

**EDUARDO LUIZ GASNHAR MOREIRA**

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UMA FRAÇÃO RICA  
EM PROANTOCIANIDINAS OBTIDA DA *Croton celtidifolius*  
SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E EM UM MODELO  
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON.**

**Florianópolis – SC  
2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE UMA FRAÇÃO RICA  
EM PROANTOCIANIDINAS OBTIDA DA *Croton celtidifolius*  
SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E EM UM MODELO  
ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON.**

**EDUARDO LUIZ GASNHAR MOREIRA**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Farmacologia  
do Centro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia.**

**Área de concentração: Farmacologia  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria  
Ribeiro do Valle Nicolau.**

**Co-orientador: Prof. Dr. Rui Daniel  
Schröder Prediger.**

**Florianópolis - SC  
2010**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

M638a Moreira, Eduardo Luiz Gasnhar  
Avaliação farmacológica de uma fração rica em proantocianidinas obtida de *Croton celtidifolius* sobre o sistema nervoso central e em um modelo animal da doença de Parkinson [dissertação] / Eduardo Luiz Gasnhar Moreira ; orientadora, Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau. - Florianópolis, SC, 2010.  
96 p. : il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui bibliografia

1. Farmacologia. 2. *Croton celtidifolius*. 3. Proantocianidinas. 4. Catequina. 5. Parkinson, Doença de. I. Nicolau, Rosa Maria Ribeiro do Valle. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

Dedico este trabalho aos meus pais, Geovani e Neuza, exemplos de caráter e honestidade, por todo o apoio, carinho e educação em todas as etapas de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

- À Professora **Dr<sup>a</sup>. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau** por possibilitar a execução deste trabalho, pela confiança em mim depositada desde a iniciação científica e, sobretudo, pela amizade, incentivo e ensinamentos durante todo o período em que trabalhamos juntos.
- Ao Professor **Dr. Rui Daniel Schröder Prediger** pela orientação, sobretudo pelo voto de confiança desde o meu primeiro contato em 2007. Agradeço-lhe pela oportunidade, convivência e por todos os ensinamentos que contribuíram na minha formação acadêmico-científica. Por ser mais que um orientador, mas um grande amigo durante esses anos de convívio.
- Aos Professores membros da banca examinadora do mestrado, **Dr. Giles Alexander Rae, Dr. Juliano Ferreira e Dr<sup>a</sup> Áurea Elisabeth Linder**, pela atenção dispensada na leitura da dissertação e sugestões para o aprimoramento desta versão final.
- A todos os **Professores do Departamento de Farmacologia** da UFSC, pela qualidade do Curso de Pós-Graduação e pelos conhecimentos transmitidos.
- Ao **Dr. Filipe Silveira Duarte**, pelo companheirismo e por todo o auxílio no desenvolvimento do trabalho e conhecimentos transmitidos.
- Ao **Dr. Jarbas Mota Siqueira Junior** pelo auxílio nos experimentos e técnicas de *western blot*. Mas em especial, por toda a amizade e ensinamentos durante todo o tempo de convívio, desde minha iniciação científica.
- Ao Professor **Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti** e ao **Heros Horst**, pelo fornecimento da fração e pelo auxílio e atenção em todos os momentos em que precisei.
- Às Professoras **Dr<sup>a</sup>. Andreza Fabro de Bem e Dr<sup>a</sup>. Alexandra Latini**, e seus alunos **Gianni e Jade**, por toda a colaboração nos experimentos bioquímicos.
- À **Dr<sup>a</sup>. Cláudia P. Figueiredo** pela colaboração nos experimentos de imunohistoquímica.
- À **Cristiane**, minha fonte de inspiração, onde sempre encontrei incentivo, carinho e amor incondicional.

- Às companheiras do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, **Andreza, Suelen, Karin, Christiane, Paula, Marcela, Tamirys, Mabel e Mariana Duz**, pela convivência, amizade e momentos agradáveis que passamos. Em especial, agradeço à **Mariana Appel Hort** e à **Silvia DalBó**, pela amizade, apoio e constante troca de conhecimentos. Por contribuírem enormemente na minha formação acadêmico-científica, sem as quais certamente esse trabalho não teria sido possível.
- Aos companheiros do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas, **Adalberto, Sandro, Filipe, Néelson, Xikota, Róbson, Paulo, Rodrigo e Marcelo**. Em especial agradeço ao **Daniel Rial** e ao **Aderbal Aguiar**, pela grande amizade, companheirismo, momentos de descontração e troca de informações.
- Aos amigos **Pamplona, Pablo, Rafael, Assini, Tiago, Giliard, Rafael Dutra, Eduardo, Rodrigo, Ney, Geison, Gustavo, Rimenez, Fabrício, Vecchi** e **todos os alunos do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia** pela troca de informações e companheirismo.
- Aos funcionários do departamento **Pedro, Murilo, Rédna, Diana e Rita** pela atenção e ajuda prestada.
- Aos **animais** que involuntariamente cederam suas vidas para o progresso da ciência.
- Ao **CNPq** pelo apoio financeiro.
- **A todas as pessoas não mencionadas** que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÇÕES .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABELAS .....	xi
LISTA DE ESQUEMAS .....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Polifenóis e Flavonóides .....	2
1.1.1. Flavonóides com atividade no sistema nervoso central .....	5
1.1.2. Flavonóides com atividade neuroprotetora .....	5
1.2. Doença de Parkinson .....	10
1.2.1. Etiologia da doença de Parkinson .....	10
1.2.2. Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson .....	12
1.3. <i>Croton celtidifolius</i> Baill (Euphorbiaceae) .....	13
2. OBJETIVOS .....	16
2.1. Objetivo geral .....	16
2.2. Objetivos específicos .....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1. Considerações éticas .....	17
3.2. Animais .....	17
3.3. Preparações, drogas e soluções .....	17
3.3.1. Material botânico .....	17
3.3.2. Extração e caracterização da FRP .....	18
3.3.3. Drogas padrão e soluções .....	19
3.4. Delineamento experimental .....	19
3.4.1. Protocolo experimental 1: Avaliação farmacológica da FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> sobre o sistema nervoso central .....	19
3.4.2. Protocolo experimental 2: Avaliação dos efeitos neuroprotetores da FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> em um modelo experimental da doença de Parkinson .....	21
3.5. Equipamentos e testes farmacológicos .....	22
3.5.1. Administração intranasal de MPTP .....	22
3.5.2. Testes comportamentais .....	22



3.5.2.1. Teste da caixa de atividade .....	22
3.5.2.2. Teste do campo aberto .....	23
3.5.2.3. Teste da ptose palpebral .....	23
3.5.2.4. Hipnose induzida por éter etílico .....	23
3.5.2.5. Comportamento estereotipado induzido por apomorfina .....	24
3.5.2.6. Labirinto em cruz elevado .....	24
3.5.2.7. Convulsões induzidas por pentilenotetrazol .....	25
3.5.2.8. Temperatura retal .....	25
3.5.2.9. Teste do reconhecimento social .....	26
3.5.2.10. Teste do nado forçado .....	26
3.5.3. Ensaio neuroquímico .....	27
3.5.3.1. Atividade do complexo-I da cadeia respiratória mitocondrial .....	27
3.5.3.2. Ensaio de <i>western blot</i> .....	27
3.5.3.3. Ensaio de imunohistoquímica .....	28
3.6. Análise estatística .....	29
4. RESULTADOS .....	30
4.1. Avaliação farmacológica da FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> sobre o sistema nervoso central .....	30
4.2. Avaliação dos efeitos neuroprotetores da FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> em um modelo experimental da doença de Parkinson .....	38
4.2.1. Testes comportamentais .....	38
4.2.2. Testes neuroquímicos .....	42
5. DISCUSSÃO .....	49
6. CONCLUSÕES .....	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## LISTA DE ABREVIACES

<b>ATP</b>	Tri-fosfato de adenosina
<b>COMT</b>	Catecol- <i>O</i> -metiltransferase
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DAT</b>	Transportador de dopamina
<b>DNA</b>	cido desoxirribonuclico
<b>DOPAC</b>	cido 3,4-diidroxifeniloactico
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>EDTA</b>	cido etilenodiaminotetraactico
<b>EGCG</b>	Epigalocatequina-3-galato
<b>ERO</b>	Espcie reativa do oxignio
<b>FRP</b>	Frao rica em proantocianidinas
<b>GABA</b>	cido $\gamma$ -aminobutrico
<b>GMPc</b>	Mono-fosfato cclico de guanosina
<b>HVA</b>	cido homovanlico
<b>i.n.</b>	Via intranasal
<b>i.p.</b>	Via intraperitoneal
<b>LCE</b>	Labirinto em cruz elevado
<b>MAPK</b>	Protena quinase ativada por mitgeno
<b>MAO-B</b>	Monoamina oxidase - B
<b>MEKC</b>	Cromatografia eletrocnica micelar
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>NO</b>	xido nítrico
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PTZ</b>	Pentilenotetrazol
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNpc</b>	Substância negra parte compacta
<b>TH</b>	Tirosina hidroxilase

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura básica dos flavonóides .....	4
<b>Figura 2</b>	Estrutura básica dos flavan-3-óis .....	4
<b>Figura 3</b>	<i>Croton celtidifolius</i> .....	14
<b>Figura 4</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (1 - 30 mg/kg) na atividade locomotora de ratos avaliada na caixa de atividade durante 30 min. ....	31
<b>Figura 5</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (1 - 30 mg/kg) na atividade locomotora de ratos avaliada através do número de cruzamentos (Painel A) e atos de levantar (Painel B) no campo aberto durante 5 min. ....	32
<b>Figura 6</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (3 - 30 mg/kg) na hipnose induzida por éter etílico em ratos. ....	33
<b>Figura 7</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 - 60 mg/kg) sobre a ptose palpebral em ratos.....	34
<b>Figura 8</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (3 - 30 mg/kg) no comportamento estereotipado induzido por apomorfina (0.5 mg/kg; s.c.) em ratos. ....	35
<b>Figura 9</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (3 - 30 mg/kg) na temperatura retal de ratos. ....	38
<b>Figura 10</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) na atividade locomotora de ratos avaliada no campo aberto durante 5 min, 6 dias após a administração intranasal de MPTP .....	39
<b>Figura 11</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) na memória olfativa de curta duração de ratos avaliada no teste de reconhecimento social, 10 dias após a administração intranasal de MPTP .....	40

<b>Figura 12</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) no comportamento de ratos avaliado no teste do nado forçado, 16 dias após a administração intranasal de MPTP .....	41
<b>Figura 13</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) na locomoção de ratos avaliada na caixa de atividade, 33 dias após a administração intranasal de MPTP.....	42
<b>Figura 14</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (3 dias) com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) na atividade do complexo-I mitocondrial, 6 horas após a administração intranasal de MPTP, no bulbo olfatório (Painel A) e no estriado (Painel B). .....	44
<b>Figura 15</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (3 dias) com a (10 mg/kg) obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) na atividade do complexo-I mitocondrial na SNpc, 6 horas após a administração intranasal de MPTP .....	45
<b>Figura 16</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) na expressão da enzima tirosina hidroxilase no bulbo olfatório, 7 dias após a administração intranasal de MPTP. ....	46
<b>Figura 17</b>	Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (10 mg/kg) na expressão da enzima tirosina hidroxilase na SNpc, 33 dias após a administração intranasal de MPTP.....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Principais classes de polifenóis .....	3
<b>Tabela 2 -</b>	Exemplos de polifenóis com ações neuroprotetoras caracterizadas. ....	6
<b>Tabela 3 -</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (0.3 – 3 mg/kg) no comportamento de ratos avaliado no labirinto em cruz elevado. ....	36
<b>Tabela 4 -</b>	Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP obtida da <i>C. celtidifolius</i> (3 - 30 mg/kg) nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol (60 mg/kg; i.p.) em ratos. ....	37

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> -	Resumo do protocolo experimental 1 .....	20
<b>Esquema 2</b> -	Resumo do protocolo experimental 2 .....	21

## RESUMO

No presente estudo investigamos as possíveis propriedades psicofarmacológicas e neuroprotetoras da fração rica em proantocianidinas (FRP) obtida das cascas da *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae) em ratos. Para tal finalidade, foram utilizados testes comportamentais classicamente empregados na triagem inicial de drogas com atividade sobre o sistema nervoso central e um modelo experimental da doença de Parkinson (DP). A administração intraperitoneal (i.p.) aguda da FRP (10 ou 30 mg/kg) diminuiu significativamente a atividade locomotora espontânea dos animais no campo aberto e na caixa de atividade, e prolongou a duração da hipnose induzida pelo éter etílico, sugerindo um efeito do tipo hipnosedativo. No labirinto em cruz elevado, a FRP (0,3 ou 3 mg/kg) aumentou significativamente a frequência de entradas nos braços abertos do aparato, indicando um putativo efeito ansiolítico. Além destes efeitos, a FRP (10 ou 30 mg/kg) também aumentou a latência para a primeira convulsão induzida pelo pentilenotetrazol (60 mg/kg; i.p.), induziu ptose palpebral, hipotermia e atenuou o comportamento estereotipado induzido pela apomorfina (0,5 mg/kg; s.c.) na dose de 30 mg/kg. Estes achados sugerem que a FRP possui um amplo espectro de propriedades psicofarmacológicas como hipnosedativa, anticonvulsivante, neuroléptica e ansiolítica. No presente estudo, também foram avaliados os efeitos neuroprotetores do pré-tratamento com a FRP (10 mg/kg; i.p.), durante cinco dias, nas alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração intranasal (i.n.) de MPTP (1 mg/narina) em ratos. A FRP foi capaz de prevenir os prejuízos cognitivos, emocionais e motores induzidos pela administração i.n. do MPTP, como também impediu a inibição da atividade do complexo-I mitocondrial e a degeneração dos neurônios dopaminérgicos do bulbo olfatório e substância negra causados pelo MPTP. Nossos resultados corroboram com outros estudos prévios acerca das propriedades neuroprotetoras dos polifenóis, sugerindo a possibilidade destes compostos serem ferramentas úteis em estratégias de neuroproteção.

## ABSTRACT

The present study investigated the possible psychopharmacological and neuroprotective properties of the proanthocyanidin-rich fraction (PRF) obtained from the bark of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae) in rats. For this purpose, we used behavioral tests classically used in the initial screening of drugs with central nervous system (CNS) activity. Acute intraperitoneal (i.p.) administration of PRF (10 or 30 mg/kg) significantly decreased the spontaneous motor activity in the open field arena and activity cages and enhanced the duration of ethyl ether-induced hypnosis, suggesting a hypnosedative effect. In the elevated plus maze test, the PRF (0.3 or 3 mg/kg, i.p.) increased the frequency of entries into the open arms indicating an anxiolytic-like profile. Moreover, PRF (10 or 30 mg/kg, i.p.) also increased the latency to the first convulsion induced by pentylentetrazole (60 mg/kg, i.p.), induced palpebral ptosis and hypothermia at a dose of 30 mg/kg, and attenuated apomorphine-induced (0.5 mg/kg; s.c.) stereotyped behavior. These findings suggest that the PRF possesses a wide spectrum of psychopharmacological properties such as hypnosedative, anticonvulsant, and anxiolytic effects, and these effects could be attributed to the presence of various catechin and/or proanthocyanidin compounds in the PRF. Pretreatment with PRF (10 mg/kg/day; i.p.), for five consecutive days prior to intranasal (i.n.) administration of MPTP (1 mg/nostril) prevented the cognitive, emotional and motor impairments induced by MPTP, as well as the inhibition of the mitochondrial complex-I activity and the dopaminergic cell death in the olfactory bulb and substantia nigra. Our results favour the view that polyphenols can represent useful tools in strategies for neuroprotection in Parkinson's disease.



## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamentos remonta ao início da história da humanidade. Grandes civilizações forneceram evidências escritas da utilização de plantas para o tratamento de uma variedade de doenças. Todavia, foi somente após o século XIX que o homem começou a isolar princípios ativos de plantas medicinais, sendo um marco especial a descoberta do quinino a partir das cascas da *Cinchona* feita pelos cientistas franceses Caventou e Pelletier. Tais descobertas despertaram interesse nas plantas do Novo Mundo e expedições vasculharam selvas e florestas quase impenetráveis em busca de novos medicamentos (Phillipson, 2001). O isolamento de compostos a partir de produtos naturais foi um passo decisivo para a criação da indústria farmacêutica. Inicialmente, os produtos naturais constituíram a principal fonte de insumos para a preparação de medicamentos (Costa, 2009).

Entretanto, gradativamente os produtos sintéticos ganharam posição de destaque no arsenal terapêutico. O desenvolvimento da Química Combinatória, somada à introdução da tecnologia da triagem de alta capacidade na década de 1990 por parte da indústria farmacêutica, diminuíram sensivelmente o interesse em produtos naturais entre 1984 e 2003, o que se traduziu em um menor volume de investimentos neste setor. Todavia, nos últimos anos, reduziu-se também o número de novos fármacos lançados no mercado, podendo-se observar um ressurgimento no interesse por produtos naturais como fonte de novas substâncias bioativas. Os avanços nas técnicas de separação, purificação e identificação de misturas complexas e diversidades estruturais presentes na natureza são os fatores responsáveis por este renovado interesse (Costa, 2009). Além disso, o notável aumento no número de publicações científicas relacionadas ao estudo de plantas medicinais sinaliza o crescente interesse da comunidade científica e da indústria farmacêutica pelo assunto (Briskin, 2000; De Smet, 2002; Carlini, 2003).

Os benefícios da utilização de plantas medicinais geralmente resultam da combinação de metabólitos secundários presentes nestas (Wink, 2003). Esta afirmação é corroborada pelo fato de as ações terapêuticas das plantas medicinais serem exclusivas para espécies ou grupos particulares, tendo em vista que as combinações de metabólitos secundários são freqüentemente e taxonomicamente distintas (Wink, 2003). Desta forma há um contraste com os metabólitos primários das plantas, como carboidratos, lipídios, proteínas, clorofila e ácidos nucleicos, que são comuns a todas as plantas e estão envolvidos nos

processos metabólicos primários de construção e manutenção de células vegetais (Kaufman et al., 1999; Wink, 2003).

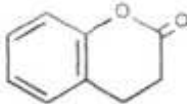
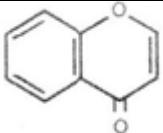
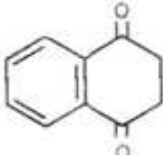
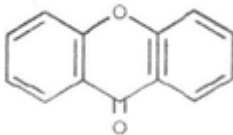
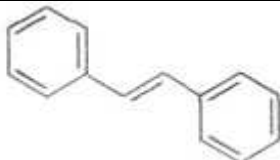
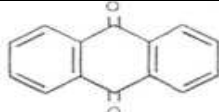
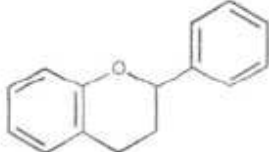
De forma contrária aos fármacos sintéticos baseados em substâncias químicas simples, muitos fitofármacos exercem seus efeitos através de efeitos aditivos e/ou sinérgicos de diversos compostos químicos agindo em alvos únicos ou múltiplos associados a um processo fisiológico. De acordo com Tyler (1999), este sinergismo ou adição de efeitos farmacológicos pode, em alguns casos, ser benéfico, eliminando os efeitos colaterais associados com a predominância de um único xenobiótico no organismo. Esta característica de diversos compostos químicos atuando de forma aditiva ou sinérgica provavelmente tem sua origem no papel funcional dos metabólitos secundários em promoção da sobrevivência das plantas (Kaufman et al., 1999; Wink, 2003).

Embora os metabólitos secundários possam ter uma variedade de funções nas plantas, é provável que a sua importância na função ecológica possa ter alguma relação com o potencial medicinal para os seres humanos. Por exemplo, metabólitos secundários envolvidos na defesa das plantas pela sua citotoxicidade à patógenos microbianos podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos se não forem demasiadamente tóxicos. Da mesma forma, metabólitos secundários envolvidos na defesa contra herbívoros pela sua atividade neurotóxica podem apresentar efeitos benéficos em seres humanos através de sua ação no sistema nervoso central (antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos) (Briskin, 2000).

### **1.1. Polifenóis e Flavonóides**

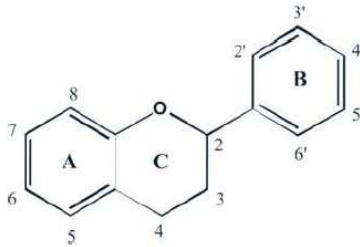
Os polifenóis constituem uma classe de metabólitos secundários presentes nas plantas e encontrados em frutos, folhas, sementes, flores e cascas (Wollgast e Anklan, 2000). Esta classe de compostos ostenta o maior grupo de substâncias conhecidas no reino vegetal e apresenta mais de 4000 estruturas conhecidas (Heim et al., 2002). Um polifenol é caracterizado por apresentar mais de um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel (Bravo, 1998). A Tabela 1 resume as principais classes de polifenóis encontradas.

**Tabela 1.** Principais classes de Polifenóis. Retirado de Bravo, 1998.

Classe	Esqueleto Básico	Estrutura Básica
<b>Cumarinas</b>	$C_6-C_3$	
<b>Cromonas</b>	$C_6-C_3$	
<b>Naftoquinonas</b>	$C_6-C_4$	
<b>Xantonas</b>	$C_6-C_1-C_6$	
<b>Estilbenos</b>	$C_6-C_2-C_6$	
<b>Antraquinonas</b>	$C_6-C_2-C_6$	
<b>Flavonóides</b>	$C_6-C_3-C_6$	

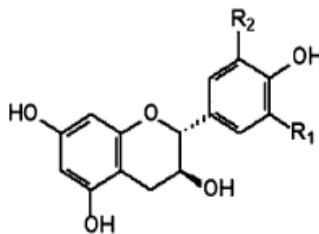
Os flavonóides são polifenóis que apresentam uma estrutura química básica ( $C_6-C_3-C_6$ ), sendo dois anéis aromáticos (A e B) e uma ligação entre três carbonos formando um heterociclo oxigenado (Figura 1) (Fine, 2000; Graf et al., 2005). Os flavonóides são divididos em

subclasses baseados nas conexões nos anéis A e B bem como no grau de saturação, oxidação e hidroxilação do anel C.



