

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

LUCIANA FERNANDES PASTANA RAMOS

**Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vivo*
de doença de Parkinson com lesão com 6-hidroxiopamina**

Belém-Pará
2012

LUCIANA FERNANDES PASTANA RAMOS

Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vivo* de doença de Parkinson com lesão com 6-hidroxidopamina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Sumi Yamada

Belém-Pará
2012

Dados Internacionais da Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca de Pós-Graduação do ICB-UFPa – Belém (PA)

Ramos, Luciana Fernandes Pastana

Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vivo* de doença de Parkinson com lesão com 6-hidroxidopamina / Luciana Fernandes Pastana Ramos; orientador, Luiz Martins do Nascimento. – 2012.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2012.

1. Parkinson, Doença de. 2. Mogno – Uso terapêutico - Pesquisa. 3. Hidroxidopamina. 3. Antioxidantes. 4. I. Título.

CDD – 22. ed. 616.833

LUCIANA FERNANDES PASTANA RAMOS

Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vivo* de doença de Parkinson com lesão com 6-hidroxi-dopamina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Aprovada em: 28 de setembro de 2012

Local de defesa: sala PAT01, *campus* da Universidade Federal do Pará

A Deus e Jesus, por serem a minha
inspiração de vida

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram a chegar até aqui, especialmente a Deus que me fez iniciar o mestrado e me deu coragem para passar por todos os obstáculos encontrados durante esses dois anos.

Aos meus pais, Rubens Ramos e Elizete Ramos, que me ensinaram a trilhar o caminho com ética, respeito e amor. A minha irmã Juliana Ramos, pelos conselhos, pelo carinho e amor dedicado a mim.

Ao Dr. José Luiz Martins do Nascimento pela orientação e apoio.

À Dra. Elizabeth Sumi Yamada, pelo incentivo, dedicação, apoio, paciência e, principalmente, por todos os conselhos durante esse período.

À Dra. Elaine Del Bel, por ter me proporcionado um estágio em seu laboratório, onde fiz amizades e ampliei o conhecimento.

Aos meus ex-orientadores e eternos professores Sanny Alberio, Emanuel Sousa e Gionovaldo Lourenço, por terem auxiliado na minha formação profissional.

Aos meus amigos do Laboratório de Neuropatologia Experimental, Arnaldo Filho, Anderson Baracho, Daniela Garcez, Gabriela Sampaio, Natália Pontes, Natasha Valente, Nilton Barreto e Solimar, pela companhia, pelos risos e pelas pizzas de graça.

À coordenação, secretaria e todos os meus amigos neurocientistas do Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, principalmente, a Elane Magno que me ensinou imuno-histoquímica e a Socorro Andrade que me socorreu muitas vezes, tranquilizando-me na correria dos trâmites burocráticos.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Pará, pelo acesso ao Portal Periódico, que me permitiu a leitura de artigos científicos utilizados nesta dissertação, e pela infraestrutura utilizada na execução do projeto.

Ao Instituto Evandro Chagas pelo fornecimento dos animais.

Ao Dr. Milton Nascimento da Silva e ao Laboratório de Cromatografia Líquida pelo fornecimento do extrato aquoso de mogno.

A todos que oraram por mim. A todos os meus amigos de infância, de colégio, de faculdade e de igreja. Amo todos vocês!

O temor do SENHOR é o princípio da sabedoria
Provérbios 9:10

RESUMO

RAMOS, L.F.P. **Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vivo* de doença de Parkinson com lesão com 6-hidroxi-dopamina.** Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, 2012.

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e por presença de sinais clínicos clássicos, tais como bradicinesia, rigidez muscular, tremor em repouso e instabilidade postural. A etiologia ainda é desconhecida e as opções de tratamento disponíveis promovem apenas o alívio dos sintomas. Nesse sentido, os modelos experimentais de DP são fundamentais em estudos visando identificar os eventos moleculares envolvidos na doença e a descoberta de novas terapias neuroprotetoras. Este trabalho utilizou um modelo de hemiparkinsonismo, com lesão induzida por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), e investigou os efeitos do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) sobre as células dopaminérgicas da substância negra *pars compacta* (SNpc) e sobre parâmetros comportamentais avaliados no teste do campo aberto e no teste de rotações induzidas por apomorfina. Os resultados mostraram que os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram rotação contralateral induzida por apomorfina e redução significativa dos neurônios dopaminérgicos na SNpc. Entretanto, apenas o grupo injetado com 6-OHDA e tratado com mogno apresentou diminuição significativa de neurônios no lado injetado em comparação com o grupo veículo/veículo. Houve também um decréscimo significativo na ambulação e na bipedestação no grupo 6-OHDA/mogno. Com isso, nós concluímos que o extrato aquoso de mogno, nas condições utilizadas no presente estudo, potencializou o efeito citotóxico da 6-OHDA e ainda promoveu a piora do quadro comportamental dos animais.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, 6-hidroxi-dopamina, mogno, *Swietenia macrophylla*, estereologia

ABSTRACT

RAMOS, L.F.P. **Effect of an aqueous extract of leaves of mahogany (*Swietenia macrophylla*) in vivo model of Parkinson's disease with 6-hydroxydopamine lesion.** Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, 2012.

Parkinson's disease (PD) is characterized by a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra and the presence of classical clinical signs bradykinesia, muscle rigidity, resting tremor and postural instability. The etiology is still unknown and the available treatment options only promote relief of symptoms. Experimental models of PD are fundamental for studies aiming to identify the molecular events involved in the disease and to discover new neuroprotective therapies. This study used a hemiparkinsonism model with lesion induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and investigated effects of an aqueous extract of leaves of mahogany (*Swietenia macrophylla*) on the dopaminergic neurons of the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) and on behavioural parameters assessed in the open-field and apomorphine-induced rotacional tests. The results showed that the 6-OHDA lesioned animals exhibited contralateral rotation induced by apomorphine and significant reduction of dopaminergic neurons in SNpc. However, only 6-OHDA lesioned animals treated with mahogany extract showed significant decrease in relation to the group vehicle/vehicle. There was also a significant decrease in ambulation and rearing in the group 6-OHDA/mahogany. In conclusion, the mahogany extract under the conditions used in the present study potentiated the cytotoxic effect of 6-OHDA and yet promoted worsening of behavioral parameters of the animals.

Keywords: Parkinson's disease, 6-hydroxydopamine, mahogany, *Swietenia macrophylla*, stereology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Anátomo-patologia da doença de Parkinson.....	15
Figura 2-	Características neuroquímicas da doença de Parkinson: fatores e eventos associados com a patogênese da DP.....	16
Figura 3-	Reações catalisadas pela superóxido dismutase (SOD) e pela catalase.....	19
Figura 4-	Reação de Fenton.....	20
Figura 5-	Estruturas químicas das principais neurotoxinas utilizadas para induzir lesão nigroestriatal em alguns modelos animais de Doença de Parkinson....	22
Figura 6-	Representação esquemática do metabolismo do MPTP no encéfalo.....	24
Figura 7-	Teste das rotações induzidas por agonistas dopaminérgicos.....	27
Figura 8-	Estratégias de tratamento na DP.....	29
Figura 9-	Estrutura das vitaminas E	31
Figura 10-	Estrutura química dos limonóides encontrados na semente de <i>Swietenia macrophylla</i>	34
Figura 11-	Constituintes químicos isolados da casca de <i>Swietenia macrophylla</i>	35
Figura 12-	Randomização dos animais.....	38
Figura 13-	Cronograma e procedimentos dos grupos experimentais da pesquisa.....	38
Figura 14-	Aparato estereotáxico.....	40
Figura 15-	Cirurgia estereotáxica.....	40
Figura 16-	Posicionamento dos animais no teste de campo aberto.....	41
Figura 17-	Teste de campo aberto.....	42
Figura 18-	Aparato utilizado no teste rotacional induzido por apomorfina.....	43
Figura 19-	Rotação contralateral característica do teste de apomorfina.....	43
Figura 20-	Contagem neuronal por estereologia.....	46
Figura 21-	Rotação contralateral induzida por apomorfina no dia 7.....	48
Figura 22-	Densidade das fibras tirosina hidroxilase positivas no estriado.....	49

Figura 23-	Mesencéfalos imunomarcados com tirosina hidroxilase.....	49
Figura 24-	Contagem estereológica com seis secções.....	50
Figura 25-	Contagem estereológica com três secções.....	51
Figura 26-	Porcentagem de perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc do lado lesionado, na contagem de três e seis secções.....	52
Figura 27-	Contagem de células marcadas com Nissl.....	53
Figura 28-	Coloração com Nissl no estriado.....	53
Figura 29-	Análise da ambulação.....	54
Figura 30-	Bipedestação com apoio.....	55
Figura 31-	Bipedestação sem apoio.....	56
Figura 32-	Parâmetro comportamental de limpeza.....	57
Figura 33-	Análise da micção dos animais antes e 7 dias após a cirurgia.....	58
Figura 34-	Análise da defecação dos animais antes e 7 dias após a cirurgia.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sintomas não motores da Doença de Parkinson.....	15
Tabela 2-	Espécies reativas de oxigênio.....	18
Tabela 3-	Principais agentes do sistema antioxidante.....	30
Tabela 4-	Efeitos de plantas utilizadas em diferentes modelos de DP.....	32
Tabela 5-	Efeitos da <i>Swietenia macrophylla</i> na expressão da tirosina hidroxilase na substância negra <i>pars compacta</i> do modelo animal de DP induzido por 6-OHDA.....	52
Tabela 6-	Porcentagem de neurônios dopaminérgicos encontrados na SNpc do lado lesionado.....	52
Tabela 7-	Teste de campo aberto: média de cruzamento de linhas.....	55
Tabela 8-	Número de bipedestação com apoio.....	56
Tabela 9-	Número de bipedestação sem apoio.....	56
Tabela 10-	Limpeza dos animais no teste de campo aberto.....	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Doença de Parkinson.....	14
1.2	Extresse oxidativo na doença de Parkinson.....	17
1.3	Modelos experimentais da doença de Parkinson.....	21
1.4	Neurotoxinas.....	22
1.4.1	<i>6-hidroxi-dopamina</i>	26
1.5	Terapias antioxidantes.....	28
1.5.1	<i>Mogno (Swietenia macrophylla)</i>	33
2	OBJETIVO	36
2.1	Objetivo geral.....	36
2.2	Objetivos específicos.....	36
3	MÉTODO	37
3.1	Animais.....	37
3.2	Randomização.....	37
3.3	Extrato aquoso de folhas de mogno (<i>Swietenia macrophylla</i>).....	39
3.4	Cirurgia estereotáxica.....	39
3.5	Teste comportamental do campo aberto.....	41
3.6	Teste das rotações induzidas por apomorfina.....	42
3.7	Perfusão e obtenção de secções de encéfalos.....	43
3.8	Imuno-histoquímica.....	44
3.9	Contagem neuronal por estereologia.....	45
3.10	Coloração de Nissl.....	47
3.11	Análise estatística.....	47
4	RESULTADOS	48
4.1	Rotação induzida por apomorfina.....	48
4.2	Análise estereológica dos neurônios dopaminérgicos da SNpc.....	48
4.3	Análise das células marcadas com Nissl no estriado lesionado.....	53
4.4	Teste de campo aberto.....	54
4.4.1	<i>Ambulação</i>	54
4.4.2	<i>Bipedestação</i>	55
4.4.3	<i>Limpeza, micção e defecação</i>	57

