaram resposta nociceptiva menor do que os camundongos tratados com salina. Neste mesmo estudo, demonstrou-se que o efeito antinociceptivo da *C. leprosum* estende-se a outros modelos de nocicepção tanto química (ácido acético, formalina e capsaicina) quanto térmica (placa quente).

A análise fitoquímica demonstrou que a *C. leprosum* apresenta diversas classes químicas de compostos que podem contribuir para o efeito biológico desta planta, incluindo ácido arjunólico, ácido mólico, ácidos graxos, o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), flavonóides glicosilados, 3-O-metilquercetina e quercetina (FACUNDO et al., 1993). Interessantemente, o triterpeno TTHL apresentou efeito antinociceptivo similar ao apresentado pelo EE de *C. leprosum* e poderia contribuir, em grande parte, para o efeito observado para o extrato (PIETROVSKI et al., 2006). Foi demonstrado, em outro trabalho, o efeito

antinociceptivo da injeção intratecal do TTHL em animais injetados com agonistas dos receptores glutamatérgicos NMDA e metabotrópico (LONGHI-BALBINOT et al., 2009). Porém, não foram observados efeitos do TTHL em atenuar a nocicepção induzida pelos agonistas AMPA e cainato.

Foi verificado que *C. leprosum* também possui ação anti-inflamatória em modelos animais de inflamação de pele, induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-acetato e óleo de cróton (HORINOUCI et al., 2013). Estas substâncias promovem a liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas e leucotrienos, que foram reduzidos com o uso tópico do EE das flores de *C. leprosum*. O triterpeno TTHL (0.01–10 mg/kg) também demonstrou efeito anti-inflamatório em um estudo anterior utilizando modelos de inflamação induzidos por ácido acético (i.p.) (LONGHI-BALBINOT et al., 2012). Utilizando um modelo de peritonite induzida por carragenina, o TTHL apresentou redução da migração leucocitária total, principalmente de neutrófilos, e dos níveis das citocinas inflamatórias TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal (LONGHI-BALBINOT et al., 2012). Há evidências mostrando que inflamação e/ou dano tecidual podem induzir liberação de glutamato dos neurônios aferentes primários, aumentando a ativação de receptores de aminoácidos excitatórios no tecido periférico (CARLTON et al., 2001; HOFFMAN et al., 2010; MILLER et al., 2011). A ativação dos receptores de glutamato NMDA causa a secreção de mediadores inflamatórios (KANE et al., 2005; MCNEARNEY et al., 2010; ZELENKA et al., 2005). Assim, pôde-se sugerir que o extrato promoveu ação anti-inflamatória e antinociceptiva por inibição do efeito excitatório do sistema glutamatérgico.

A ação terapêutica das espécies da família Combretacea amplia-se a doenças gástricas ulcerativas (NUNES et al., 2009). Ratos submetidos a tratamento oral com etanol apresentam lesões ulcerativas típicas e são utilizados como modelo experimental de ulceração gástrica. O etanol inibe a produção de muco e bicarbonato pela mucosa gástrica, além de aumentar o influxo de íons cálcio e radicais livres (GLAVIN; SZABO, 1992). O tratamento oral com o EE de *C. leprosum* reduziu a lesão na mucosa gástrica dos animais de forma dose-dependente. Interessantemente, a dose do EE de 500 mg/kg obteve efeito protetor semelhante ao

observado pela Ranitidina, um medicamento amplamente utilizado no tratamento de gastrites e úlceras (NUNES et al., 2009).

Em um estudo mais recente de DELLA-PACE et al. (2013), a ação anticonvulsivante de *C. leprosum* foi demonstrada. Utilizando-se modelo de convulsão induzida pela droga pentilenoterazol (PTZ), um antagonista GABAérgico, na dose de 80 mg/kg, i.p., animais receberam o TTHL (30 mg/kg, p.o.) 60 minutos antes da injeção com PTZ. Sabe-se que a alta estimulação do sistema glutamatérgico, a baixa estimulação do sistema GABAérgico e o estresse oxidativo derivado da inibição da bomba Na^+ , K^+ -ATPase, estão envolvidos com o desenvolvimento e propagação da epilepsia (PATSOUKIS et al., 2005; SOUZA et al., 2009). Foi verificado que o TTHL reduziu as crises convulsivas, e, adicionalmente, observou-se uma diminuição da peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas, além de diminuir a inibição da atividade enzimática da Na^+ , K^+ -ATPase induzida por PTZ. Esses resultados sugerem que o TTHL age também na manutenção da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, mostrando, além do efeito anticonvulsivante, uma proteção contra danos oxidativos (DELLA-PACE et al., 2013).

2 JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A procura de tratamentos para diversas enfermidades, a partir de compostos naturais, sempre esteve presente na literatura popular. E a vasta flora brasileira é um potencial berço para a descoberta de diversos fitoterápicos com amplo espectro de ação com menores efeitos colaterais. Entretanto, o papel neuroprotetor de plantas da flora nacional nas doenças neurodegenerativas relacionadas ao envelhecimento ainda é pouco explorado.

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que 1% da população acima dos 65 anos sofre com a doença do mal de Parkinson. No Brasil, a percentagem de população idosa é crescente e, conseqüentemente, demandará maiores investimentos em saúde pública voltada para a terceira idade. Segundo a Associação Parkinson Brasília, a estimativa é de que pelo menos 200 mil pessoas tenham a doença, que não atinge um grupo específico de pessoas, mas normalmente os sintomas surgem a partir dos 50 anos (PORTAL BRASIL, 2010).

Esse trabalho tem como objetivo abrir novas terapias que sejam mais acessíveis à população, diminuindo ou mesmo melhorando os sintomas que afetam a qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos, uma vez que os fármacos atuais apresentam diversos efeitos colaterais. Os resultados descritos na literatura com o EE de *C. leprosum* e seu metabólito TTHL demonstraram que os mesmos possuem importante efeito antinociceptivo e anti-inflamatório em parte por modular o sistema glutamatérgico (PIETROVSKI et al., 2006; LONGHI-BALBINOT et al., 2009). Neste sentido, este trabalho foi conduzido com o objetivo de investigar se a administração oral do EE da planta medicinal *C. leprosum* poderia ser efetiva em doenças neurodegenerativas de cunho inflamatório como o Parkinson, tendo em vista a participação do sistema glutamatérgico na sua gênese.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar o potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico (EE) das flores de *C. leprosum* em um modelo murino experimental da doença de Parkinson.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar se o EE de *C. leprosum* previne as alterações locomotoras apresentadas pelos camundongos tratados com MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina);
- Analisar se o EE de *C. leprosum* previne os déficits de equilíbrio e de força muscular apresentados pelos camundongos tratados com MPTP;
- Determinar se o EE de *C. leprosum* inibe a redução dos níveis de dopamina e seus metabólitos apresentados pelos camundongos tratados com MPTP;
- Caracterizar a regulação transcricional dos mecanismos responsáveis pela eventual neuroproteção e neurodegeneração nos camundongos submetidos à toxina MPTP e tratados com o EE de *C. leprosum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 92 camundongos machos da linhagem C57Bl/6 de 10 semanas de idade (25-30g), mantidos em gaiolas sobre um ciclo claro-escuro de 12:12h, temperatura de 22-25°C, provenientes de biotério próprio. Todos os animais receberam água e ração comercial *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo (protocolo número 001/2011).

4.2 Desenvolvimento do modelo animal de doença de Parkinson e desenho experimental

Para desenvolvimento do modelo de doença de Parkinson, foi utilizada a droga MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina, Sigma-Aldrich, cat M0896), dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%). Os camundongos foram injetados com o MPTP na dose de 30 mg/kg uma vez ao dia por 5 dias consecutivos, e os animais controle foram injetados com salina. O desenho experimental está ilustrado na Figura 6.

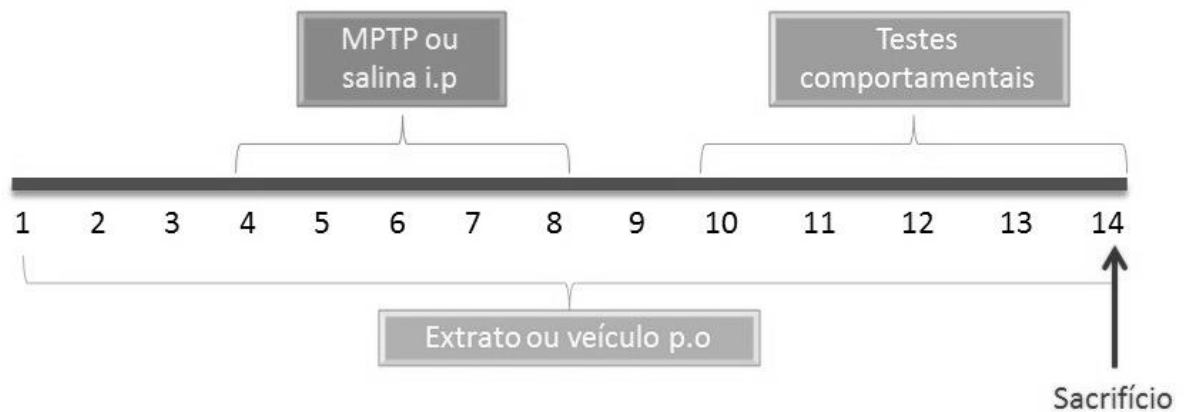


Figura 6: Desenho experimental. O EE (ou veículo) foi administrado durante 14 dias v.o., na dose de 100 mg/Kg. Do 4º ao 8º dia de experimento, os animais receberam injeções i.p. de MPTP (ou salina). A partir de 48h após a última injeção, foram realizados os testes comportamentais, que duraram até a data de sacrifício.

4.3 Extrato etanólico (EE) de *C. leprosum*

O extrato da planta *C. leprosum* utilizado nos experimentos foi fornecido pelo professor Adair R. S. Santos do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. As flores de *C. leprosum* Mart. foram coletadas em maio de 2007 em Cocalzinho – Viçosa, estado do Ceará, e identificadas pelo professor Afrânio Fernandes (Universidade Federal do Ceará, Fortaleza). Um exemplar da espécie foi depositado no Herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará. Para obtenção do extrato etanólico, as flores foram secas e trituradas, para então serem submetidas à extração com etanol, em temperatura ambiente, como descrito previamente (FACUNDO et al., 1993). A obtenção do EE de *C. leprosum* foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Valdir Alves Facundo, do Departamento de Química da Universidade Federal de Rondônia.

Para ser administrado por via oral, o EE das flores de *C. leprosum* foi solubilizado em veículo contendo solução salina e 3% de tween 20. O tratamento com o EE consistiu de administração oral na dose de 100 mg/kg, 3 dias antes do desafio com MPTP, 1 hora antes da injeção de MPTP durante os 5 dias, baseado na curva tempo-resposta realizada por Pietrovski et al. (2006), e se estendeu até a

data de sacrifício dos animais. Para realizar o experimento, os animais foram divididos em 4 grupos: veículo + salina (V+S), extrato + salina (E+S), veículo + MPTP (V+M) e extrato + MPTP (E+M).

4.4 Testes comportamentais

4.4.1 Avaliação da atividade locomotora

Para avaliar se o tratamento com *C. leprosum* preserva a atividade locomotora normal, analisamos a atividade exploratória de 24 camundongos em campo aberto (*open field*) (Figura 7). O teste foi realizado 48 horas após a última sessão de MPTP em uma caixa de madeira medindo 40x60x50 cm, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais.

Os animais tiveram a locomoção monitorada por 5 minutos (ambientação), foram injetados com D-anfetamina (i.p.) 2 mg/kg e posteriormente monitorados por mais 5 minutos (WEST et al., 2006). Os dados foram expressos como número de quadrantes cruzados por animal, e analisados através de Anova de duas vias com *post-hoc* Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando o $p < 0.05$.

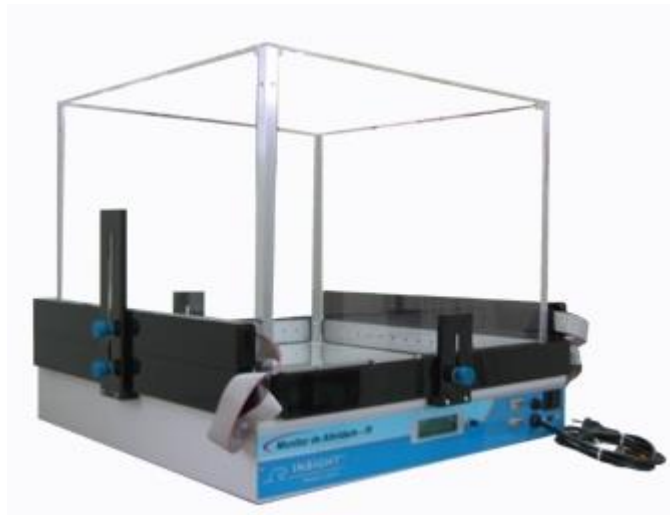


Figura 7: Avaliação da atividade locomotora.

FONTE: INSIGHT, 2014.