**Figura 1.** Estrutura básica dos Flavonóides. Retirado de Lazarus e Schmitz, 2000.

Dentre as subclasses de flavonóides encontram-se os flavanóis, sendo os flavan-3-óis, que possuem uma hidroxila ligada ao carbono três, os mais conhecidos (Figura 2). Entre os flavan-3-óis mais encontrados destacam-se as catequinas e epicatequinas (Hammerstone et al., 1999; Hatano et al., 2002). Estas são encontradas na forma de monômeros ou na forma polimérica. As catequinas e/ou epicatequinas, quando na forma polimérica, são conhecidas como proantocianidinas ou taninos condensados (Simões et al., 1999; Heim et al., 2002).



Flavan-3-óis	R1	R2
(-) – epicatequina	OH	H
(-) – epigalocatequina	OH	OH
(+) – catequina	OH	H
(+) – galocatequina	OH	OH

**Figura 2.** Estrutura básica dos Flavan-3-óis. Retirado de Xie e Dixon (2005).

### **1.1.1. Flavonóides com atividade no sistema nervoso central**

Diversos metabólitos secundários obtidos de plantas são reconhecidos como ativos no sistema nervoso central (SNC) e apresentam pelo menos um potencial hipotético para afetar condições crônicas como ansiedade, depressão, dores de cabeça ou epilepsia (Blanco et al., 2009). Entretanto, ao contrário da medicina popular, até recentemente pouca atenção foi dada pela comunidade científica para os benefícios da utilidade terapêutica das plantas dotadas de propriedades psicodélicas e psicoanalépticas (Carlini, 2003).

Os flavonóides apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas clássicas e bem elucidadas, dentre as quais propriedades antiinflamatórias e antioxidantes (Clavin et al., 2007). Contudo, estudos mais recentes vêm demonstrando que alguns destes compostos também apresentam efeitos sobre o SNC, como analgésicos, ansiolíticos e sedativos (Paladini et al., 1999). Em particular têm sido reconhecidos os potenciais efeitos de flavonóides envolvendo os receptores GABA<sub>A</sub> (Paladini et al., 1999; Goutman et al., 2003). De acordo com Mohler e colaboradores (2002), a subunidade  $\alpha_1$  do receptor GABA<sub>A</sub> medeia a sedação, a amnésia anterógrada e parte da proteção contra convulsões enquanto que a subunidade  $\alpha_2$  do receptor GABA<sub>A</sub> medeia a ansiedade. De interesse, Fernandez e colaboradores (2008) demonstraram que derivados de flavan-3-óis são moduladores positivos dos receptores GABA<sub>A</sub> com alta afinidade para o subtipo  $\alpha_2$  e ação ansiolítica em camundongos. Estas ações sobre o SNC são validadas por estudos de biodisponibilidade que demonstraram que flavonóides, incluindo catequinas, permeiam através de membranas biológicas e atravessam a barreira hematoencefálica se acumulando no cérebro após a administração sistêmica (Suganuma et al., 1998; Kavvadias et al., 2004; Youdim et al., 2004).

### **1.1.2. Flavonóides com atividade neuroprotetora**

Diversas pesquisas têm demonstrado que polifenóis, em especial os flavonóides, possuem propriedades neuroprotetoras, como demonstrado na Tabela 2. As atividades neuroprotetoras dos polifenóis são um reflexo de suas propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e quelantes de ferro (Mandel e Youdim, 2004). Estas ações em conjunto com a capacidade destes em penetrar no cérebro após a administração

sistêmica completam os requisitos para uma potencial/hipotética ação neuroprotetora (Bastianetto et al., 2000; Weinreb et al., 2004).

**Tabela 2.** Exemplos de Polifenóis com ações neuroprotetoras caracterizadas.

<b>Polifenol:</b>	<b>Extraído de:</b>	<b>Achados:</b>
<b>Curcumina</b>	Polifenol encontrado no rizoma da <i>Curcuma longa</i> (açafraão-da-india, curcuma).	Restaurou os níveis de glutatona, protegeu contra a oxidação de proteínas e preservou a atividade do complexo-I mitocondrial, em um modelo <i>in vitro</i> de depleção de glutatona em neurônios dopaminérgicos (Jagatha et al., 2007).
<b>Caempferol</b>	Flavonóide extraído do <i>Hypericum perforatum</i>	Efeito neuroprotetor em um modelo de excitotoxicidade neuronal e disfunção mitocondrial <i>in vitro</i> , causados pela administração de cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA) (Silva et al., 2008).
<b>Epicatequina</b>	Catequina encontrada no chá verde, cacau, vinho tinto, e vendida comercialmente.	Preveniu o estresse oxidativo e o prejuízo cognitivo induzidos pela administração do peptídeo A $\beta$ <sub>25-35</sub> no hipocampo de ratos (Cuevas et al., 2009).
<b>Epigallocatequina-3-galato (EGCG)</b>	Principal catequina do chá verde ( <i>Camellia sinensis</i> ).	Preveniu os prejuízos cognitivos induzidos pela administração intracerebroventricular do peptídeo A $\beta$ <sub>1-42</sub> em camundongos (Lee et al., 2009).

<b>Extrato de polifenóis da uva (GPE)</b>	Uvas liofilizadas da Califórnia - EUA	Efeito neuroprotetor em um modelo experimental de isquemia por oclusão da artéria carótida em gerbilos. Atenuou os danos ao DNA (fragmentação e oxidação) e a ativação de células gliais no hipocampo (Wang et al., 2008).
<b>Fração rica em chalconas</b>	Cascas da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	Ação neuroprotetora em um modelo experimental da doença de Parkinson (DP) <i>in vitro</i> . Preveniu o estresse oxidativo e a morte de neurônios dopaminérgicos induzidos pela administração da toxida 6-hidroxi-dopamina (Nobre-Junior et al., 2009).
<b>Fração rica em procianidinas do cacau.</b>	Fração vendida comercialmente.	Atenuou o estresse oxidativo e a apoptose induzida <i>in vitro</i> pela administração de 4-hidroxinonenal, um produto da peroxidação lipídica, aumentado nos pacientes com doença de Alzheimer (Cho et al., 2009).
<b>Fustina</b>	Flavonóide extraído da <i>Rhus verniciflua</i>	Ação neuroprotetora em um modelo experimental da DP <i>in vitro</i> . Preveniu o estresse oxidativo e a morte de neurônios dopaminérgicos induzidos pela administração da toxida 6-hidroxi-dopamina (Park et al., 2007).

<b>Luteolina</b>	Flavonóide (flavona) encontrado em diversas plantas. Vendido comercialmente.	Efeito neuroprotetor em um modelo experimental da DP <i>in vitro</i> . Preveniu o estresse oxidativo induzido pelo MPP <sup>+</sup> através da ativação do fator nuclear eritróide-2 (Nrf2) (Wruck et al., 2007).
<b>Mangiferina</b>	Folhas da <i>Mangifera indica</i>	Propriedades antioxidantes e anti-apoptóticas. Reduziu o dano neuronal associado com excitotoxicidade glutamatérgica em um modelo experimental <i>in vitro</i> (Campos-Esparza et al., 2009).
<b>Naringenina</b>	Flavonona extraída da <i>Citrus junoson</i>	Preveniu o estresse oxidativo induzido pela proteína beta-amiloide em um modelo <i>in vitro</i> , e reverteu a amnésia induzida por escopolamina em camundongos (Heo et al., 2004).
<b>Polifenóis do chá verde (GTP)</b>	Folhas da <i>Camellia sinensis</i>	Efeito neuroprotetor em um modelo experimental da DP em ratos. Preveniu os neurônios dopaminérgicos no estriado do estresse oxidativo induzido pela 6-hidroxi-dopamina (Guo et al., 2007).
<b>Polifenóis do vinho tinto (RWPC)</b>	Fração vendida comercialmente.	Neuroproteção em um modelo experimental de isquemia cerebral em ratos. Diminuiu a excitotoxicidade (Ritz et al., 2008).



<b>Puerarina</b>	Isoflavona extraída da raiz da <i>Pueraria lobata</i> .	Preveniu contra a lesão isquêmica em ratos. Diminuiu o volume do infarto, a morte celular e melhorou as funções neurológicas (Xu et al., 2005).
<b>Quercetina</b>	Flavonóide encontrado em diversas plantas. Vendida comercialmente.	Efeito neuroprotetor em um modelo de lesão cerebral traumática em ratos. Preveniu a diminuição nos níveis de glutatona e a diminuição da atividade da mieloperoxidase (Schültke et al., 2005).
<b>Resveratrol</b>	Principal polifenol extraído do vinho tinto	Efeito neuroprotetor em um modelo experimental da doença de Alzheimer <i>in vitro</i> . Inibiu a formação fibrilar do peptídeo A $\beta$ <sub>42</sub> e atenuou a citotoxicidade induzida pelo peptídeo (Feng et al., 2009).
<b>Resveratrol</b>	Principal polifenol extraído do vinho tinto	Efeito neuroprotetor em um modelo experimental da DP em camundongos. Preveniu os déficits comportamentais, estresse oxidativo e morte celular induzida pela pré-toxina MPTP (Lu et al., 2008).
<b>Rutina</b>	Flavonóide encontrado em diversas plantas. Vendida comercialmente.	Aumentou o aprendizado de ratos em um teste de esquivas passivas (Nassiri-Al et al., 2009),

## **1.2. Doença de Parkinson**

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo, caracterizado clinicamente por alguns sintomas cardinais como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez, instabilidade postural e anormalidades na marcha (Dawson e Dawson, 2003). De acordo com a evolução da doença, muitos pacientes desenvolvem também sintomas não-motores relacionados à disfunção cognitiva, como ansiedade, depressão e demência (Dawson e Dawson, 2002), sendo que estes sintomas muitas vezes antecedem os sintomas motores. A principal característica neuropatológica da DP é a lesão dos neurônios dopaminérgicos localizados na parte compacta da substância negra (SNpc), os quais enviam projeções para os gânglios da base, ocasionando uma redução nos níveis de dopamina (DA) no estriado (Lindner et al., 1999; Blandini et al., 2000). Outra notável peculiaridade neuropatológica da DP é o aparecimento de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas denominadas corpos de Lewy, as quais são constituídas principalmente pelo acúmulo das proteínas  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (Hagan et al., 1997; Blandini et al., 2000).

O relato inicial da doença foi descrito pelo médico inglês James Parkinson no ano de 1817 em seu estudo “*Essay on the shaking palsy*” (Ensaio sobre a Paralisia Agitante), e caracterizada desde então como um distúrbio do movimento, sendo o seu diagnóstico baseado na presença de dois ou mais sintomas motores (rigidez, bradicinesia, tremor, perda do reflexo postural, etc). Contudo, uma limitação deste sistema de diagnóstico é que pacientes parkinsonianos somente apresentam estes sintomas motores quando aproximadamente 60–70% dos neurônios da SNpc encontrarem-se degenerados e os níveis estriatais de DA estarem reduzidos em 70-80% (Barrio et al., 1997; Lindner et al., 1999; Meissner et al., 2004). Assim, o diagnóstico somente é estabelecido quando o processo degenerativo encontra-se em um estágio avançado, o que pode ser o responsável pela baixa efetividade clínica de diversas drogas e agentes neuroprotetores testados no tratamento desta patologia.

### **1.2.1. Etiologia da doença de Parkinson**

Embora a etiologia do processo neurodegenerativo encontrado na DP não esteja completamente elucidada, diversos estudos sugerem uma associação entre um estado de desbalanço oxidativo desencadeado por um ou mais fatores, dentre os quais se destacam: o envelhecimento

cerebral, predisposição genética, disfunções mitocondriais, produção de radicais livres e toxinas ambientais (Langston, 1996; Fukae et al., 2007; Henchcliffe e Beal, 2008; Zhou et al., 2008). Desta maneira, a explicação mais plausível é que a DP seja uma doença multifatorial decorrente da combinação de fatores genéticos e ambientais (Langston, 1996).

As evidências do estado de desbalanço oxidativo são oriundas da análise de tecidos cerebrais *post-mortem*, que sugerem o estresse oxidativo e nitrativo como fatores essenciais no processo de neurodegeneração da SNpc associada à DP (Zhou et al., 2008). Por exemplo, a diminuição dos níveis de glutatona, um antioxidante ubíquo nos sistemas vivos, na SNpc parece ser uma das primeiras mudanças bioquímicas observadas na doença. Nesta estrutura cerebral também é observado um aumento dos níveis de peroxidação lipídica, como indicado pela diminuição nos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (substratos para a peroxidação lipídica) e aumento dos níveis de malonaldeído e 4-hidroxinonenal, produtos da peroxidação lipídica (Hald e Lotharius, 2005; Zhou et al., 2008).

A aparente vulnerabilidade seletiva dos neurônios dopaminérgicos ao processo de desbalanço oxidativo pode ser em parte oriunda do metabolismo normal da dopamina o qual pode contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) citotóxicas na presença de íons de metais de transição como ferro, cobre e manganês (Giasson et al., 2002; Hald e Lotharius, 2005). Em condições fisiológicas, a dopamina é oxidada não-enzimaticamente pelo oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e quinonas. A dopamina também é desaminada enzimaticamente pela enzima monoamina oxigenase-B (MAO-B) para formar  $H_2O_2$  e 3,4-desidroxifenilacetaldeído. Por sua vez este último é oxidado pela enzima aldeído desidrogenase, para formar o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), o qual é metilado pela enzima catecol-*O*-metiltransferase (COMT) para formar o ácido homovanílico (HVA) (Hald e Lotharius, 2005). Desta forma, tanto a auto-oxidação da dopamina quanto o seu metabolismo mediado pela MAO-B envolvem a formação de  $H_2O_2$ , um composto que pode ser facilmente reduzido na presença do íon ferroso ( $Fe^{2+}$ ), pela reação de Fenton, formando o radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ), uma espécie altamente reativa e virtualmente capaz de reagir com qualquer macromolécula celular (Hald e Lotharius, 2005). A catálise do radical hidroxil mediada pelo ferro pode ser um mecanismo patogênico chave que contribui com o estresse oxidativo observado na DP, visto que os níveis de ferro na SNpc não são maiores que nas outras áreas do cérebro (Gerlach et al., 1994) mas estão aumentados em aproximadamente 35% nos pacientes com a DP (Dexter

et al., 1989). Desta forma, a oxidação da dopamina pode levar a uma vulnerabilidade seletiva dos neurônios dopaminérgicos à morte celular.

### **1.2.2. Tratamento farmacológico atual da doença de Parkinson**

Há mais de dez anos, era crescente a expectativa de que fármacos com mecanismos de ação não-dopaminérgicos pudessem contribuir decisivamente para o êxito no tratamento da DP (Williams et al., 1997). Corroborando esta afirmação, na mesma época foi publicado um relatório sobre resultados promissores com antagonistas do receptor  $A_{2A}$  de adenosina em modelos animais da DP (Richardson et al., 1997). A idéia de amenizar os sintomas da DP através da influência sobre sistemas não-dopaminérgicos é baseada em: (a) um melhor conhecimento da fisiopatologia dos sintomas motores e não motores, (b) numa visão mais profunda da fisiopatologia das complicações motoras associadas ao uso crônico da levodopa, (3) na existência de modelos animais da doença, e (d) no desenvolvimento de agentes farmacológicos altamente seletivos capazes de agir em vias de sinalizações específicas (Linazasoro et al., 2008).

Nos gânglios da base, a dopamina e os demais sistemas de neurotransmissão estão intimamente conectados por relações complexas e não completamente elucidadas (para revisão ver Linazasoro, 2004; Fox et al., 2006). A depleção de dopamina no estriado leva a um aumento no tônus glutamatérgico, colinérgico e adenosinérgico a tal nível que, por sua vez, resulta em mudanças na transmissão GABAérgica, opióide e canabinóide na via estriato-palidal. A direção da mudança (aumento ou diminuição da atividade) é diferente de acordo com os efeitos da depleção de dopamina nos receptores  $D_1$  ou  $D_2$ . Além disso, esse desequilíbrio não é normalizado pela administração crônica de levodopa o que acaba resultando em novas alterações relacionadas com o desenvolvimento das discinesias (Linazasoro et al., 2008).

Ao longo destes mais de dez anos, agentes atuando nos sistemas de neurotransmissão glutamatérgico, adenosinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, GABAérgico, canabinóide e opióide têm sido testados em pacientes com DP (Olson et al., 1997; Richardson et al., 1997; Verhagen Metman et al., 1998; Henry et al., 1999; Bibbiani et al., 2001; Sieradzan et al., 2001; Samadi et al., 2003). Entretanto, os resultados obtidos não vêm sendo tão significativos como antecipados pelos estudos com animais. A falta de eficácia preditiva dos modelos pré-clínicos e os efeitos colaterais não esperados são os maiores responsáveis pelo insucesso.

Além disso, resultados inconsistentes e às vezes até contraditórios têm somado confusão para este cenário (Linazasoro et al., 2008).

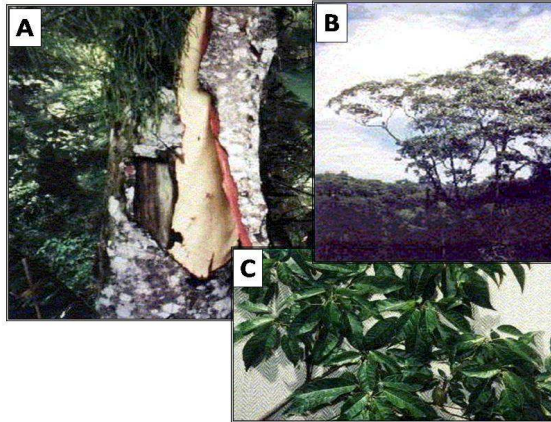
Contudo, mesmo com os efeitos colaterais, em contraste com outras doenças neurodegenerativas, na DP há relativamente uma boa terapia sintomática. O atual tratamento padrão para a doença continua sendo baseado na terapia de reposição de dopamina, agonistas dopaminérgicos, inibidores da enzima monoamina oxidase e/ou antagonistas de receptores colinérgicos destinados a contrabalancear o desequilíbrio neuroquímico provocado principalmente pela degeneração da via nigroestriatal dopaminérgica (Schapira et al., 2006). Entretanto, ainda não há evidências e comprovações de uma terapia que impeça a morte dos neurônios ou que restaure os neurônios a um estado normal (Dawson e Dawson, 2002). Conseqüentemente, a progressão da doença não é bloqueada por nenhum recurso terapêutico disponível e, conforme a doença evolui, faz-se necessária a administração de doses cada vez maiores dos fármacos paliativos (Dunnet e Bjorklund, 1999).

Novas estratégias de neuroproteção sustentam a aplicação de seqüestradores de espécies reativas do oxigênio, quelantes de metais de transição (por exemplo, ferro e cobre), antiinflamatórios não esteroidais, antioxidantes naturais (por exemplo, polifenóis) e drogas anti-apoptóticas, em monoterapia ou como parte de uma formulação de um coquetel antioxidante (Mandel e Youdim, 2004). Além disso, a etiologia multifatorial da DP sugere que drogas com múltiplos alvos terapêuticos, tais como os polifenóis, poderiam apresentar um potencial terapêutico na DP (Ramassamy, 2006).

### **1.3. *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae)**

As plantas do gênero *Croton* são ricas em constituintes ativos, como as proantocianidinas, taninos, terpenos, alcalóides, flavonas e outros compostos fenólicos. Além disso, várias espécies de *Croton* são descritas como plantas medicinais (Gupta et al., 2004).

A *Croton celtidifolius* (Figura 3) é uma árvore nativa das regiões de Mata Atlântica, sendo freqüentemente encontrada do Estado do Rio de Janeiro a Goiás, São Paulo e região Sul do Brasil. Ela recebe diversos nomes populares, dependendo da região aonde é encontrada, como por exemplo, Pau-Sangue, Sangue de Dragão e Sangue de Adáve (Smith et al., 1988). A medicina popular em geral recomenda o seu uso para o tratamento de doenças inflamatórias (como artrite reumatóide), ulcerativas e diabetes, mascando a própria casca ou fazendo infusão das mesmas (Nardi et al., 2003).



**Figura 3.** (A) Retirada da casca, matéria prima utilizada obtenção da FRP. (B) A *Croton celtidifolius* em seu habitat natural, visão panorâmica; (C) Folhas de 10 – 25 cm de comprimento. (Fotos gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Moacir Pizzolatti).

Os estudos acerca das atividades biológicas da *C. celtidifolius* demonstraram atividades antiedematogênica e antiinflamatória (Nardi et al., 2003), efeito antiinflamatório no modelo de pleurisia induzida por carragenina e modulação da atividade da enzima superóxido dismutase (Nardi et al., 2007), assim como um efeito analgésico de vários extratos, frações e sub-frações obtidas das cascas da planta (Nardi et al., 2006).

Entre as sub-frações, a fração rica em proantocianidinas (FRP), em especial, apresentou ainda uma pronunciada ação antinociceptiva em modelos animais de dor química e térmica, cujo mecanismo parece envolver os receptores dopaminérgicos  $D_2$  e as fibras C sensíveis à capsaicina (DalBó et al., 2005; 2006). Também foram demonstrados efeitos vasorelaxantes dependentes de endotélio para a FRP, com o envolvimento da via NO-GMPc e causados por estimulação de canais de cálcio dependentes de potássio (DalBó et al., 2008a, 2008b). Quimicamente a FRP é caracterizada pela presença de catequinas, epicatequinas, galocatequinas, catequina-(4 $\alpha$ -8)-catequina, galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-catequina e proantocianidinas oligoméricas (DalBó et al., 2008a).

Desta forma, com base nas ações anteriormente de polifenóis já descritas, em especial as catequinas, e com o embasamento das atividades biológicas já descritas para a fração rica em proantocianidinas

obtida das cascas da *Croton celtidifolius*, o presente trabalho buscou avaliar os possíveis efeitos neuroprotetores da FRP em um modelo experimental da DP, como também avaliar os possíveis efeitos centrais desta fração, com a utilização de diversos testes comportamentais amplamente padronizados para a triagem inicial de plantas com atividade sobre o sistema nervoso central.