5	DISCUSSÃO	59
5.1	Modelo da 6-OHDA e terapias antioxidantes.....	59
5.2	Perda neuronal na substância negra.....	61
5.3	Avaliação comportamental.....	62
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

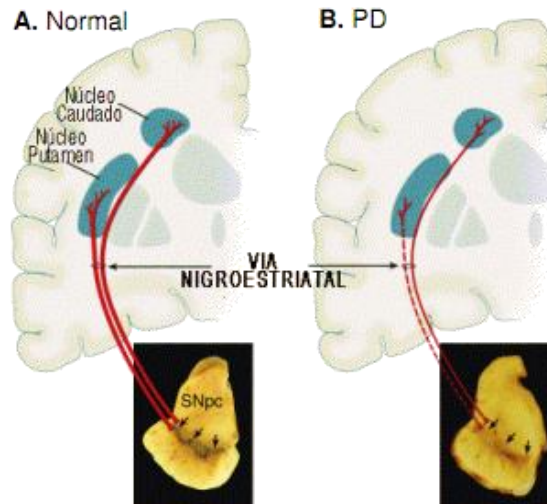
1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

Em 1817, James Parkinson publicou a primeira descrição mundial da doença de Parkinson (DP). Em seu estudo, foram apresentados seis casos clínicos, todos do sexo masculino, com idade entre 50 a 72 anos. O autor definiu as características clínicas, descreveu o diagnóstico diferencial de outras doenças, fez considerações sobre a etiologia e o tratamento, e intitulou a enfermidade como “paralisia agitante” (Teive, 1998). Na segunda metade do século XIX, Jean-Martin Charcot sugeriu a mudança do nome “paralisia agitante” para doença de Parkinson porque reconheceu que os pacientes não necessariamente apresentavam tremor. Além disso, ele definiu os sinais cardinais da DP e foi o primeiro a sugerir o tratamento para a doença (Goetz, 2007; Goetz, 2011).

A doença de Parkinson é tradicionalmente conhecida como uma desordem motora causada pela degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) (FIGURA 1), resultando na redução dos níveis de dopamina no estriado. A presença de agregados proteicos citoplasmáticos intraneuronais, conhecidos como corpos de Lewy, é considerada a característica histopatológica mais importante. Tais agregados são ricos em alfa-sinucleína e ubiquitina. O diagnóstico clínico baseia-se na avaliação dos sinais cardinais de parkinsonismo: bradicinesia, tremor de repouso, rigidez muscular e instabilidade postural. Outra forma de diagnosticar a DP é através da administração oral de levodopa seguida de ausência/diminuição dos sinais motores (Massano e Bhatia, 2012).

De acordo com Langston (2006), os sintomas motores da DP representam apenas “a ponta do iceberg”, onde os sintomas não motores são mais numerosos e menos investigados. A DP é uma patologia progressiva e algumas características não motoras (TABELA 1) podem aparecer anos ou décadas antes dos sinais motores clássicos se manifestarem. Entretanto, sinais como demência e alucinações ocorrem no final do curso da DP (Massano e Bhatia, 2012).



Fonte: Dauer e Przedborski (2003) *apud* Martins-Filho (2011)

Figura 1 – Anátomo-patologia da doença de Parkinson. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. Os corpos neuronais dopaminérgicos (setas pretas) possuem projeção axonal (linhas vermelhas sólidas grossas) em direção ao estriado (núcleo caudado e putâmen). (B) Representação esquemática da via nigroestriatal afetada na doença de Parkinson. Degeneração dos neurônios dopaminérgicos (setas pretas), com perda mais acentuada na projeção para o putâmen (linha vermelha tracejada) e perda menos acentuada na projeção para o caudado (linha vermelha sólida fina).

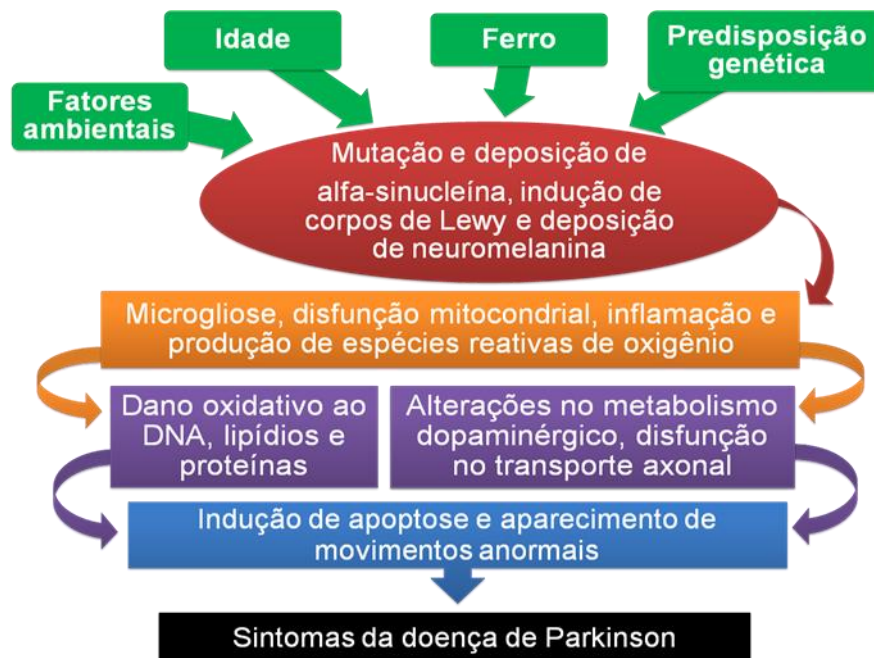
Tabela 1 – Sintomas não motores da Doença de Parkinson

Características neuropsiquiátricas	Apatia Ansiedade, ataques de pânico Transtornos de humor, especialmente depressão Alucinações, ilusões Deterioração cognitiva
Disautonomia	Hipotensão ortostática Disfunção urinária Disfunção sexual Sialorréia
Desordens do sono	Insônia Desordem do sono REM
Dor	
Fadiga	

Fonte: adaptado de Massano e Bhatia, 2012

A doença de Parkinson pode acometer qualquer pessoa de todas as raças e localizações geográficas, e é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum. As taxas de incidência são de 8 a 18 por 100.000 pessoas/ano. Estima-se que nos países industrializados a prevalência seja de 0,3% para a população total e de aproximadamente 1% para pessoas acima de 60 anos de idade. Na maioria dos estudos, a incidência e prevalência da DP são maiores no sexo masculino. A idade é um fator de risco para a DP, sendo raro antes dos 50 anos e comum a partir dos 60 anos (Lau e Breteler, 2006). Deste modo, espera-se que a prevalência da doença aumente dramaticamente na próxima década devido ao envelhecimento da população (Massano e Bhatia, 2012).

A etiologia da DP ainda é desconhecida, mas provavelmente resulta de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (FIGURA 2) (Farooqui e Farooqui, 2011). O mecanismo fisiopatológico da DP pode sofrer interferência do sistema imune e da reação inflamatória no sistema nervoso central (SNC). As descobertas genéticas aumentaram o conhecimento das vias moleculares patogênicas da DP, principalmente do estresse oxidativo e da inflamação (Dauer e Przedborski, 2003; Farooqui e Farooqui, 2011).



Fonte: adaptado de Farooqui e Farooqui, 2011

Figura 2 – Características neuroquímicas da doença de Parkinson: fatores e eventos associados com a patogênese da DP.

A maioria dos casos de DP é esporádica e as formas genéticas são raras (Klein e Westenberger, 2012). A DP genética serve como um excelente modelo humano para a DP idiopática. Atualmente, existem 18 regiões cromossômicas específicas denominadas *PARK* (para denotar sua suposta ligação com a DP) e as suas variações (alfa-sinucleína, ubiquitina hidrolase carboxi terminal 1 - *UCHL1*, quinase repetida rica em leucina 2) são associadas com o aumento do risco de desenvolver a DP (Klein e Westenberger, 2012).

1.2 Extresse oxidativo na doença de Parkinson

O estresse oxidativo é uma condição que ocorre no tecido quando há desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês, reactive oxygen species) por causa da falha do sistema de reparo e substituição das biomoléculas oxidadas (Sies e Stahl, 1995; Halliwell, 2006; Farooqui e Farooqui, 2011; Shukla et al., 2011). O alto consumo de oxigênio molecular, os altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados nos fosfolipídios da membrana neural e a alta concentração de ferro são fatores importantes na produção de estresse oxidativo (Halliwell, 2006). No encéfalo, níveis baixos de espécies reativas de oxigênio são necessários para a manutenção das funções normais. A elevação das concentrações de ROS promove neurotoxicidade e causa danos na membrana neuronal, que pode ter como consequência a morte celular (Farooqui e Farooqui, 2011; Patel e Chu, 2011).

Aproximadamente 100% do oxigênio molecular são consumidos pela respiração mitocondrial, e assim, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (TABELA 2) ocorre principalmente na cadeia respiratória mitocondrial (Dauer e Przedborski, 2003; Farooqui e Farooqui, 2011). A ROS reage com proteínas de membrana, lipídios insaturados e DNA; os seus produtos oxidativos são 3-nitrotirosina (3-NT), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OhdG), respectivamente (Halliwell, 2006; Sun et al., 2008; Farooqui e Farooqui, 2011).

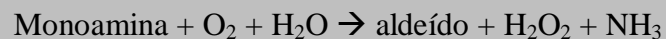
Dopamina, 6-hidroxidopamina, adrenalina e noradrenalina são exemplos de compostos ‘autoxidáveis’ capazes de gerar ROS e quinonas/semiquinona (Halliwell, 2006; Patel e Chu, 2011). Os neurônios são particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo porque a maioria dos mecanismos de defesa antioxidantes está localizada nos astrócitos (Sun et al., 2008). Os

neurônios dopaminérgicos possuem um ambiente propício para a geração de ROS, já que o metabolismo dopaminérgico produz superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Dauer e Przedborski, 2003).