4.4.2 Teste de resistência de agarre (*wire hang*)

O teste de resistência de agarre (*wire hang*) avalia a força neuromuscular (MIYAKAWA et al., 2001) e foi realizado conforme descrito por Sango et al. (1996) (Figura 8). Os animais foram habituados à sala de experimentação e manipulados pelo experimentador pelos menos duas horas antes do experimento. Como aparato, foi utilizada uma grade metálica com espaçamento de 1 cm entre barras de 0,8 mm de diâmetro. Inicialmente o animal foi colocado sobre a grade e brevemente agitada para que o animal a agarre. A grade foi então invertida e mantida 20 cm acima de uma caixa preenchida com maravalha, altura suficiente para fazer com que o animal se mantenha agarrado à grade, mas incapaz de feri-lo durante a queda. A latência para queda foi medida com o uso de um cronômetro. Para análise dos dados foi respeitado um teto de 60 segundos. Para este teste, foram avaliados 31 animais. A estatística foi realizada através de Anova de uma via com post-hoc Bonferroni, considerando significativo $p < 0,05$.



Figura 8: Teste de resistência de agarre (*wire hang*).

4.4.3 Teste de força de agarre (*grip test*)

Para realizar o teste de força de agarre (FOWLER et al., 2002), foi utilizado um transdutor de força conectado a um pequeno suporte metálico (Figura 9). Os animais foram habituados à sala de experimentação 2 horas antes do experimento e manipulados pelo experimentador. Durante o teste, o experimentador manteve o animal seguro pela cauda e o permitiu agarrar o suporte com as patas dianteiras, mantendo o corpo sempre paralelo em relação à superfície. Após manter o animal por dois segundos nessa posição, aumenta-se gradativamente a força aplicada à cauda do animal (sempre paralela à superfície) até que o mesmo solte o suporte. O pico de força máxima foi registrado automaticamente no momento em que o animal soltou o suporte e foi expresso em *g*. Cinco testes foram realizados por animal num período máximo de 60 segundos. No total, foram utilizados 38 animais para o teste. A média das tentativas por animal foi utilizada para análise estatística, que foi realizada através de Anova de uma via com post-hoc Bonferroni, considerando significativo $p < 0,05$.



Figura 9: Teste de força de agarre (*grip test*).

FONTE: UNIVERSITY OF WASHINGTON, 2014.

4.4.4 Teste de escalada em haste vertical (*pole test*)

O *pole test* é um paradigma utilizado na avaliação da bradicinesia (OGAWA et al., 1985), sendo uma ferramenta útil para avaliar distúrbios do movimento causados pela depleção de DA estriatal (MATSUURA et al., 1997) (Figura 10). Este teste avalia indiretamente a integridade dos gânglios da base, que é necessária para

o animal ter habilidade nos membros dianteiros para conseguir agarrar a haste e se virar para baixo. O aparato consiste em uma haste metálica de 45 cm de altura e 1 cm de diâmetro envolvida em gaze. Os animais foram colocados no topo da haste com a face voltada para cima e foi medido o tempo gasto para se orientarem para baixo e escalarem a haste do topo até a sua base. A latência da escalada foi medida com o uso de um cronômetro. O teste foi realizado 72 horas após a última injeção com MPTP e sendo permitidas 5 tentativas de escalada por animal. Caso o animal não escalasse a haste em nenhuma das tentativas foi atribuído um teto de 60 segundos. Foram utilizados 30 animais para o teste. A estatística foi realizada através de Anova de uma via com post-hoc Bonferroni, considerando significativo $p < 0,05$.



Figura 10: Teste de escalada em haste vertical (*pole test*).

FONTE: QPS, 2014.

4.5 Dosagem dos níveis estriatais de DA e metabólitos por HPLC

A ação neuroprotetora do EE foi analisada através da quantificação dos níveis de DA e seus metabólitos no estriado dos camundongos através de Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC). Para esta análise, foram utilizados 26 animais.

Os animais foram sacrificados seis dias após a última sessão de MPTP, o cérebro removido e o estriado dissecado. Os tecidos foram rapidamente pesados e mantidos a -80°C até serem processados. Os estriados foram homogeneizados em solução gelada de ácido perclórico 0,1 M; 0,1 mM EDTA e centrifugados a $10.000\times g$ por 10 minutos a 4°C . Os sobrenadantes foram filtrados com filtro de poro $0.22\mu\text{m}$. Aproximadamente 20 microlitros foram injetados em HPLC equipado com uma coluna de fase reversa (Eclipse XDB – C18 Agilent, $4,6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) e detector eletroquímico (VT-03, Decode II Antec®) para quantificar os níveis estriatais de DA, ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA).

Para quantificar a DA, foi utilizada fase móvel contendo 0,15 M de NaH_2PO_4 , 1 mM de EDTA dissódico diidratado, 2,28 mM de ácido octanossulfônico de sódio e 13% (v/v) de metanol em água grau HPLC, com pH 5,25, com um fluxo de 0,7 mL/min (ZAPATA et al., 2009). Para quantificar DOPAC e HVA, a fase móvel consistiu de 0,02 M de acetato de sódio, 0,0125 M ácido cítrico, 16% v/v de metanol, 0,033% p/v de ácido octanossulfônico e 0,1mM EDTA, com pH 3,92. Todas as soluções utilizadas no HPLC foram filtradas com membrana de $0,22 \mu\text{m}$ de porosidade. As injeções das amostras foram feitas em triplicata, e as concentrações do neurotransmissor e seus metabólitos foram expressos em % do controle.

4.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

A fim de avaliar o efeito do EE de *C. leprosum* na expressão gênica da região mesencefálica (Figura 11) e do estriado de animais tratados com MPTP e/ou com o extrato de CL, foram realizados experimentos de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), utilizando no total 44 animais. Foram investigados genes relacionados ao sistema dopaminérgico (transportador de dopamina - DAT; enzima tirosina hidroxilase - TH; e receptores de dopamina D_1 e D_2).

deionizada, previamente tratada com dietilpircarbonato (DEPC). A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA) e por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante, respectivamente.

4.6.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, CA, USA) usando o equipamento S1000 Thermal Cycler (Biorad, CA, USA). As condições da reação foram as seguintes: 25°C por 5 min., 42°C por 30min., 85°C por 5 min.

4.6.3 Reação de PCR em tempo real

Foram desenhados iniciadores para analisar a expressão de RNA mensageiro (RNAm) de componentes do sistema dopaminérgico (DAT, TH, D₁ e D₂). As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação de PCR em tempo real utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA). Em suma, as reações foram preparadas em um volume total de 10µL contendo 5 µL de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 µL de água purificada, 0,5µL de cada iniciador a 10µM e 0,5 µL de cDNA. Foram realizados 45 ciclos após a desnaturação inicial (95°C, 2 minutos) de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação) por 15s; 60°C (anelamento) por 30s e 72°C (amplificação) por 30s.

Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata, e para cada experimento incluiu-se uma reação sem molde como controle negativo. Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi avaliada utilizando-se amostras RT-negativas e pela análise da curva de “melting” dos produtos amplificados, que foi feita resfriando-se as amostras a 60°C e, em seguida, aumentando-se a temperatura para 95°C a 0,1°C/s. A especificidade das reações de PCR também pôde ser confirmada pela verificação dos amplicons em gel de

acrilamida, além da curva de melting. A quantificação relativa da expressão gênica foi feita pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando o gene da β -actina para normalização dos dados.

Gene	Sequência	Tamanho do fragmento (Pb)	Tm (°C)
DAT	F: TGG CAC ATC TAT CCT CTT TGG	175	57
	R: GAC CAC GAC CAC ATA CAG AAG		58
TH	F: AAG ATC AAA CCT ACC AGC CG	118	57
	R: TAC GGG TCA AAC TTC ACA GAG		57
D₁	F: CCA AGA ACG TGA GGG CTA AG	120	58
	R: TGA GGA TGC GAA AGG AGA AG		57
D₂	F: GAG CCA ACC TGA AGA CAC C	158	58
	R: TGA CAG CAT CTC CAT TTC CAG		58
Actina	F: TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG A	122	61
	R: AAT GCC TGG GTA CAT GGT GGT A		61

4.7 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e foi utilizado o software Graph Pad Prism (2007, San Diego, CA) versão 5.01. A significância estatística dos diferentes grupos foi determinada por ANOVA de uma via ou duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni, sendo considerados valores significativos aqueles com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Testes comportamentais

5.1.1 Atividade locomotora

A Figura 12 mostra a média de cruzamentos efetuados pelos animais testados na atividade locomotora. A locomoção basal dos animais, avaliada durante os 5 minutos iniciais (pré-anfetamina), não diferiu entre os grupos. Após injeção de anfetamina na dose de 2 mg/Kg, os animais de todos os grupos (V+S, E+S, V+M e E+M) demonstraram significativo aumento na atividade locomotora.

O grupo controle E+S não apresentou alteração da locomoção após a injeção de anfetamina em relação ao grupo controle V+S. Interessantemente, os animais que receberam a toxina parkinsoniana MPTP e não receberam o EE de *C. leprosum* (V+M) e injetados com anfetamina apresentaram uma hiperlocomoção muito acentuada quando comparados à hiperlocomoção apresentada pelos animais dos grupos controles V+S e E+S. Já animais tratados com MPTP e que receberam extrato previamente (E+M) obtiveram atenuação dessa hiperlocomoção exacerbada induzida pela anfetamina quando comparados aos animais tratados somente com MPTP (V+M). Este dado indica que o EE de *C. leprosum* preveniu o aumento da resposta locomotora causada pela anfetamina em animais tratados com MPTP.

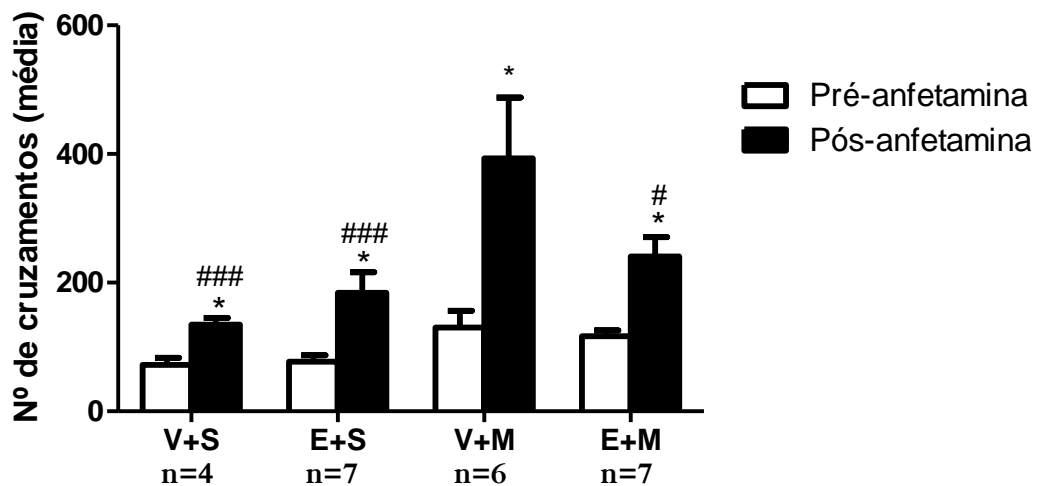


Figura 12: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* na Atividade locomotora. Anova de duas vias seguida de post-hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ em relação ao número de cruzamentos pré-anfetamina; # $p < 0.05$ e ### $p < 0.0001$ em relação ao grupo V+M pós-anfetamina. Veículo + salina (V+S) (n=4); Extrato + salina (E+S) (n=7); Veículo + MPTP (V+M) (n=6); Extrato + MPTP (E+M) (n=7); [F(3,40)=23.28; $p < 0.0001$]; [F(3,40)=5.802; $p = 0.0022$].

5.1.2 Teste de resistência de agarre (*Wire hang*)

A Figura 13 demonstra o tempo que os animais permaneceram agarrados à uma grade invertida. Três tentativas foram feitas para cada animal e o tempo médio foi calculado. Neste teste, foi observado que os animais que receberam extrato e salina (E+S) não apresentaram alterações na força de agarre comparados ao grupo controle V+S, mostrando que o EE de *C. leprosum* não afeta a força muscular e a habilidade inata do animal em se manter suspenso pelas 4 patas em uma grade invertida. Apesar de ocorrer uma tendência do grupo E+S permanecer maior tempo agarrado à grade, nenhuma diferença significativa foi vista neste parâmetro comportamental entre nenhum dos grupos.

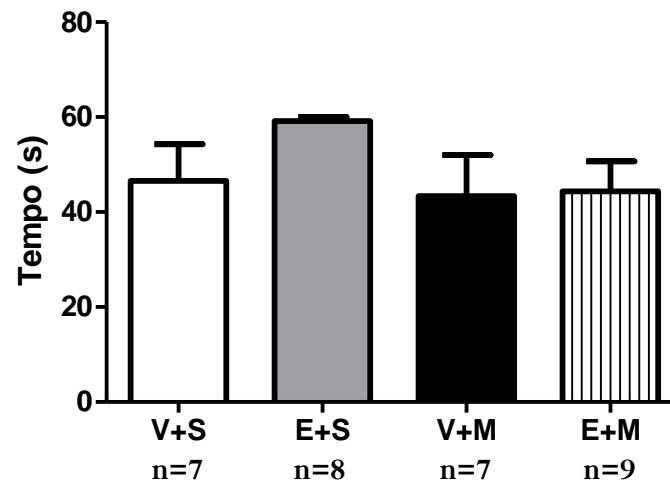


Figura 13: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* no *Wire hang*. Anova de uma via seguida de *post-hoc* de Bonferroni. Veículo + salina (V+S) (n=7); Extrato + salina (E+S) (n=8); Veículo + MPTP (V+M) (n=7); Extrato + MPTP (E+M) (n=9); [F3,27]=1,338; p=0.2827].