Por causa da direta aplicabilidade em humanos, o modelo ideal da DP deveria apresentar as seguintes características: (i) déficits motores facilmente detectáveis; (ii) perda de neurônios dopaminérgicos seletivos e graduais, desenvolvendo-se com a idade; e (iii) produção de inclusões citoplasmáticas assim como os corpos de Lewy (Shimohama et al., 2003). Todavia, estas características não são frequentemente encontradas nos modelos de DP que utilizam roedores. Apesar destas limitações os modelos animais da DP são de grande valia na compreensão dos mecanismos patogénéticos e na pesquisa de novos alvos terapêuticos para minimizar os sintomas da doença. Entre os principais modelos animais da DP está a administração da pré-toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Przedborski et al., 2004). O modelo experimental que utilizaremos no presente trabalho consiste na administração intranasal (i.n.) do MPTP em ratos, procedimento capaz de induzir uma série de alterações comportamentais (prejuízos olfatórios, cognitivos, emocionais e motores) e neuroquímicas (estresse oxidativo, degeneração de neurônios dopaminérgicos e redução de dopamina em diferentes áreas cerebrais) muito semelhantes às observadas na doença de Parkinson (Prediger et al., 2006, 2009; Franco et al., 2007).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar atividades farmacológicas da fração rica em proantocianidinas (FRP) obtida das cascas da planta *Croton celtidifolius*, no sistema nervoso central bem como suas propriedades neuroprotetoras em um modelo experimental da doença de Parkinson em ratos.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de atividade farmacológica central da fração rica em proantocianidinas (FRP) obtida da *C. celtidifolius* em ratos, através dos modelos do campo aberto, caixa de atividade, sono induzido por éter etílico, ptose palpebral, comportamento estereotipado induzido por apomorfina, labirinto em cruz elevado, convulsões induzidas por pentilenotetrazol e temperatura retal.
- Investigar o efeito do pré-tratamento com a FRP nos prejuízos comportamentais induzidos pela administração intranasal de MPTP, avaliados nos testes do reconhecimento social, campo aberto, nado forçado e caixa de atividade.
- Investigar o efeito do pré-tratamento com a FRP nos déficits neuroquímicos induzidos pela administração intranasal de MPTP em ratos, avaliados através da mensuração da atividade do complexo-I da cadeia respiratória mitocondrial no bulbo olfatório, estriado e substância negra, e através da expressão da enzima tirosina hidroxilase no bulbo olfatório e substância negra, com o auxílio das técnicas de imunohistoquímica e *Western blot*.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Considerações Éticas**

Os procedimentos experimentais envolvidos neste estudo foram delineados de tal maneira a minimizar ao máximo o sofrimento dos animais. Além disso, foi utilizado um tamanho de amostra mínimo e adequado para as análises estatísticas e que possibilitasse a obtenção do máximo de informações relevantes para o cumprimento dos objetivos propostos, de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (PP00235).

#### **3.2. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 3 meses de idade e peso corporal variando entre 280 - 320 g, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para o teste de Reconhecimento Social, foram utilizados além desses animais, ratos Wistar machos jovens com aproximadamente 1 mês de idade e peso corporal variando entre 100 - 120 g. Os animais foram alojados em grupos de cinco animais por caixa (42 x 34 x 17 cm) e mantidos em condições controladas de umidade e temperatura ( $22 \pm 1^\circ$  C), com ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acesas das 06h às 18h), tendo livre acesso a água e comida.

#### **3.3. Preparações, drogas e soluções**

##### **3.3.1. Material botânico**

A FRP foi extraída das cascas da *Croton celtidifolius* Baill pelo Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), utilizando a metodologia descrita abaixo. As cascas da *Croton celtidifolius* foram coletadas em março de 2008, na cidade de Águas Mornas, Santa Catarina, e a espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Daniel de Barcellos Falkenberg no Departamento de Botânica, UFSC, onde se encontra depositada uma exsicata identificada pelo número de voucher, FLOR 31272.

### 3.3.2. Extração e Caracterização da FRP

Para a extração da FRP, as cascas da *Croton celtidifolius* foram secas sob ventilação, cortadas em pequenos pedaços e maceradas exaustivamente com etanol 80 % a temperatura ambiente. O extrato foi filtrado e o solvente evaporado sob vácuo formando um extrato bruto hidroalcoólico que foi solubilizado em acetona de maneira a obter uma solução saturada. Em seguida, foi adicionada uma grande quantidade de água que ocasionou a formação de um precipitado. Este precipitado foi removido por filtração e a solução foi transferida para um rotaevaporador para eliminação da acetona. A solução aquosa resultante foi submetida a uma extração com acetato de etila e após remoção do solvente orgânico, obteve-se a fração rica em proantocianidinas (FRP).

O estudo fitoquímico foi executado por fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel, seguido de análise dos compostos isolados por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN). A análise em cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) demonstrou que a fração FRP contém 27,4% de catequina; 1,3% de epicatequina; 6,4% de galocatequina; 16,7% de catequina-(4 $\alpha$ -8)-catequina; 4,9% de galocatequina-(4 $\alpha$ -8)-catequina e 43,3% de proantocianidinas oligoméricas. Procedeu-se a tiólise da FRP seguida da análise em MEKC, a qual mostrou que as proantocianidinas oligoméricas são os compostos majoritários e constituídos por unidades de catequina e epicatequina na razão de 1,5 para 1 (DalBó et al., 2008a).

Nas análises eletroforéticas foi utilizado um aparelho da Agilent Technologies HP<sup>3D</sup>CE (Palo Alto, CA, EUA) equipado com um detector de arranjo de iodos operado em 207 nm. Procedeu-se a separação a 25° C em um capilar de sílica fundida (60 cm x 375  $\mu$ m diâmetro externo x 50  $\mu$ m diâmetro interno) da Polymicro Technologies. Entre cada análise, o capilar foi lavado por 2 min com solução tampão. As amostras e os padrões foram injetados hidrodinamicamente a 50 mbar por 6 s (50 mbar = 4996.2 Pa) com pressão negativa. A voltagem de separação aplicada foi de 20 kV de polaridade positiva. A aquisição e o tratamento dos dados foram executados com software HP Chemstation. A identificação dos picos foi feita por comparação do tempo de migração e os dados dos espectros obtidos foram comparados com padrões.

A tiólise da FRP foi seguida pelo procedimento descrito por Herrero-Martinez e colaboradores (2003). A fração FRP (10 mg) foi dissolvida em metanol (1 mL) e em seguida uma alíquota (200  $\mu$ L) foi adicionada para reação de tiólise que consiste em cisteína (50 mg) e

37% de ácido clorídrico (20 µL) dissolvidos em metanol (930 µL). A mistura foi mantida a 65° C por 20 min, e então a reação foi interrompida com 0,1 % v/v de solução aquosa de ácido trifluor acético (TFA) (1,2 mL), e injetado para eletroforese capilar.

### 3.3.3. Drogas padrão e soluções

- Cloridrato de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP-HCl, Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Dissolvido em etanol 10 %;
- 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-dibenzodiazepin-2-ona (Diazepam, Dienpax®, Sanofi-Winthrop Lab., SP, Brasil);
- Cloral Hidratado (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Dissolvido em solução salina (NaCl 0,9 %);
- Cloridrato de apomorfina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Dissolvido em solução salina (NaCl 0,9 %);
- Éter etílico (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil);
- Haloperidol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Dissolvido em solução salina (NaCl 0,9 %) contendo 0,05% de Tween-20;
- Isoflurano (Isothane™, Astrazeneca do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil);
- Paraformaldeído (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil). Dissolvido em PBS;
- PBS (salina tamponada com potássio) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA): NaCl 137 mM, KCl 1,17 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,4;
- Pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Dissolvido em solução salina (NaCl 0,9 %).

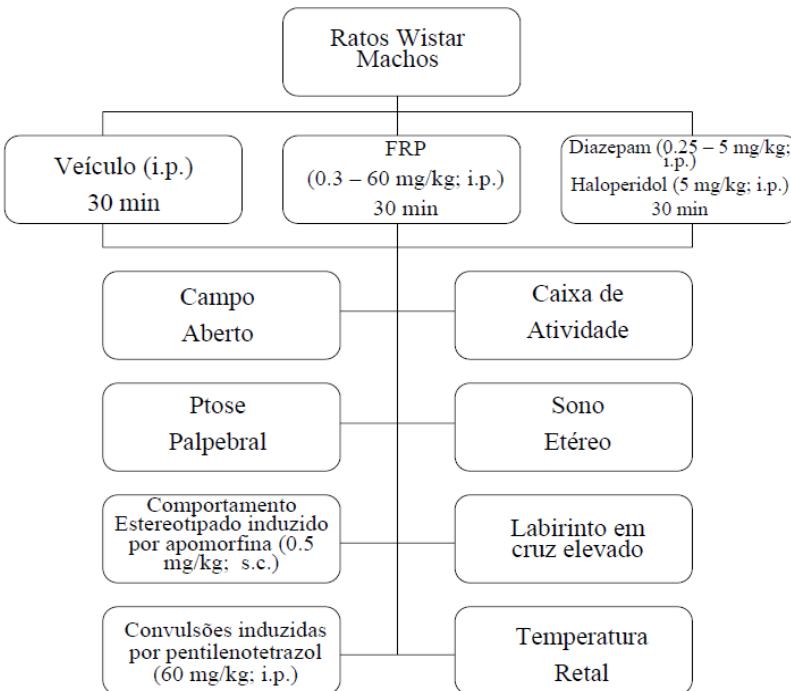
### 3.4. Delineamento experimental

#### 3.4.1. Protocolo experimental 1: Avaliação farmacológica da FRP obtida da *C. celtidifolius* sobre o sistema nervoso central.

No protocolo 1, ratos Wistar machos receberam através de administração intraperitoneal (i.p.) a FRP obtida da *C. celtidifolius* (0,3 – 60 mg/kg) em um volume constante de 0,1 ml/100g de peso corporal. Os animais do grupo controle foram tratados pela mesma via e volume

com veículo (solução salina 0,9 %). O diazepam (0,25 – 5 mg/kg; i.p.) e o haloperidol (5 mg/kg; i.p.) foram utilizados como controles positivos, com o objetivo de garantir a validade preditiva dos testes comportamentais utilizados. As doses foram baseadas em estudos prévios (DalBó et al., 2005; Duarte et al., 2007; Sugimoto et al., 2008). Trinta minutos após os tratamentos, os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais (grupos independentes de animais em cada teste): campo aberto, caixa de atividade, ptose palpebral, hipnose induzida por éter etílico, comportamento estereotipado induzido por apomorfina, labirinto em cruz elevado, convulsões induzidas por pentilenotetrazol e temperatura retal, conforme descrito adiante.

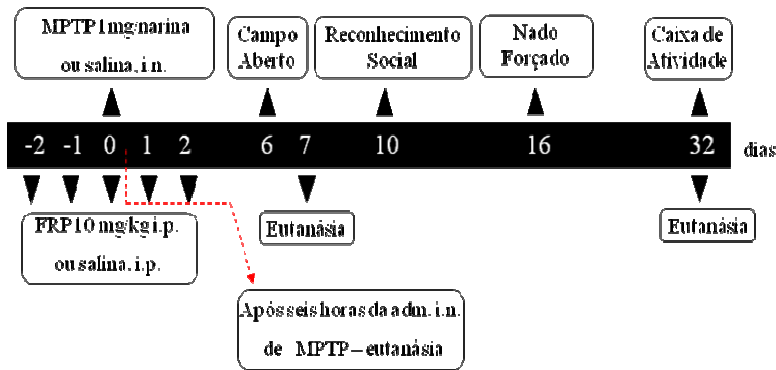
**Esquema 1** – Resumo do protocolo experimental 1.



### **3.4.2. Protocolo experimental 2: Avaliação dos efeitos neuroprotetores da FRP obtida da *C. celtidifolius* em um modelo experimental da doença de Parkinson.**

No protocolo 2, ratos Wistar machos receberam através de administração i.p. a FRP obtida da *C. celtidifolius* (10 mg/kg) em um volume constante de 0,1 ml/100 g de peso corporal durante 5 dias. Esta dose foi escolhida de acordo com estudos prévios (Nardi et al., 2003; DalBó et al., 2006). Os animais do grupo controle foram tratados pela mesma via, volume e duração com veículo (solução salina 0,9 %). No terceiro dia deste cronograma foi administrado pela via intranasal (i.n.) MPTP (1 mg/narina) ou veículo em metade dos animais de cada grupo, totalizando quatro grupos experimentais. Os animais foram então submetidos a uma bateria de testes comportamentais: campo aberto (6 dias após a administração de MPTP/salina), reconhecimento social (10 dias após), nado forçado (16 dias após) e caixa de atividade (33 dias após). Imediatamente após o último teste comportamental os animais foram anestesiados com cloral hidratado (400 mg/kg; i.p.) e perfundidos pela via transcardíaca com solução salina e PBS contendo paraformaldeído 4 %, para os posteriores experimentos de imunohistoquímica. Em outra bateria experimental, os animais foram eutanaziados seis horas após a administração i.n. de MPTP (ensaios bioquímicos; Franco et al., 2007), ou após 7 dias (ensaios de *western blot*), e seus cérebros foram removidos com suas estruturas cerebrais (bulbo olfatório, estriado e substância negra) isoladas.

## Esquema 2. Resumo do protocolo experimental 2.



### 3.5. Equipamentos e testes farmacológicos

#### 3.5.1. Administração intranasal de MPTP

A administração i.n. de MPTP em ratos foi realizada utilizando um procedimento semelhante ao descrito por Dluzen e Kefalas (1996) e recentemente padronizada por Prediger e colaboradores (2006). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano e receberam a infusão bilateral (nas duas narinas) de MPTP na dose de 1 mg/narina (solução 20 mg/ml). A infusão do MPTP foi realizada com o auxílio de um tubo de polietileno (PE 50), que foi inserido cerca de 10 mm de profundidade na narina dos animais. O tubo de polietileno foi conectado a uma micro-seringa de 50  $\mu$ l (Hamilton, USA) acoplada a uma bomba de infusão (Insight, Brasil), permitindo o controle da velocidade (12,5  $\mu$ l/min) e do volume (50  $\mu$ l/narina) de infusão.

#### 3.5.2. Testes Comportamentais

##### 3.5.2.1. Teste da Caixa de Atividade

A avaliação da atividade locomotora dos animais foi realizada na caixa de atividade durante 30 minutos (Rial et al., 2009). O aparato consiste em uma caixa de madeira (40 x 12 x 20 cm) com piso gradeado que apresenta três células fotoelétricas instaladas a 3 cm de altura do

chão, espaçadas igualmente ao longo de sua extensão e acopladas a um contador digital que registra o número de vezes que o animal interrompe os feixes de luz (cada interrupção do feixe de luz consiste em uma medida de atividade). Assim, somente os movimentos horizontais dos animais foram detectados pelas fotocélulas.

### **3.5.2.2. Teste do Campo Aberto**

Para a avaliação da atividade estimulante ou depressora de um dado composto, também foi utilizado o teste do campo aberto (Archer, 1973). A arena, feita de madeira e fórmica, é formada por um chão de cor branca (100 x 100 cm), dividida em 25 quadrantes de 20 x 20 cm, com paredes brancas de 40 cm de altura. Durante os experimentos, cada rato foi colocado no centro do campo aberto, sendo que um sistema de câmera de vídeo captava as imagens do aparato. A atividade exploratória dos animais teve como parâmetro a movimentação espontânea dos animais aferida a partir da contagem do número de cruzamentos transpassados com as quatro patas e o número de comportamentos de levantar, registrados durante um período de cinco minutos.

### **3.5.2.3. Teste da Ptose Palpebral**

A ptose palpebral é uma manifestação comportamental de roedores produzida por algumas classes de drogas depressoras centrais e consiste no fechamento dos olhos, podendo ser quantificada através de escalas fixadas em graus (Janssen et al., 1975; Almeida, 2006). O grau da ptose foi avaliado após 30 e 60 minutos dos tratamentos e foi qualificada de acordo com Chen e Bohner (1961): 0= olhos bem abertos, 1= olhos ligeiramente fechados ( $\frac{1}{4}$ ), 2= olhos parcialmente fechados ( $\frac{1}{2}$ ), 3= olhos totalmente fechados. A soma total das pontuações dos graus de ptose para cada animal nas duas medições foi utilizada para obter a mediana dos valores dentro de cada grupo.

### **3.5.2.4. Hipnose Induzida por Éter Etilico**

Para a avaliação do efeito sedativo/hipnótico de um dado composto foi utilizado o teste da hipnose induzida por éter etílico (Duarte et al., 2007). Os animais foram colocados em uma câmara saturada (30 cm x 20 cm de diâmetro) de vidro transparente

hermeticamente fechada. A saturação deu-se através do umedecimento de uma bola de algodão de tamanho padrão (6 g) com 10 ml de éter etílico colocado em uma plataforma localizada a 20 cm de altura em relação à superfície da câmara, 10 min antes da realização dos testes farmacológicos (Duarte et al., 2007). Transcorrido o tempo para saturação da câmara, os animais foram introduzidos individualmente na mesma, registrando-se a latência para a perda do reflexo de endireitamento. Uma vez perdido o reflexo, esperou-se mais 1 min para a retirada de cada animal da câmara de saturação, e em seguida colocando-os em decúbito dorsal para registro da duração da hipnose, cujo término foi caracterizado pela recuperação da postura normal (Carlini et al., 1986).

### **3.5.2.5. Comportamento estereotipado induzido por apomorfina**

Para a avaliação do potencial neuroléptico de um dado composto foi utilizado o teste do comportamento estereotipado induzido por apomorfina (Setler et al., 1976). Os animais foram isolados em caixas de plástico por 45 minutos e somente depois os tratamentos com a FRP da *C. celtidifolius* foram feitos. Após trinta minutos dos tratamentos os animais foram tratados com apomorfina pela via subcutânea (s.c.) (0,5 mg/kg) e foram observados em gaiolas de arame (15 x 31 x 26 cm) por 10 segundos a cada 10 min durante 90 min pós-administração de apomorfina para a quantificação do comportamento estereotipado.

O comportamento estereotipado foi classificado de acordo com a escala proposta por Setler e colaboradores (1976): 0= adormecido ou parado; 1= ativo; 2= predominantemente ativo, mas com períodos curtos de farejar e/ou levantar estereotipado; 3= atividade estereotipada constante, tal como farejar, levantar ou balançar a cabeça, mas com atividade locomotora ainda presente; 4= atividade estereotipada constante realizada em um só local; 5= atividade estereotipada constante, mas com períodos curtos de lambar e/ou roer e morder as barras da gaiola; 6= lambar e/ou roer e morder as barras da gaiola. A soma total das pontuações obtidas para cada animal durante o período de observação foi utilizada para obter a mediana dos escores dentro de cada grupo.

### **3.5.2.6. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

O LCE foi utilizado com base na sua capacidade de detectar tanto efeitos do tipo ansiolítico quanto do tipo ansiogênico em ratos (Pellow et al., 1985). O aparato, feito de madeira e fórmica, consiste de dois braços



abertos (50 x 10 cm), opostos a dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), elevados 50 cm do chão. A área de junção dos quatro braços (plataforma central) mede 10 x 10 cm. Cada animal foi colocado no centro do labirinto de frente para um braço fechado. Eles foram observados por um período de 5 min, com os seguintes parâmetros sendo observados: o número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados, o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados (foi considerada uma entrada quando as quatro patas do animal estivessem no interior do braço). Estes dados foram utilizados para calcular a porcentagem de entradas nos braços abertos [%EA: entradas nos braços abertos / (entrada nos braços abertos + entradas nos braços fechados) x 100]; porcentagem de permanência nos braços abertos [%TBA: tempo nos braços abertos / (tempo nos braços abertos + tempo nos braços fechados) x 100]. O número de entradas nos braços fechados foi usado como um índice da atividade locomotora (Rodgers e Dalvi, 1997).

### **3.5.2.7. Convulsões induzidas por pentilenotetrazol**

Para a avaliação do potencial anticonvulsivante de um dado composto foi utilizado o teste das convulsões induzidas por pentilenotetrazol (Fisher, 1989). Trinta minutos após os tratamentos com a FRP da *C. celtidifolius*, as convulsões foram induzidas com pentilenotetrazol (PTZ) (60 mg/kg; i.p.) (Fisher, 1989). Os seguintes parâmetros foram observados: total de mortes por grupo, total de animais que desenvolveram convulsão por grupo, latência e duração da primeira convulsão clônica ou tônico/clônica, assim como sua duração (medida com um tempo limite de 1800 s).

### **3.5.2.8. Temperatura Retal**

A temperatura retal dos animais foi medida através da inserção de uma sonda térmica dentro do reto de cada animal. A leitura do registro da temperatura foi realizada por meio de um termômetro digital (Dixtal<sup>®</sup>). A sonda térmica foi colocada com vaselina e inserida 2 cm dentro do reto até a estabilização da temperatura (aproximadamente 30 s). A temperatura retal foi mensurada duas vezes, antes ( $T_1$ ) e 1 h após os diferentes tratamentos ( $T_2$ ). A variação da temperatura ( $\Delta T$ ) foi estimada como  $\Delta T = T_2 - T_1$ , para cada animal (Carlini et al., 1986; Duarte et al., 2007).

### **3.5.2.9. Teste do Reconhecimento Social**

O teste de reconhecimento social é utilizado como um modelo válido para o estudo da memória olfativa de curta duração (Prediger e Takahashi, 2003). Os ratos foram isolados em caixas de plástico individuais por sete dias antes do experimento. O teste de reconhecimento social consistiu em duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um intervalo de 30 min. Durante a primeira apresentação, um rato jovem (1 mês de idade) foi colocado na gaiola-moradia do rato adulto, e foi registrado o tempo que o rato adulto gastou investigando (cheirar, lambe, se aproximar, etc) o rato jovem. Ao final da primeira apresentação, o rato jovem foi retirado da caixa do rato adulto, ficando isolado em outra caixa durante o intervalo entre as apresentações. Após o intervalo de 30 min, o rato jovem foi reapresentado ao rato adulto, e registrou-se novamente o tempo de investigação gasto pelo rato adulto durante a segunda apresentação. O que acontece neste modelo é que quando o mesmo rato jovem (familiar) é reapresentado após um intervalo pequeno (menor que 40 minutos), o rato adulto “reconhece” este rato jovem sendo verificada uma redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação. Esta redução não é decorrente de uma simples habituação por parte do rato adulto, uma vez que não é observada quando um rato jovem diferente (não-familiar) daquele utilizado no primeiro encontro é apresentado ao rato adulto (Prediger e Takahashi, 2003).