Tabela 2 – Espécies reativas de oxigênio

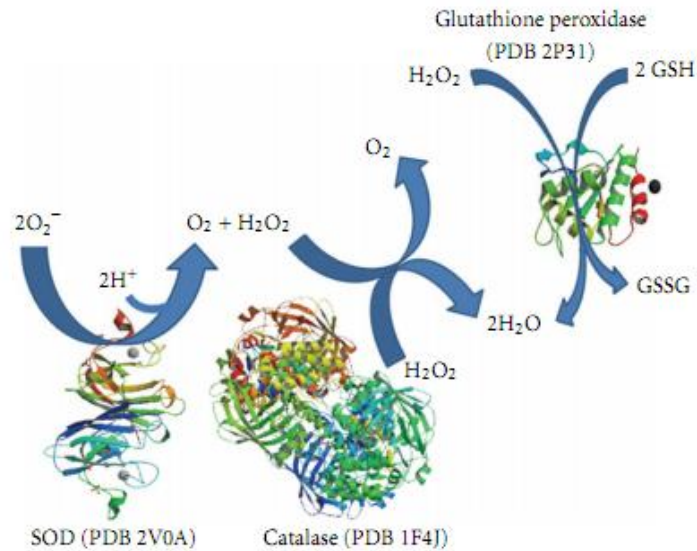
RADICAIS LIVRES	NÃO-RADICAIS
Superóxido	Peróxido de hidrogênio
Hidroxila	Ácido hipobromoso
Hidroperoxila	Ácido hipocloroso
Carbonato	Ozônio
Peroxila	Peróxidos orgânicos
Alcoxila	Peroxinitrito
Radical dióxido de carbon	Peroxinitrato
	Ácido peroxinitroso
	Peroxomonocarbonato
	Nitrosoperoxicarbonato

Os compostos ‘autoxidáveis’ reagem com oxigênio para produzir superóxido. A superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio e esse, por sua vez, é convertido a H_2O pela catalase (FIGURA 3) (Farooqui e Farooqui, 2011). Além da SOD, outras enzimas são muito importantes na produção de H_2O_2 no encéfalo, a exemplo da monoamina oxidase A e B (Halliwell, 2006):



A catalase, peroxirredoxina e glutathiona peroxidase (GPx) são enzimas que participam do processo de remoção de peróxido de hidrogênio (Melo et al., 2011). No encéfalo, a catalase não é a enzima mais importante do processo antioxidante, visto que tem níveis baixos em muitas regiões encefálicas e não está presente nas mitocôndrias cerebrais. Todavia, na substância negra e no hipotálamo, os níveis de catalase estão um pouco mais elevados. Atualmente, acredita-se que as enzimas mais importantes no processo de degradação de H_2O_2 são as peroxirredoxinas porque estão presentes em grandes quantidades nas células. A glutathiona peroxidase reduz o H_2O_2 através da oxidação de glutathiona reduzida (GSH) e, assim, obtem-se o produto glutathiona oxidada (GSSG). A GSSG é uma estrutura química formada por duas GSH que são ligadas por uma ponte de dissulfeto e pode retornar à forma de GSH através da enzima glutathiona redutase (Halliwell, 2006). Na DP há diminuição de

glutathiona na substância negra *pars compacta* e isso está coerente com o aumento de ROS (Dauer e Przedborski, 2003).



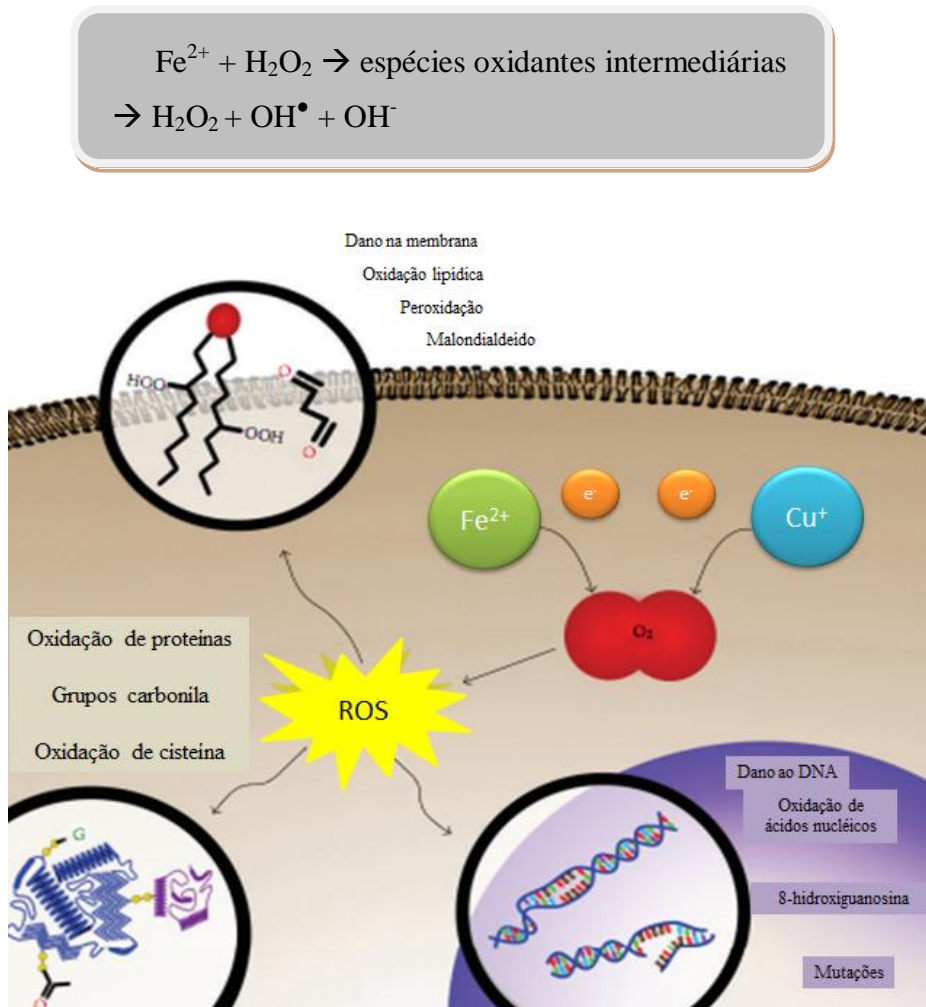
Fonte: Melo et al., 2011

Figura 3 – Reações catalisadas pela superóxido dismutase (SOD) e pela catalase.

O superóxido em excesso pode reagir com o óxido nítrico (NO), formar o peroxinitrito e prejudicar a cadeia respiratória mitocondrial, o que leva à diminuição na síntese de ATP. Uma interrupção no fornecimento de ATP aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} livre e isso interfere na função da mitocôndria, aumentando ainda mais a formação de superóxido mitocondrial (Halliwell, 2006). O estresse nitrosativo excessivo modifica ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, contribui para a hiperativação do receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), disfunção mitocondrial, dano nuclear, inibição do proteassoma e estresse do retículo endoplasmático (Farooqui e Farooqui, 2011).

As espécies reativas de oxigênio, nitrogênio, cloro, bromo ou enxofre podem contribuir para o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Halliwell, 2006). Dentre as espécies reativas, o radical hidroxila (OH^\bullet) é o mais oxidante, pois ataca ácidos graxos poli-insaturados nos fosfolipídios de membrana formando o radical peróxido e, em seguida, propaga a reação em cadeia da peroxidação lipídica (Farooqui e Farooqui, 2011). A reação de Fenton é a principal fonte do radical hidroxila, onde o H_2O_2 é convertido a OH^\bullet .

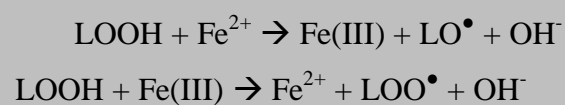
através da interação com íon metal (Fe^{2+} e Cu^{2+}) (FIGURA 4) (Halliwell, 2006; Farooqui e Farooqui, 2011):



Fonte: adaptado de Melo et al., 2011

Figura 4 – Reação de Fenton. Danos oxidativos induzidos por íons metais. Ferro e cobre podem reduzir o oxigênio, levando a formação de espécies reativas de oxigênio e subsequente oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos.

O ferro também pode converter H_2O_2 em OH^\bullet através da reação de Fenton pelo rompimento da ligação O-O (Halliwell, 2006):



A substância negra, núcleo caudado, putâmen e globo pálido têm alto teor de ferro que pode ser detectado por ressonância magnética (Halliwell, 2006). Na DP, há um aumento na concentração de ferro e estresse oxidativo na substância negra (Dauer e Przedborski, 2003; Halliwell, 2006). McCormack e colaboradores (2005) sugerem que os neurônios dopaminérgicos são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo e que o aumento da produção de espécies reativas pode promover neurodegeneração. Nesse sentido, o processo patológico ocorre devido a um ciclo de eventos degenerativos subsequentes ao estresse oxidativo e, dentre esses, a inflamação é o mais potente (Faust et al., 2009).

No processo inflamatório, a microglia e os astrócitos são ativados. A microglia ativada produz superóxido, peróxido de hidrogênio e citocinas (interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa). Os astrócitos ativados também produzem citocinas. Essas citocinas podem estimular a microglia ativada a produzir mais ROS e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e então, ter excesso de óxido nítrico (Halliwell, 2006). Com base em todas as evidências supracitadas, a busca por terapias antioxidantes em modelos de DP está plenamente justificada.

1.3 Modelos experimentais da doença de Parkinson

A busca do conhecimento acerca da etiologia da doença de Parkinson é muito importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (Dauer e Przedborski, 2003). Nesse sentido, os modelos experimentais da DP são importantes instrumentos de estudo e precisam reproduzir os sinais clínicos da doença, a lesão de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal e a progressão da degeneração neuronal (com fase pré-sintomática) (Deumens et al., 2002; Hisch, 2006).

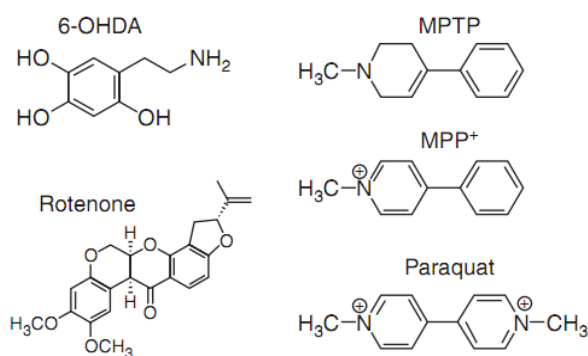
De acordo com Hisch (2006), há três formas de desenvolver modelos animais de DP: (1) através da reprodução das mutações encontradas em formas hereditárias da DP, (2) através do uso de toxinas que supostamente poderiam causar DP e (3) através da reprodução de alterações moleculares e bioquímicas encontradas em encéfalos pós-morte de pacientes com DP. Infelizmente, nenhum dos modelos atuais apresenta todas as características da DP. Apesar dessas limitações, os modelos animais têm contribuído de modo significativo na

produção de conhecimento acerca do processo patológico e dos possíveis alvos terapêuticos na DP (Tieu, 2011).