5.1.3 Teste de força de agarre (*Grip test*)

Os dados apresentados na Figura 14 mostram que no grupo de animais que recebeu extrato + salina (E+S) a força muscular não foi alterada. O grupo tratado com veículo + MPTP (V+M) apresentou uma redução da força de agarre em relação ao grupo V+S, porém este efeito não foi estatisticamente significativo. Já o grupo tratado com MPTP e com o extrato (E+M) obteve uma força de agarre maior que a dos animais do grupo V+M, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p < 0.01$). Nenhuma diferença significativa foi encontrada nos demais grupos.

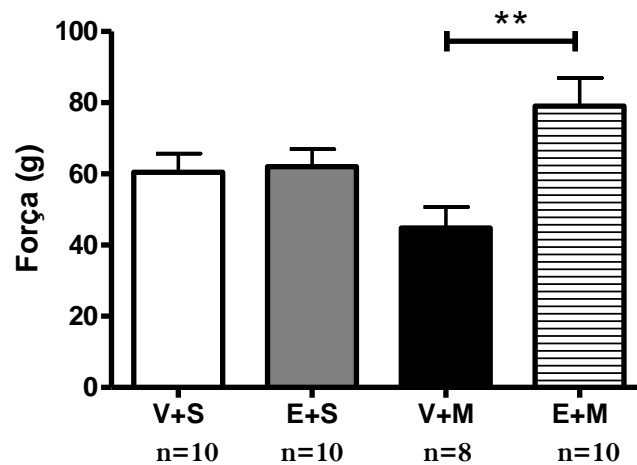


Figura 14: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* no Grip test. Anova de uma via seguida de post-hoc de Bonferroni. ** $p < 0.01$ em relação ao grupo E+M. Veículo + salina (V+S) (n=10); Extrato + salina (E+S) (n=10); Veículo + MPTP (V+M) (n=8); Extrato + MPTP (E+M) (n=10). [F(3,34)=4.830; $p < 0.01$]

5.1.4 Teste de escalada em haste vertical (*Pole test*)

O tratamento com o extrato no grupo injetado com salina (E+S) não alterou o equilíbrio e a coordenação motora dos animais (Figura 15). O grupo tratado com MPTP e que recebeu veículo (V+M) não diferiu significativamente do grupo controle V+S. Porém, foi possível observar que o grupo V+M despendeu um tempo significativamente menor de escalada em relação ao grupo tratado com extrato (E+S) ($p < 0.05$). O grupo E+M, por sua vez, apresentou resultado semelhante ao do grupo controle V+S.

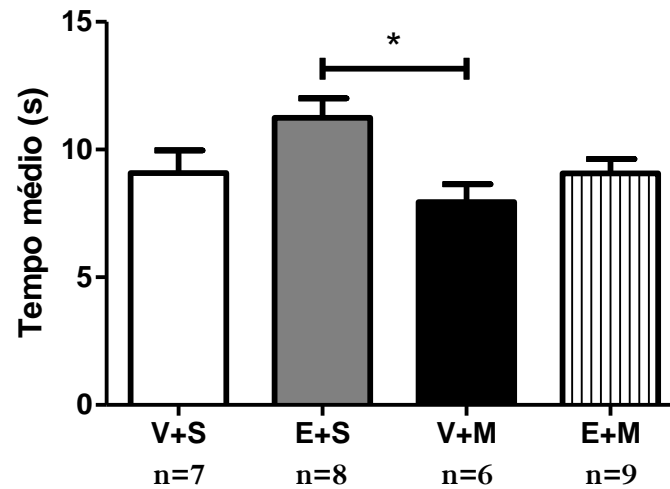


Figura 15: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* no Pole test. Anova de uma via seguida de post-hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ em relação ao grupo E+S. Veículo + salina (V+S) (n=7); Extrato + salina (E+S) (n=8); Veículo + MPTP (V+M) (n=6); Extrato + MPTP (E+M) (n=9). [$F(3,26)=3.480$; $p < 0.05$].

5.2 Dosagem dos níveis estriatais de dopamina e metabólitos por HPLC

Os resultados apresentados na Figura 16 demonstram que animais tratados com EE de *C. leprosum* (E+S) apresentam um aumento, porém não estatisticamente significativo, na DA estriatal quando comparados ao grupo V+S. Já o tratamento com a toxina MPTP induziu uma diminuição de 85% nos níveis de DA, em relação aos grupos controle V+S e E+S ($p < 0.05$ e $p < 0.0001$, respectivamente). O tratamento com EE de *C. leprosum* em animais injetados com MPTP apresentou uma maior concentração de DA em relação ao grupo V+M, porém não foi significativo.

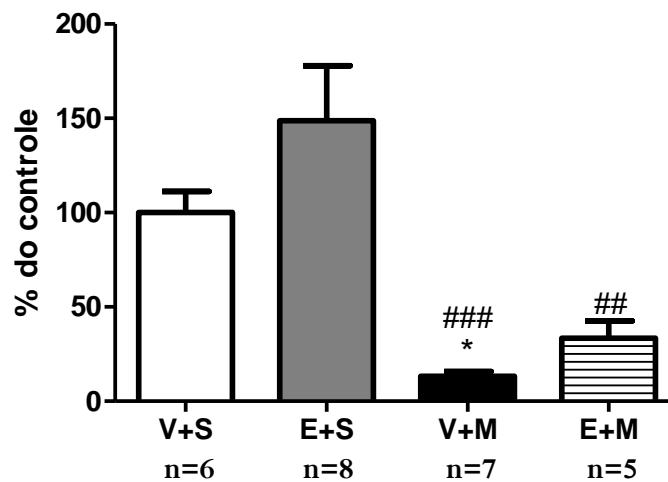


Figura 16: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* nos níveis estriatais de DA. Anova de uma via seguida de post-hoc de Bonferroni. Veículo + salina (V+S) (n=6); Extrato + salina (E+S) (n=8); Veículo + MPTP (V+M) (n=7); Extrato + MPTP (E+M) (n=5). * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle V+S; ## $p < 0.01$ e ### $p < 0.0001$ em relação ao grupo E+S. [$F(3,22)=11,30$; $p < 0.0001$].

Na Figura 17 estão representadas as dosagens dos metabólitos da DA, o ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e o ácido homovanílico (HVA) estriatais. O tratamento com o EE de *C. leprosum* promoveu um aumento nos níveis de ambos os metabólitos, que, apesar de não ser significativo em relação ao controle V+S, correlaciona-se com o aumento encontrado nos níveis de DA. Os animais tratados com MPTP (V+M) apresentaram um menor nível dos metabólitos em relação ao grupo E+S ($p < 0.01$, DOPAC e $p < 0.05$, HVA), porém não houve diferença estatisticamente significativa deste grupo em relação ao controle V+S. O tratamento com o extrato em animais MPTP, por sua vez, mostrou uma tendência a apresentar uma concentração maior de ambos os metabólitos em relação ao grupo V+M, resultado este concordante com a tendência à prevenção da depleção de DA observada para esse grupo.

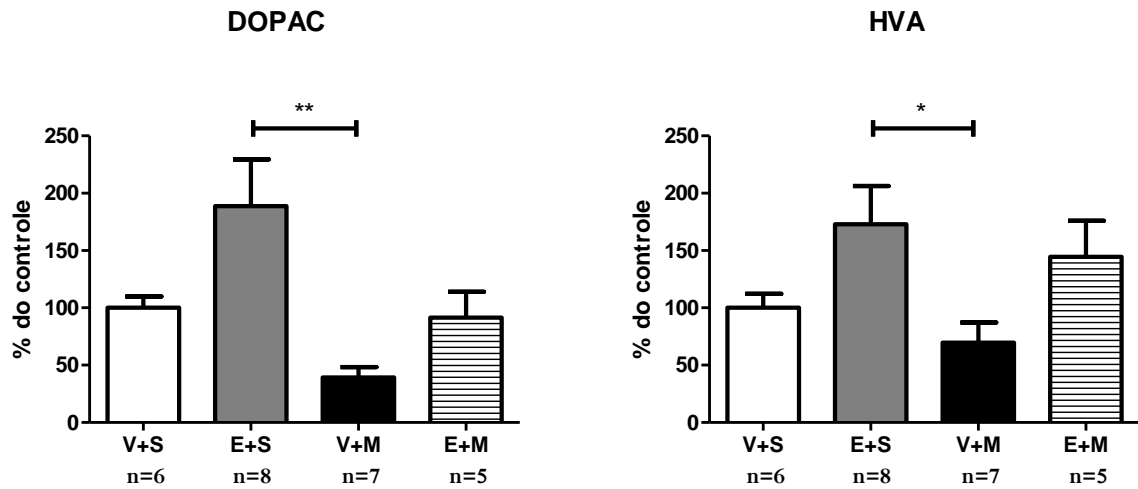


Figura 17: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* nos níveis de DOPAC e HVA estriatais. Anova de uma via seguida de post-hoc de Bonferroni. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ em relação ao grupo E+S. DOPAC: [F(3,22)=5.800; $p=0.0044$]; HVA: [F(3,22)=3.307; $p=0.0390$]

Avaliando o metabolismo da DA, o tratamento com EE de *C. leprosum* nos animais MPTP mostrou uma tendência à prevenção do aumento das razões DOPAC/DA, HVA/DA e (DOPAC+HVA)/DA desencadeadas pelo MPTP (Figura 18). O grupo tratado com o extrato não diferiu em relação ao grupo controle V+S neste parâmetro.

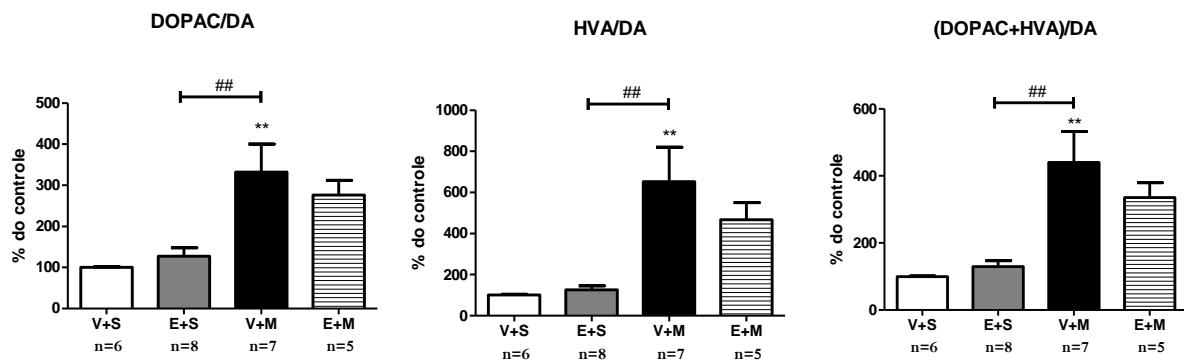


Figura 18. Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* no metabolismo estriatal da DA. Anova de uma via seguida de post-hoc de Bonferroni. ** $p < 0.01$ em relação ao grupo controle V+S; ## $p < 0.01$ em relação ao grupo E+S. DOPAC/DA [F(3,22)=7.548; $p=0.0012$]; HVA/DA: [F(3,22)=8.030; $p=0.0008$]; (DOPAC+HVA)/DA: [F(3,22)=9.602; $p=0.0003$]

5.3 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

5.3.1 Análise da expressão gênica de componentes do sistema dopaminérgico na região mesencefálica

Foi avaliada a expressão de dois marcadores dopaminérgicos: a enzima de síntese de DA tirosina hidroxilase (TH) e o transportador de dopamina (DAT) na região mesencefálica. Na análise da expressão de RNAm para o gene TH, foi possível observar um aumento da expressão do gene dessa enzima nos animais do grupo E+S comparado ao grupo V+S, porém não significativo. Já o grupo V+M apresentou redução estatisticamente significativa na expressão do gene para TH quando comparada ao grupo E+S ($p < 0.01$). Já o grupo E+M apresentou um aumento na expressão desse gene quando comparado ao grupo V+S e ao grupo V+M ($p < 0.05$ e $p < 0.01$, respectivamente).

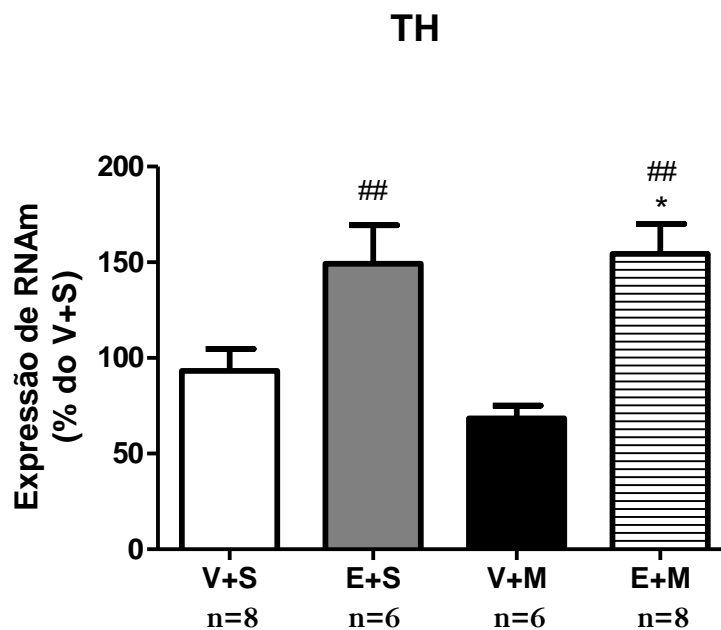


Figura 19. Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* na expressão do gene TH na região mesencefálica. Media \pm erro padrão da expressão relativa de RNAm normalizada pelo gene da β actina na região mesencefálica. Veículo + salina (V+S) (n=7); Extrato + salina (E+S) (n=6); Veículo + MPTP (V+M) (n=6); Extrato + MPTP (E+M) (n=8). TH: tirosina hidroxilase. * $p < 0.05$, comparado ao grupo controle; ### $p < 0.01$, comparado ao grupo V+M. [F(3,23)=8.297; $p = 0.0006$]. ANOVA de uma via com post-hoc Bonferroni.