### **3.5.2.10. Teste do Nado Forçado**

O estado emocional do tipo-depressivo dos animais foi avaliado com o auxílio do teste da natação forçada, como descrito por Porsolt e colaboradores (1978). Os ratos foram colocados em cilindros de plástico individuais (40 cm de altura e 17 cm de diâmetro) contendo água (até a marca de 30 cm;  $25 \pm 0.5$  °C). Duas sessões de natação foram realizadas (uma sessão de treino de 15 min seguida de uma sessão de teste de 5 min, 24 horas após). A duração total de imobilidade foi manualmente marcada durante os 5 min. Um rato foi considerado imóvel quando ficou flutuando imóvel ou apenas fazendo os movimentos necessários para manter sua cabeça acima da água.

### 3.5.3. Ensaios Neuroquímicos

#### 3.5.3.1. Atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial

Os animais foram sacrificados por decapitação e o cérebro foi rapidamente removido sobre uma placa de Petri colocada sobre gelo e recoberta com papel filtro umedecido. As estruturas cerebrais (bulbo olfatório, estriado e substância negra) foram isoladas, pesadas e mantidas refrigeradas até a homogeneização. As estruturas cerebrais foram homogeneizadas em 20 volumes de tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,3 M sucrose, 5 mM MOPS, 1 mM EGTA e 0,1 % de albumina sérica bovina. Os homogenatos foram centrifugados a 1000 x g por 10 minutos a 4° C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante foi mantido a -70 °C até a determinação enzimática.

A atividade do complexo-I foi medida pela taxa de redução do ferricianeto dependente de NADH a 420 nm ( $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) como descrito por Cassina e Radi (1996) e com algumas modificações como detalhado por Latini e colaboradores (2005). A atividade do complexo-I da cadeia respiratória foi calculada como nmol/min/mg de proteína.

#### 3.5.3.2. Eletroforese seguida de imunodeteção de proteínas (*Western Blot*)

Os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e seus cérebros foram removidos e lavados com solução salina (NaCl 0,9%) gelada (4 °C). Imediatamente após, o cérebro foi dissecado rapidamente sobre uma placa de Petri rodeada por pedras de gelo seco. O bulbo olfatório foi isolado e armazenado em freezer -70° C.

As amostras coletadas foram homogeneizadas em tampão de lise A gelado (HEPES 10 mM, pH 7,9), contendo: 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de NaF, 2 mM de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mM de  $\beta$ -glicerolfosfato, 1 mM de DTT, 10  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina, 10  $\mu\text{g/ml}$  de leupeptina e 1 mM de PMSF, posteriormente incubadas em gelo por 15 min e logo após foram centrifugadas a 15.000 x g, por 60 min (4° C). O sobrenadante foi coletado como extrato citosólico. A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada utilizando o kit Bio-Rad para determinação de proteínas (Bio-Rad Protein Assay Kit) segundo recomendações do fabricante. Os extratos citosólicos foram armazenadas em freezer a -70° C até o momento do uso.

Com o objetivo de verificar possíveis alterações no padrão de expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) após o tratamento i.n. com MPTP, foi realizado o ensaio de imunodeteção de proteínas (*Western blot*). A fração citosólica, obtida como descrito anteriormente, foi submetida à eletroforese em gel desnaturante de SDS-poliacrilamida (12%), sendo logo depois transferida para membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond<sup>TM</sup>-C Extra). Após a transferência, a membrana foi bloqueada em solução de leite desnatado (5 %) e posteriormente incubada com anticorpos primários contra TH e  $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA). A visualização das proteínas foi realizada utilizando anticorpo secundário específico conjugado a peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) e as bandas imunorreativas foram visualizadas através do uso de kit de aumento de quimiluminescência (Amersham ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents) e filme radiográfico (Amersham Hyperfilm ECL), segundo recomendações do fabricante.

### **3.5.3.3. Ensaio de Imunohistoquímica**

Após serem anestesiados com cloral hidratado (400 mg/kg; i.p.), os animais foram perfundidos pela via transcardíaca com solução salina, seguido de PBS contendo paraformaldeído 4 %. Os cérebros foram retirados e fixados na solução de paraformaldeído 4% durante 24 h, armazenados em etanol 70%, e posteriormente submetidos a um processamento histológico para realização dos estudos de microscopia. No processamento histológico as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%), seguido de diafanização em três banhos consecutivos de xilol absoluto e finalmente inclusas em parafina.

A detecção do padrão de expressão da enzima TH foi acessada em secções de tecido em parafina utilizando-se anticorpo monoclonal anti-TH (1:200; Millipore Chemicon International Technology, Billerica, MA, EUA). A restauração antigênica por alta temperatura foi procedida pela imersão das fatias em banho-maria em temperaturas de 95–98° C com 10 mM de tampão citrato trissódico com pH 6,0, por 45 min. Ligações não-específicas foram bloqueadas por sessões de incubação de 1 h com soro de cabra diluídos em PBS. Após um período de incubação de uma noite (*overnight*) a 4°C com o anticorpo primário, as fatias foram lavadas com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Envision plus (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), por 1 h em temperatura ambiente. As secções foram lavadas em PBS, e a

visualização foi completada utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina (Dako Cytomation) em solução cromógena e contramarcacão com solução de hematoxilina de Harri. Amostras dos diferentes grupos experimentais foram colocados no mesmo tipo de lâmina e processados nas mesmas condições. As imagens foram capturadas utilizando-se um microscópio (Eclipse 50i; Nikon) com uma câmera digital acoplada (DS- 5M-L1; Nikon). Foram obtidas quatro imagens da substância negra para cada rato. As imagens foram digitalizadas e transferidas para um computador, sendo a medida da intensidade dos pixels para imunomarcacão de TH calculada com o auxílio do programa NIH ImageJ 1.36b (NIH, Bethesda, MD, USA).

### **3.6. Análise Estatística**

Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.) e a análise estatística foi realizada utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma ou mais vias, adequadas ao protocolo experimental. Comparações entre grupos foram realizadas com o emprego dos testes *post hoc* de Dunnet ou Newman-Keuls. Os resultados das drogas utilizadas como controles positivos foram analisados separadamente em relação ao grupo controle (veículo) utilizando um teste “t” de Student não pareado.

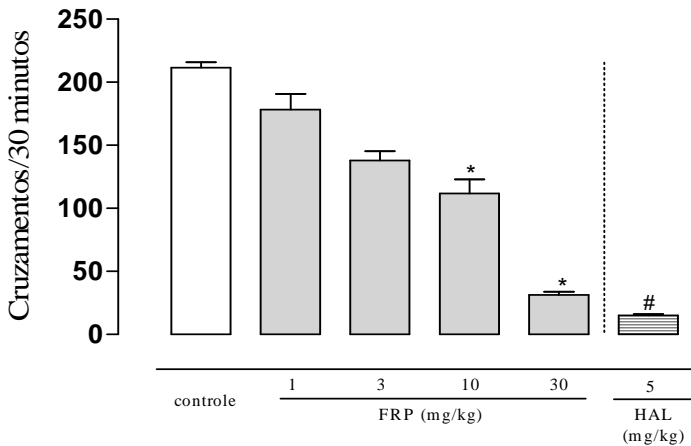
Os dados não-paramétricos foram expressos como medidas das medianas (intervalos interquartis) e analisados através do teste Kruskal-Wallis seguido do teste *post hoc* de Dunn. Os resultados das drogas utilizadas como controles positivos foram analisados separadamente em relação ao grupo controle (veículo) utilizando o teste de Mann-Whitney. O nível de significância aceito para todos os testes foi  $P \leq 0,05$ . Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico STATISTIC® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Avaliação farmacológica da FRP obtida da *C. celtidifolius* sobre o sistema nervoso central.

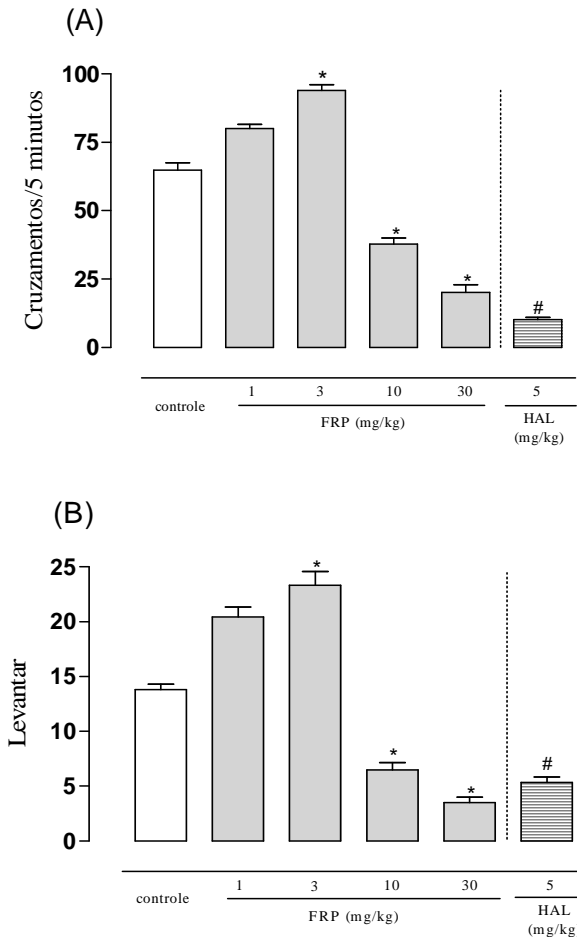
A avaliação da atividade motora espontânea de roedores é amplamente utilizada para analisar os possíveis efeitos centrais de drogas (Carpenedo et al., 1994). No presente trabalho, a locomoção dos animais foi avaliada em dois testes – caixa de atividade e campo aberto – com a utilização de grupos independentes de animais com o intuito de avaliar os efeitos da FRP da *C. celtidifolius* na locomoção geral (sessão longa, 30 min) e na locomoção induzida por um novo ambiente (sessão curta, 5 min), respectivamente.

A análise de variância efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP [ $F_{(4,40)}=10,60$ ;  $P\leq 0,001$ ] na locomoção de ratos avaliada na caixa de atividade. Posterior teste de Dunnet indicou que a administração da FRP nas doses de 10 ( $P\leq 0,01$ ) e 30 mg/kg ( $P\leq 0,0001$ ) causou um decréscimo dose-dependente no número de cruzamentos na caixa de atividade (Figura 4). O controle positivo haloperidol, como esperado, também foi capaz de diminuir a locomoção dos animais ( $t=7,01$ ;  $P\leq 0,001$ ; teste “t” de Student).



**Figura 4.** Efeitos do tratamento intraperitoneal (i.p.) com a FRP obtida da *C. celtidifolius* (1 - 30 mg/kg) na atividade locomotora de ratos avaliada na caixa de atividade durante 30 min. Haloperidol (HAL 5 mg/kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-10 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnet). # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste “t” de Student).

No teste do campo aberto, a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP tanto no número total de cruzamentos efetuados na arena [ $F_{(4,32)}=16,54$ ;  $P \leq 0,001$ ] quanto no número total de comportamentos de levantar [ $F_{(4,32)}=17,12$ ;  $P \leq 0,0001$ ], respectivamente. Posterior teste de Dunnet indicou uma curva dose-dependente bifásica com a administração de doses mais baixas da FRP (3 mg/kg;  $P \leq 0,05$ ) causando um aumento significativo no número de cruzamentos e comportamentos de levantar, e as doses mais altas da fração, 10 ( $P \leq 0,05$ ) e 30 mg/kg ( $P \leq 0,005$ ), produzindo uma diminuição significativa nestes parâmetros avaliados no campo aberto (Figura 5A e 5B, respectivamente). O controle positivo haloperidol, como esperado, também foi capaz de diminuir a os cruzamentos e atos de levantar dos animais na arena ( $t=4,90$ ;  $P \leq 0,001$ ; teste “t” de Student) e ( $t=3,85$ ;  $P \leq 0,01$ ; teste “t” de Student), respectivamente.

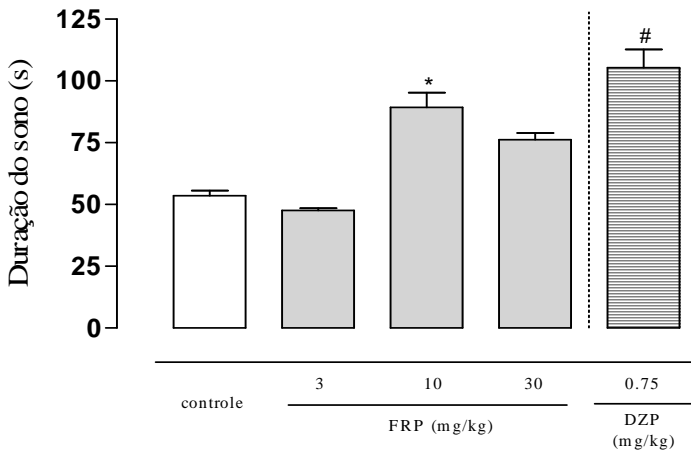


**Figura 5.** Efeitos do tratamento intraperitoneal (i.p.) com a FRP obtida da *C. celtidifolius* (1 - 30 mg/kg) na atividade locomotora de ratos avaliada através do (A) número de cruzamentos e (B) atos de levantar no campo aberto durante 5 min. Haloperidol (HAL 5 mg/kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-10 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnet). # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste “t” de Student).



Com o intuito de confirmar os efeitos sedativo/hipnóticos da FRP obtida da *C. celtidifolius*, a fração foi avaliada em dois testes mais específicos para avaliar drogas com perfil sedativo sobre o SNC: hipnose induzida por éter etílico e ptose palpebral.

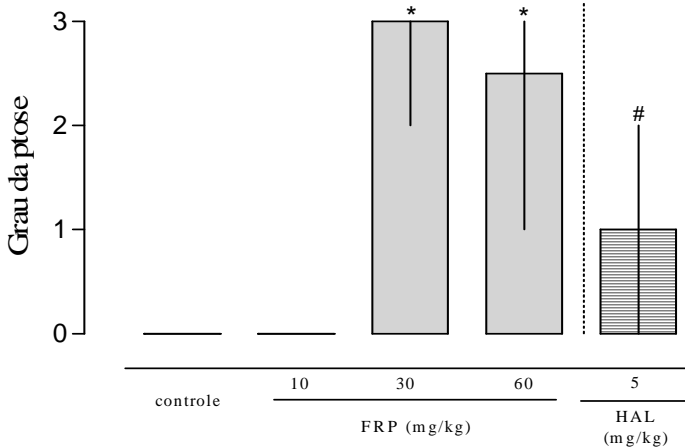
A análise de uma via revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP [ $F_{(3,28)}=4,02$ ;  $P\leq 0,05$ ] na hipnose induzida por éter etílico. Posterior teste de Dunnett indicou que a administração da FRP prolongou significativamente a hipnose induzido pelo éter na dose de 10 mg/kg ( $P\leq 0,05$ ) (Figura 6). O controle positivo diazepam, como esperado, também prolongou significativamente o sono etéreo ( $t=-3,02$ ;  $P\leq 0,01$ ; teste “t” de Student).



**Figura 6.** Efeitos do tratamento intraperitoneal (i.p.) com a FRP obtida da *C. celtidifolius* (3 - 30 mg/kg) na hipnose induzida por éter etílico. Diazepam (DZP 0,75 mg/kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-8 animais. \* $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett). # $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste “t” de Student).

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP [ $H=31,44$ ;  $P\leq 0,001$ ] na ptose palpebral em ratos. Posterior teste de Dunn indicou que a administração

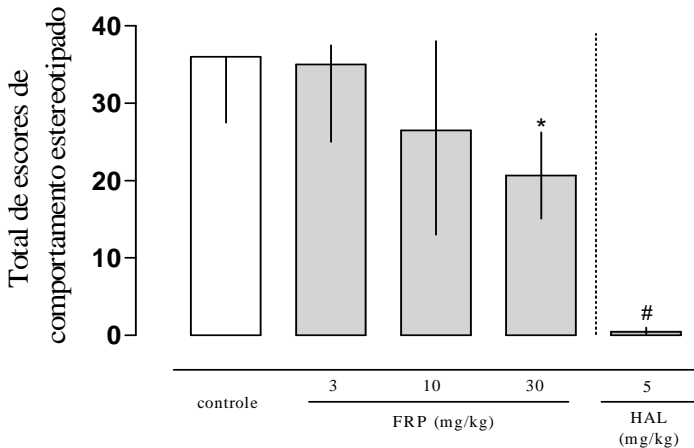
da FRP foi capaz de induzir ptose palpebral nos roedores nas doses de 30 e 60 mg/kg ( $P \leq 0,001$ ) (Figura 7). O controle positivo haloperidol, como esperado, também foi capaz de causar ptose palpebral nos animais ( $t=25,00$ ;  $P \leq 0,01$ ; teste de Mann-Whitney).



**Figura 7.** Efeitos do tratamento intraperitoneal (i.p.) com a FRP obtida da *C. celtidifolius* (10 - 60 mg/kg) sobre a ptose palpebral em ratos. Haloperidol (HAL 5 mg/kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo. Cada coluna representa a mediana dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os intervalos interquartis. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-9 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste de Mann-Whitney).

Com o objetivo de avaliar se o efeito sedativo/hipnótico da FRP seria derivado de uma atividade neuroléptica, a fração foi avaliada no comportamento estereotipado induzido pela apomorfina. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP [ $H=8,86$ ;  $P \leq 0,05$ ] na estereotipia induzida por apomorfina. Posteriormente o teste de Dunn indicou que a administração da FRP foi capaz de reduzir a estereotipia causada pela apomorfina na dose de 30 mg/kg ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 8). O controle positivo haloperidol, como esperado, bloqueou completamente o

comportamento estereotipado ( $t=0,00$ ;  $P\leq 0,001$ ; teste de Mann-Whitney).



**Figura 8.** Efeitos do tratamento intraperitoneal (i.p.) com a FRP obtida da *C. celtidifolius* (3 - 30 mg/kg) no comportamento estereotipado induzido por apomorfina (0,5 mg/kg; s.c.). Haloperidol (HAL 5 mg/kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo. Cada coluna representa a mediana dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os intervalos interquartis. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-8 animais. \* $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). # $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste de Mann-Whitney).

Com base na curva bifásica observada na locomoção induzida por um ambiente novo no teste do campo aberto, os possíveis efeitos do tipo ansiolítico da FRP foram observados no LCE. A análise de variância efetuada através da ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP na porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE [ $F_{(3,26)}=3,86$ ;  $P\leq 0,05$ ]. Posterior teste de Dunnett indicou que a administração da FRP causou um aumento significativo na porcentagem de entradas nos braços abertos nas doses de 0,3 e 3 mg/kg ( $P\leq 0,05$ ) (Tabela 3), indicando um possível perfil do tipo-ansiolítico para a FRP. Entretanto, a ANOVA de uma via não revelou um efeito significativo do fator tratamento na porcentagem do tempo gasto nos

braços abertos do LCE [ $F_{(3,26)}=2,25$ ;  $P=0,11$ ]. Os resultados obtidos não foram devido a uma estimulação da atividade locomotora uma vez que a ANOVA de uma via não revelou um efeito significativo do fator tratamento no número total de entradas nos braços fechados [ $F_{(3,26)}=2,19$ ;  $P=0,11$ ], um índice da atividade locomotora dos animais no LCE (Rodgers, 1997). O controle positivo diazepam, como esperado, aumentou a porcentagem do tempo gasto nos braços abertos [ $t=3,39$ ;  $P\leq 0,05$ ; teste “t” de Student], aumentou a porcentagem de entradas nos braços abertos [ $t=4,27$ ;  $P\leq 0,01$ ; teste “t” de Student], e não alterou o total de entradas nos braços fechados [ $t=1,33$ ;  $P=0,23$ ; teste “t” de Student].

**Tabela 3.** Efeitos do tratamento intraperitoneal com a FRP (0.3 – 3 mg/kg) obtida da *C. celtidifolius* no comportamento de ratos avaliado no labirinto em cruz elevado (LCE).

Tratamento	% Tempo nos braços abertos	% Entradas nos braços abertos	Total de entradas nos braços fechados
Controle	24.65 ± 6.21	33.22 ± 5.33	8.37 ± 0.62
FRP 0.3 mg/kg	44.01 ± 5.96	50.13 ± 3.42*	6.33 ± 0.76
FRP 1 mg/kg	34.25 ± 5.12	43.74 ± 2.40	7.25 ± 0.56
FRP 3 mg/kg	41.81 ± 5.77	45.44 ± 3.25*	6.37 ± 0.68
DZP 0.25 mg/kg	61.03 ± 9.97 <sup>#</sup>	59.36 ± 9.05 <sup>#</sup>	6.57 ± 2.02

Cada valor representa a média ± E.P.M.de 6 – 8 animais. \* $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnet). <sup>#</sup> $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste “t” de Student).