Os animais utilizados nos modelos de DP geralmente são primatas não humanos, camundongos, ratos, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e peixe-zebra. Desses animais, apenas os primatas não humanos mimetizam fielmente os sintomas motores da DP (Dauer e Przedborski, 2003), e o camundongo é uma espécie extremamente usual nos modelos com manipulações genéticas (Hisch, 2006).

1.4 Neurotoxinas

Os modelos animais de DP que utilizam toxinas são conhecidos como “modelos patológicos”. As neurotoxinas mais usadas são a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA); o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP); o 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto (paraquat) e a rotenona (FIGURA 5) (Dauer e Przedborski, 2003; Salama e Arias-Carrión, 2011).



Fonte: adaptado de Tieu, 2011

Figura 5 – Estruturas químicas das principais neurotoxinas utilizadas para induzir lesão nigroestriatal em modelos animais de doença de Parkinson.

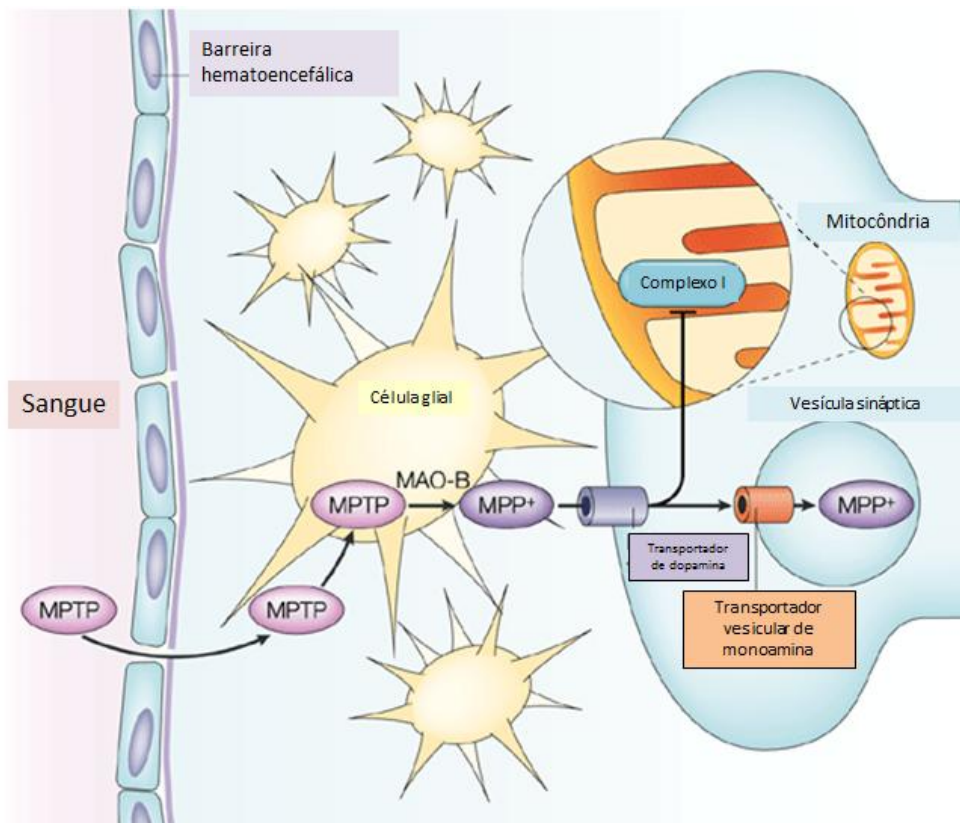
Além dessas, outras toxinas têm demonstrado neurotoxicidade nigroestriatal e podem ser usadas no desenvolvimento futuro de modelos animais de DP, tais como: epoximicin,

anonacina (*Annona muricata*) (Salama e Arias-Carrión, 2011), reserpina, alfa-metil-para-tirosina e anfetaminas (Tieu, 2011). Esses modelos objetivam reproduzir as mudanças bioquímicas verificadas nos encéfalos de pacientes pós-morte, baseado na premissa de que neurônios dopaminérgicos têm uma cascata de morte estereotipada que pode ser ativada por uma série de insultos (Dauer e Przedborski, 2003; Hisch, 2006; Patel e Chu, 2011).

O 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) foi descoberto em 1982, quando jovens californianos, usuários de droga intravenosa, foram admitidos em um hospital apresentando síndrome parkinsoniana (Tieu, 2011). Após a investigação dos casos, foi descoberto que esses pacientes tinham administrado meperidina sintética contaminada com MPTP. Desde então, o MPTP tem sido extensivamente estudado e caracterizado como modelo de DP, sendo a única neurotoxina que possui uma história de contaminação em humanos (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011). Em humanos e macacos, o MPTP provoca uma degeneração preferencial dos terminais nervosos dopaminérgicos do putâmen *versus* caudado (Dauer e Przedborski, 2003). Os ratos são menos susceptíveis à toxicidade do MPTP do que os camundongos (Tieu, 2011).

O MPTP é altamente lipofílico, cruza a barreira hematoencefálica em minutos, e por isso, pode ser administrado sistematicamente (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011). Atualmente, a sua patogênese é atribuída a três disfunções celulares: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e agregação anormal de proteínas (Dauer e Przedborski, 2003). Além disso, já foi encontrado aumento da citocina inflamatória fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) na substância negra de camundongos sete dias após administração de MPTP (Clerehugh et al., 2005).

O MPTP é oxidado pela monoamina oxidase B (MAO-B) dentro das células gliais e dos neurônios serotoninérgicos, onde é transformado em 1-metil-4-fenil-2,3,-diidropiridina (MPDP+) (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011). Posteriormente, o MPDP+ é convertido a 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), que é a molécula tóxica ativa. O MPP+ tem alta afinidade para os transportadores de dopamina (DAT), noradrenalina e serotonina. Através do sistema de recaptação da dopamina, o MPP+ entra nas células dopaminérgicas e produz alterações bioquímicas, tal como o bloqueio da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria pela inibição do complexo I que aumenta a produção de superóxido (FIGURA 6) (Dauer e Przedborski, 2003).

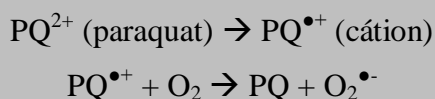


Fonte: adaptado de Vila e Przedborski, 2003

Figura 6 – Representação esquemática do metabolismo do MPTP no encéfalo. O MPTP cruza a barreira hematoencefálica, interage com as células gliais e é convertido a MPTP⁺ através da monoamina oxidase B. Na sequência, o MPTP⁺ é convertido a MPP⁺. Dentro dos neurônios dopaminérgicos, o MPP⁺ pode seguir duas rotas: (1) concentração dentro da mitocôndria, através de um processo ativo (tóxico) e (2) sequestro em vesículas sinápticas através dos transportadores vesiculares de monoamina (VMAT; protetor). Dentro da mitocôndria, o MPP⁺ bloqueia o complexo I, que interrompe a transferência de elétrons do complexo I para a ubiquinona. Esta irregularidade aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (não mostrado) e diminui a síntese de ATP (adenosina trifosfato).

O paraquat (PQ) ou 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto é um herbicida que está presente no ambiente e possui características neurotóxicas no encéfalo de animais devido à indução de dano oxidativo (Dauer e Przedborski, 2003; McCormack et al., 2005; Halliwell,

2006; Somayajulu-Nitu et al., 2009; Tieu, 2011). O PQ apresenta estrutura molecular similar ao MPP⁺ e atravessa a barreira hematoencefálica através do transportador de aminoácido neutro (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011). O cátion divalente PQ tem sido usado em modelos de DP, a reação química envolve a redução de um elétron para formar cátion paraquat e esse, por sua vez, catalisa a formação de superóxido a partir de oxigênio. O processo químico ocorre da seguinte maneira (Halliwell, 2006; Tieu, 2011):



O PQ tem sido usado em modelos experimentais de DP porque induz a perda seletiva dos neurônios dopaminérgicos, o aparecimento de sintomas motores parkinsonianos e a formação de inclusões de alfa-sinucleína (Dauer e Przedborski, 2003; McCormack et al., 2005; Somayajulu-nitu et al., 2009). Entretanto, ainda não se sabe ao certo como o PQ entra nos neurônios dopaminérgicos e induz a neurotoxicidade (Tieu, 2011). Em modelo *in vivo* com ratos e administração sistêmica de PQ (10 mg/kg), verificou-se uma diminuição de 50-70% de neurônios dopaminérgicos, diminuição de GSH e aumento da peroxidação lipídica em neurônios dopaminérgicos, ou seja, o paraquat induziu estresse oxidativo e apresentou efeitos tóxicos aos neurônios. Além disso, o estudo de Somayajulu-nitu e colaboradores (2009) verificou uma disfunção do balanço motor e deficiência do controle motor fino em ratos que tiveram perda neuronal na SNpc induzida por paraquat.

A rotenona é uma substância encontrada naturalmente em algumas raízes de plantas tropicais pertencentes à família Leguminosa. Na metade do século XVII, ela começou a ser utilizada como veneno para peixes na América do Sul (Dauer e Przedborski, 2003; Jardim e Andrade, 2009; Tieu, 2011) e, atualmente, é classificada como um pesticida moderadamente perigoso (Organização Mundial de Saúde, 2009). De acordo com Dauer e Przedborski (2003), a rotenona é uma neurotoxina altamente lipofílica e o seu mecanismo fisiopatológico envolve a inibição do complexo I, perda seletiva de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal e a formação de inclusões citoplasmáticas de alfa-sinucleína.

Pesquisa de Betarbet e colaboradores (2000) verificaram que a exposição de altas doses (1-12 mg/kg/dia) de rotenona produzia toxicidade sistêmica e lesões encefálicas não-específicas em ratos. Doses menores (2-3 mg/kg/dia) de rotenona resultaram em diminuição

da toxicidade sistêmica e degeneração dopaminérgica específica. Além disso, os autores verificaram que a infusão de rotenona afetou seletivamente o complexo I da cadeia mitocondrial e que esse defeito sistêmico parcial tinha relação direta o desenvolvimento da DP. As recentes descobertas da toxicidade da rotenona, nos modelos experimentais de DP, implicaram na proibição da sua utilização como pesticida na Europa (Schapira, 2010).