Na figura 20, estão representados os níveis de expressão de RNAm em porcentagem do controle V+S para o gene do transportador de dopamina (DAT) na região mesencefálica. Observamos que o tratamento com EE de *C. leprosum* (E+S)

não altera a expressão de DAT. Os animais tratados com MPTP (V+M) apresentam uma tendência à diminuição da expressão deste gene. Já no grupo de animais tratados com o extrato e injetados com MPTP (E+M), observou-se maior expressão gênica para o DAT em relação ao grupo tratado com MPTP e recebeu veículo (V+M) ($p < 0.05$).

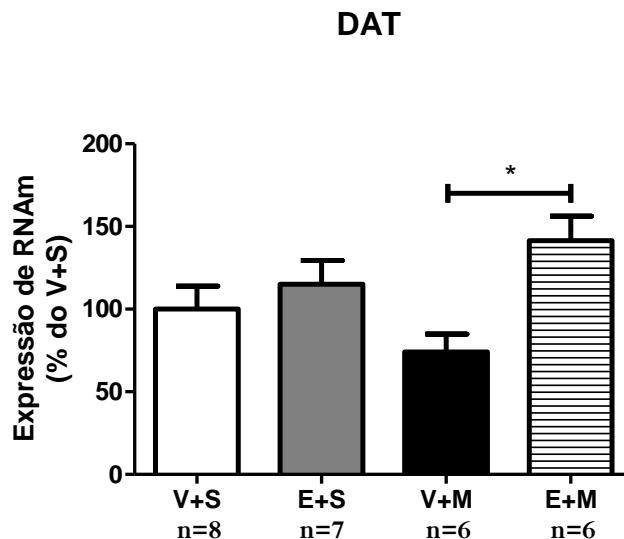


Figura 20. Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* na expressão do gene DAT na região mesencefálica. Média \pm erro padrão da expressão relativa de RNAm normalizada pelo gene da β actina na região mesencefálica. Veículo + salina (V+S) (n=8); Extrato + salina (E+S) (n=7); Veículo + MPTP (V+M) (n=6); Extrato + MPTP (E+M) (n=6); DAT: transportador de dopamina; [F(3,23)=3.754; $p=0.0249$]. $p < 0.05$, comparado ao grupo V+M. ANOVA de uma via com post-hoc Bonferroni.

Ao analisar a expressão dos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 na região mesencefálica, podemos observar que a expressão do receptor D_1 não foi alterada em nenhum dos grupos analisados. Já quando se avaliou a expressão do receptor D_2 , observou-se uma redução da expressão gênica no grupo V+M, porém não significativa. Interessantemente, o grupo E+M não mais apresentou essa tendência (Figura 21).

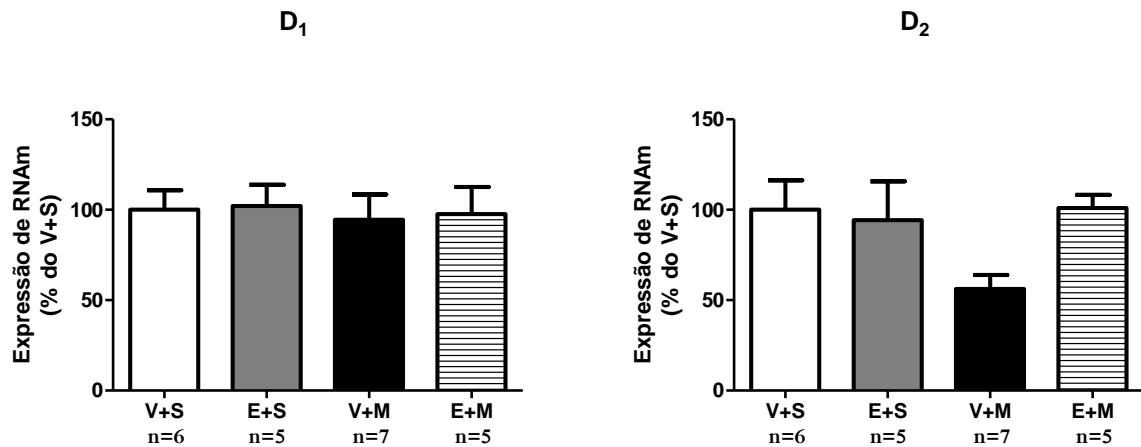


Figura 21: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* na expressão dos genes para os receptores D₁ e D₂ na região mesencefálica. Media ± erro padrão da expressão relativa de RNAm normalizada pelo gene da β actina no estriado. Veículo + salina (V+S) (n=6); Extrato + salina (E+S) (n=5); Veículo + MPTP (V+M) (n=7); Extrato + MPTP (E+M) (n=5). D₁: [F(3,14)=1,647; p=0.2238]; D₂: [F(3,14)=2,041; p=0.1544].

5.3.2 Análise de componentes do sistema dopaminérgico na região do estriado

Analizamos também a expressão do gene TH na região estriatal nos 4 grupos e não foram observadas diferenças significativas entre eles (Figura 22). Quando da análise da expressão dos receptores D₁ e D₂ no estriado, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos (Figura 23).

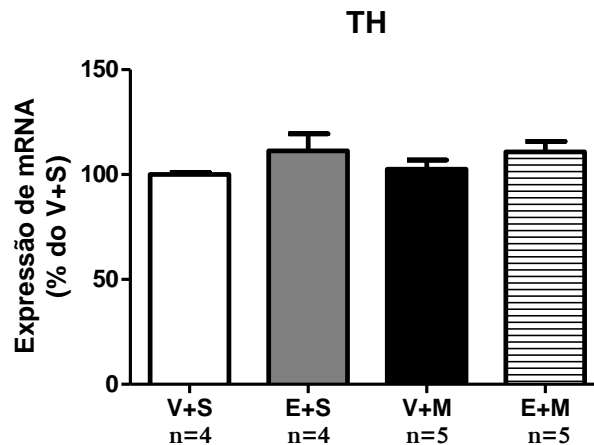


Figura 22: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* na expressão do gene TH no estriado. Media ± erro padrão da expressão relativa de RNAm normalizada pelo gene da β actina no estriado. Veículo + salina (V+S) (n=4); Extrato + salina (E+S) (n=4); Veículo + MPTP (V+M) (n=5); Extrato + MPTP (E+M) (n=5); TH: tirosina hidroxilase; [F(3,14)=1,200; p=0.3458].

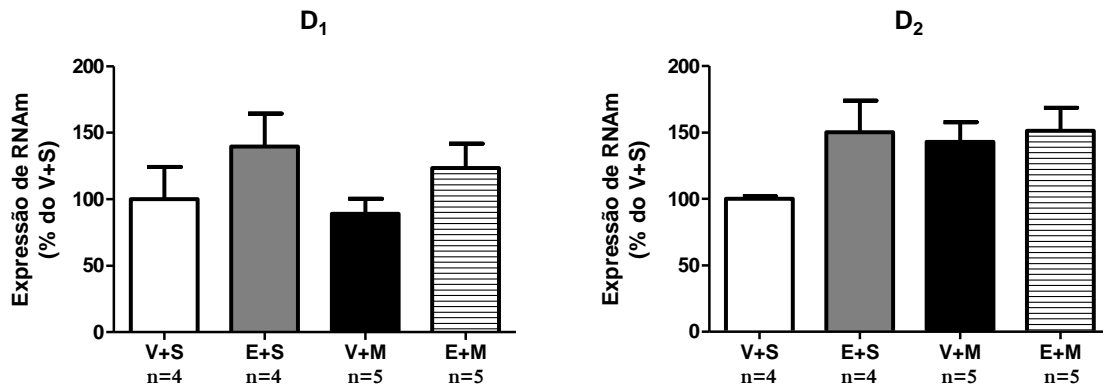


Figura 23: Efeito do tratamento com EE de *C. leprosum* na expressão dos genes para os receptores D₁ e D₂ no estriado. Média \pm erro padrão da expressão relativa de RNAm normalizada pelo gene da β actina no estriado. Veículo + salina (V+S) (n=4); Extrato + salina (E+S) (n=4); Veículo + MPTP (V+M) (n=5); Extrato + MPTP (E+M) (n=5). D₁: [F(3,14)=1,370; p=0.2926]; D₂: [F(3,14)=2,041; p=0.1544].

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A doença de Parkinson é uma síndrome associada a diferentes etiologias, e devido a isso há uma grande variação entre os indivíduos envolvendo uma ampla faixa de sintomas motores e não motores. Atualmente, o tratamento principal baseia-se na reposição dos níveis de DA com a administração de levodopa, que ameniza principalmente os distúrbios motores. Fármacos mais modernos são hoje administrados concomitantemente à levopoda, mas ainda não são efetivos e não previnem o avanço da doença (STOCCHI, 2009; ALBRECHT; BUERGER 2009).

Em nosso estudo, foram analisados os efeitos comportamentais, moleculares e bioquímicos do tratamento com o extrato etanólico das flores de *Combretum leprosum* em um modelo de DP utilizando a toxina MPTP, a fim de investigar o potencial terapêutico desta planta na prevenção da DP.

Análise da função motora

O modelo animal de DP baseado na administração da toxina MPTP em camundongos C57BL/6 é amplamente utilizado para avaliar novas terapias anti-parkinsonianas (ROUSSELET et al., 2003). Em nosso estudo, avaliamos a atividade locomotora dos animais antes e após injeção de anfetamina na dose de 2 mg/Kg. As anfetaminas são substâncias simpatomiméticas com ação predominante no sistema nervoso central, que causam liberação de DA de seus estoques intraneurais. Também acarretam na liberação de outros neurotransmissores, como serotonina e noradrenalina, e na inibição da sua recaptção no terminal axônico pré-sináptico (GOODMAN; GILMAN, 2012). A administração de anfetamina leva a um aumento transiente nos níveis de DA no estriado e núcleo accumbens, resultando em aumento da atividade locomotora em camundongos normais (HELMESTE; SEEMAN, 1982). Assim, animais tratados com MPTP poderiam demonstrar uma resposta comprometida à anfetamina em comparação aos animais salina, relacionada à denervação estriatal induzida pela toxina. Nosso estudo mostrou, porém, através deste teste, que os animais que receberam MPTP (V+M)

apresentaram uma hiperlocomoção exacerbada pela administração de anfetamina, que foi prevenida pelo tratamento com o EE de *C. leprosum*. Outros trabalhos, que também avaliam a atividade locomotora em modelos animais de parkinsonismo induzido por MPTP, apresentam resultados que sofrem variação de acordo com o regime de administração e doses da toxina utilizados, podendo ser encontrados déficits na atividade locomotora ou aumento dessa atividade (WILLIS; DONNAN, 1987; CHIA *et al.*, 1996; SEDELIS *et al.*, 2000; ROUSSELET *et al.*, 2003; WEST *et al.*, 2006; LUCHTMAN *et al.*, 2009; HUTTER-SAUNDERS, *et al.*, 2012). Já foi verificado que o tratamento com esta toxina pode causar hiperlocomoção em camundongos em diversos regimes de administração e doses de MPTP: 20-30 mg/kg/3dias, i.p.; 35-45 mg/kg/10dias, s.c.; 14x30 mg/kg/3semanas, i.p.; 18x30 mg/kg/8semanas, i.p.; 25 mg/kg/5dias, i.p.; e 25 mg/kg/10dias, s.c. (COLOTLA *et al.*, 1990; CHIA *et al.*, 1996; ROUSSELET *et al.*, 2003; LUCHTMAN *et al.*, 2009).

O comportamento de hiperlocomoção exacerbada perante à anfetamina observado nos animais administrados com MPTP ainda não é bem compreendido. Existem evidências de que a denervação dopaminérgica nigroestriatal resulta em aumento da inervação serotoninérgica da via reticulo-estriatal (THIBAUT ET AL., 1995; FOX; BROTCHE, 2000). Segundo Chia *et al.* (1996), essa hiperlocomoção pode ser devida ao aumento da neurotransmissão serotoninérgica ocorrida nos cérebros dos animais tratados com essa toxina em altas doses, na tentativa de compensar a deficiência de DA. Este grupo verificou que animais tratados com MPTP (35-45 mg/kg/10dias s.c.), que apresentaram essa hiperlocomoção, continham altos níveis de 5-HT e 5-HIAA no estriado, demonstrando que o MPTP, nessas doses, evocava a síntese, liberação e a renovação de 5-HT. Estudos anteriores mostram que animais com elevados níveis de serotonina (5-HT), induzidos por 5-hidroxitriptofano (5-HTTP) com ou sem inibidor de monoamina oxidase (MAO), apresentaram hiperatividade (GRAHAME-SMITH, 1971). Adicionalmente, a destruição dos neurônios serotoninérgicos, através de 5,7 diidroxitriptamina (5,7-DHT), levaram à diminuição de 5-HT no estriado e a uma consequente hipoatividade (CHIA, 1999; MODIGH, 1972). Dessa forma, sugerimos que o efeito do EE em prevenir a hiperlocomoção exacerbada nos animais tratados com MPTP possa estar relacionado à inibição deste efeito compensatório de maior

síntese e liberação de serotonina no estriado. Isto é devido à tendência observada de uma maior síntese de DA no grupo E+M em relação ao grupo V+M, que foi correlacionada à aumentada expressão do gene para a sua enzima de síntese, a TH, nos neurônios dopaminérgicos remanescentes ou ainda a uma possível proteção dos neurônios dopaminérgicos da SNpc da toxicidade do MPTP.