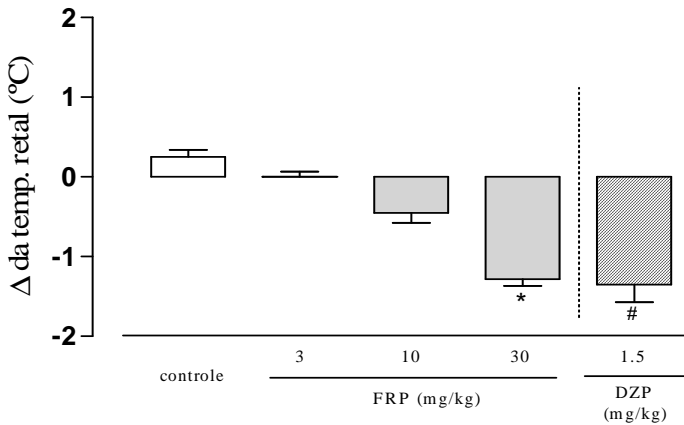
Com o intuito de avaliar as propriedades anticonvulsivantes da fração, a FRP foi avaliada nas convulsões induzidas pelo PTZ. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis não revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP na duração da primeira convulsão induzida pelo PTZ ( $P>0,05$ ), porém revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP [ $H=13,19$ ;  $P\leq 0,01$ ] na latência para a primeira convulsão induzida pelo PTZ. Posteriormente o teste de Dunn indicou que a administração da FRP foi capaz de aumentar significativamente a latência para a primeira crise convulsiva nos animais nas doses de 10 ( $P\leq 0,05$ ) e 30 mg/kg ( $P\leq 0,01$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4** Efeitos da fração rica em proantocianidinas (FRP) (3-30 mg/kg; i.p.) da *Croton celtidifolius* nos parâmetros comportamentais avaliados nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

<b>Tratamento</b>	<b>Duração primeira convulsão (s)</b>	<b>Latência p/ primeira convulsão (s)</b>	<b>Desenvolvimento de convulsão</b>	<b>Mortes</b>
<b>Controle</b>	10 (7 – 12,75)	68 (51 – 83,50)	6/6	3/6
<b>FRP 3 mg/kg</b>	10,50 (7,50 – 12,75)	566,50 (58 – 1480)	5/6	1/6
<b>FRP 10 mg/kg</b>	8 (4,5 – 13)	484 (98 – 1800)*	5/6	1/6
<b>FRP 30 mg/kg</b>	8,5 (5,25 – 11,25)	537 (237 – 1095)*	5/6	0/6
<b>DZP 5 mg/kg</b>	0 (0 – 0) <sup>#</sup>	1800 (1800 – 1800) <sup>#</sup>	0/6	0/6

Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. Os dados estão representados como mediana e intervalos interquartis. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn). <sup>#</sup> $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste de Mann-Whitney).

Os efeitos benéficos da hipotermia na atenuação das convulsões induzidas pelo PTZ foram demonstrados por Rauca e colaboradores (2000). Desta maneira, foi avaliado o possível envolvimento da hipotermia na proteção parcial da FRP contra as crises induzidas pelo PTZ através da medida da temperatura retal dos animais. A ANOVA de uma via revelou um efeito significativo do fator tratamento com FRP [ $F_{(3,20)}=8,59$ ;  $P \leq 0,001$ ] na temperatura retal dos animais. Posterior teste post-hoc de Dunnett indicou que a administração da FRP causou um decréscimo significativo na temperatura retal dos ratos na dose de 30 mg/kg ( $P \leq 0,001$ ) (Figura 9). O controle positivo diazepam, como esperado, também foi capaz de diminuir a temperatura retal dos animais [ $t=5,14$ ;  $P \leq 0,005$ ; teste “t” de Student].



**Figura 9.** Efeitos do tratamento intraperitoneal (i.p.) com a FRP obtida da *C. celtidifolius* (3 - 30 mg/kg) na temperatura retal de ratos. Diazepam (DZP 1,5 mg/kg; i.p.) foi utilizado como controle positivo. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento foi de 6 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnet). # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle (teste “t” de Student).

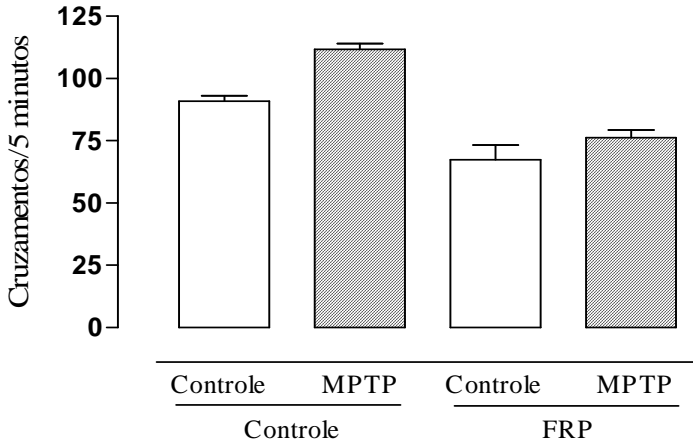
#### 4.2. Avaliação dos efeitos neuroprotetores da FRP obtida da *C. celtidifolius* em um modelo experimental da doença de Parkinson.

Com o objetivo de investigar as propriedades neuroprotetoras da FRP obtida da *C. celtidifolius* em um modelo animal da DP, a fração foi testada no modelo da administração i.n. de MPTP e avaliada com o auxílio de técnicas comportamentais e neuroquímicas.

##### 4.2.1. Testes comportamentais

Seis dias após a administração intranasal de MPTP, os animais tiveram o seu comportamento exploratório e locomotores aferidos através do teste do campo aberto (Figura 10). A análise de variância efetuada através da ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,32)}=8,28$ ;  $P \leq 0,01$ ] no

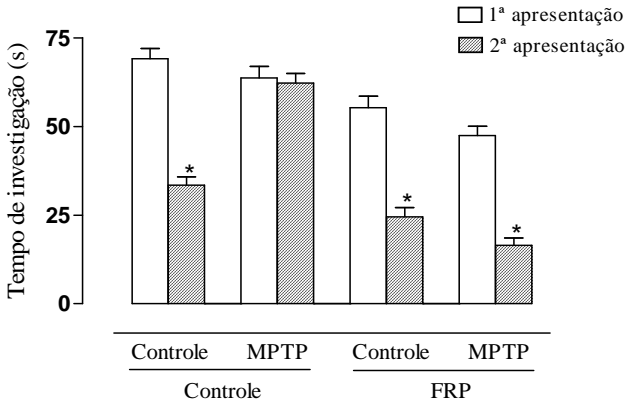
número de cruzamentos na arena. Entretanto, a ANOVA não revelou um efeito significativo do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,32)}=2,09$ ;  $P=0,16$ ] e nem uma interação entre os dois fatores [ $F_{(1,32)}=0,34$ ;  $P=0,56$ ].



**Figura 10.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celtidifolius* na atividade locomotora de ratos avaliada no campo aberto durante 5 min, 6 dias após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-10 animais.

Dez dias após administração i.n. a memória olfatória de curta duração dos animais foi aferida através do teste do reconhecimento social (Figura 11). A análise de variância efetuada através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas revelou um efeito não significativo para a interação entre o pré-tratamento com FRP e o fator repetição ( $[F_{(1,31)}=3,44$ ;  $P=0,07$ ]. Entretanto a ANOVA de duas vias para medidas repetidas revelou um efeito significativo para a interação entre tratamento com MPTP e fator repetição [ $F_{(1,31)}=6,62$ ;  $P\leq 0,05$ ], e para a interação entre os três fatores [ $F_{(1,31)}=6,74$ ;  $P\leq 0,05$ ]. Posteriormente o teste de Newman-Keuls revelou que os animais do grupo controle/MPTP gastaram o mesmo tempo investigando o rato jovem quanto na primeira exposição ( $P=0,84$ ), indicando um distúrbio na sua habilidade de reconhecimento social. Todavia, as comparações *post-hoc* mostraram que os animais dos demais grupos apresentaram uma redução

significativa no tempo de investigação do animal jovem quando este foi reapresentado após 30 min ( $P \leq 0,05$ ).

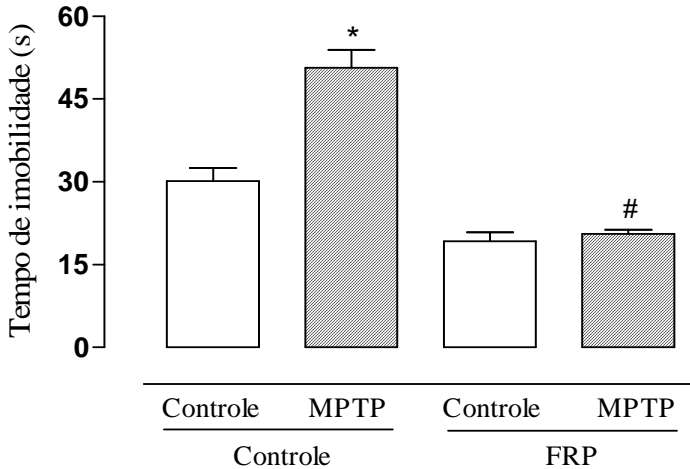


**Figura 11.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celtidifolius* na memória olfatória de curta duração de ratos avaliada no teste de reconhecimento social, 10 dias após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-10 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com a primeira apresentação do mesmo grupo (ANOVA de duas via para medidas repetidas seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Dezesseis dias após a administração i.n. de MPTP, os animais tiveram o seu comportamento emocional do tipo-depressivo aferido através do teste do nado forçado (Figura 12). A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,30)}=11,66$ ;  $P \leq 0,005$ ] no tempo total de imobilidade. Entretanto, a análise de variância não revelou um efeito significativo do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,30)}=3,32$ ;  $P=0,07$ ] e nem uma interação entre os dois fatores [ $F_{(1,30)}=2,55$ ;  $P=0,12$ ]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que o grupo controle/MPTP apresentou um tempo de imobilidade significativamente maior que o grupo controle/controle ( $P \leq 0,05$ ), enquanto que a administração da FRP preveniu este prejuízo, pois não houve diferenças significativas entre o grupo FRP/MPTP e o



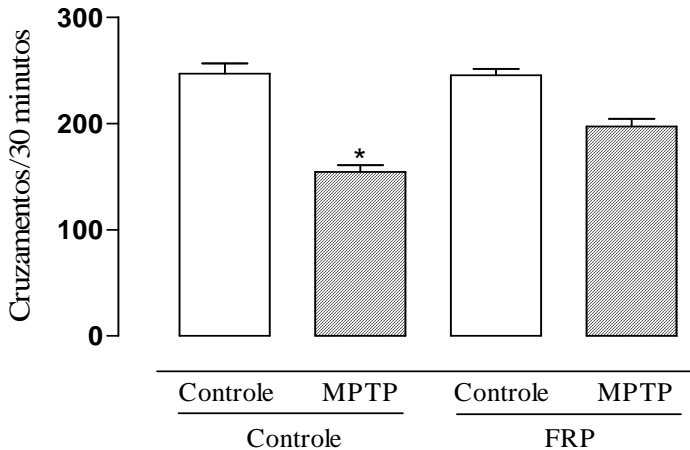
grupo controle/controle ( $P=0,27$ ), e houve diferenças significativas entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/MPTP ( $P\leq 0,01$ ).



**Figura 12.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celtidifolius* no comportamento tipo-depressivo ratos avaliada no nado forçado, 16 dias após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-10 animais. \* $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/controle; # $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/MPTP (ANOVA de duas via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Trinta e três dias após a administração i.n. de MPTP, a locomoção dos animais foi aferida através do teste da caixa de atividade durante 30 min (Figura 13). A ANOVA de duas vias revelou um efeito não significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,29)}=0,87$ ;  $P=0,36$ ] no número de cruzamentos. Entretanto, a análise de variância revelou um efeito significativo do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,29)}=10,28$ ;  $P\leq 0,005$ ]. Porém, a ANOVA não revelou um efeito significativo na interação entre os dois fatores [ $F_{(1,29)}=1,00$ ;  $P=0,32$ ]. Posteriormente o teste de Newman-Keuls indicou que o grupo controle/MPTP apresentou um número de cruzamentos significativamente menor que o grupo

controle/controle ( $P \leq 0,05$ ), enquanto que não houve diferenças significativas entre os grupos controle/controle e FRP/MPTP ( $P = 0,26$ ).



**Figura 13.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celtidifolius* na locomoção dos ratos avaliada na caixa de atividade, 33 dias após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-10 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/controle; # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/MPTP (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Newman-Keuls).

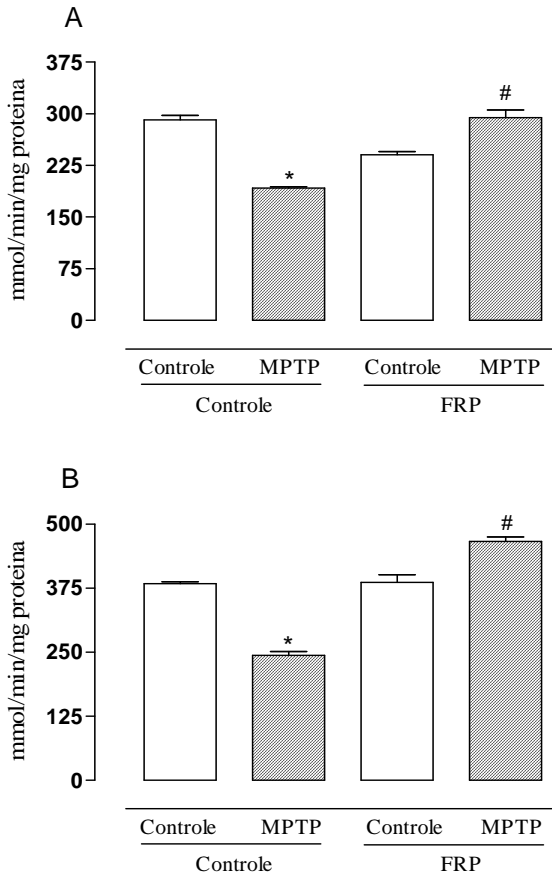
#### 4.2.2. Testes Neuroquímicos

Após seis horas do tratamento intranasal, a atividade do complexo-I da cadeia respiratória mitocondrial foi aferida no bulbo olfatório, estriado e substância negra dos animais. A análise de variância efetuada através da ANOVA de duas vias não revelou um efeito significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,33)} = 1,66$ ;  $P = 0,21$ ], nem do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,33)} = 1,3$ ;  $P = 0,26$ ] na atividade do complexo-I mitocondrial no bulbo olfatório (Figura 14A). Entretanto, a análise de variância revelou um efeito significativo na interação entre os dois fatores [ $F_{(1,33)} = 14,89$ ;  $P \leq 0,001$ ]. Posteriormente o teste de Newman-Keuls indicou que o grupo controle/MPTP apresentou uma

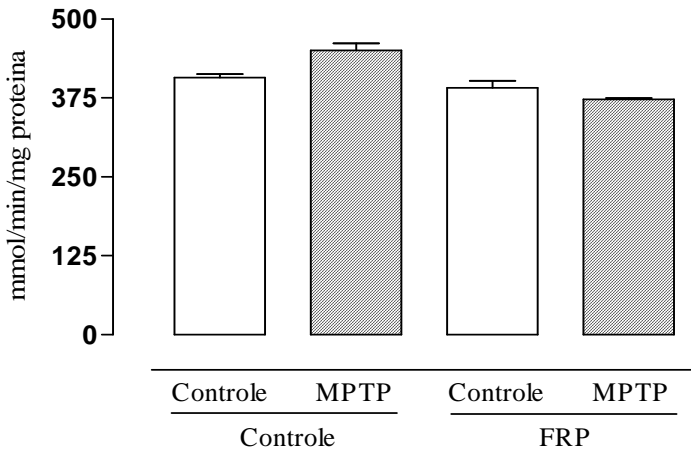
atividade do complexo-I significativamente menor que o grupo controle/controle ( $P \leq 0,01$ ), enquanto que a administração da FRP preveniu este prejuízo, pois não houve diferenças significativas entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/controle ( $P=0,92$ ), enquanto houve diferenças significantes entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/MPTP ( $P < 0,005$ ).

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,34)}=12,72$ ;  $P \leq 0,005$ ] na atividade do complexo-I mitocondrial no estriado (Figura 14B). A ANOVA revelou um efeito não significativo do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,34)}=0,91$ ;  $P=0,35$ ], porém, revelou um efeito significativo da interação entre os dois fatores [ $F_{(1,34)}=12,28$ ;  $P \leq 0,005$ ]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que o grupo controle/MPTP apresentou uma atividade do complexo-I significativamente menor do que o grupo controle/controle ( $P \leq 0,01$ ), enquanto que a administração da FRP preveniu este prejuízo, pois não houve diferenças significativas entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/controle ( $P=0,17$ ), enquanto houve diferenças significantes entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/MPTP ( $P \leq 0,001$ ).

A ANOVA de duas vias revelou um efeito não significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,36)}=3,24$ ;  $P=0,08$ ], do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,36)}=0,22$ ;  $P=0,64$ ], e nem na interação entre os dois fatores [ $F_{(1,36)}=1,35$ ;  $P=0,25$ ] na atividade do complexo-I mitocondrial na substância negra (Figura 15).



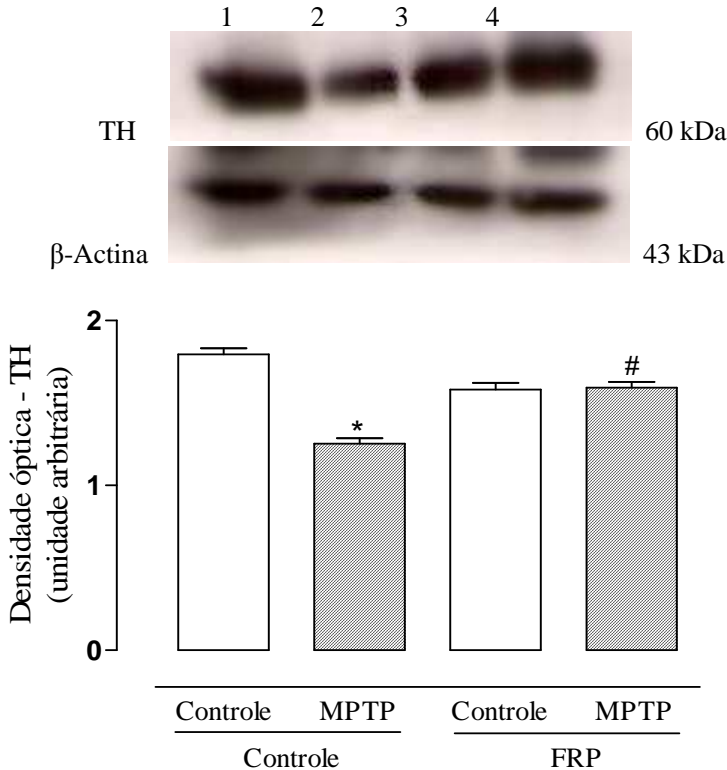
**Figura 14.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (3 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celidifolius* na atividade do complexo-I mitocondrial no (A) bulbo olfatório e (B) estriado, 6 horas após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-10 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/controle; # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/MPTP (ANOVA de duas via seguido pelo teste de Newman-Keuls).



**Figura 15.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (3 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celtidifolius* na atividade do complexo-I mitocondrial da substância negra, 6 horas após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8-10 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/controle; # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/MPTP (ANOVA de duas via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

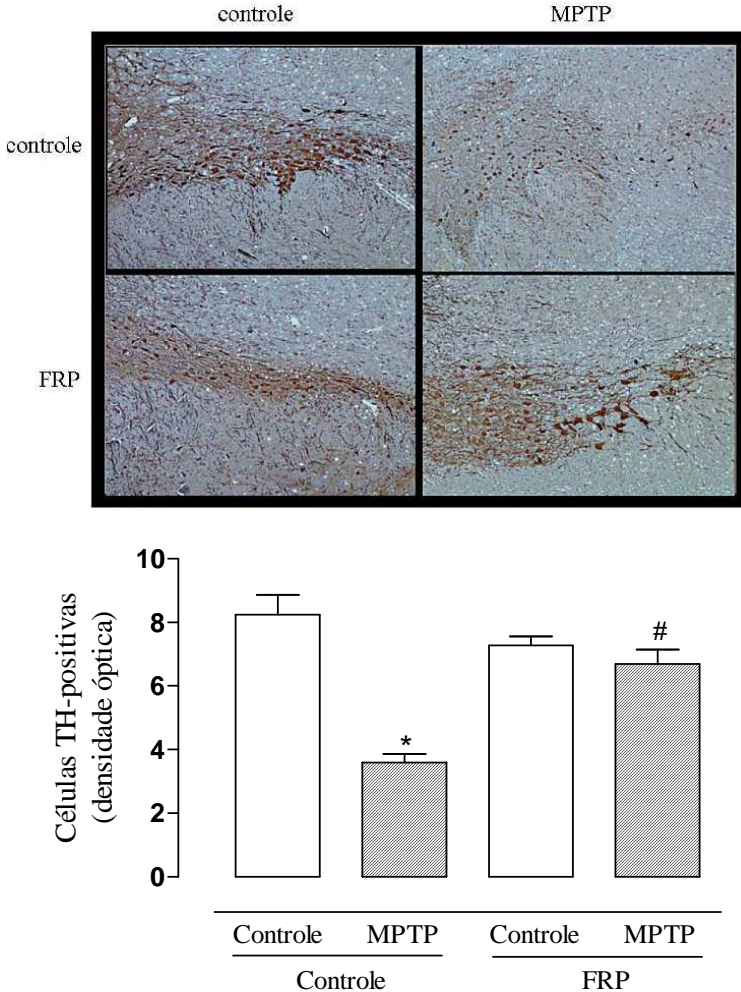
A expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) foi avaliada no bulbo olfatório dos animais sete dias após a administração i.n. de MPTP através do ensaio de *western blot*. A análise de variância efetuada através da ANOVA de duas vias revelou um efeito não significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,12)}=0,714$ ;  $P=0,41$ ] na expressão da enzima TH (Figura 16). Entretanto, a ANOVA revelou um efeito significativo do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,12)}=12,57$ ;  $P \leq 0,005$ ] e um efeito significativo na interação entre os dois fatores [ $F_{(1,12)}=13,81$ ;  $P \leq 0,005$ ]. Posteriormente o teste de Newman-Keuls indicou que o grupo controle/MPTP apresentou uma significativa diminuição na expressão da enzima TH em relação ao grupo controle/controle ( $P < 0,005$ ), enquanto que a administração da FRP preveniu esta diminuição, pois não houve diferenças significativas entre o grupo FRP/MPTP e o grupo

controle/controle ( $P=0,08$ ), enquanto houve diferenças significantes entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/MPTP ( $P\leq 0,05$ ).



**Figura 16.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celidifolius* na expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório, 7 dias após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento foi de 4 animais. \* $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/controle; # $P\leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/MPTP (ANOVA de duas via seguido pelo teste de Newman-Keuls).