1.4.1 6-hidroxi-dopamina

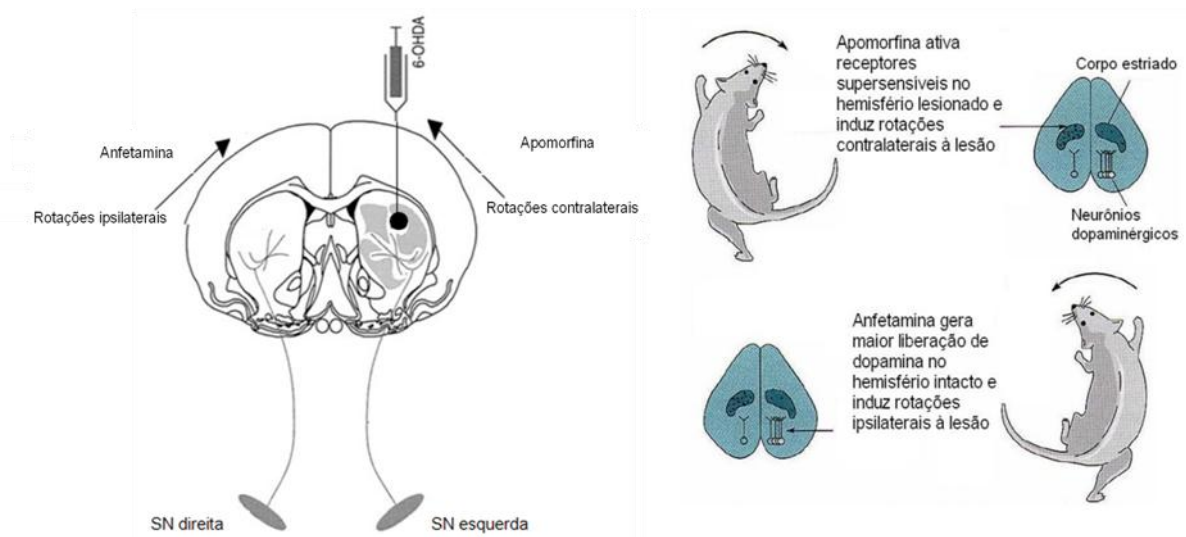
A 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) foi introduzida há mais de 30 anos como o primeiro modelo animal de doença de Parkinson associado com a morte neuronal dopaminérgica da substância negra *pars compacta* (Dauer e Przedborski, 2003). A 6-OHDA é um análogo da dopamina que tem toxicidade seletiva para neurônios catecolaminérgicos e é amplamente utilizada para estudar os mecanismos de morte celular dos neurônios dopaminérgicos (Dauer e Przedborski, 2003; Salama e Arias-carrión, 2011). Essa descoberta trouxe um novo conceito de “denervação química” na neurobiologia, onde uma molécula neurotóxica foi usada para atingir uma população neuronal específica (Tieu, 2011).

A administração da 6-OHDA no encéfalo é feita através de cirurgia estereotáxica porque ela não cruza a barreira hematoencefálica (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011). A 6-OHDA é transportada para dentro dos neurônios através dos transportadores de dopamina (DAT) e noradrenalina (Tieu, 2011). Nos neurônios, a 6-OHDA se acumula no citosol, gera espécies reativas de oxigênio (ROS) e inativa macromoléculas biológicas através da geração de quinonas (Dauer e Przedborski, 2003; Salama e Arias-carrión, 2011; Tieu, 2011). Todavia, esse modelo não apresenta formação de inclusões típicas de corpos de Lewy (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011).

Os principais locais de infusão da 6-OHDA são: substância negra, prosencéfalo e estriado (Dauer e Przedborski, 2003; Salama e Arias-carrión, 2011; Tieu, 2011). Cerca de 24 horas após a injeção de 6-OHDA na substância negra ou no prosencéfalo, os neurônios dopaminérgicos começam a morrer sem morfologia apoptótica (Dauer e Przedborski, 2003). Assim, esse modelo representa o estágio final da DP (Dauer e Przedborski, 2003; Salama e Arias-carrión, 2011).

Quando injetada no estriado, a 6-OHDA produz uma degeneração retrógrada, lenta, progressiva e parcial dos neurônios nigroestriatais que dura 1 a 3 semanas (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011). Segundo Tieu (2011), a injeção intraestriatal de 6-OHDA oferece três vantagens: (1) a lesão é progressiva e menos extensiva, sendo mais relevante para a DP; (2) a presença de sintomas não-motores de DP, incluindo disfunções cognitiva, psiquiátrica e gastrointestinal; (3) a facilidade da injeção estereotáxica em estruturas maiores, tal como o estriado, aumenta a probabilidade de funcionar o modelo em animais pequenos como os camundongos. Geralmente, a lesão intraestriatal é feita unilateralmente e o lado contralateral serve como controle interno (Dauer e Przedborski, 2003; Tieu, 2011).

A lesão unilateral com 6-OHDA ocasiona um desequilíbrio na atividade dopaminérgica entre os dois estriados e isso induz um comportamento rotacional assimétrico. Nos modelos de DP, a administração subcutânea de agonistas dopaminérgicos (apomorfina, anfetamina ou L-3,4-dihidroxifenilalanina) é muito utilizada como teste comportamental de indução de rotação, e tem como objetivo averiguar as anormalidades motoras dos animais e correlacionar com a magnitude da lesão nigroestriatal (FIGURA 7) (Deumens et al., 2002; Blandini et al., 2008).



Fonte: adaptado de Deumens et al., 2002 e Silvestrin, 2008.

Figura 7 – Teste das rotações induzidas por agonistas dopaminérgicos. A lesão unilateral com 6-OHDA provoca um desequilíbrio na atividade dopaminérgica entre os dois estriados e causa a assimetria no comportamento motor dos animais.

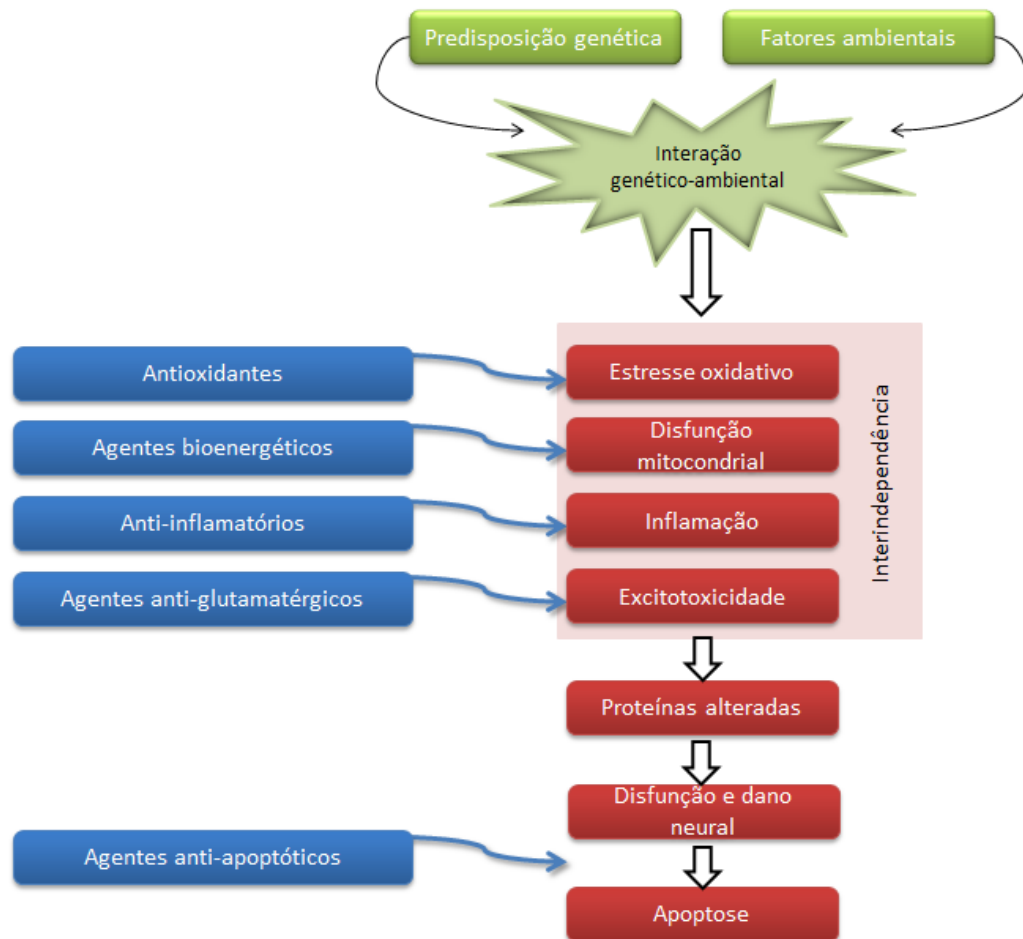
Kirik e colaboradores (1998) investigaram a relação do efeito da dose da toxina (20-30 µg), o número de aplicações da toxina e o local da injeção. Injeções de 20 µg induziram uma lesão necrótica ao redor da área de injeção e o efeito da denervação apresentou diferenças dependendo da área de lesão. Quando a mesma quantidade de toxina foi distribuída ao longo de dois ou três locais (2 x 10 ou 3 x 7 µg), a extensão da denervação de células tirosina hidroxilase-positivas foi progressivamente aumentada. Na injeção da quantidade total de 20 µg de 6-OHDA (grupos com 1, 2 ou 3 aplicações) houve redução de aproximadamente 50% nos neurônios tirosina hidroxilase-positivos na substância negra. Além disso, a análise de regressão linear demonstrou que o total de células tirosina hidroxilase positivas (TH+) contadas na substância negra está altamente correlacionada com a densidade das fibras TH+ no estriado. Com isso, entende-se que a degeneração e os efeitos funcionais induzidos pela lesão intraestriatal com 6-OHDA são afetados de modo significativo pela quantidade total de toxina injetada, local de injeção e difusão da toxina (Kirik et al., 1998).

Henry e colaboradores (2009) pesquisaram a cinética do processo degenerativo no modelo de DP com 6-OHDA em ratos, analisando os neurônios dopaminérgicos e as microglias vizinhas, do 1º ao 35º dia pós-lesão. Eles observaram que o estriado lesionado apresentou menor densidade óptica de fibras tirosina hidroxilase positivas a partir do 7º dia. Na SNpc, a perda de neurônios dopaminérgicos foi observada principalmente na parte medial e posterior dos ratos analisados 5 e 7 dias após a cirurgia estereotáxica.

1.5 Terapias antioxidantes

O tratamento farmacológico com 3,4-dihidroxifenil-L-alanina (L-DOPA), um precursor de dopamina, é a conduta clínica mais efetiva no alívio sintomático dos portadores da doença de Parkinson (DP) porque restaura os níveis de dopamina no estriado. Entretanto, essa terapia não impede a progressão da doença e, na maioria dos pacientes, causa flutuações motoras e discinesia (movimentos involuntários anormais) potencialmente incapacitantes (Marsden, 1992; Cenci e Lundblad, 2006; Cenci e Konradi, 2010). Além disso, pode aparecer uma série de complicações psiquiátricas (incluindo alucinações, psicoses, e estados confusionais tóxicos) (Marsden, 1992). Outras drogas têm sido testadas em modelos experimentais de DP visando a neuroproteção e alívio dos sintomas motores (Dauer e

Przedborski, 2003). As estratégias de tratamentos são baseadas nos eventos moleculares que ocorrem nos encéfalos dos parkinsonianos e, dentre essas, os antioxidantes têm apresentado bons resultados (FIGURA 8) (Faust et al., 2009).