Alguns estudos demonstraram, ainda, que o receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) possa estar envolvido na atividade locomotora (GRAY et al., 2009; MCGEEHAN et al., 2004). O bloqueio do mGluR5 com o antagonista 3-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)etnil]piridina (MTEP) e animais nocaute para este receptor (mGluR5^{-/-}) promove aumento da atividade locomotora em camundongos (DORIA et al., 2013). Dessa forma, sugerimos que o efeito do EE em prevenir hiperlocomoção exacerbada pela anfetamina nos animais MPTP possa também estar relacionada a uma modulação dos receptores metabotrópicos de glutamato, dado que o triterpeno TTHL, presente no EE da *C. leprosum*, demonstrou ter ação sobre esse sistema (LONGHI-BALBINOT et al., 2009).

Além disso, existe a hipótese de que a exacerbação da hiperlocomoção observada está relacionada a modificações discretas na atividade de receptores D2 na região mesencefálica, como será abordado na sessão “Expressão gênica”.

No presente trabalho, os testes *wire hang* e *pole test* não apresentaram diferenças entre os animais MPTP para o grupo controle V+S. Estudos anteriores utilizando modelos de DP induzidos por MPTP (30 mg/kg/5dias, s.c.) também não demonstraram diferenças significativas entre os animais tratados com MPTP e os tratados com salina quando submetidos aos testes *wire suspension* (que também avalia a coordenação motora e força muscular, como o *wire hang*) e *pole test* (CHAGNIEL et al., 2012). Já foi demonstrado que mesmo altos graus de depleção de DA não induziram alterações detectáveis nas habilidades motoras em geral como coordenação motora, força muscular e velocidade de movimento (CHAGNIEL et al., 2012). Essas informações concordam com outros estudos que demonstram que mais de 80% de depleção dos níveis de DA após tratamento com MPTP não causou prejuízo no desempenho do camundongo no *pole test* (SEDELIS et al., 2000; KUROSAKI et al., 2004). Apesar disso, esses dados são surpreendentes, pois é observado um prejuízo no desempenho motor em humanos cuja DA foi severamente

depletada. O *wire hang* realizado por Hutter-Saunders et al. (2012) também não apresentou diferenças significativas entre os animais tratados com MPTP (18, 20, 22, ou 24 mg/kg x4/2h, s.c.) e os tratados com salina. Trabalhos anteriores mostram que animais modelo da doença de Parkinson submetidos a um regime subcrônico de MPTP (30 mg/kg/5dias), como o aqui utilizado, podem ter os déficits comportamentais mascarados por mecanismos compensatórios dos neurônios sobreviventes para a perda da inervação dopaminérgica no estriado causada pela droga parkinsoniana, como aumento da sensibilidade dos receptores de DA ou renovação de DA (LIEBETANZ et al., 2007). Esses mecanismos compensatórios já foram observados em outros trabalhos (CHIA et al., 1996; ROUSSELET et al., 2003). Isso mostra que os testes *wire hang* e *pole test* podem ter sensibilidade insuficiente para examinar os movimentos finos e complexos (CHAGNIEL et al., 2012) apresentados por animais submetidos ao regime de administração de MPTP (30 mg/kg/5dias, i.p.) utilizado neste estudo.

O *grip test* mede diretamente a força de agarre dos membros dianteiros do animal. É uma avaliação mais refinada que a realizada com o teste *wire hang*, pois ele consegue medir a força do animal em gf (FOWLER et al., 2002; HUTTER-SAUNDERS et al., 2012). Porém, neste trabalho não foram detectadas diferenças significativas entre os animais tratados com salina e os tratados com MPTP no regime utilizado (30 mg/kg/5dias, i.p.). Os animais que foram tratados com MPTP e receberam o EE de *C. leprosum* (E+M) alcançaram uma força maior que os animais tratados com MPTP e veículo (V+M). Essa diferença foi estatisticamente significativa, indicando que o EE de *C. leprosum* proporciona um adicional de força motora em camundongos submetidos à droga parkinsoniana MPTP (30 mg/kg/5dias, i.p.). Testes anteriores mostram que camundongos nocaute para o receptor D₂ de DA (D₂^{-/-}) apresentam características de parkinsonismo (dificuldade em iniciar movimentos e bradicinesia), mas não apresentaram diferença na força de agarre em relação aos animais controle V+S (D₂^{+/+}; D₂^{+/-}) utilizando este mesmo teste (FOWLER et al., 2002). Outros estudos, utilizando o MPTP, demonstraram que o *grip test* não foi sensível à neurodegeneração dopaminérgica causada pelo MPTP nas doses de 18, 20, 22, ou 24 mg/kg x4/2h, s.c. (HUTTER-SAUNDERS et al., 2012). Esses dados corroboram com os resultados aqui encontrados, onde não

houve diferenças na força de agarre entre os animais tratados com MPTP e veículo (V+M) e os animais controle V+S.

O presente estudo mostrou ainda que o EE de *C. leprosum*, na dose utilizada de 100 mg/kg, p.o., não prejudica a função motora dos animais, pois os animais que receberam o extrato e não foram tratados com MPTP (E+S) obtiveram o mesmo desempenho motor que os animais controle V+S. Este resultado foi reproduzido em todos os testes realizados: *open field*, *wire hang*, *pole test* e *grip test*. Estudos anteriores também mostram, através dos testes motores *rotarod* e *open field*, que o EE de *C. leprosum* (10-500 mg/kg, p.o.) não prejudica a função motora dos animais (PIETROVSKI, *et al*, 2006; LOPES, *et al*, 2010).

Análise do conteúdo estriatal de dopamina e seus metabólitos

Após administração sistêmica de MPTP, ocorre sua metabolização pela monoamino oxidase B nas células da glia, gerando o metabólito MPP+, que possui alta afinidade pelo DAT dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc). Dentro do neurônio, o MPP+ se acumula no interior da mitocôndria, causando a inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, induzindo a sua morte por apoptose; conseqüentemente, os níveis estriatais de DA são depletados (SMEYNE; JACKSON-LEWIS, 2005).

Na análise do conteúdo estriatal de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA, no regime de tratamento e dose utilizados, foi constatado que o MPTP foi capaz de reduzir significativamente os níveis dessas substâncias e a razão metabólito/neurotransmissor foi elevada. Isto sugere a ocorrência de mecanismos compensatórios dos neurônios sobreviventes, como resultado da neurodegeneração mediada pelo MPTP, como uma aumentada sensibilização dos receptores dopaminérgicos, levando a uma maior renovação da DA nos animais tratados com essa toxina (CHIA *et al.*, 1996). Além disso, Rousselet *et al.* (2003) apontam que o aumento da renovação de DA e outros mecanismos compensatórios na via nigroestriatal, como a menor recaptação de DA pelo DAT e a hiperatividade dos neurônios dopaminérgicos nas fases iniciais da DP em humanos e em modelos

animais de DP, como causas da hiperlocomoção observada nos animais tratados com MPTP, mesmo sem administração de anfetamina (ROUSSELET et al., 2003).

O tratamento com o EE de *C. leprosum* mostrou uma discreta preservação do conteúdo estriatal de DA, DOPAC e HVA nos animais tratados com MPTP. Este pequeno aumento da síntese e degradação de DA foi correlacionado com a expressão aumentada do gene para a tirosina hidroxilase (TH) encontrada para este grupo, confirmando os resultados encontrados.

Expressão gênica

Em nosso trabalho, foi avaliada a expressão de genes envolvidos na função dos núcleos da base, incluindo a enzima TH, o DAT e os receptores de dopamina D₁ e D₂. Alterações na expressão desses genes têm sido demonstradas nos modelos animais que utilizam o MPTP como indutora da DP (JAKOWEC et al., 2004).

A enzima TH e o DAT são amplamente utilizados como marcadores de depleção dopaminérgica (CHEN et al., 2009). A administração de MPTP leva à redução na expressão dos genes que codificam essas proteínas.

Sabe-se que a TH é a enzima que limita a velocidade de síntese da DA (KOZINA et al., 2014). Em nosso estudo, apesar de apresentar uma redução nos níveis de RNAm para a TH na região mesencefálica no grupo tratado com MPTP (V+M), essa não foi estatisticamente significativa comparada ao grupo controle V+S. Apesar da diminuição comprovada dos níveis de TH em tratamentos com MPTP, nosso resultado pode refletir o método de dissecação, pois ela engloba, além da substância negra *pars compacta* e *pars reticulata*, a área tegmental ventral (VTA). Como o regime de tratamento não afeta a expressão de TH na VTA, também rica em neurônios dopaminérgicos, esse resultado sugere que a dissecação possa mascarar a depleção induzida pelo MPTP. O tratamento com o EE nos animais salina apresentou um efeito direto na expressão deste gene, aumentando os níveis de RNAm, que se mostrou estar refletido nos níveis de DA encontrados para este grupo. Também foi observado que o tratamento com o EE nos animais que receberam a toxina MPTP obteve o mesmo efeito sobre o gene TH.

Dados presentes na literatura científica sobre a DP mostram que o DAT presente na membrana plasmática é considerado um marcador da perda de terminais dopaminérgicos pré-sinápticos (MILLER et al., 1997) que encontra-se reduzido em cerca de 50-70% na DP (NUTT et al., 2004). No nosso trabalho, foi verificada uma tendência à menor expressão desse gene pelo grupo tratado com MPTP, e novamente um efeito direto do tratamento com o EE pelo aumento da expressão gênica do DAT foi observado no grupo E+M. Isto sugere uma possível proteção dos neurônios dopaminérgicos contra a toxicidade do MPTP promovida pelo tratamento com o EE de *C. leprosum*, ou ainda, um efeito direto nos neurônios sobreviventes sobre a expressão do gene DAT.

Analizamos também a expressão dos receptores de dopamina D₁ e D₂ na região mesencefálica e no estriado. Esses receptores são amplamente expressos no estriado e substância negra (LEVEY et al., 1993). Verificamos que a expressão de D₁ na região mesencefálica foi inalterada, enquanto D₂ teve tendência à redução da sua expressão no grupo V+M, que foi prevenida pelo tratamento com o EE.

Estudos prévios também reportaram que a administração de MPTP produziu uma diminuição no receptor D₂ na região mesencefálica (ARAKI et al., 2001; ROJAS et al. 2012). No trabalho de Tanabe et al. (2004), foi demonstrado que uma pré-exposição à eticloprida, um antagonista específico dos receptores D₂, por infusão direta na VTA na dose de 0.75 µg/0.5 µL em cada lado induziu exacerbação da hiperlocomoção em ratos após o desafio com anfetamina (1,0 mg/Kg). Intrigantemente, neste mesmo estudo a exacerbação da hiperlocomoção não foi observada em doses maiores (3 e 12 µg/0.5 µL em cada lado). Além disso, o grupo triou os efeitos da liberação de DA da VTA após a infusão por microdiálise de concentrações crescentes de eticloprida (0.1, 1.0, 10.0 e 100.0 µmol/L) e, interessante, demonstraram um aumento significativo da liberação de DA apenas na menor dose. Os resultados encontrados nesse trabalho indicaram que o bloqueio farmacológico dos receptores D₂ na VTA pode desencadear processos neuroadaptativos, culminando em uma resposta aumentada à anfetamina. Isso sugere que o comprometimento mais discreto e sutil do nível de atividade dos receptores D₂ podem ter consequências significativas na modulação da liberação de DA na região mesencefálica e em suas aferências, influenciando, assim, em

aspectos relacionados à motricidade. Corroborando com esse trabalho, em nosso estudo a exacerbação da hiperlocomoção após o desafio com anfetamina nos animais V+M foi associada a uma tendência de menor expressão dos receptores D_2 na região mesencefálica neste grupo, que foi revertida pelo tratamento com EE de *C. leprosum*. Isso demonstra que o tratamento com o EE foi capaz de prevenir as alterações motoras possivelmente desencadeadas pela redução dos receptores D_2 induzidas pelo tratamento com MPTP.

Evidências na literatura demonstram que tanto a expressão do gene quanto da proteína TH encontram-se diminuídas no estriado após o desafio com MPTP (ROJAS et al., 2012; BISSONNETTE et al., 2014; KOZINA et al., 2014). Porém, em nosso estudo não foram detectadas alterações significativas na expressão estriatal deste gene, tanto com o tratamento com o MPTP quanto com o EE de *C. leprosum*.

O estriado é a região do cérebro com maior densidade de receptores D_1 e D_2 (MISSALE et al., 1998). Em roedores, esses dois receptores são segregados em duas vias, com o predomínio de D_1 na via direta e de D_2 na via indireta (GERFEN; SURMEIER, 2011). Receptores D_1 estriatais são localizados nos neurônios de projeção GABAérgicos, enquanto receptores D_2 são expressos tanto pré-sinápticamente nos terminais nigroestriatais quanto pós-sinápticamente nos neurônios GABAérgicos (ROTH, 1979). Esses receptores também têm robusta expressão nos neurônios espinhosos médios do estriado, sendo D_1 predominantemente expresso nos neurônios estriatonigrais, e D_2 nos neurônios estriatopálidais (SURMEIER et al., 2010).