Após 33 dias da administração i.n. de MPTP, a expressão da enzima TH foi avaliada na substância negra através da técnica de imunohistoquímica. A análise de variância efetuada através da ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo do fator pré-tratamento com FRP [ $F_{(1,34)}=12,72$ ;  $P\leq 0,01$ ] na expressão da enzima TH (Figura 17). A ANOVA revelou um efeito não significativo do fator tratamento com MPTP [ $F_{(1,34)}=0,91$ ;  $P=0,35$ ]. Entretanto, a análise de variância revelou um efeito significativo na interação entre os dois fatores [ $F_{(1,34)}=12,28$ ;  $P\leq 0,005$ ]. Posterior teste de Newman-Keuls indicou que o grupo controle/MPTP apresentou uma diminuição significativa na expressão da enzima TH em relação ao grupo controle/controle ( $P<0,05$ ), enquanto que a administração da FRP preveniu esta diminuição, pois não houve diferenças significativas entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/controle ( $P=0,44$ ), enquanto houve diferenças significantes entre o grupo FRP/MPTP e o grupo controle/MPTP ( $P<0,05$ ).



**Figura 17.** Efeitos do pré-tratamento intraperitoneal (5 dias) com a FRP (10 mg/kg) obtida da *C. celtidifolius* na expressão da enzima tirosina hidroxilase na SNpc, 33 dias após a administração i.n. de MPTP. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento foi de 4 animais. \* $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/controle; # $P \leq 0,05$ , quando comparado com o grupo controle/MPTP (ANOVA de duas via seguido pelo teste de Newman-Keuls).



## 5. DISCUSSÃO

Estratégias terapêuticas que cessem ou atenuem o avanço do processo neurodegenerativo encontrado na DP apresentarão um grande impacto no tratamento desta doença (Meissner et al., 2004). As veementes investigações em torno dos mecanismos pelo qual os neurônios entram em processo apoptótico ou necrótico têm impellido a crença de que o uso terapêutico de antioxidantes pode ser benéfico no processo de envelhecimento e nos distúrbios neurodegenerativos (Di Matteo e Esposito, 2003; Zhou et al., 2008). Seguindo esta linha de evidência, nos últimos anos vêm crescendo a quantidade de estudos com compostos de origem natural que apresentam possíveis e/ou hipotéticas propriedades neuroprotetoras, entre os quais os compostos polifenólicos ou polifenóis (Ramassamy, 2006; Mandel et al., 2008). Além disso, pesquisas com novas moléculas de origem natural oferecem uma grande possibilidade para avaliar novas classes químicas de medicamentos, como também, novos e relevantes mecanismos de ação (Mahady, 2001; Rocha et al., 2001; Balunas e Kinghorn, 2005).

Os polifenóis de origem natural, como os flavonóides, exibem algumas atividades biológicas bem caracterizadas, como por exemplo, uma potente atividade seqüestradora de radicais livres e queladora de ferro (Salah et al., 1995; Guo et al., 1996), além de propriedades antiinflamatórias (Haqqi et al., 1999). Recentemente também tem sido caracterizadas ações sobre o SNC para estes compostos, tais como propriedades analgésicas, ansiolíticas e sedativas (Paladini et al., 1999; Goutman et al., 2003). Todavia, diversas evidências vêm demonstrando que estas propriedades dos polifenóis não seriam unicamente responsáveis por suas ações neuroprotetoras (Mandel e Youdim, 2004). Estes compostos parecem apresentar um espectro pleiotrópico de alvos moleculares intracelulares, como a regulação do cálcio intracelular (Ishige et al., 2001), a ativação de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) (Schroeter et al., 2002; Chung et al., 2003), da proteína quinase C (PKC) (Levites et al., 2002; Levites et al., 2003), da proteína serina/treonina quinase AKT (Lorenz et al., 2003) e a modulação de diversos genes envolvidos na sobrevivência celular (Levites et al., 2003; Weinreb et al., 2003).

As catequinas são um grupo de flavonóides naturais que recentemente estão sendo intensamente estudadas em virtude de suas altas concentrações no chá verde (*Camellia sinensis*), uma planta largamente utilizada na medicina tradicional chinesa e japonesa (Crespy e Williamson, 2004). Diversas ações centrais, como ansiolíticas e

sedativas (Adachi et al., 2006) e neuroprotetoras em modelos animais das doenças de Parkinson e Alzheimer (Levites et al., 2003; Mandel e Youdim, 2004) estão sendo atribuídas a diversas catequinas, como a epigalocatequina-3-galato (EGCG). As catequinas e proantocianidinas oligoméricas (constituídas por unidades de catequina e epicatequina) são as principais moléculas encontradas na fração rica em proantocianidinas (FRP) obtida das cascas *C. celtidifolius*. Como citado anteriormente, já foram caracterizadas propriedades antinociceptivas, antiinflamatórias, antioxidantes, moduladora da enzima superóxido dismutase e vasorelaxantes para a FRP da *C. celtidifolius* (Nardi et al., 2003; Dalbo et al., 2005, 2006, 2008a).

No presente trabalho foi demonstrado que a FRP obtida da *C. celtidifolius* apresenta um amplo espectro de ação central em ratos. Nas doses mais altas testadas a fração significativamente diminuiu a locomoção espontânea dos animais no campo aberto e na caixa de atividade indicando um efeito sedativo, o qual foi corroborado pela potenciação da hipnose induzida pelo éter etílico, pela habilidade em causar ptose palpebral nos animais e pela proteção parcial contra as convulsões induzidas pelo PTZ. Além disso, as doses mais altas da FRP atenuaram o comportamento estereotipado induzido pela apomorfina e causaram hipotermia nos animais. Baixas doses da fração, no entanto, apresentaram uma atividade do tipo ansiolítica como demonstrada pela maior frequência de entradas nos braços abertos do LCE e pelo aumento na locomoção observada no campo aberto. Foi demonstrado também, que o pré-tratamento com a FRP preveniu os déficits comportamentais, disfunção mitocondrial e morte celular dopaminérgica induzida pela administração i.n. de MPTP em ratos.

A avaliação da atividade locomotora espontânea de roedores tem sido utilizada para avaliar efeitos putativos centrais de drogas (Carpenedo et al., 1994). Esse parâmetro comportamental mensura o nível de excitabilidade do SNC e agentes que suprimem essa atividade podem possuir propriedades sedativas centrais (Amos et al., 2004). Por exemplo, a locomoção e a atividade exploratória de roedores são influenciadas pelos neurolépticos ou benzodiazepínicos que agem como sedativos (Mohler et al., 2002; Geyer e Ellebroek, 2003). No presente trabalho, a locomoção dos animais foi observada em dois testes, caixa de atividade e no campo aberto, com o intuito de avaliar os efeitos da FRP na locomoção geral e na locomoção induzida por um novo ambiente, respectivamente (Rial et al., 2009). Nossos resultados demonstraram que a administração aguda da FRP aos ratos causou um decréscimo dose-dependente na atividade locomotora espontânea observada na caixa de

atividade. Entretanto, no campo aberto a análise revelou uma curva dose-resposta bifásica em forma de “U invertido”, aonde doses mais baixas da fração significativamente aumentaram a locomoção e o comportamento exploratório e altas doses significativamente diminuíram este comportamento. Este tipo de curva bifásica, denominada hormese, é comum em agonistas benzodiazepínicos (Wang et al., 2003; Calabrese et al., 2008) e pode ser atribuída a uma redução da ansiedade no ambiente novo em baixas doses e um efeito sedativo em altas doses, o qual leva a uma redução no comportamento exploratório.

Com o intuito de ratificar o efeito sedativo da FRP da *C. celtidifolius*, a fração foi posteriormente aferida em dois testes com maior especificidade para efeitos sedativo/hipnóticos no SNC: ptose palpebral e hipnose induzida por éter etílico. A hipnose induzida pelo éter etílico segue os mesmos princípios da hipnose induzida pelos barbitúricos, diferindo apenas no agente indutor, e agentes com propriedades sedativo/hipnóticas são capazes de prolongar esta hipnose (Duarte et al., 2007). Porém, devido à possibilidade de interações farmacocinéticas ocorrerem quando barbitúricos são utilizados como agentes indutores (Gyamfi et al., 2000), e o fato que muitos compostos polifenólicos são conhecidos por inibirem enzimas e proteínas (Zhu et al., 1997), o éter etílico foi escolhido como agente indutor, uma vez que este agente não é metabolizado hepaticamente. Nossos resultados demonstraram que a FRP prolongou o sono etéreo confirmando a propriedade sedativo/hipnótica, a qual foi ainda corroborada pela habilidade da fração em induzir ptose palpebral nos animais. A ptose é uma manifestação comportamental produzida por algumas classes de drogas depressoras centrais (Oka et al., 1979), incluindo os neurolépticos ou agentes analgésicos centrais, e consiste no fechamento dos olhos dos animais, podendo ser mensurada em escalas fixadas em grau (Chen e Bohner, 1961; Janssen et al., 1975).

Com a ratificação do efeito sedativo/hipnótico da FRP, o próximo objetivo foi aferir se esta propriedade seria oriunda de uma ação neuroléptica, e para isso, avaliamos o efeito da fração no comportamento estereotipado induzido pela apomorfina. A propriedade de uma droga de antagonizar a estereotipia induzida pela apomorfina em roedores tem sido correlacionada com uma potencial atividade neuroléptica (Geyer e Ellenbroek, 2003). Além disso, esta atividade é sugestiva de bloqueio de receptores de dopamina D<sub>1</sub> e/ou D<sub>2</sub>, uma vez que drogas como olanzapina, clozapina e haloperidol apresentam ação preventiva neste comportamento (Moore et al., 1992). Nossos achados demonstraram que a FRP foi capaz de atenuar o comportamento

estereotipado induzido pela apomorfina, e sugerem que um mecanismo dopaminérgico pode estar envolvido nas ações sedativas e/ou antipsicóticas da fração. Estes efeitos parecem ser específicos, uma vez que as respostas comportamentais foram dose-dependentes e nenhum evento adverso como hipoatividade induzida por contorções abdominais (*writhing*) ou diarreia foram observadas após os tratamentos i.p.

Com base na curva bifásica observada no teste do campo aberto, os possíveis efeitos do tipo ansiolítico da fração foram posteriormente avaliados no LCE. Este teste é o mais popular para a pesquisa de novos agentes ansiolíticos do tipo benzodiazepínicos e é baseado no fato que espaços abertos são extremamente aversivos a roedores (Pellow, 1986). Um aumento na exploração das áreas abertas do LCE sugere uma resposta do tipo ansiolítica (Pellow et al., 1985). No presente trabalho foi demonstrado que doses menores da fração significativamente aumentaram a porcentagem de entradas nos braços abertos e exibiram uma tendência em aumentar a porcentagem de tempo nos braços abertos do labirinto, indicando um putativo efeito do tipo ansiolítico. Estes resultados não ocorreram devido a uma estimulação da atividade locomotora uma vez que a FRP não influenciou o número de entradas nos braços fechados, que representa um índice bastante validado da atividade locomotora dos animais no LCE (Rodgers e Dalvi, 1997).

A ansiedade e as crises epilépticas são resultantes, pelo menos em parte, de um desequilíbrio entre a excitabilidade de determinados circuitos neuronais e a inibição dos disparos elétricos (Hansen et al., 2004). Este desequilíbrio parece ser, dentre outros fatores, decorrente de uma diminuição da neurotransmissão inibitória GABAérgica mediada pelo receptor GABA<sub>A</sub> (MacDonald e Olsen, 1994). Desta maneira, drogas que aumentam a atividade GABAérgica apresentam, dependendo da dose, efeitos ansiolíticos e anticonvulsivantes (MacDonald e Olsen, 1994; Hansen et al., 2004). As convulsões induzidas pelo PTZ são acopladas a marcações anormais na atividade elétrica cerebral (Taleb-Contini et al., 2008). Embora o mecanismo exato pelo qual o PTZ exerce suas ações ainda não é completamente compreendido, sugere-se que esta droga atue como um antagonista do sítio sensível à picrotoxina do complexo receptor GABA<sub>A</sub> (Ramanjaneyulu e Ticku, 1984), deprimindo a corrente ativada pelo GABA. Nossos resultados demonstraram que os animais tratados com a FRP foram parcialmente protegidos contra as convulsões induzidas pelo PTZ, sugerindo que, possivelmente, mecanismos GABAérgicos possam estar envolvidos na modulação dos efeitos induzidos pela fração.

Tem sido demonstrado também que a hipotermia pode ser útil na redução das crises epiléticas e no dano cerebral associado a elas, sendo que a hipertermia deveria ser evitada no estado epilético (Liu et al., 1993; Lundgren et al., 1994). O benefício da hipotermia na atenuação das convulsões induzidas pelo PTZ também já foi demonstrado (Rauca et al., 2000). Desta maneira, nós posteriormente investigamos se a hipotermia poderia estar envolvida na proteção parcial da FRP contra as crises induzidas pelo PTZ em ratos. De maneira interessante, apenas a dose mais alta da FRP que apresentou proteção contra as crises induzidas pelo PTZ, causou também uma redução significativa na temperatura retal dos animais. Desta maneira, outros mecanismos além da hipotermia parecem estar envolvidos nos efeitos anticonvulsivantes da FRP. Além disso, é bem sabido que a hipotermia é um efeito comum de benzodiazepínicos (Frosini et al., 2004), o que foi mais uma vez demonstrado no presente trabalho com a administração da droga padrão diazepam.

Um estudo coordenado por Chang e colaboradores (2009) demonstrou que a atividade neuronal no locus coeruleus é inibida por diversas catequinas, o que pode fornecer a explicação para os mecanismos acerca dos efeitos sedativos e/ou ansiolíticos observados nos testes comportamentais. Entretanto, as bases moleculares que permeiam essas ações ainda não são completamente entendidas. Algumas possibilidades incluem uma interação direta com proteínas de canal para alterar o gatilho ou cinética de canais iônicos dependentes de voltagem ou receptores de neurotransmissores, como GABA<sub>A</sub>,  $\mu$ -opióide e  $\alpha_2$ -adrenérgico (Aghajanian e Wang, 1986; North et al., 1987; Luque et al., 1994). Em especial, as propriedades dos flavonóides envolvendo os receptores GABA<sub>A</sub> têm sido reconhecidas (Paladini et al., 1999; Goutman et al., 2003). De peculiar interesse, Fernandez e colaboradores (2008) demonstraram que os derivados de flavan-3-ol são moduladores positivos dos receptores GABA<sub>A</sub> com alta eficácia para o subtipo  $\alpha_2$  e ação ansiolítica em camundongos. De acordo com Mohler e colaboradores (2002), a subunidade  $\alpha_1$  do receptor GABA<sub>A</sub> é responsável por mediar a sedação, memória anterógrada e parte da proteção contra crises, enquanto que a subunidade  $\alpha_2$  do receptor GABA<sub>A</sub> a ansiólise.

Entretanto, com base no modelo de estrutura-atividade proposto por Dekermendjian e colaboradores (1999) para flavonas agindo no sítio benzodiazepínico, as catequinas seriam preditivamente inativas no sítio benzodiazepínico do receptor GABA<sub>A</sub>, uma vez que elas não apresentam o grupo 4-carbonil, possuem um grupo 7-hidroxi e são não-planares. Contudo, diversos estudos têm exibido resultados

contraditórios a esta interpretação, demonstrando ações ansiolíticas (Vignes et al., 2006) e sedativa/hipnóticas – parcialmente mediadas através de receptores GABA<sub>A</sub> – de catequinas *per se* (Adachi et al., 2006).

As propriedades farmacológicas da FRP sobre o SNC também são validadas por estudos de biodisponibilidade que demonstraram que oligômeros de proantocianidinas são rapidamente absorvidos em ratos (Schotz e Noldner, 2007) e flavonóides, incluindo catequinas, permeiam as membranas biológicas e a barreira hemato-encefálica, acumulando-se no cérebro após administração sistêmica (Kavvadias et al., 2004; Suganuma et al., 1998; Youdim et al., 2004). Além disso, flavonóides, incluindo a epicatequina, podem ser transformados *in vivo* por glicuronização (Schroeter et al., 2002). Corroborando com esses achados, a presença da epicatequina glicuronídeo e da 3'-*O*-metil epicatequina glicuronídeo no tecido cerebral de ratos após a administração oral foi demonstrado por Abd El Mohsen e colaboradores (2002).

As ações farmacológicas já descritas e caracterizadas para a FRP obtida da *C. celtidifolius*, juntamente com a habilidade das catequinas em penetrarem no cérebro após administração sistêmica, preenchem os requisitos para uma potencial/hipotética ação neuroprotetora. A hipótese atual acerca da patogênese da DP idiopática aponta para danos oxidativos a biomoléculas neuronais, acúmulo de ferro em áreas cerebrais específicas e processo inflamatório com proliferação de micróglia reativa como aspectos patológicos iniciais e onipresentes (Mandel e Youdim, 2004; Hald e Lotharius, 2005; Przedborski e Ischiropoulos, 2005). Além disso, estudos neuroquímicos em pacientes e modelos animais da doença têm fornecido evidências que envolvem processos suplementares na fisiopatologia da DP, tais como: neurotoxicidade glutamatérgica, elevação de óxido nítrico e disfunção dos sistemas ubiquitina-proteossoma e mitocondrial, o que levaria a uma quebra do metabolismo energético seguida de uma elevação do cálcio intraneuronal, aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas e uma diminuição de glutatona reduzida tecidual (um fator essencial para a remoção do peróxido de hidrogênio). Todos estes achados indicam claramente que o processo de neurodegeneração dopaminérgica é multifatorial, e ajudam a explicar porque as terapias neuroprotetoras que utilizam apenas uma classe de drogas, não tem apresentado resultados animadores até o presente momento (Mandel e Youdim, 2004).

O desenvolvimento de novas terapias neuroprotetoras na DP depende da existência de modelos animais representativos, que permitam a avaliação de novos agentes farmacológicos e estratégias terapêuticas antes que estes sejam aplicados em testes clínicos (Gerlach

et al., 2003). A DP é uma das várias doenças humanas que parece não ocorrer espontaneamente em outros animais. Entretanto, as características desta doença podem ser mimetizadas em animais de laboratório (como roedores) através da administração de diferentes compostos, como por exemplo: reserpina, 6-hidroxi-dopamina, rotenona e MPTP (Dawson, 2000; Beal, 2001).

O MPTP é uma pré-toxina cuja toxicocinética é complexa, composta de várias etapas e com o envolvimento do estresse oxidativo (Przedborski et al., 2004). Uma vez no cérebro, o MPTP é rapidamente convertido ao íon tóxico 1-metil-4-fenil-piperidínio ( $MPP^+$ ) pela enzima MAO-B, principalmente nas células da glia. O  $MPP^+$  é uma molecular polar, ao contrário do seu precursor MPTP, e não atravessa as membranas biológicas livremente. Entretanto, esta toxina apresenta alta afinidade de ligação ao transportador de dopamina (DAT), fazendo com que seja captado nos terminais dopaminérgicos (Beal, 2001). Os neurônios dopaminérgicos acumulam o  $MPP^+$  na mitocôndria a níveis que inibem o complexo-I da cadeia transportadora de elétrons ocasionando uma severa depleção de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO), em especial a do superóxido. A produção de ERO, em decorrência da inibição do complexo-I mitocondrial, parece ser um dos eventos primários do mecanismo de neurotoxicidade do  $MPP^+$ . E embora não seja o responsável direto pela morte neuronal, a formação de ERO funciona como um ativador de diferentes cascatas celulares que acarretam morte dos neurônios dopaminérgicos (Hasegawa et al., 1997; Beal, 2001; Przedborski et al., 2004).

Franco e colaboradores (2007) demonstraram que a administração i.n. de MPTP causou mudanças tempo-dependente nos marcadores de estresse oxidativo no tecido cerebral de ratos, inferidas através de um aumento significativo nos produtos finais da peroxidação lipídica e do metabolismo da glutatona. Estas mudanças foram observadas principalmente no bulbo olfatório e estriado dos animais, atingindo um pico de resposta em seis horas após a administração da neurotoxina. Entretanto os autores não observaram, em nenhum período de tempo analisado, mudanças significativas nos parâmetros de estresse oxidativo na substância negra dos animais.

No presente trabalho, a atividade do complexo-I mitocondrial foi avaliada após seis horas da infusão i.n. do MPTP em estruturas cerebrais sabidamente acometidas na DP. Este tempo foi escolhido justamente por ser o pico do estresse oxidativo induzido pela neurotoxina. Como esperado, o MPTP foi capaz de inibir significativamente a atividade do complexo-I no bulbo olfatório e no estriado dos animais, porém não

alterou a atividade do complexo na substância negra, corroborando com os estudos que demonstraram que a administração i.n. da neurotoxina não causa mudanças significativas nos marcadores de estresse oxidativo nesta estrutura. Uma provável explicação para esta resistência da substância negra pode ser devido ao MPP<sup>+</sup> ser basicamente captado pelos terminais dopaminérgicos, sendo que o estriado constitui o maior sítio para esta captação (Franco et al., 2007). Todavia, de maior interesse, o pré-tratamento com a FRP foi capaz de impedir esta neurotoxicidade do MPTP, mantendo a atividade do complexo-I mitocondrial em níveis normais tanto no bulbo olfatório quanto no estriado. Esta atividade pode ser ao menos em parte, oriunda de uma proteção da FRP contra o estresse oxidativo na mitocôndria. De fato, como o estresse oxidativo mitocondrial é um ponto chave em doenças neurodegenerativas como a DP, as pesquisas atuais estão focando na descoberta de novos antioxidantes que sejam seletivos para a mitocôndria (Zhao et al., 2005). Com respeito às catequinas, um estudo com cultura de neurônios cerebelares conduzido por Schoroeder e colaboradores (2009) demonstrou que após incubação com <sup>3</sup>H-EGCG, 90 a 95% desta catequina se acumulou na fração mitocondrial, demonstrando que estas moléculas podem apresentar certa seletividade por esta estrutura celular. Este mesmo estudo demonstrou ainda que esta catequina apresentou ação neuroprotetora em modelos que envolviam apoptose induzida por insultos causadores de estresse oxidativo mitocondrial, corroborando com nossos achados acerca das propriedades da FRP contra a neurotoxicidade do MPTP.