Fonte: adaptado de Faust et al., 2009

Figura 8 – Estratégias de tratamento na DP. Diagrama que descreve fatores de risco (em verde), eventos moleculares patogênicos na DP (caixas em vermelho) e locais onde agentes neuroprotetores potencialmente poderiam agir (caixas em azul).

Segundo Sies e Stahl (1995), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em comparação com os substratos oxidativos, retarda ou inibe significativamente a oxidação dos substratos. O sistema antioxidante utiliza estratégias enzimáticas e não-enzimáticas (TABELA 3) para diminuir o dano ao DNA e atenuar a peroxidação lipídica. Em geral, a reparação ocorre através de mecanismos enzimáticos,

porém, muitos compostos de origem alimentar podem interagir com compostos endógenos e apresentar funções antioxidantes (Sies e Stahl, 1995).

Tabela 3 – Principais agentes do sistema antioxidante

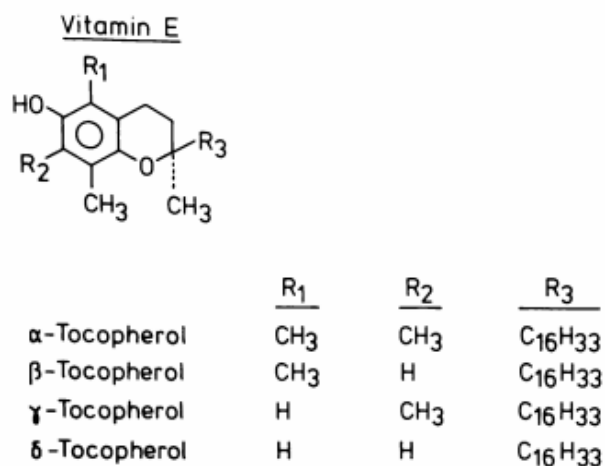
ENZIMÁTICO	NÃO-ENZIMÁTICO
Catalase	α -tocoferol (vitamina E)
Glutaciona peroxidase	β -caroteno
NADPH-quinona oxireductase	Ácido ascórbico (vitamina C)
Enzimas de reparo	Flavonoides
	Proteínas do plasma
	Selênio
	Clorofilina

A coenzima Q, glutaciona, vitamina E e C são antioxidantes intracelulares. A ubiquinona ou coenzima Q10 (CoQ10) é um agente bioenergético altamente hidrofóbico, e um potente antioxidante presente nas membranas celulares. É um co-fator obrigatório na cadeia mitocondrial, serve como um aceptor de elétrons nos complexos I e II/III da cadeia transportadora de elétrons e participa da recuperação das células que sofrem ação do estresse oxidativo (Halliwell, 2006; Faust et al., 2009).

A disfunção mitocondrial e o aumento do estresse oxidativo (McCormack et al., 2005; Farooqui e Farooqui, 2011) são eventos moleculares investigados como possíveis fatores patogênicos da DP, e por isso, a CoQ10 têm sido usada em modelos experimentais de DP (Halliwell, 2006; Faust et al., 2009; Somayajulu-nitu et al., 2009). O uso de CoQ10 (5 mg/kg/dia), solúvel em água, em ratos lesionados com paraquat assegurou o efeito antioxidante através da manutenção do sistema GSH, diminuição da peroxidação lipídica, melhora da condição motora e neuroproteção dopaminérgica (Somayajulu-nitu et al., 2009). No entanto, em um modelo de DP genético, a CoQ10 (100mg/ml) não apresentou neuroproteção (Faust et al., 2009).

A vitamina C (ácido L-ascórbico) é considerada o antioxidante mais importante nos fluidos extracelulares, sendo muito eficaz na inibição da peroxidação lipídica (Sies e Stahl, 1995). A vitamina E representa uma família de quatro tocoferóis (FIGURA 9) e tocotrienóis que inibem a peroxidação lipídica através do sequestro de radicais peroxila usando um grupo hidroxila fenólico (Sies e Stahl, 1995; Halliwell, 2006). O α -tocoferol é a principal forma de vitamina E encontrada no encéfalo e os níveis verificados em encéfalos de pacientes com

doença de Parkinson estão dentro na normalidade. Os efeitos celulares do α -tocoferol não são necessariamente relacionados à capacidade antioxidante, pois o mesmo tem outras ações metabólicas (Halliwell, 2006).



Fonte: adaptado de Sies e Stahl, 1995

Figura 9 – Estrutura das vitaminas E. A série de tocoferol possui cadeia lateral de fitilo (R3), enquanto que nos tocotrienóis a cadeia lateral tem ligações duplas nas posições 3', 7' e 11'.

Atualmente, há uma atenção crescente para o desenvolvimento de terapias nutricionais e investigação de possíveis propriedades antioxidantes de legumes, frutas, grãos, raízes, flores, sementes, chás e vinhos (Sun et al., 2008). Há mais de 50 espécies de plantas diferentes e mais de 8000 compostos fenólicos identificados em forma molecular pura ou em proporções específicas de diferentes extratos de plantas (Sá, 2010). Compostos fenólicos podem atravessar a barreira hematoencefálica, e além das propriedades antioxidantes, possui várias outras funções (anti-inflamatório, anti-neoplásico, antiviral, antimicrobiana, vasorrelaxante e anticoagulante) que podem limitar o dano celular (Halliwell, 2006; Sun et al., 2008). Alguns autores relatam o efeito neuroprotetor de extratos administrados em animais com DP (TABELA 4), e esses efeitos são frequentemente atribuídos à presença de flavonóides (Halliwell, 2006; Sun et al., 2008).

Os flavonoides constituem o maior e mais importante grupo de polifenóis, a sua estrutura química é geralmente representada por C₆ – C₃ – C₆, onde consiste em dois anéis de

benzeno (A e B) e um anel C com um átomo de oxigênio substituindo um átomo de carbono (Sá, 2010). De acordo com o nível de oxidação do anel C, são divididos em subgrupos, tais como os flavanóis (catequina e epicatequina), flavonóis (quercetina, miricetina, kaempferol), flavanonas (hesperitina, naringenina), flavonas (apigenina, luteolina), isoflavonóides (genisteína, daidzeína) e antocianinas (cianidina, malvidina) (Sun et al., 2008; Sá, 2010).

Tabela 4 – Efeitos de plantas utilizadas em diferentes modelos de DP

Polifenol/Nome da planta	Modelo de DP	Efeitos	Referências
Chá preto	6-OHDA rato	+	Chatuverdi et al., 2006
Cacau	6-OHDA rato	-/+	Datla et al., 2007
Epigallocatequina galato	MPTP camundongo	+	Choi et al., 2002 Mandel e Youdim, 2004
Ginkgo biloba	6-OHDA rato	+	Kim et al., 2004
Semente de uva	6-OHDA rato	-	Datla et al., 2007
Chá verde	MPTP camundongo 6-OHDA rato	+	Choi et al., 2002 Guo et al., 2007
Quercetina	6-OHDA rato	-	Zbarsky et al., 2005
Trevo vermelho	6-OHDA rato	+	Datla et al., 2007
Extrato da casca de tangerina	6-OHDA rato	+	Datla et al., 2007

Fonte: adaptado de Sun et al., 2008

Dado o envolvimento do estresse oxidativo, aumento dos níveis de ferro e mecanismos inflamatórios na DP, é relevante pesquisar se os flavonoides podem oferecer neuroproteção (Datla et al., 2007). Todavia, é necessário ter critérios de dosagem estabelecidos, pois os compostos fenólicos têm o seu modo de ação e diferentes alvos da via intracelular dependentes da concentração. Além disso, é importante saber que os resultados dos estudos de compostos fenólicos em sistema de cultura de células podem não corresponder à sua ação *in vivo* (Sun et al., 2008).

1.5.1 Mogno (*Swietenia macrophylla*)

De acordo com o Sistema de Classificação de Cronquist, o mogno está na posição taxonômica de *Swietenia macrophylla*, e pertence à família Meliaceae. A etimologia da palavra *Swietenia* deriva de uma homenagem ao médico holandês Gerard van Swieten, e o epíteto específico *macrophylla* significa folha grande. O mogno é conhecido internacionalmente como Mahogany e é muito utilizado para fabricação de móveis, instrumentos e na construção civil. A *Swietenia macrophylla* tem uma grande área de distribuição geográfica, ocorrendo de forma natural em Belize, na Colômbia, na Bolívia, na Costa Rica, na Guatemala, na Guiana Francesa, em Honduras, no México, em Nicarágua, no Panamá, no Peru, na Venezuela e no Brasil. Na Amazônia brasileira, estima-se uma área de 1.518.964 km² de ocorrência natural do mogno, e abrange: Acre, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Tocantins. Além disso, o mogno foi introduzido e tem-se desenvolvido satisfatoriamente em Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro, Paraná e Distrito Federal (Carvalho, 2007).

A *Swietenia macrophylla* está na categoria “perigo” da lista oficial de espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção (Carvalho, 2007) e, desde o início da década de 1990, o governo brasileiro tem adotado uma série de ações para proteger o mogno da extinção (Chimeli e Boyd, 2009). Os projetos de reposição florestal registrados no Pará, de 1976 a 1996, demonstraram que a *Swietenia macrophylla* foi plantada por 28% das empresas, representando a segunda espécie mais utilizada na reposição (Carvalho, 2007). Em março de 1999, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) publicou um relatório de estudo, realizado de 1995 a 1998, que levou à suspensão de 85% da exportação do mogno. No ano de 2001, a extração, transporte, comércio doméstico e internacional do mogno foram proibidos pelo governo brasileiro, por tempo indeterminado. No final do ano de 2002, o mogno foi incluído no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Fauna e da Flora Selvagens Ameaçadas de Extinção das Nações Unidas (CITES), onde há regras restritas para o comércio internacional, mas não determina a proibição do comércio (Chimeli e Boyer, 2009).

Por ser uma das madeiras mais valorizadas no mercado mundial, o mogno é uma planta da floresta tropical de bastante interesse econômico. O reflorestamento e a legislação

que regula a sua comercialização são métodos importantes para proteger o mogno da extinção (Carvalho, 2007). Pesquisas atuais têm investigado a constituição química da *Swietenia macrophylla* e já foi verificado que na semente (FIGURA 10) (Kojima et al., 1998), casca (FIGURA 11) (Falah et al., 2008) e folha do mogno (Sá, 2010) há presença de ácidos fenólicos, limonóides e flavonoides. Além disso, os compostos isolados da casca (Falah et al., 2008) e folha de mogno (Sá, 2010) apresentaram potente atividade antioxidante.

Lopes (2009) utilizou extrato aquoso de folhas de mogno em modelo *in vitro* de células cerebelares com exposição ao metilmercúrio (MeHg) e concluiu que o mogno apresentou efeito citoprotetor parcial ou total, dependendo do paradigma da exposição. No entanto, inexistem pesquisas avaliando o efeito do mogno no sistema fisiológico em modelos experimentais *in vivo*. Nesse sentido, este estudo investigou o efeito do extrato de mogno em um modelo experimental *in vivo* de DP, com lesão com 6-hidroxi-dopamina.