Estudos que analisam esses receptores estriatais reportam alterações na sua expressão em roedores e primatas parkinsonianos, assim como em pacientes com a DP. Alguns mostram aumento dos receptores D_2 , enquanto que já foram documentadas diminuição ou inalteração para o receptor D_1 (GERFEN et al., 1990; MORISSETTE et al., 1996; AUBERT et al., 2005). Em nosso estudo, a expressão de D_2 foi inalterada.

A DP é conhecida como uma desordem que surge da falta de produção de DA causada pela morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Associado a isso, existe uma liberação anormal de glutamato nos circuitos dos núcleos da base, que geralmente é considerada como uma consequência dos níveis diminuídos de DA.

Assume-se que a perda neuronal na SNpc e consequente depleção de DA estriatal leva a uma excessiva inibição do tálamo a partir de projeções do globo pálido interno (GPi) e substância negra pars reticulata (SNpr). Isto é devido à desinibição do núcleo subtalâmico, que possui projeções excitatórias glutamatérgicas para o GPi e SNpr (BLANDINI et al., 2000). Além disso, evidências sugerem que excitotoxicidade mediada por glutamato, através de receptores NMDA, pode ser uma causa primária da perda de neurônios dopaminérgicos, e, assim, uma neurotransmissão glutamatérgica alterada pode contribuir para a patogênese da DP (KOUTSILIERI; RIEDERER, 2007). Portanto, o bloqueio de receptores glutamatérgicos pode ser uma estratégia terapêutica para a DP (para revisão, ver STAYTE; VISSEL, 2014).

Longhi-Balbinot et al. (2009) demonstrou que o triterpeno TTHL, componente encontrado no EE de *C. leprosum*, produziu significativa ação antinociceptiva em modelo de dor induzida pelo glutamato e pelos agonistas de receptores glutamatérgicos NMDA e trans-ACPD. Esses resultados sugeriram que o efeito antinociceptivo do TTHL envolve modulação do sistema glutamatérgico. Dessa forma, os efeitos encontrados para o tratamento com o EE de *C. leprosum* podem estar relacionados a uma atenuação da neurotransmissão glutamatérgica nos gânglios da base, capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos da sua excitotoxicidade. Além disso, a utilização de alguns antagonistas de receptores NMDA, em roedores e primatas, têm mostrado potencialização dos efeitos antiparkinsonianos da levodopa e redução das complicações motoras e discinesias associadas com o seu tratamento crônico, sugerindo que estas drogas poderiam ser utilizadas juntamente à levodopa (para revisão, ver STAYTE; VISSEL, 2014).

A inflamação é uma característica comum em doenças neurodegenerativas. Ambas as respostas imunes inata e adaptativa têm sido implicadas na patofisiologia da DP. Apesar de que a inflamação pode não ser a causa primária da neurodegeneração, existem evidências de que a inflamação crônica, envolvendo ativação microglial e astrocitária, contribui para a progressão da doença (NUZZO et al., 2014). Dados da literatura têm sugerido que mediadores inflamatórios como NO, espécies reativas de oxigênio, TNF- α e interleucina (IL-1 β) derivados da micróglia modulam a progressão da morte neuronal na DP (HIRSCH; HUNOT, 2009). A ativação microglial também é uma característica patológica proeminente em

roedores e primatas após a intoxicação por MPTP (HIRSCH et al., 2012). Existem evidências de que o bloqueio da inflamação pode tanto reduzir os sintomas da DP quanto atrasar o aparecimento destes, representando assim um atrativo alvo terapêutico (HIRSCH et al., 2012; NUZZO et al., 2014).

No trabalho de Longhi-Balbinot et al. (2012), foi demonstrado que o triterpeno TTHL apresentou atividade anti-inflamatória. Utilizando um modelo de peritonite induzida por carragenina, o tratamento com o TTHL reduziu a migração leucocitária total, principalmente de neutrófilos, e também os níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β no líquido peritoneal. Estes efeitos do TTHL podem ser atribuídos à inibição da ativação do sistema glutamatérgico. Neste sentido, sugerimos que o EE de *C. leprosum* possa ter exercido ação protetora nos neurônios dopaminérgicos da SNpc através de sua atividade anti-inflamatória, prevenindo da morte neuronal induzida pelo MPTP.

A etiopatogênese da DP esporádica, a forma mais comum de parkinsonismo, é complexa, possuindo contribuições tanto de fatores ambientais quanto genéticos (EXNER et al., 2012). A utilização de modelos genéticos animais e celulares forneceu o conhecimento de que as alterações mitocondriais, o estresse oxidativo e disfunção proteassomal e lisossomal contribuem para o processo neurodegenerativo (DAWSON et al., 2010; CORTI et al., 2011; MARTIN et al., 2011; SHULMAN et al., 2011).

A primeira relação entre parkinsonismo e mitocôndria se tornou evidente após a descoberta de que a toxina MPTP causava síndrome parkinsoniana e inibia a respiração mitocondrial. Foi demonstrado que o MPTP induzia a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc através da inibição do complexo I da cadeia respiratória (VILA; PRZEDBORSKI, 2003). Corroborando com esses dados, foi reportado que a atividade do complexo I está reduzida cerca de 30% na SNpc e no córtex pré-frontal na autópsia de pacientes com DP (SCHAPIRA et al., 1989; PARKER et al., 2008). Estresse oxidativo aumentado, resultante da formação de espécies reativas de oxigênio, é um dos mecanismos propostos para a morte dos neurônios dopaminérgicos na DP, e o complexo I é considerado como uma das fontes primárias dessas espécies reativas (para revisão, ver SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013). Além disso, afirma-se que a dopamina seja uma das

responsáveis pela inibição da função da cadeia respiratória mitocondrial e também pela inibição da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$. Assim, o restabelecimento dessas funções tem implicações importantes na pesquisa de terapias neuroprotetoras, uma vez que inativação da cadeia respiratória e da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ pode desencadear dano intracelular levando à morte dos neurônios dopaminérgicos nigrais (BAGH et al., 2008).

No trabalho de Della-Pace et al. (2013), foi analisado o efeito do tratamento com o triterpeno TTHL v.o. em um modelo de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ), antagonista GABAérgico. A utilização deste antagonista leva à inibição da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, efeito este prevenido pelo tratamento com o TTHL. Foi verificado que o efeito anticonvulsivante exercido pelo TTHL está associado à manutenção da atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, e, adicionalmente, sugeriu-se que este triterpeno exerce uma proteção contra o estresse oxidativo. Assim, no presente estudo, os efeitos observados para o tratamento com o EE de *C. leprosum* nos parâmetros comportamentais, moleculares e bioquímicos podem estar relacionados a este efeito do TTHL contra danos oxidativos, possivelmente ocorrendo proteção da função mitocondrial dos danos gerados pelo tratamento com o MPTP, com consequente preservação dos neurônios dopaminérgicos.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que:

- O tratamento com o EE de *C. leprosum* preveniu as alterações locomotoras apresentadas pelos camundongos tratados com MPTP, avaliadas pelo teste *open field*;
- A força muscular avaliada pelo teste *wire hang* não foi afetada pelo tratamento com o MPTP. Este parâmetro também não foi alterado pela administração do EE de *C. leprosum*;
- Na avaliação da força muscular pelo *grip test*, o tratamento com o EE de *C. leprosum* proporcionou um adicional de força em camundongos submetidos à droga parkinsoniana MPTP;
- A administração de MPTP, na dose de 30 mg/kg i.p durante 5 dias, resultou numa depleção de aproximadamente 85% da DA estriatal, e também redução dos níveis dos metabólitos DOPAC e HVA. O tratamento com EE de *C. leprosum* não foi capaz de prevenir a depleção dopaminérgica induzida pelo MPTP no estriado. Porém, o tratamento com EE de *C. leprosum* parece prevenir a depleção dos metabólitos dopaminérgicos nesta mesma região;
- O tratamento com o EE de *C. leprosum*, por si só, mostrou tendência a elevar a expressão da enzima TH na região mesencefálica, que foi correlacionada a um maior conteúdo de DA no estriado;
- O tratamento com o EE de *C. leprosum* foi capaz de aumentar a expressão do gene para TH e DAT na região mesencefálica de animais tratados com MPTP, mostrando exercer efeitos diretos sobre os neurônios dopaminérgicos;

- A expressão do receptor D₁ na região mesencefálica apresentou-se inalterada por ambos os tratamentos com MPTP e com o EE;
- A administração de MPTP não induziu alterações na expressão da TH no estriado. O tratamento com o EE de *C. leprosum* também não revelou ter ação sobre a expressão desse gene;
- A expressão do receptor D₁ no estriado apresentou discreta diminuição pelo tratamento com MPTP. Já a expressão do receptor D₂ apresentou-se inalterada por ambos os tratamentos;
- O tratamento com o EE na dose de 100 mg/Kg previne as alterações motoras e moleculares desencadeadas pelo MPTP, entretanto parcialmente revertendo as alterações bioquímicas. Dessa forma, nosso estudo evidencia um potencial terapêutico da *Combretum leprosum* na prevenção e tratamento da DP.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ADNYANA, I.K.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A.H.; TRAN, K.O.; KADOTA, S. Three new triterpenes from the seeds of *Combretum quadrangulare* and their hepatoprotective activity. **Journal of Natural Products**, v. 64:360–3, 2001.

ALBRECHT S.; BUERGER E. Potential neuroprotection mechanisms in PD: focus on dopamine agonist pramipexole **Current Medical Research & Opinion**, v. 25, n. 12, p. 2977–2987, 2009.

ALI, H.; KONIG, G.M.; KHALID, S.A.; WRIGHT, A.D.; KAMINSKY, R. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83:219–28, 2002.

ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? **Nature Medicine**, 10(Suppl), S18–S25, 2004.

ARAKI, T.; MIKAMI, T.; TANJI, H.; MATSUBARA, M.; IMAI, Y.; MIZUGAKI, M.; ITOYAMA, Y. Biochemical and immunohistological changes in the brain of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated mouse. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 12(3):231-8, 2001.

ASRES, K.; BUCAR, F.; KNAUDER, E.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H.; CROFT, S.L. In vitro antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. **Phytotherapy Research**, v. 15:613–7, 2001.

AUBERT I, et al. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. **Annals of Neurology**, 57(1):17-26, 2005.

BAGH M.B.; MAITI, A.K.; JANA, S.; BANERJEE, K.; ROY, A.; CHAKRABARTI, S. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: Implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. **Free Radical Research**, v. 42, n. 6, p. 574-581, 2008.

BARBOSA, M.T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D.P.; CUNNINGHAM, M.C.; GUERRA, H.L.; LIMA-COSTA, M.F., et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Movement Disorders**, 21(6):800-8. 2006.

BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 325– 332, 2001.

BENITO-LEON, J.; BERMEJO-PAREJA, F.; MORALES-GONZALEZ, J.M.; PORTA-ETESSAM, J.; TRINCADO, R.; VEGA, S., et al. Incidence of Parkinson disease and parkinsonism in three elderly populations of central Spain. **Neurology**, 62:734–41, 2004.

BETARBET, R. et al. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**, v. 24, p. 308– 318, 2002.

BISSONNETTE, S.; MURATOT, S.; VERNOUX, N.; BEZEAU, F.; CALON, F.; HÉBERT, S.S.; SAMADI, P. The effect of striatal pre-enkephalin overexpression in the basal ganglia of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, p. 1-11, 2014.

BLANDINI, F.; PORTER, R.H.; GREENAMYRE, J.T. Glutamate and Parkinson's disease. **Molecular Neurobiology**, v. 12(1), p. 73–94, 1996.

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 62, n. 1, p. 63–88, 2000.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.T. Animal models of Parkinson's disease. **The FEBS Journal**, Apr;279(7):1156-66, 2012.

BLUM, D., et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, 65(2), 135–172, 2001.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3, 4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature** 180:1200, 1957.

CARLTON, S.M. Peripheral excitatory amino acids. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 52–56, 2001.

CHAGNIEL, L.; ROBITAILLE, C.; LACHARITÉ-MUELLE, C.; BUREAU, G.; CYR, M. Partial dopamine depletion in MPTP-treated mice differentially altered motor skill learning and action control. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 9–15, 2012.

CHATHA, B.T. et al. Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. **Neuroscience**, v. 101, n. 4, pp. 1037–1051, 2000.

CHEN, P.; VARGAS, M. R.; PANI, A. K.; et al. Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease : Critical role for the astrocyte, **Proceedings of the National Academy of Sciences** n. 38, p. 1–6, 2009.

CHIA, L.G. et al. Effects of 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7 dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amines in C57BL/6 mice. **Neuroscience Letters**, v. 218, p. 67–71, 1996.

CHOI D.W. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. **Neuron**, v. 1, p. 623–633, 1988.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R.E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30(9):475-83, 2009.

CICCONE, S., et al. Parkinson's disease: A complex interplay of mitochondrial DNA alterations and oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, 14 (2), 2388–2409, 2013.

CIRLA, A.; MANN, J. Combretastatins: from natural products to drugs discovery. **Natural Product Reports**, v. 20:558–64, 2003.