Com relação à sintomatologia da DP, nos últimos anos vêm crescendo o número de trabalhos demonstrando que ela não está restrita somente às alterações motoras. Na realidade, a DP parece se tratar de uma doença multidimensional, estando associada, além dos déficits motores, a uma série de distúrbios emocionais e cognitivos que resultam em uma perda na qualidade de vida do indivíduo (Gupta e Bathia, 2000). Dentre os sintomas verificados na DP destacam-se: depressão (Cummings e Masterman, 1999); ansiedade (Richard et al., 2004); prejuízos cognitivos (Goldman et al., 1998) e prejuízos olfatórios (Doty et al., 1988). Os prejuízos comportamentais induzidos pela administração intranasal de MPTP em ratos foram estudados por Prediger e colaboradores (2006). Neste estudo foi demonstrado que após a administração da neurotoxina os animais apresentaram prejuízos olfatórios, cognitivos e motores, semelhantes e correlacionados aos observados durante as diferentes fases do desenvolvimento da DP.



De acordo com a hipótese de Braak, o bulbo olfatório é a primeira estrutura cerebral a exibir a patologia relacionada com a DP (Braak et al., 2004). Corroborando esta hipótese, aproximadamente 90% dos pacientes parkinsonianos exibe uma disfunção olfatória já nas fases iniciais da doença, que não responde aos tratamentos atuais da DP (Doty et al., 1988). Esta disfunção ocorre porque a DA aparenta ser necessária para a memória olfatória, uma vez que a sua liberação aumenta durante o aprendizado olfatório (Coopersmith et al., 1991), e os antagonistas de receptores de DA (Weldon et al., 1991; Prediger et al., 2004, 2005) ou tratamentos que reduzem a neurotransmissão dopaminérgica como a reserpina (Prediger et al., 2004, 2005) e o MPTP (Dluzen e Kreutzberg, 1993) inibem a memória olfatória. Corroborando estes achados, no presente estudo, os ratos infundidos com MPTP gastaram significativamente mais tempo investigando o rato jovem durante a segunda apresentação, assim como fizeram no primeiro encontro, sugerindo um prejuízo na habilidade em reconhecer o rato jovem após um curto período de tempo. Além disso, este prejuízo cognitivo foi correlacionado temporalmente com uma redução significativa na expressão da enzima TH no bulbo olfatório de ratos. De maior interesse, os achados do presente estudo demonstraram que o pré-tratamento com a FRP preveniu significativamente tanto o déficit cognitivo quanto a redução na expressão da TH, indicando mais uma vez, a propriedade neuroprotetora da fração contra a neurotoxicidade do MPTP em ratos.

Além das disfunções olfatórias, desordens depressivas comumente ocorrem em pacientes com DP (Cummings e Masterman, 1999) afetando aproximadamente 40% dos pacientes nos estágios iniciais da doença (Tolosa et al., 2007). Todavia, de acordo com diversos estudos, a patofisiologia acerca das desordens de humor na DP parece ser diferente dos mecanismos acerca dos sintomas comportamentais observados na população em geral (Lieberman, 2006). Em acordo com a literatura, nós observamos que a infusão i.n. de MPTP aos ratos causou um quadro do tipo depressivo, desamparo comportamental, refletido por um aumento no tempo de imobilidade no teste do nado forçado, o qual reflete um estado emocional negativo (Porsolt et al., 1978). Esse estado do tipo depressivo pode ser correlacionado com alterações neuroquímicas ao nível estriatal (Tadaiesky et al., 2008). Os efeitos protetores da FRP foram demonstrados mais uma vez, sendo que a fração preveniu significativamente esse prejuízo comportamental induzido pelo MPTP, visto que manteve o tempo de imobilidade dos animais nos níveis normais, semelhantes ao grupo controle.

Adicionalmente, nós observamos que a infusão i.n. de MPTP aos ratos gerou apenas um prejuízo locomotor tardio observado na caixa de atividade, em acordo com o observado por Prediger e colaboradores (2006). Entretanto, nossos achados contrastam com estudos prévios (Da Cunha et al., 2001; Gevaerd et al., 2001; Miyoshi et al., 2002; Ferro et al., 2005) que demonstraram que a infusão bilateral de MPTP, diretamente na SNpc, não foi capaz de alterar grosseiramente a locomoção dos animais. Contudo, a administração de MPTP pela via i.n. pode estar atuando de um modo mais difuso do que o diretamente infundido na SNpc. Assim, estruturas cerebrais (como o bulbo olfatório, amígdala e loco cerúleo) implicados nas respostas sensório-motivacionais podem ser afetadas pela administração i.n. de MPTP. A redução no comportamento exploratório de ratos tratados com MPTP observada na caixa de atividade pode não ser inteiramente relacionada a anormalidades motoras. Todavia, essa redução tardia na atividade locomotora foi acompanhada por uma diminuição significativa da expressão da enzima TH na substância negra dos animais. A administração da FRP novamente demonstrou suas propriedades neuroprotetoras, visto que preveniu significativamente o déficit locomotor e a redução na expressão da TH na substância negra dos animais, corroborando mais uma vez o potencial neuroprotetor dos polifenóis.

Um possível mecanismo pela qual a FRP pode estar atuando para exercer os efeitos protetores contra a neurotoxicidade do MPTP demonstrados no presente trabalho, pode envolver a estrutura do tipo catecol presente nas catequinas (Levites et al., 2001). Compostos contendo a estrutura do tipo catecol são potentes antioxidantes e queladores do íon férrico, como a (R-) e (S-) apomorfina (Gassen et al., 1996; Grinberg et al., 1997). A estrutura catecol também pode estar correlacionada com uma atividade inibitória na captação da [<sup>3</sup>H] DA, algo que foi demonstrado por Pan e colaboradores (2003) em sinaptossomas estriatais extraídos de camundongos tratados pela via i.p. com uma única dose de catequinas do chá verde. Esta inibição do transportador de dopamina por catequinas presentes na FRP poderia acarretar bloqueio da captação do produto metabólico do MPTP, a neurotoxina MPP<sup>+</sup>, assim protegendo os neurônios dopaminérgicos contra a toxicidade do MPP<sup>+</sup> (Weinreb et al., 2009). Todavia, estas ações neuroprotetoras das catequinas não parecem ocorrer devido a uma interferência na conversão do MPTP ao seu metabólito tóxico MPP<sup>+</sup>, uma reação mediada pela MAO-B, uma vez que as catequinas são maus inibidores desta enzima (Levites et al., 2001).

Além disso, é bem caracterizado que as catequinas possuem uma vasta atividade seqüestradora de radicais livres e agem como antioxidantes biológicos (Mandel e Youdim, 2004). As catequinas podem seqüestrar tanto o radical superóxido quanto o hidroxil, assim como radicais peroxil, óxido nítrico, oxigênio singlete e peróxidos lipídicos, como também peroxinitritos por prevenir a nitração da tirosina. Adicionalmente, estes compostos podem quelar íons metálicos, como o cobre (II) e o ferro (III) para formar complexos inativos e prevenir a geração de potenciais radicais livres tóxicos. As catequinas tem sido reconhecidas como mais eficientes que antioxidantes como as vitaminas E e C (Weinreb et al., 2009). Ademais, como já descrito anteriormente, diversos dados na literatura vêm demonstrando que os polifenóis exercem seus efeitos neuroprotetores independentemente de suas ações antioxidantes.

## 6. CONCLUSÕES

- Os resultados do presente estudo demonstraram ações sedativo/hipnóticas, neurolépticas e ansiolíticas para a FRP obtida das cascas da *Croton celtidifolius*;
- O pré-tratamento com a FRP da *C. celtidifolius* foi capaz de prevenir os déficits cognitivos, emocionais e locomotores induzidos pela administração intranasal de MPTP (1 mg/narina).
- O pré-tratamento com a FRP da *C. celtidifolius* foi capaz de prevenir a disfunção mitocondrial no bulbo olfatório e estriado dos animais tratados pela via intranasal com MPTP (1 mg/narina).
- O pré-tratamento com a FRP da *C. celtidifolius* foi capaz de prevenir a morte celular dopaminérgica no bulbo olfatório e substância negra dos animais tratados pela via intranasal com MPTP (1 mg/narina).
- Nossos achados reforçam a hipótese de que polifenóis podem ser ferramentas terapêuticas úteis como agentes neuroprotetores na doença de Parkinson.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL MOHSEN, M.M.; KUHNLE, G.; RECHNER, A.R.; SCHROETER, H.; ROSE, S.; JENNER, P.; RICE-EVANS, C.A. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. **Free Radic Biol Med.** 33(12): 1693-702, 2002.

ADACHI, N.; TOMONAGA, S.; TACHIBANA, T.; DENBOW, D.M.; FURUSE, M. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates acute stress responses through GABAergic system in the brain. **Eur J Pharmacol.** 531(1-3): 171-5, 2006.

AGHAJANIAN, G.K.; WANG, Y.Y. Pertussis toxin blocks the outward currents evoked by opiate and alpha 2-agonists in locus coeruleus neurons. **Brain Res.** 371(2): 390-4, 1986.

ALMEIDA, R.N. Psicofarmacologia: Fundamentos Práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 357p.

AMOS, S.; AKAH, P.A.; ENWEREM, N.; CHINDO, B.A.; HUSSAINI, I.M.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Behavioural effect of Pavetta crassipes extract on rodents. **Pharmacol Biochem Behav.** 77(4): 751-9, 2004.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav.** 21(2): 205-35, 1973.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.** 78(5): 431-41, 2005.

BARRIO, J.R.; HUANG, S.C.; PHELPS, M.E. Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic diseases. **Biochem Pharmacol.** 54(3): 341-8, 1997.

BASTIANETTO, S.; ZHENG, W.H.; QUIRION, R. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. **Br J Pharmacol.** 131(4): 711-20, 2000.

BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci.** 2(5): 325-34, 2001.

BIBBIANI, F.; OH, J.D.; CHASE, T.N. Serotonin 5-HT1A agonist improves motor complications in rodent and primate parkinsonian models. **Neurology**. 57(10): 1829-34, 2001.

BLANCO, M.M.; COSTA, C.A.; FREIRE, A.O.; SANTOS, J.G., JR.; COSTA, M. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**. 16(2-3): 265-70, 2009.

BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**. 62(1): 63-88, 2000.

BRAAK, H.; GHEBREMEDHIN, E.; RUB, U.; BRATZKE, H.; DEL TREDICI, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**. 318(1): 121-34, 2004.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr Rev**. 56(11): 317-33, 1998.

BRISKIN, D.P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiol**. 124(2): 507-14, 2000.

CALABRESE, E.J. An assessment of anxiolytic drug screening tests: hormetic dose responses predominate. **Crit Rev Toxicol**. 38(6): 489-542, 2008.

CAMPOS-ESPARZA, M.R.; SANCHEZ-GOMEZ, M.V.; MATUTE, C. Molecular mechanisms of neuroprotection by two natural antioxidant polyphenols. **Cell Calcium**. 45(4): 358-68, 2009.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol Biochem Behav**. 75(3): 501-12, 2003.

CARLINI, E.A.; CONTAR, J.D.D.P.; SILVA-FILHO, A.R.; DA SILVEIRA-FILHO, N.G.; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **J Ethnopharmacol**. 17(1): 37-64, 1986.

CARPENEDO, R.; CHIARUGI, A.; RUSSI, P.; LOMBARDI, G.; CARLA, V.; PELLICCIARI, R.; MATTOLI, L.; MORONI, F. Inhibitors of kynurenine hydroxylase and kynureninase increase cerebral formation of kynurenate and have sedative and anticonvulsant activities. **Neuroscience**. 61(2): 237-43, 1994.

CASSINA, A.; RADÌ, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. **Arch Biochem Biophys**. 328(2): 309-16, 1996.

CHANG, K.C.; YANG, J.J.; WANG-HSU, E.C.; CHIU, T.H.; HSU, F.C. (-)Epigallocatechin-3-gallate inhibits the spontaneous firing of rat locus coeruleus neuron. **Neurosci Lett**. 452(2): 141-5, 2009.

CHEN, G.; BOHNER, B. The anti-reserpine effects of certain centrally-acting agents. **J Pharmacol Exp Ther**. 131: 179-84, 1961.

CHO, E.S.; JANG, Y.J.; KANG, N.J.; HWANG, M.K.; KIM, Y.T.; LEE, K.W.; LEE, H.J. Cocoa procyanidins attenuate 4-hydroxynonenal-induced apoptosis of PC12 cells by directly inhibiting mitogen-activated protein kinase kinase 4 activity. **Free Radic Biol Med**. 46(10): 1319-27, 2009.

CHUNG, J.H.; HAN, J.H.; HWANG, E.J.; SEO, J.Y.; CHO, K.H.; KIM, K.H.; YOUN, J.I.; EUN, H.C. Dual mechanisms of green tea extract (EGCG)-induced cell survival in human epidermal keratinocytes. **Faseb J**. 17(13): 1913-5, 2003.

CLAVIN, M.; GORZALCZANY, S.; MACHO, A.; MUNOZ, E.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C.; MARTINO, V. Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnotianum*. **J Ethnopharmacol**. 112(3): 585-9, 2007.

COOPERSMITH, R.; WEIHMULLER, F.B.; KIRSTEIN, C.L.; MARSHALL, J.F.; LEON, M. Extracellular dopamine increases in the neonatal olfactory bulb during odor preference training. **Brain Res**. 564(1): 149-53, 1991.

COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com

ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Ver Virtual Quim.** 1(1): 58-66, 2009.

CRESPY, V.; WILLIAMSON, G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. **J Nutr.** 134(12 Suppl): 3431S-40S, 2004.

CUEVAS, E.; LIMON, D.; PEREZ-SEVERIANO, F.; DIAZ, A.; ORTEGA, L.; ZENTENO, E.; GUEVARA, J. Antioxidant effects of epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. **Eur J Pharmacol.** 616(1-3): 122-7, 2009.

CUMMINGS, J.L.; MASTERMAN, D.L. Depression in patients with Parkinson's disease. **Int J Geriatr Psychiatry.** 14(9): 711-8, 1999.

DA CUNHA, C.; GEVAERD, M.S.; VITAL, M.A.; MIYOSHI, E.; ANDREATINI, R.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; CANTERAS, N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behav Brain Res.** 124(1): 9-18, 2001.

DA ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr Opin Pharmacol.** 1(4): 364-9, 2001.

DALBO, S.; MOREIRA, E.G.; BRANDAO, F.C.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; MICKE, G.A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Mechanisms underlying the vasorelaxant effect induced by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* in rat small resistance arteries. **J Pharmacol Sci.** 106(2): 234-41, 2008a.

DALBO, S.; GOULART, S.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M.G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Activation of endothelial nitric oxide synthase by proanthocyanidin-rich fraction from *Croton celtidifolius* (Euphorbiaceae): involvement of extracellular calcium influx in rat thoracic aorta. **J Pharmacol Sci.** 107(2): 181-9, 2008b.

DALBO, S.; JURGENSEN, S.; HORST, H.; RUZZA, A.A.; SOETHE, D.N.; SANTOS, A.R.; PIZZOLATTI, M.G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antinociceptive effect of proanthocyanidins from *Croton celtidifolius* bark. **J Pharm Pharmacol.** 57(6): 765-71, 2005.



DALBO, S.; JURGENSEN, S.; HORST, H.; SOETHE, D.N.; SANTOS, A.R.; PIZZOLATTI, M.G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Analysis of the antinociceptive effect of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* barks: evidence for a role of the dopaminergic system. **Pharmacol Biochem Behav.** 85(2): 317-23, 2006.

DAWSON, T.M. New animal models for Parkinson's disease. **Cell.** 101(2): 115-8, 2000.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. **Nat Neurosci.** 5 Suppl: 1058-61, 2002.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science.** 302(5646): 819-22, 2003.

DE SMET, P.A. Herbal remedies. **N Engl J Med.** 347(25): 2046-56, 2002.

DEKERMENDJIAN, K.; KAHNBERG, P.; WITT, M.R.; STERNER, O.; NIELSEN, M.; LILJEFORS, T. Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex. **J Med Chem.** 42(21): 4343-50, 1999.

DEXTER, D.T.; WELLS, F.R.; LEES, A.J.; AGID, F.; AGID, Y.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. **J Neurochem.** 52(6): 1830-6, 1989.

DI MATTEO, V.; ESPOSITO, E. Biochemical and therapeutic effects of antioxidants in the treatment of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis. **Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.** 2(2): 95-107, 2003.

DLUZEN, D.E.; KEFALAS, G. The effects of intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) upon catecholamine concentrations within olfactory bulbs and corpus striatum of male mice. **Brain Res.** 741(1-2): 215-9, 1996.

DLUZEN, D.E.; KREUTZBERG, J.D. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. **Brain Res.** 609(1-2): 98-102, 1993.

DOTY, R.L.; DEEMS, D.A.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology.** 38(8): 1237-44, 1988.

DUARTE, F.S.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; DE LIMA, T.C. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacol Biochem Behav.** 86(1): 150-61, 2007.

DUNNETT, S.B.; BJORKLUND, A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. **Nature.** 399(6738 Suppl): A32-9, 1999.

FERNANDEZ, S.P.; MEWETT, K.N.; HANRAHAN, J.R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A. Flavan-3-ol derivatives are positive modulators of GABA(A) receptors with higher efficacy for the alpha(2) subtype and anxiolytic action in mice. **Neuropharmacology.** 55(5): 900-7, 2008.

FENG, Y.; WANG, X.P.; YANG, S.G.; WANG, Y.J.; ZHANG, X.; DU, X.T.; SUN, X.X.; ZHAO, M.; HUANG, L.; LIU, R.T. Resveratrol inhibits beta-amyloid oligomeric cytotoxicity but does not prevent oligomer formation. **Neurotoxicology.** 30(6): 986-95, 2009.

FERRO, M.M.; BELLISSIMO, M.I.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ANGELLUCCI, M.E.; CANTERAS, N.S.; DA CUNHA, C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **J Neurosci Methods.** 148(1): 78-87, 2005.

FINE, A.M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. **Altern Med Rev.** 5(2): 144-51, 2000.

FISHER, R.S. Animal models of the epilepsies. **Brain Res Brain Res Rev.** 14(3): 245-78, 1989.

FOX, S.H.; LANG, A.E.; BROTCHE, J.M. Translation of nondopaminergic treatments for levodopa-induced dyskinesia from MPTP-lesioned nonhuman primates to phase IIa clinical studies: keys to success and roads to failure. **Mov Disord.** 21(10): 1578-94, 2006.

FRANCO, J.; PREDIGER, R.D.; PANDOLFO, P.; TAKAHASHI, R.N.; FARINA, M.; DAFRE, A.L. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. **Life Sci.** 80(20): 1906-14, 2007.

FUKAE, J.; MIZUNO, Y.; HATTORI, N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Mitochondrion.** 7(1-2): 58-62, 2007.

GASSEN, M.; GLINKA, Y.; PINCHASI, B.; YODIM, M.B. Apomorphine is a highly potent free radical scavenger in rat brain mitochondrial fraction. **Eur J Pharmacol.** 308(2): 219-25, 1996.

GERLACH, M.; BEN-SHACHAR, D.; RIEDERER, P.; YODIM, M.B. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? **J Neurochem.** 63(3): 793-807, 1994.

GERLACH, M.; FOLEY, P.; RIEDERER, P. The relevance of preclinical studies for the treatment of Parkinson's disease. **J Neurol.** 250 Suppl 1: I31-4, 2003.

GEVAERD, M.S.; TAKAHASHI, R.N.; SILVEIRA, R.; DA CUNHA, C. Caffeine reverses the memory disruption induced by intranigral MPTP-injection in rats. **Brain Res Bull.** 55(1): 101-6, 2001.

GEYER, M.A.; ELLENBROEK, B. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 27(7): 1071-9, 2003.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radic Biol Med.** 32(12): 1264-75, 2002.

GOLDMAN, W.P.; BATY, J.D.; BUCKLES, V.D.; SAHRMANN, S.; MORRIS, J.C. Cognitive and motor functioning in Parkinson's disease – subjects with and without questionable dementia. **Arch. Neurol.** 55: 674–680, 1998.

GOUTMAN, J.D.; WAXEMBERG, M.D.; DONATE-OLIVER, F.; POMATA, P.E.; CALVO, D.J. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA(A) and GABA(C) receptors. **Eur J Pharmacol.** 461(2-3): 79-87, 2003.

GRAF, B.A.; MILBURY, P.E.; BLUMBERG, J.B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. **J Med Food.** 8(3): 281-90, 2005.

GRINBERG, L.N.; NEWMARK, H.; KITROSSKY, N.; RAHAMIM, E.; CHEVION, M.; RACHMILEWITZ, E.A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochem Pharmacol.** 54(9): 973-8, 1997.

GUO, Q.; ZHAO, B.; LI, M.; SHEN, S.; XIN, W. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. **Biochim Biophys Acta.** 1304(3): 210-22, 1996.

GUO, S.; YAN, J.; YANG, T.; YANG, X.; BEZARD, E.; ZHAO, B. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. **Biol Psychiatry.** 62(12): 1353-62, 2007.

GUPTA, A.; BHATIA, S. Psychological functioning in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism. Relat. Disord.** 6: 185-190, 2000.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U.K.; VAMSII, M.L.; SIVAKUMAR, T.; KANDAR, C.C. Anti-steroidogenic activity of the

two Indian medicinal plants in mice. **J Ethnopharmacol.** 90(1): 21-5, 2004.

GYAMFI, M.A.; HOKAMA, N.; OPPONG-BOACHIE, K.; ANIYA, Y. Inhibitory effects of the medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, on liver drug metabolizing enzymes of rats. **Hum Exp Toxicol.** 19(11): 623-31, 2000.

HAGAN, J.J.; MIDDLEMISS, D.N.; SHARPE, P.C.; POSTE, G.H. Parkinson's disease: prospects for improved drug therapy. **Trends Pharmacol Sci.** 18(5): 156-63, 1997.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Exp Neurol.** 193(2): 279-90, 2005.

HAMMERSTONE, J.F.; LAZARUS, S.A.; MITCHELL, A.E.; RUCKER, R.; SCHMITZ, H.H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. **J Agric Food Chem.** 47(2): 490-6, 1999.

HANSEN, S.L.; SPERLING, B.B.; SANCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABAA receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.** 28(1): 105-13, 2004.

HAQQI, T.M.; ANTHONY, D.D.; GUPTA, S.; AHMAD, N.; LEE, M.S.; KUMAR, G.K.; MUKHTAR, H. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 96(8): 4524-9, 1999.