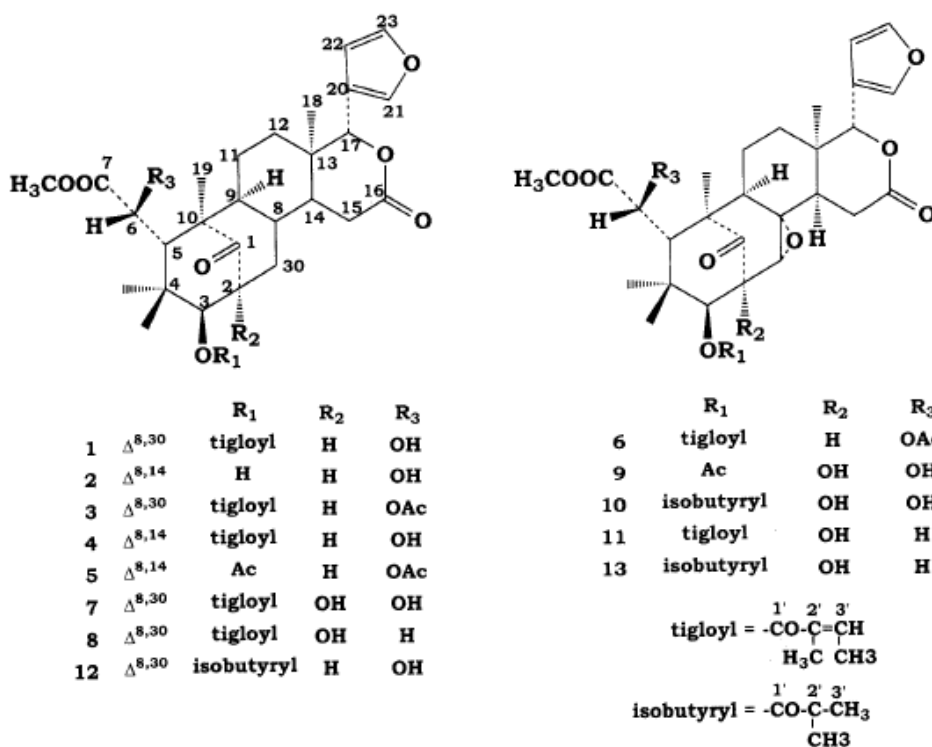


Figura 10 – Estrutura química dos limonóides encontrados na semente de *Swietenia macrophylla*. (1) Swietenine, (2) Swietenolide, (3) Swietenine acetato, (4) Swietenolide tiglate, (5) Swietenolide diacetato, (6) 8,30-epoxi-swietenine-acetate.

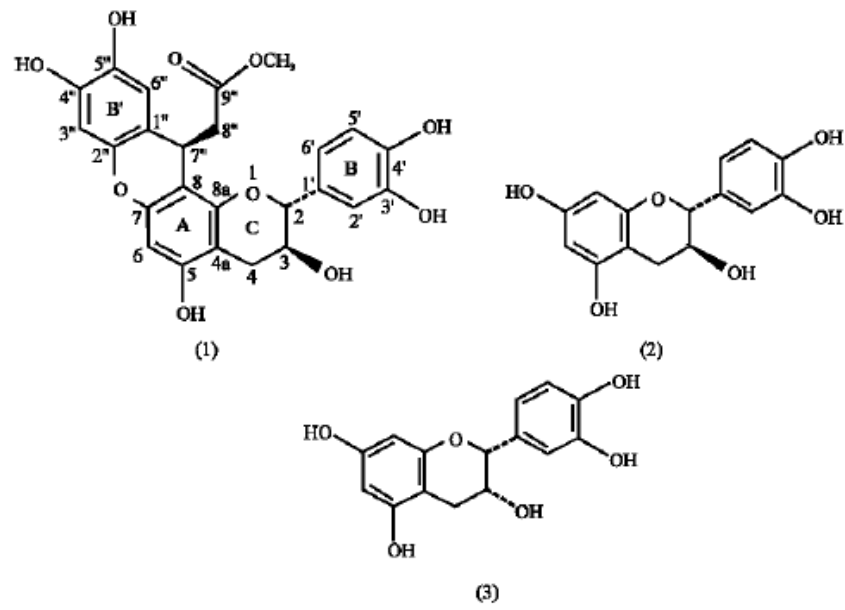


Figura 11 – Constituintes químicos isolados da casca de *Swietenia macrophylla*. (1) Flavonoide tipo-catequina denominada swietemacrophyllanina (2) Catequina, (3) Epicatequina.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral:

- Investigar o efeito do extrato aquoso de *Swietenia macrophylla* (mogno) em modelo experimental de hemiparkinsonismo, com lesão com 6-hidroxidopamina.

2.2 Objetivos específicos:

- Investigar os efeitos do tratamento com extrato aquoso de *Swietenia macrophylla* (mogno) sobre as alterações comportamentais de camundongos com indução experimental de doença de Parkinson.

- Investigar quantitativamente o efeito do tratamento com extrato aquoso de *Swietenia macrophylla* (mogno) sobre a perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* no modelo experimental proposto.

3 MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa envolvendo Animais, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Andersen et al., 2004). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFGA) com o número BIO015-11. O estudo foi realizado no Laboratório de Neuropatologia Experimental (LANEX), da Universidade Federal do Pará (UFGA); no turno da manhã, durante o período de novembro de 2010 a novembro de 2011.

3.1 Animais

Um total de 30 camundongos machos adultos (30-50 g), da linhagem *Swiss*, foram obtidos do Instituto Evandro Chagas (IEC, Belém/Pará). Os animais foram transferidos para o LANEX onde foram mantidos em caixas de plástico dentro de cabines para biotério (Insight®) dotadas de sistema de exaustão, com temperatura média de 26°C e ciclo claro-escuro de 12 h (6:00 - 18:00 h). Água e ração foram fornecidas à vontade aos animais durante todo o período do experimento.

3.2 Randomização

Cada animal tinha uma identificação única, que foi feita com caneta permanente (Pilot) das cores preto, vermelho e azul. Com isso, o pesquisador realizou um sorteio das identificações e os animais sorteados foram incluídos em quatro diferentes grupos (FIGURA 12). Foram excluídos do experimento os animais que morreram antes de completar os 7 dias pós-cirurgia e aqueles lesionados com 6-hidroxidopamina e que não apresentaram comportamento rotacional no teste de apomorfina. Foram incluídos 20 animais, os quais passaram por todos os procedimentos estabelecidos no protocolo experimental do estudo

(FIGURA 13).

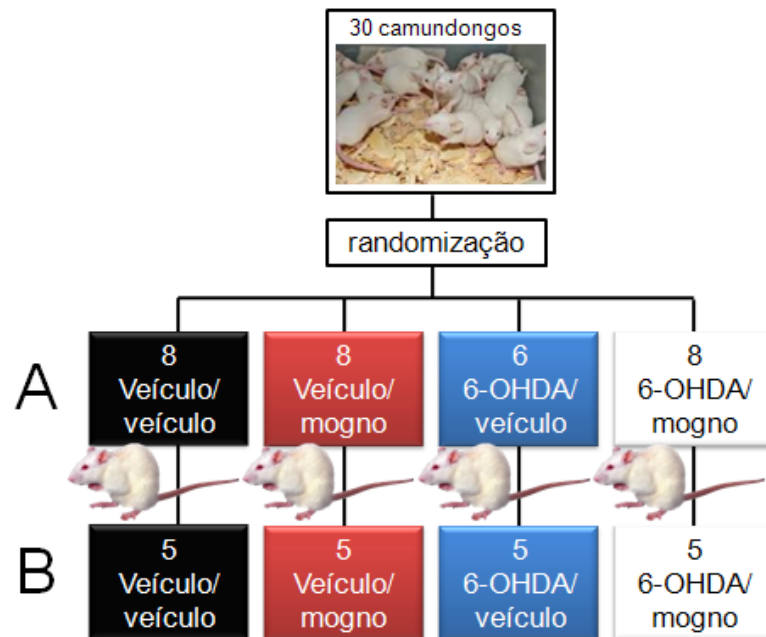


Figura 12 – Randomização dos animais. (A) Cada camundongo foi identificado, com ou sem caneta permanente (cores preta, vermelha e azul), depois era feito um sorteio e os animais eram direcionados aos grupos. (B) Animais incluídos no experimento.



Figura 13 – Cronograma e procedimentos dos grupos experimentais da pesquisa. A pesquisa iniciava com o teste de campo aberto (dia 0). No dia seguinte, os animais eram submetidos à cirurgia estereotáxica com infusão de veículo ou 6-OHDA na região intraestriatal dos camundongos. Nesse mesmo dia, iniciava-se o tratamento (veículo ou mogno), que prosseguia durante os 7 dias de sobrevivência (traços vermelhos). No 7º dia, realizava-se o teste do campo aberto, teste de indução de rotação por apomorfina e a perfusão dos animais.

3.3 Extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*)

Nessa pesquisa foi utilizada a planta *Swietenia macrophylla*, que foi coletada em São Francisco do Pará. O extrato aquoso de folhas de *Swietenia macrophylla* (mogno) foi cedido pelo Laboratório de Cromatografia Líquida (LabCrol) do Instituto de Química da Universidade Federal do Pará, obtido a partir de fracionamento para identificação de ácidos fenólicos e flavonoides, descrito no trabalho de Sá (2010). A administração do extrato aquoso de folhas de mogno foi feita diariamente, durante 7 dias, através de aplicação intraperitoneal, em uma dose de 0,5mg/kg/dia. A dose foi selecionada após realização de experimento piloto que indicou essa dose como melhor potencial neuroprotetor.

3.4 Cirurgia estereotáxica

Os animais ($n=20$) foram anestesiados com cloreto de cetamina (Vertanacol), na dose de 75 mg/kg, misturado com cloreto de xilazina (Rompum) na dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.). A profundidade anestésica foi avaliada através da presença ou ausência dos sinais: reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das alterações das frequências cardíaca e respiratória. Após a confirmação de que o animal estava anestesiado, o mesmo tinha sua cabeça fixada em aparelho estereotáxico (FIGURAS 14A e 14B).