CNIP/APNE, 2014. Mofumbo. Disponível em <http://www.cnip.org.br/banco_img/Mofumbo/index.html>. Acesso em: 11 maio, 2014.

COLOTLA, V.A; FLORES, E.; OSCOS, A.; MENESES, A; TAPIA, R. Effects of MPTP on Locomotor Activity in Mice. **Neurotoxicology and teratology**, v. 12, pp. 405–7, 1990.

CORTI, O.; LESAGE, S.; BRICE, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. *Physiological Reviews*, 91(4):1161-218, 2011.

CROSIERS, D., et al. Parkinson disease: Insights in clinical, genetic and pathological features of monogenic disease subtypes. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 42 (2), pp. 131–141, 2011.

DAVIS, G.C., et al. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Research**, v. 1, pp. 249–254, 1979.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v.39, pp. 889-909, 2003.

DAWSON, T.M.; KO, H.S.; DAWSON, V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron**, 66(5):646-61, 2010.

DE LAU, L.M.; GIESBERGEN, P.C.; DE RIJK, M.C.; HOFMAN, A.; KOUDSTAAL, P.J.; BRETELER, M.M. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: the Rotterdam Study. **Neurology**, v. 63, pp. 1240–4, 2004.

DE LAU, L.M.; BRETELER, M.M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 5, pp. 525-35, 2006.

DELLA-PACE, I. D.; RAMBO, L. M.; RIBEIRO, L. R.; et al. Triterpene 3 β , 6 β , 16 β trihidroxilup-20(29)-ene protects against excitability and oxidative damage induced by pentylenetetrazol: the role of Na(+),K(+)-ATPase activity. **Neuropharmacology**, v. 67, pp. 455–64, 2013.

DORIA, J.; SILVA, F.; DE SOUZA, J.; VIEIRA, L.; CARVALHO, T.; REIS, H.; PEREIRA, G.; DOBRANSKY, T.; RIBEIRO, F. Metabotropic glutamate receptor 5 positive allosteric modulators are neuroprotective in a mouse model of Huntington's disease. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 169, pp. 909–921, 2013.

DORSEY, E.R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**. 68:384-6, 2007.

ELBAZ, A.; TRANCHANT, C. Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease. **Journal of the neurological sciences**, v. 262, n. 1-2, p. 37–44, 2007.

EXNER, N.; LUTZ, A.K; HAASS, C.; WINKLHOFER, K.F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. **EMBO Journal**, 26;31(14):3038-62, 2012.

FACUNDO, V.A.; ANDRADE, C.H.S.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFFORD, C.D. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 411–415, 1993.

FARINA et al. Protective effects of *Palygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **Journal of Pharmacy and Pharm.** (57): 1503-1508, 2005.

FENG, L. R., & MAGUIRE-ZEISS, K. A. Gene therapy in Parkinson's disease: Rationale and current status. **CNS Drugs**, 24(3), 177–192, 2010.

FLOEL, A. et al. Levodopa increases memory encoding and dopamine release in the striatum in the elderly. **Neurobiology of Aging**, (2):267-79, 2008.

FOWLER, S.C.; ZARCONE, T.J.; VORONTOSOVA, E.; CHEN, R. Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. **International Journal of Developmental Neuroscience**. 20(3-5):309-21, 2002.

FOX, S.H.; BROTHIE, J.M. 5-HT_{2C} receptor binding is increased in the *substantia nigra pars reticulata* in Parkinson's disease. **Movement Disorders**. 15:1064–1069, 2000.

FREUND, H.J. Mechanisms of voluntary movements. **Parkinsonism & Related Disorders**, v.9, p.55-9, 2002.

FYRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTROM, C.; VOURELA, H.; HILTUNEM, R.; VURELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79:169–77, 2002.

GERFEN, C.R.; ENGBER, T.M.; MAHAN, L.C.; SUSEL, Z.; CHASE, T.N.; MONSMA, F.J. Jr; SIBLEY, D.R. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. **Science**. Dec 7;250(4986):1429-32, 1990.

GERFEN, C.R.; SURMEIER, D.J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. **Annual Review of Neuroscience**, v. 34, p. 441–466, 2011.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms and new therapeutic strategies. **FASEB J**, v. 6, p. 825–831, 1992.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

GRAHAME-SMITH, D.G. Studies in vivo on the relationship between brain tryptophan, brain 5-HT synthesis and hyperactivity in rats treated with a monoamine oxidase inhibitor and L-tryptophan. **Journal of Neurochemistry**, v. 18, pp. 1053-1066, 1971.

GRAY, L.; VAN DEN BUUSE, M.; SCARR, E.; DEAN, B.; HANNAN, A.J. Clozapine reverses schizophrenia-related behaviours in the metabotropic glutamate receptor 5 knockout mouse: association with N-methyl-D-aspartic acid receptor up-regulation. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 12, p. 45–60, 2009.

GRAYBIEL, A. M. The basal ganglia: Learning new tricks and loving it. **Current Opinion in Neurobiology**, 15 (6), 638–644, 2005.

- GRIGGS, J.; METCALFE, J.C.; HESKETH, R. Targeting tumour vasculature: the development of combretastatin A4. **Lancet Oncology**, v. 2:82–7, 2001.
- HAGAN, J.J.; MIDDLEMISS, D.N.; SHARPE, P.C.; POSTE, G.H. Parkinson's disease: Prospects for improved drug therapy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 18, p. 156–163, 1997.
- HAMETNER, E.; SEPPI, K.; POEWE, W. The clinical spectrum of levodopa-induced motor complications. **Journal of Neurology**, 257(Suppl 2):S268–75, 2010.
- HARE, D.J.; ADLARD, P.A.; DOBLE, P.A.; FINKELSTEIN, D.I. Metallobiology of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Metallomics*, v. 5(2):91-109, 2013.
- HAWKES, C.H. The prodromal phase of sporadic Parkinson's disease: does it exist and if so how long is it? **Movement Disorders**, v. 23, p. 1799–1807, 2008.
- HELMESTE, D.M.; SEEMAN, P. Amphetamine-induced hypolocomotion in mice with more brain D2 dopamine receptors. *Psychiatry Research*, v. 7, pp. 351–9, 1982.
- HIRSCH, E.C.; PERIER, C.; ORIEUX, G.; FRANCOIS, C.; FEGER, J.; YELNIK, J.; VILA, M.; LEVY, R.; TOLOSA, E.S.; MARIN, C.; TRINIDAD HERRERO, M.; OBESO, J.A.; AGID, Y. Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. **Trends in Neuroscience**. 23(10 Suppl): S78–S85, 2000.
- HIRSCH, E.C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurology**, 8(4):382-97, 2009.
- HIRSCH, E.C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 18 Suppl 1:S210-2, 2012.
- HOFFMAN, E.M.; MILLER, K.E. Peripheral inhibition of glutaminase reduces carrageenan-induced Fos expression in the superficial dorsal horn of the rat. **Neuroscience Letters**, v. 472, p. 157–216, 2010.
- HORINOUCHI, C.D.S.; MENDES, D.A.G.B.; SOLEY, B.S.; et al. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 311–9, 2013.
- INSIGHT, 2014. **EP 149 - Monitor de Atividades - IR**. Disponível em: <<http://insightltda.com.br/insight-equipamento-cientifico-261-Monitor-de-Atividades---IR#pag>>. Acesso em: 10 agosto, 2014.
- ISAACSON, S.H.; HAUSER, R.A. Improving symptom control in early Parkinson's disease. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**. 2(6):29–41, 2009.
- IZUMI, Y.; YAMAMOTO, N.; MATSUO, T.; WAKITA, S.; TAKEUCHI, H.; KUME, T.; KATSUKI, H.; SAWADA, H.; AKAIKE, A.. Vulnerability to glutamate toxicity of dopaminergic neurons is dependent on endogenous dopamine and MAPK activation. **Journal of Neurochemistry**, v. 110(2):745-55, 2009.

JAKOWEC, M.W.; NIXON, K.; HOGG, L.; MCNEILL, T.; PETZINGER, G.M. Tyrosine hydroxylase and dopamine transporter expression following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse nigrostriatal pathway. **Journal of Neuroscience Research**, v. 76, p. 539–550, 2004.

JÁIDAR, O.; CARRILLO-REID, L.; HERNÁNDEZ, A.; DRUCKER-COLÍN, R.; BARGAS, J.; HERNÁNDEZ-CRUZ, A. Dynamics of the Parkinsonian striatal microcircuit: entrainment into a dominant network state. **Journal of Neuroscience**. 25;30(34):11326-36, 2010.

JENNER, P. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione level's in Parkinson disease. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 146, p. 6-13, 1993.

JENNER, P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 13(Suppl 1):24–34, 1998.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 53(Suppl 3), S26–S36, 2003.

KANDEL, E.R.; SQUIRE, L.R. *Memória: da mente às moléculas*. Porto Alegre: Artmed, 2003. 251 p

KANE, D.; LOCKHART, J.C.; BALINT, P.V.; MANN, C.; FERRELL, W.R.; MCINNES, I.B. Protective effect of sensory denervation in inflammatory arthritis. **Annals of Rheumatic Disease**, v. 64, p. 325–327, 2005.

KITA H.; KITAI S.T. (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. **Journal of Comparative Neurology**, v. 260, p. 435–452, 1987.

KORCZYN, A.D. **Psychopharmacology**: the fourth generation of progress. New York USA: Raven Press, 1995.

KOUTSILIERI, E.; RIEDERER, P. Excitotoxicity and new antiglutamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 13(Suppl. 3), S329–S331, 2007.

KOZINA, E.A.; KHAKIMOVA, G.R.; KHAINDRAVA, V.G.; KUCHERYANU, V.G.; VOROBYEVA, N.E.; KRASNOV, A.N.; GEORGIEVA, S.G.; KERKERIAN-LEGOFF, L.; UGRUMOV, M.V. Tyrosine hydroxylase expression and activity in nigrostriatal dopaminergic neurons of MPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism. **Journal of the Neurological Sciences**, 15;340(1-2):198-207, 2014.

KUROSAKI, R.; MURAMATSU, Y.; KATO, H.; ARAKI, T. Biochemical, behavioral and immunohistochemical alterations in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, 78:143–53, 2004.

LANGSTON, J.W. et al. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog sintese. **Science**. 219:979-80, 1983.

LANGSTON, J.W., AND IRWIN, I. MPTP: current concepts and controversies. **Clinical Neuropharmacology**, 9, 485–507, 1986.

LANGSTON, J.W. et al. Evidence of active nerve cell degeneration in the *substantia nigra* of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Annals of Neurology**, 46: 598–605, 1999.

LANGSTON, J.W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Annals of Neurology**. 59, 591–596, 2006.

LESAGE, S., & BRICE, A. Role of Mendelian genes in “sporadic” Parkinson’s disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18 (Suppl 1), S66–S70, 2012.

LEVEY, A.I.; HERSCH, S.M.; RYE, D.B.; SUNAHARA, R.K.; NIZNIK, H.B.; KITT, C.A.; PRICE, D.L.; MAGGIO, R.; BRANN, M.R.; CILIAK, B.J. Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1;90(19):8861-5, 1993.

LIEBETANZ, D.; BAIER, P.C.; PAULUS, W.; MEUER, K.; BAHR, M.; WEISHAUPT, J.H. A highly sensitive automated complex running wheel test to detect latent motor deficits in the mouse MPTP model of Parkinson’s disease. **Experimental Neurology**, v. 205, pp. 207–13, 2007.

LIRA, S.R.D.; ALMEIDA, R.N.; ALMEIDA, F.R.C.; OLIVEIRA, F.S.; DUARTE, J.C. Preliminary studies on the analgesic properties of the ethanol extract of *C. leprosum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40:213–5, 2002.

LIMA, M.M.S.; REKSIDLER, A.B.; ZANATA, S.M.; MACHADO, H.B.; TUFIK, S.; VITAL, M.A. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain Research**, v. 1101:117-125, 2006.

LOPES, L. S.; MARQUES, R. B.; PEREIRA, S. S.; et al. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and (-) epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 12, p. 1184–1192, 2010.

LONGHI-BALBINOT, D.T.; PIETROVSKI, E.F.; GADOTTI, V.M.; MARTINS, D.F.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, A.R. Spinal antinociception evoked by the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 623, p. 30-36, 2009.

LONGHI-BALBINOT, D.T.; LANZMASTER, D.; BAGGIO, C.H.; SILVA, M.D.; CABRERA, C.H.; FACUNDO, V.A.; SANTOS, A.R. Anti-inflammatory effect of triterpene 3b, 6b, 16b-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 59–64, 2012.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson’s disease: Dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nature Reviews Neuroscience**, 3(12), 932–942, 2002.

LUCENA et al. *Cipura paludosa* extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. **Basic & Clin Pharmacology & Toxicology**.;101(2):127-31, 2007.

LUCENA et al. *Cipura paludosa* attenuates long-term behavioural deficits in rats exposed to methylmercury during early development. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73(6):1150-8, 2010.

LUCHTMAN, D.W.; SHAO, D.; SONG, C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Physiology & Behavior**, 4;98(1-2):130-8, 2009.

MARSDEN, C.D.; PARKES, J.D. Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. **Lancet**, v. 12;1(8007):345-9, 1977.

MARTIN, I.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Recent advances in the genetics of Parkinson's disease. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 12:301-25, 2011.

MARTINI, N.D.; KATERERE, D.R.P.; ELOFF, J.N. Biological activity of antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93:207–12, 2004.