HASEGAWA, E.; KANG, D.; SAKAMOTO, K.; MITSUMOTO, A.; NAGANO, T.; MINAKAMI, S.; TAKESHIGE, K. A dual effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-analogs on the respiratory chain of bovine heart mitochondria. **Arch Biochem Biophys.** 337(1): 69-74, 1997.

HATANO, T.; MIYATAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin

glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. **Phytochemistry**. 59(7): 749-58, 2002.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem**. 13(10): 572-84, 2002.

HENCHCLIFFE, C.; BEAL, M.F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. **Nat Clin Pract Neurol**. 4(11): 600-9, 2008.

HENRY, B.; CROSSMAN, A.R.; BROTCHE, J.M. Effect of repeated L-DOPA, bromocriptine, or lisuride administration on preproenkephalin-A and preproenkephalin-B mRNA levels in the striatum of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. **Exp Neurol**. 155(2): 204-20, 1999.

HEO, H.J.; KIM, D.O.; SHIN, S.C.; KIM, M.J.; KIM, B.G.; SHIN, D.H. Effect of antioxidant flavanone, naringenin, from Citrus junoson neuroprotection. **J Agric Food Chem**. 52(6): 1520-5, 2004.

HERRERO-MARTINEZ, J.M.; RAFOLS, C.; ROSES, M.; BOSCH, E.; LOZANO, C.; TORRES, J.L. Micellar electrokinetic chromatography estimation of size and composition of procyanidins after thiolysis with cysteine. **Electrophoresis**. 24(9): 1404-10, 2003.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radic Biol Med**. 30(4): 433-46, 2001.

JAGATHA, B.; MYTHRI, R.B.; VALI, S.; BHARATH, M.M. Curcumin treatment alleviates the effects of glutathione depletion in vitro and in vivo: therapeutic implications for Parkinson's disease explained via in silico studies. **Free Radic Biol Med**. 44(5): 907-17, 2008.

JANSSEN, P.A.; NIEMEGERES, C.J.; SCHELLEKENS, K.H.; LENAERTS, F.M.; WAUQUIER, A. Clopimozide (R 29 764), a new highly potent and orally long-acting neuroleptic of the diphenylbutylpiperidine series. **Arzneimittelforschung**. 25(8): 1287-94, 1975.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; DENISOVA, N.A.; BIELINSKI, D.; MARTIN, A.; MCEWEN, J.J.; BICKFORD, P.C. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. **J Neurosci.** 19(18): 8114-21, 1999.

KAUFMAN, P.B.; CSEKE, L.J.; WARBER, S.; DUKE, J.A.; BRIELMANN, H.L. Natural products from plants. Flórida: CRC Press, Boca Raton, 1999.

KAVVADIAS, D.; SAND, P.; YOUDIM, K.A.; QAISER, M.Z.; RICE-EVANS, C.; BAUR, R.; SIGEL, E.; RAUSCH, W.D.; RIEDERER, P.; SCHREIER, P. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. **Br J Pharmacol.** 142(5): 811-20, 2004.

LANGSTON, J.W. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. **Neurology.** 47(6 Suppl 3): S153-60, 1996.

LATINI, A.; RODRIGUEZ, M.; BORBA ROSA, R.; SCUSSIATO, K.; LEIPNITZ, G.; REIS DE ASSIS, D.; DA COSTA FERREIRA, G.; FUNCHAL, C.; JACQUES-SILVA, M.C.; BUZIN, L.; GIUGLIANI, R.; CASSINA, A.; RADJ, R.; WAJNER, M. 3-Hydroxyglutaric acid moderately impairs energy metabolism in brain of young rats. **Neuroscience.** 135(1): 111-20, 2005.

LAZARUS, S.A.; SCHMITZ, H.H. Dietary flavonoids may promote health, prevent heart disease. **California Agriculture.** 54(5): 33-9, 2000.

LEE, J.W.; LEE, Y.K.; BAN, J.O.; HA, T.Y.; YUN, Y.P.; HAN, S.B.; OH, K.W.; HONG, J.T. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits beta-amyloid-induced cognitive dysfunction through modification of secretase activity via inhibition of ERK and NF-kappaB pathways in mice. **J Nutr.** 139(10): 1987-93, 2009.

LEE, S.; SUH, S.; KIM, S. Protective effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal

damage after transient global ischemia in gerbils. **Neurosci Lett.** 287(3): 191-4, 2000.

LEVITES, Y.; AMIT, T.; MANDEL, S.; YODIM, M.B. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKC-dependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Faseb J.** 17(8): 952-4, 2003.

LEVITES, Y.; AMIT, T.; YODIM, M.B.; MANDEL, S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/ cell cycle genes in green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate neuroprotective action. **J Biol Chem.** 277(34): 30574-80, 2002.

LEVITES, Y.; WEINREB, O.; MAOR, G.; YODIM, M.B.; MANDEL, S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. **J Neurochem.** 78(5): 1073-82, 2001.

LIEBERMAN, A. Depression in Parkinson's disease -- a review. **Acta Neurol Scand.** 113(1): 1-8, 2006.

LINAZASORO, G.; VAN BLERCOM, N.; UGEDO, L.; RUIZ ORTEGA, J.A. Pharmacological treatment of Parkinson's disease: life beyond dopamine D2/D3 receptors? **J Neural Transm.** 115(3): 431-41, 2008.

LINDNER, M.D.; CAIN, C.K.; PLONE, M.A.; FRYDEL, B.R.; BLANEY, T.J.; EMERICH, D.F.; HOANE, M.R. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. **Behav Brain Res.** 102(1-2): 1-16, 1999.

LIU, Z.; GATT, A.; MIKATI, M.; HOLMES, G.L. Effect of temperature on kainic acid-induced seizures. **Brain Res.** 631(1): 51-8, 1993.

LORENZ, M.; WESSLER, S.; FOLLMANN, E.; MICHAELIS, W.; DUSTERHOFT, T.; BAUMANN, G.; STANGL, K.; STANGL, V. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OH-



kinase-, cAMP-dependent protein kinase-, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. **J Biol Chem.** 279(7): 6190-5, 2004.

LU, K.T.; KO, M.C.; CHEN, B.Y.; HUANG, J.C.; HSIEH, C.W.; LEE, M.C.; CHIOU, R.Y.; WUNG, B.S.; PENG, C.H.; YANG, Y.L. Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. **J Agric Food Chem.** 56(16): 6910-3, 2008.

LUNDGREN, J.; SMITH, M.L.; BLENNOW, G.; SIESJO, B.K. Hyperthermia aggravates and hypothermia ameliorates epileptic brain damage. **Exp Brain Res.** 99(1): 43-55, 1994.

LUQUE, J.M.; MALHERBE, P.; RICHARDS, J.G. Localization of GABAA receptor subunit mRNAs in the rat locus coeruleus. **Brain Res Mol Brain Res.** 24(1-4): 219-26, 1994.

MACDONALD, R.L.; OLSEN, R.W. GABAA receptor channels. **Annu Rev Neurosci.** 17: 569-602, 1994.

MAHADY, G.B. Global harmonization of herbal health claims. **J Nutr.** 131(3s): 1120S-3S, 2001.

MANDEL, S.; YODIM, M.B. Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. **Free Radic Biol Med.** 37(3): 304-17, 2004.

MANDEL, S.A.; AMIT, T.; KALFON, L.; REZNICHENKO, L.; YODIM, M.B. Targeting multiple neurodegenerative diseases etiologies with multimodal-acting green tea catechins. **J Nutr.** 138(8): 1578S-83S, 2008.

MATSUOKA, Y.; HASEGAWA, H.; OKUDA, S.; MURAKI, T.; URUNO, T.; KUBOTA, K. Ameliorative effects of tea catechins on active oxygen-related nerve cell injuries. **J Pharmacol Exp Ther.** 274(2): 602-8, 1995.

MEISSNER, W.; HILL, M.P.; TISON, F.; GROSS, C.E.; BEZARD, E. Neuroprotective strategies for Parkinson's disease:

conceptual limits of animal models and clinical trials. **Trends Pharmacol Sci.** 25(5): 249-53, 2004.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Res Bull.** 58(1): 41-7, 2002.

MOHLER, H.; FRITSCHY, J.M.; RUDOLPH, U. A new benzodiazepine pharmacology. **J Pharmacol Exp Ther.** 300(1): 2-8, 2002.

MOORE, N.A.; TYE, N.C.; AXTON, M.S.; RISIUS, F.C. The behavioral pharmacology of olanzapine, a novel "atypical" antipsychotic agent. **J Pharmacol Exp Ther.** 262(2): 545-51, 1992.

NARDI, G.M.; DALBO, S.; MONACHE, F.D.; PIZZOLATTI, M.G.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antinociceptive effect of *Croton celtidifolius* Baill (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol.** 107(1): 73-8, 2006.

NARDI, G.M.; FELIPPI, R.; DALBO, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; ARRUDA, D.C.; DELLE MONACHE, F.; TIMBOLA, A.K.; PIZZOLATTI, M.G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine.** 10(2-3): 176-84, 2003.

NARDI, G.M.; SIQUEIRA JUNIOR, J.M.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M.G.; CKLESS, K.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M. Antioxidant and anti-inflammatory effects of products from *Croton celtidifolius* Bailon on carrageenan-induced pleurisy in rats. **Phytomedicine.** 14(2-3): 115-22, 2007.

NASSIRI-ASL, M.; ZAMANSOLTANI, F.; JAVADI, A.; GANJVAR, M. The effects of rutin on a passive avoidance test in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry,** 2009.

NOBRE-JUNIOR, H.V.; OLIVEIRA, R.A.; MAIA, F.D.; NOGUEIRA, M.A.; DE MORAES, M.O.; BANDEIRA, M.A.; ANDRADE, G.M.; VIANA, G.S. Neuroprotective effects of chalcones

from Myracrodruon urundeuva on 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Neurochem Res.** 34(6): 1066-75, 2009.

NORTH, R.A.; WILLIAMS, J.T.; SURPRENANT, A.; CHRISTIE, M.J. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 84(15): 5487-91, 1987.

OKA, M.; YAMADA, K.; KAMEI, C.; YOSHIDA, K.; SHIMIZU, M. Differential antagonism of antiavoidance, cataleptic and ptotic effects of neuroleptics by biperiden. **Jpn J Pharmacol.** 29(3): 435-45, 1979.

OLSON, W.L.; GRUENTHAL, M.; MUELLER, M.E.; OLSON, W.H. Gabapentin for parkinsonism: a double-blind, placebo-controlled, crossover trial. **Am J Med.** 102(1): 60-6, 1997.

PALADINI, A.C.; MARDER, M.; VIOLA, H.; WOLFMAN, C.; WASOWSKI, C.; MEDINA, J.H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **J Pharm Pharmacol.** 51(5): 519-26, 1999.

PAN, T.; FEI, J.; ZHOU, X.; JANKOVIC, J.; LE, W. Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and on MPP<sup>+</sup> -induced dopamine neuron injury. **Life Sci.** 72(9): 1073-83, 2003.

PARK, B.C.; LEE, Y.S.; PARK, H.J.; KWAK, M.K.; YOO, B.K.; KIM, J.Y.; KIM, J.A. Protective effects of fustin, a flavonoid from *Rhus verniciflua* Stokes, on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death. **Exp Mol Med.** 39(3): 316-26, 2007.

PELLOW, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodents valid? **Methods Find Exp Clin Pharmacol.** 8(9): 557-65, 1986.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods.** 14(3): 149-67, 1985.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**. 56(3): 237-43, 2001.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol**. 47(4): 379-91, 1978.

PREDIGER, R.D.; RIAL, D.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, C.P.; DOTY, R.L.; TAKAHASHI, R.N. An intranasal MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) rat model of parkinson's disease. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1170: 629-36, 2009.

PREDIGER, R.D.; BATISTA, L.C.; MEDEIROS, R.; PANDOLFO, P.; FLORIO, J.C.; TAKAHASHI, R.N. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Exp Neurol**. 202(2): 391-403, 2006.

PREDIGER, R.D.; BATISTA, L.C.; MIYOSHI, E.; TAKAHASHI, R.N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behav Brain Res**. 153(1): 149-57, 2004.

PREDIGER, R.D.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R.N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behav Pharmacol**. 16(4): 209-18, 2005.

PREDIGER, R.D.; TAKAHASHI, R.N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **Eur J Pharmacol**. 462(1-3): 115-23, 2003.

PRZEDBORSKI, S.; ISCHIROPOULOS, H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**. 7(5-6): 685-93, 2005.

PRZEDBORSKI, S.; TIEU, K.; PERIER, C.; VILA, M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. **J Bioenerg Biomembr**. 36(4): 375-9, 2004.

RAMANJANEYULU, R.; TICKU, M.K. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin

site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. **Eur J Pharmacol.** 98(3-4): 337-45, 1984.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. **Eur J Pharmacol.** 545(1): 51-64, 2006.

RAUCA, C.; POHLE, W.; GRUNENBERG, K.; FRANZE, S. Hypothermia inhibits pentylentetrazol kindling and prevents kindling-induced deficit in shuttle-box avoidance. **Pharmacol Biochem Behav.** 65(1): 23-30, 2000.

RIAL, D.; DUARTE, F.S.; XIKOTA, J.C.; SCHMITZ, A.E.; DAFRE, A.L.; FIGUEIREDO, C.P.; WALZ, R.; PREDIGER, R.D. Cellular prion protein modulates age-related behavioral and neurochemical alterations in mice. **Neuroscience.** 164(3): 896-907, 2009.

RICHARD, I.H.; FRANK, S.; McDERMOTT, M.P.; WANG, H.; JUSTUS, A.W.; LADONNA, K.A.; KURLAN, R. The ups and downs Parkinson's disease: a prospective study of mood and anxiety fluctuations. **Cogn. Behav. Neurol.** 17: 201-207; 2004.

RICHARDSON, P.J.; KASE, H.; JENNER, P.G. Adenosine A2A receptor antagonists as new agents for the treatment of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci.** 18(9): 338-44, 1997.

RITZ, M.F.; RATAJCZAK, P.; CURIN, Y.; CAM, E.; MENDELOWITSCH, A.; PINET, F.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Chronic treatment with red wine polyphenol compounds mediates neuroprotection in a rat model of ischemic cerebral stroke. **J Nutr.** 138(3): 519-25, 2008.

RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci Biobehav Rev.** 21(6): 801-10, 1997.

SALAH, N.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G.; TIJBURG, L.; BOLWELL, G.P.; RICE-EVANS, C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. **Arch Biochem Biophys.** 322(2): 339-46, 1995.

SAMADI, P.; GREGOIRE, L.; BEDARD, P.J. Opioid antagonists increase the dyskinetic response to dopaminergic agents in parkinsonian monkeys: interaction between dopamine and opioid systems. **Neuropharmacology**. 45(7): 954-63, 2003.

SCHAPIRA, A.H.; BEZARD, E.; BROTHIE, J.; CALON, F.; COLLINGRIDGE, G.L.; FERGER, B.; HENGERER, B.; HIRSCH, E.; JENNER, P.; LE NOVERE, N.; OBESO, J.A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; SPAMPINATO, U.; DAVIDAI, G. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nat Rev Drug Discov**. 5(10): 845-54, 2006.

SCHOTZ, K.; NOLDNER, M. Mass spectroscopic characterisation of oligomeric proanthocyanidins derived from an extract of *Pelargonium sidoides* roots (EPs 7630) and pharmacological screening in CNS models. **Phytomedicine**. 14 Suppl 6: 32-9, 2007.

SCHROETER, H.; BOYD, C.; SPENCER, J.P.; WILLIAMS, R.J.; CADENAS, E.; RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiol Aging**. 23(5): 861-80, 2002.

SCHROEDER, E.K.; KELSEY, N.A.; DOYLE, J.; BREED, E.; BOUCHARD, R.J.; LOUCKS, F.A.; HARBISON, R.A.; LINSEMAN, D.A. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. **Antioxid. Redox Signal**. 11(3): 469-480, 2009.

SCHULTKE, E.; KAMENCIC, H.; ZHAO, M.; TIAN, G.F.; BAKER, A.J.; GRIEBEL, R.W.; JUURLINK, B.H. Neuroprotection following fluid percussion brain trauma: a pilot study using quercetin. **J Neurotrauma**. 22(12): 1475-84, 2005.

SETLER, P.; SARAU, H.; MCKENZIE, G. Differential attenuation of some effects of haloperidol in rats given scopolamine. **Eur J Pharmacol**. 39(1): 117-26, 1976.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends Mol Med**. 9(8): 360-5, 2003.

SIERADZAN, K.A.; FOX, S.H.; HILL, M.; DICK, J.P.; CROSSMAN, A.R.; BROTHIE, J.M. Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. **Neurology**. 57(11): 2108-11, 2001.

SILVA, B.; OLIVEIRA, P.J.; DIAS, A.; MALVA, J.O. Quercetin, kaempferol and biapigenin from *Hypericum perforatum* are neuroprotective against excitotoxic insults. **Neurotox Res**. 13(3-4): 265-79, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J.; KLEIN, R.M. Euphorbiaceae. *In*: Flora Ilustrada Catarinense. p.408, 1998.

SUGANUMA, M.; OKABE, S.; ONIYAMA, M.; TADA, Y.; ITO, H.; FUJIKI, H. Wide distribution of [3H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. **Carcinogenesis**. 19(10): 1771-6, 1998.

SUGIMOTO, Y.; FURUTANI, S.; ITOH, A.; TANAHASHI, T.; NAKAJIMA, H.; OSHIRO, H.; SUN, S.; YAMADA, J. Effects of extracts and neferine from embryo of *Nelumbo nucifera* seeds on the central nervous system. **Phytomedicine**. 15: 1117-24, 2008.

TADAIESKY, M.T.; DOMBROWSKI, P.A.; FIGUEIREDO, C.P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C.; TAKAHASHI, R.N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**. 156(4): 830-40, 2008.

TALEB-CONTINI, S.H.; SANTOS, W.F.; MORTARI, M.R.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L. Neuropharmacological effects in mice of *Lychnophora* species (*Vernoniaeae*, *Asteraceae*) and anticonvulsant activity of 4,5-di-O-[E]-caffeoylquinic acid isolated from the stem of *L. rupestris* and *L. staavioides*. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**. 102(3): 281-6, 2008.

TOLOSA, E.; COMPTA, Y.; GAIG, C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. 13 Suppl: S2-7, 2007.

TYLER, V.E. Phytomedicines: back to the future. **J Nat Prod**. 62(11): 1589-92, 1999.

VERHAGEN METMAN, L.; DEL DOTTO, P.; VAN DEN MUNCKHOF, P.; FANG, J.; MOURADIAN, M.M.; CHASE, T.N. Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. **Neurology**. 50(5): 1323-6, 1998.

VIGNES, M.; MAURICE, T.; LANTE, F.; NEDJAR, M.; THETHI, K.; GUIRAMAND, J.; RECASENS, M. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). **Brain Res**. 1110(1): 102-15, 2006.

WANG, D.S.; LU, S.Y.; HONG, Z.; ZHU, H.L. Biphasic action of midazolam on GABAA receptor-mediated responses in rat sacral dorsal commissural neurons. **Biochem Biophys Res Commun**. 309(4): 893-9, 2003.

WANG, Q.; SUN, A.Y.; SIMONYI, A.; MILLER, D.K.; SMITH, R.E.; LUCHTEFELD, R.G.; KORTHUIS, R.J.; SUN, G.Y. Oral administration of grape polyphenol extract ameliorates cerebral ischemia/reperfusion-induced neuronal damage and behavioral deficits in gerbils: comparison of pre- and post-ischemic administration. **J Nutr Biochem**. 20(5): 369-77, 2009.

WEINREB, O.; AMIT, T.; MANDEL, S.; YOUNDIM, M.B. Neuroprotective molecular mechanisms of (-)-epigallocatechin-3-gallate: a reflective outcome of its antioxidant, iron chelating and neurotogenic properties. **Genes Nutr**, 2009.

WEINREB, O.; MANDEL, S.; AMIT, T.; YOUNDIM, M.B. Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **J Nutr Biochem**. 15(9): 506-16, 2004.

WEINREB, O.; MANDEL, S.; YOUNDIM, M.B. Gene and protein expression profiles of anti- and pro-apoptotic actions of dopamine, R-



apomorphine, green tea polyphenol (-)-epigallocatechine-3-gallate, and melatonin. **Ann N Y Acad Sci.** 993: 351-61; discussion 87-93, 2003.

WELDON, D.A.; TRAVIS, M.L.; KENNEDY, D.A. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. **Behav Neurosci.** 105(3): 450-8, 1991.

WILLIAMS, M.; WRIGHT, S.; LLOYD, G.K. Improved therapies for Parkinson's disease: life beyond dopamine D2/D3 receptor agonists. **Trends Pharmacol Sci.** 18(9): 307-10, 1997.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry.** 64(1): 3-19, 2003.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International.** 33: 449-59, 2000.

WRUCK, C.J.; CLAUSSEN, M.; FUHRMANN, G.; ROMER, L.; SCHULZ, A.; PUFE, T.; WAETZIG, V.; PEIPP, M.; HERDEGEN, T.; GOTZ, M.E. Luteolin protects rat PC12 and C6 cells against MPP+ induced toxicity via an ERK dependent Keap1-Nrf2-ARE pathway. **J Neural Transm Suppl**(72): 57-67, 2007.

XIE, D.Y.; DIXON, R.A. Proanthocyanidin biosynthesis--still more questions than answers? **Phytochemistry.** 66(18): 2127-44, 2005.

XU, X.; ZHANG, S.; ZHANG, L.; YAN, W.; ZHENG, X. The Neuroprotection of puerarin against cerebral ischemia is associated with the prevention of apoptosis in rats. **Planta Med.** 71(7): 585-91, 2005.

YOUDEM, K.A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radic Biol Med.** 37(11): 1683-93, 2004.

ZHAO, K.; LUO, G.; GIANELLI, S.; SZETO, HH. Mitochondria-targeted peptide prevents mitochondrial depolarization and apoptoses induced by tert-butyl hydroperoxide in neuronal cell lines. **Biochem Pharmacol.** 70: 1796-1806, 2005.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. **Ann N Y Acad Sci.** 1147: 93-104, 2008.

ZHU, M.; PHILLIPSON, J.D.; GREENGRASS, P.M.; BOWERY, N.E.; CAI, Y. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein? **Phytochemistry.** 44(3): 441-7, 1997.