MARYLAND, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2005.

MATSUURA, K.; KABUTO, H.; MAKINO, H.; OGAWA, N. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. **Journal of neuroscience methods**, v. 73, n. 1, p. 45–8, 1997.

MCGAW, L.J.; RABE, T.; SPARG, S.G.; JAGER, A.K.; ELOFF, J.N.; STADEN VAN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75:45–50, 2001.

MCGEEHAN, A.J.; JANAK, P.H.; OLIVE, M.F. Effect of the mGluR5 antagonist 6-methyl-2-(phenylethynyl)pyridine (MPEP) on the acute locomotor stimulant properties of cocaine, D-amphetamine, and the dopamine reuptake inhibitor GBR12909 in mice. **Psychopharmacology**, v. 174, p. 266–273, 2004.

MCNEARNEY, T.A.; MA, Y.; CHEN, Y.; TAGLIALATELA, G.; YIN, H.; ZHANG, W.R.; WESTLUND, K.N. A peripheral neuroimmune link: glutamate agonists upregulate NMDA NR1 receptor mRNA and protein, vimentin, TNF-alpha, and RANTES in cultured human synoviocytes. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, p. 84–98, 2010.

MILLER, G.W.; STALEY, J.K.; HEILMAN, C.J.; PEREZ, J.T.; MASH, D.C.; RYE, D.B.; LEVEY, A.I. Immunohistochemical analysis of dopamine transporter protein in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 41(4):530-9, 1997.

MILLER, K.E., HOFFMAN, E.M., SUTHARSHAN, M., SCHECHTER, R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary affects: physiological and patho- physiological mechanisms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 130, p. 283–309, 2011.

MISSALE, C.; NASH, S.R.; ROBINSON, S.W.; JABER, M.; CARON, M.G. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 189–225, 1998.

MIYAKAWA, T.; YAMADA, M.; DUTTARROY, A.; WESS, J. Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 5239–5250, 2001.

MODIGH, K. Central and peripheral effects of 5-hydroxytryptophan on motor activity in mice. **Psychopharmacology**, v. 23, pp. 48-54, 1972.

MORISSETTE, M.; GOULET, M.; CALON, F.; FALARDEAU, P.; BLANCHET, P.J.; BÉDARD, P.J.; DI PAOLO, T. Changes of D1 and D2 dopamine receptor mRNA in the brains of monkeys lesioned with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: correction with chronic administration of L-3,4-dihydroxyphenylalanine. **Molecular Pharmacology**, 50(5):1073-9, 1996.

NABHA, S.M.; WALL, N.R.; MOHAMMED, R.M.; PETTIT, G.R.; AL-KATID, A.M. Effects of combretastatin A-4 prodrug against a panel of malignant human B- lymphoid cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 11:385–92 2000.

NAM, N.H. Combrestatin A-4 analogues as antimitotic antitumor agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10:1697–722, 2003.

NEVE, K.A., SEAMANS, J.K., TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine receptor signaling. **Journal of Receptors and Signal Transduction Research**, v. 24, p. 165–205, 2004.

NICHOLSON, G.; PEREIRA, A.C.; HALL, G.M. Parkinson's Disease and Anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v. 89, n. 06, p. 904-16, 2002.

NUNES, P.H.M.; CAVALCANTI, P.M.; GALVÃO, S.M.; MARTINS, M.C. Antiulcerogenic activity of *Combretum leprosum*. **Pharmazie**, v. 64, p. 58–62, 2009.

NUTT, J.G.; CARTER, J.H.; SEXTON, G.J. The dopamine transporter: importance in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 55(6):766-73, 2004.

NUYTEMANS, K.; THEUNS, J.; CRUTS, M.; VAN BROECKHOVEN, C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. **Human Mutation**, v. 31, p. 763–780, 2010.

NUZZO, D. et al. Inflammatory mediators as biomarkers in brain disorders. **Inflammation**, v. 37(3):639-48, 2014.

OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; BENITEZ-TEMINO, B.; BLESAS, F.J.; GURIDI, J.; MARIN, C.; RODRIGUEZ, M. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23 (Suppl 3):S548–S559, 2008.

OGAWA, N., HIROSE, Y., OHARA, S., et al. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 50, p. 435–441, 1985.

OLAJIDE, A.O.; MAKINDE, J.M.; OKPAKO, D.T. Evaluation of the anti-inflammatory property of the extract of *Combretum micranthum* G Don (Combretaceae). **Inflammopharmacology**, v. 11:293–8, 2003.

OLANOW, C.W.; STERN, M.B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. **Neurology**, v. 72 (21suppl 4):S1-S136, 2009.

O'SULLIVAN, S.S. et al. Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. **Movement Disorders**, v. 23, p. 101–106, 2008.

PAN-MONTOJO, F.; REICHMANN, H. Considerations on the role of environmental toxins in idiopathic Parkinson's disease pathophysiology. **Translational neurodegeneration**, v.3, n.1, p. 10, 2014.

PARKER, W.D. JR; PARKS, J.K.; SWERDLOW, R.H. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. **Brain Research**, 16;1189:215-8, 2008.

PATSOUKIS, N., ZERVOUDAKIS, G., GEORGIU, C.D., ANGELATOU, F., MATSOKIS, N.A., PANAGOPOULOS, N.T. Thiol redox state and lipid and protein oxidation in the mouse striatum after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. **Epilepsia**, v. 46, p. 1205-1211, 2005.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2. San Diego: **Academic Press**; 10.1111/j.1469-7580.2004.00264.x, 2001.

PEZZOLI, G.; ZINI, M. Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 11(4):627-635, 2010.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β ,6 β ,16 β -trihydroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology, Biochemistry And Behavior**, v. 83, p. 90-99, 2006.

POEWE, W. The need for neuroprotective therapies in Parkinson's disease: a clinical perspective. **Neurology**. V. 66, 10 Suppl 4.:S2-9, 2006.

POLYMEROPOULOS, M.H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; IDE, S.E.; DEHEJIA, A.; DUTRA, A.; PIKE, B.; ROOT, H.; RUBENSTEIN, J.; BOYER, R.; STENROOS, E.S.; CHANDRASEKHARAPPA, S.; ATHA-NASSIADOU, A.; PAPAPETROPOULOS, T.; JOHNSON, W.G.; LAZZARINI, A.M.; DUVOISIN, R.C.; DIORIO, G.; GOLBE, L.I.; NUSSBAUM, R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson disease. **Science**, v. 276, p. 2045–2047, 1997.

PORTAL BRASIL. Saúde. **Cerca de 200 mil brasileiros sofrem do mal de Parkinson**. Publicado em: 10 ago. 2010, 10:53. Modificado em: 12 ago. 2010, 02:05. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2010/08/cerca-de-200-mil-brasileiros-sofrem-do-mal-de-parkinson>>. Acesso em: 15 jun. 2014, 17:05:30.

PRZEDBORSKI, S.; TIEU, K.; PERIER, C.; VILA, M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 36, p. 375–379, 2004.

QPS, 2014. **Pole test**. Disponível em: <<http://www.qps-austria.com/pages/behavior/general-health-and-motor-ability-tests/pole-test.php?lang=DE>>. Acesso em: 10 agosto, 2014.

ROJAS, P.; RUIZ-SÁNCHEZ, E.; ROJAS, C.; OGREN, S.O. Ginkgo biloba extract (EGb 761) modulates the expression of dopamine-related genes in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. **Neuroscience**, v. 25, p. 223:246-57, 2012.

ROTH, R.H. Dopamine autoreceptors: pharmacology, function and comparison with post-synaptic dopamine receptors. **Communications in Psychopharmacology**, v. 3, p. 429–445, 1979.

ROUSSELET, E.; JOUBERT, C.; CALLEBERT, J.; PARAIN, K.; TREMBLAY, L.; ORIEUX, G.; LAUNAY, J.M.; COHEN-SALMON, C.; HIRSCH, E.C. Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. **Neurobiology of Disease**, v. 14(2):218-28, 2003.

SANGO, K.; MADONALD, M.P.; CRAWLEY, J.N.; MACK, M.L.; TIFFT, C.J.; SKOP, E.; STARR, C.M.; HOFFMANN, A.; SANDHOFF, K.; SUZUKI, K.; PROIA, R.L. Mice lacking both subunits of lysosomal-hexosaminidase display gangliosidosis and mucopolysaccharidosis. **Nature Genetics**, v. 13, p. 348–352, 1996.

SCHAPIRA, A.H.; COOPER, J.M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J.B.; MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, 1:1269, 1989.

SCHAPIRA, A.H. Etiology of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 66 (10 Suppl 4), S10-23, 2006.

SEDELIS, M.; HOFELE, K.; AUBURGER, G.W.; MORGAN, S.; HUSTON, J.P.; SCHWARTING, R.K. MPTP susceptibility in the mouse: behavioral, neurochemical, and histo- logical analysis of gender and strain differences. **Behavior Genetics**, v. 30, p. 171–82, 2000.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, p. 360–365, 2003.

SHULMAN, J.M.; DE JAGER, P.L.; FEANY, M.B. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. **Annual Review of Pathology**, 6:193-222, 2011.

SMEYNE, R.J.; JACKSON-LEWIS, V. The MPTP model of Parkinson's disease. **Molecular Brain Research**, v. 134, p. 57–66, 2005.

SOUZA, M.A., OLIVEIRA, M.S., FURIAN, A.F., RAMBO, L.M., RIBEIRO, L.R., LIMA, F.D., DALLA CORTE, L.C., SILVA, L.F., RETAMOSO, L.T., DALLA CORTE, C.L., PUNTEL, G.O., DE AVILA, D.S., SOARES, F.A., FIGHERA, M.R., DE MELLO, C.F., ROYES, L.F. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, p. 811-823, 2009.

SPILLANTINI, M.G., SCHMIDT, M.L., LEE, V.M.Y., TROJANOWSKI, J.Q., JAKES, R., GOEDERT, M. alpha-Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, p. 839–840, 1997.

STAYTE, S., VISSSEL, B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 22, p. 8-113, 2014.

STOCCHI, F. The therapeutic concept of continuous dopaminergic stimulation (CDS) in the treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, 15S3 S68–S71, 2009.

STOCCHI, F. Therapy for Parkinson's disease: what is in the pipeline? **Neurotherapeutics**. Jan; 11(1):24-33, 2014.

SUBRAMANIAM, S.R.; CHESSELET, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, v. 0, p.17-32, 2013.

SUNDAL, C., et al. Autosomal dominant Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 18 (Suppl 1), S7–S10, 2012.

SURMEIER, D.J., et al. The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. **Progress in Brain Research**, v. 183, p. 149–167, 2010.

TANABE, L.M.; SUTO, N.; CREEKMORE, E.; STEINMILLER, C.L.; VEZINA, P. Blockade of D2 dopamine receptors in the VTA induces a long-lasting enhancement of the locomotor activating effects of amphetamine. **Behavioral Pharmacology**, v. 15(5-6):387-95, 2004.

THIBAUT, F.; FAUCHEUX, B.A.; MARQUEZ, J.; VILLARES, J.; MENARD, J.F.; AGID, Y.; HIRSCH, E.C. Regional distribution of monoamine vesicular uptake sites in the mesencephalon of control subjects and patients with Parkinson's disease: a postmortem study using tritiated tetrabenazine. **Brain Research**, 692:233–243, 1995.

UNIVERSITY OF WASHINGTON, 2014. **Grip strength**. Disponível em: <<http://depts.washington.edu/compmed/ivs/grip.html>>. Acesso em: 10 agosto, 2014.

VÁZQUEZ-CLAVERIE, M.; GARRIDO-GIL, P.; SAN SEBASTIÁN, W.; IZAL-AZCÁRATE, A.; BELZUNEGUI, S.; MARCILLA, I.; LÓPEZ, B.; LUQUIN, M.R. Acute and chronic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administrations elicit similar microglial activation in the substantia nigra of monkeys. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 68, p. 977–984, 2009.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, 4(5):365-75, 2003.

WAKABAYASHI, K., et al. The Lewy body in Parkinson's disease: Molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. **Neuropathology**, v. 27 (5), p. 494–506, 2007.

WEST, B.D. et al. Amphetamine-induced locomotor activity is reduced in mice following MPTP treatment but not following selegiline/MPTP treatment. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, 84(1):158-61, 2006.

WICHMANN, T.; DELONG, M.R. Neurobiology: Oscillations in the basal ganglia. **Nature**, v. 400, p. 621-622, 1999.

WILLIS, G.L.; DONNAN, G.A. Histochemical, biochemical and behavioural consequences of MPTP treatment in C-57 black mice. **Brain Research**, 402(2):269-74, 1987.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.O.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**. 26 Suppl 1:S1-58, 2011.

YACOUBIAN, T.A.; STANDAERT, D.G. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1792 (7), p. 676–687, 2009.

ZABORSZKY, L.; VADASZ, C. The Midbrain Dopaminergic System: Anatomy and Genetic Variation in Dopamine Neuron Number of Inbred Mouse Strains. **Behavior Genetics**, v. 31, n. 1, 2001.

ZAPATA, A. et al. Detection and Quantification of Neurotransmitters in Dialysates. **Current Protocols in Neuroscience**. CHAPTER: Unit–7.430, 2009.

ZELENKA, M.; SCHAEFERS, M.; SOMMER, C. Intraneural injection of interleukin-1b and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. **Pain**, v. 116, p. 257–263, 2005.