O procedimento da cirurgia estereotáxica era iniciado com a tricotomia da região da cabeça (FIGURA 15A), e subsequente assepsia da área tricotomizada com álcool iodado (FIGURA 15B). Em seguida, o tecido subcutâneo e o periósteo foram removidos expondo-se a superfície craniana entre o bregma e o lambda (FIGURA 15C). As injeções foram aplicadas unilateralmente no estriado. Para tanto, foi feito um orifício unilateral no lado esquerdo do crânio, com o auxílio de uma broca elétrica, nas seguintes coordenadas: antero-posterior (A-P): 0,8 mm a partir do bregma; médio-lateral (M-L): 1,5 mm a partir da linha média; e dorso-ventral (D-V): 3,0 mm a partir da calota craniana, baseadas no Atlas de Estereotaxia para camundongos de Paxinos e Franklin (2004) (FIGURAS 15D, 15E, 15F e 15G). Por meio deste orifício foi injetada solução contendo 6-OHDA (10 µg administrada em um volume de 2 µl, em 5 µg/µl, em solução de cloreto de sódio a 0,9% com ácido ascórbico 0,2%) ou ácido

ascórbico (veículo) através da seringa Hamilton de 10 μ l (FIGURA 15H). A infusão foi realizada manualmente, numa taxa de 0,4 μ l/minuto, e após cada injeção a seringa Hamilton permanecia no local por mais 3 minutos, para que houvesse a difusão adequada da neurotoxina. Em seguida, a ferida cirúrgica foi suturada com linha cirúrgica de propileno.



Figura 14 – Aparato estereotáxico. (A) Aparelho estereotáxico (B) Estabilização da cabeça do animal com o auxílio de duas barras intra-auriculares e uma barra de fixação dos incisivos.

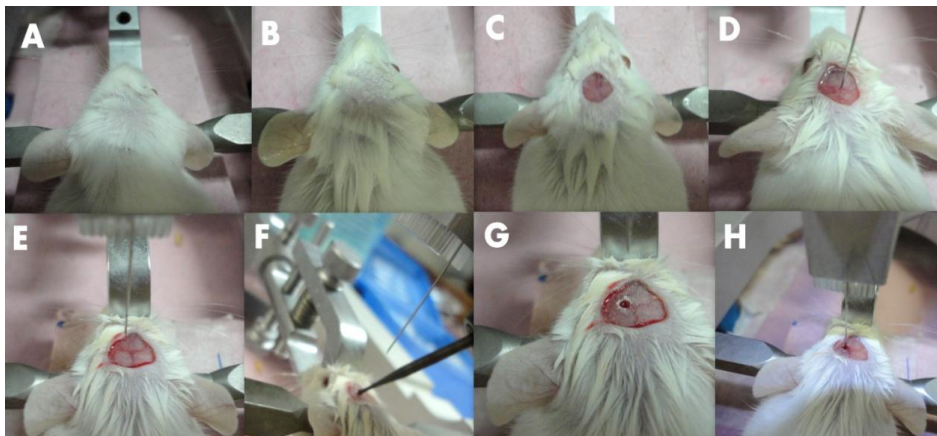


Figura 15 – Cirurgia estereotáxica. (A) Tricotomia; (B) Assepsia; (C) Retirada do tecido subcutâneo; (D) Posicionamento inicial da agulha; (E) Posição final da agulha, encontrada a partir das coordenadas estabelecidas no protocolo da pesquisa; (F) Utilização da broca no local estabelecido pelas coordenadas; (G) Orifício unilateral; (H) Injeção de 6-OHDA ou ácido ascórbico (veículo).

3.5 Teste comportamental do campo aberto

A análise da atividade locomotora foi descrita em 1992, por Cools e colaboradores, o procedimento era descrito com ratos posicionados em uma caixa com base plana horizontal de vidro (servindo de campo aberto) e parede de fundo branco neutro. No nosso estudo, o teste de campo aberto foi realizado antes (dia 0) e após a cirurgia estereotáxica (dia 7). O teste teve duração de cinco minutos para cada animal, observando-se parâmetros motores (FIGURA 16), tais como: ambulação, avaliada pelo número de linhas cruzadas pelos animais; bipedestação sem apoio, avaliada pelo número de vezes que o animal levantava o tronco apoiado apenas sobre as patas traseiras; e bipedestação com apoio, analisada pelo número de vezes que o animal levantava o tronco apoiando as patas dianteiras na parede da caixa de acrílico. Também foram avaliados parâmetros associados à ansiedade, tais como: comportamentos de limpeza, micção e defecação. Sendo assim, o teste de campo aberto foi utilizado com o objetivo de avaliar a motricidade e a ansiedade dos animais.

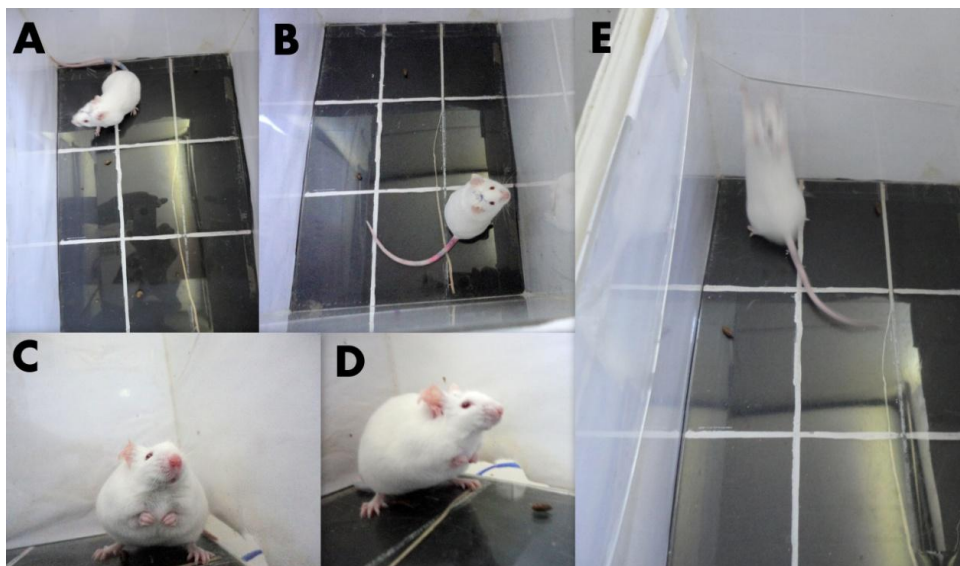


Figura 16 – Posicionamento dos animais no teste de campo aberto. (A) Cruzamento de linhas, (B) Vista superior do animal em pé sem apoio, (C) Vista frontal do animal em pé sem apoio, (D) Vista lateral do animal em pé sem apoio, (E) Animal em pé com apoio.

Os dados obtidos da ambulação dos camundongos antes da cirurgia (dia 0) serviram

como parâmetros de comparação para o teste pós-cirúrgico (dia 7). Para o teste, cada animal foi colocado ao centro de uma caixa retangular de acrílico transparente, as paredes foram forradas com papel branco para que não houvesse contato visual entre os animais. A caixa media 21 cm de largura por 30 cm de comprimento e 20 cm de altura. O assoalho do aparato estava dividido em 9 regiões com área de 10 cm x 7 cm (FIGURA 17).

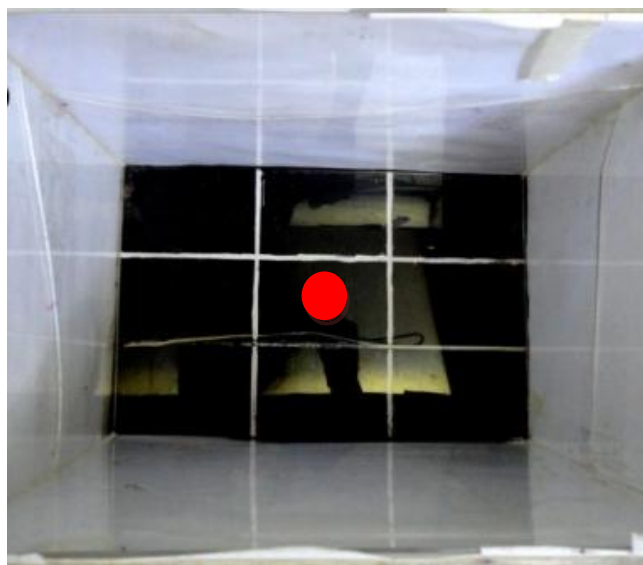


Figura 17 – Teste de campo aberto. Caixa utilizada no teste de campo aberto, com a demonstração da posição inicial dos animais (círculo vermelho).

3.6 Teste das rotações induzidas por apomorfina

Todos os animais ($n=20$) foram submetidos ao teste de rotação induzida por apomorfina, no 7º dia após a cirurgia. A apomorfina (Sigma-Aldrich), na dose de 6 mg/Kg (dissolvida em salina a 0,9%), foi injetada na região subcutânea dos animais e, imediatamente após a aplicação, eles foram colocados em aparato circular com 25,30 cm de diâmetro e 10,50 cm de altura (FIGURAS 18 e 19). O comportamento dos animais foi gravado durante 20 minutos. Depois, o vídeo foi assistido no programa Windows Media Player e os pesquisadores contaram o número de rotações que cada animal realizou em torno de seu próprio eixo.



Figura 18 – Aparato utilizado no teste rotacional induzido por apomorfina.

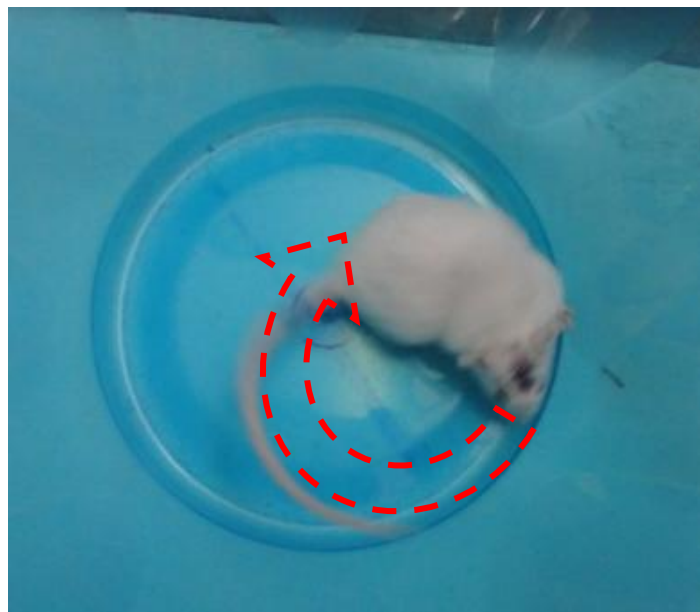


Figura 19 – Rotação contralateral característica do teste de apomorfina.

3.7 Perfusão e obtenção de secções de encéfalos

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram perfundidos, por via intracardíaca, com salina tamponada e paraformaldeído (PFA) a 4% (pH 7,2 - 7,4). Cada

solução foi administrada durante cinco minutos, com volume médio de 150 ml. Em seguida, realizou-se craniotomia para retirada dos encéfalos, e os mesmos foram pós-fixados em PFA a 4% por 72 horas. Na sequência, o tecido foi crioprottegido em sacarose a 30% por 72 horas, e então foram realizados os cortes histológicos. As secções foram cortadas na espessura de 40 µm, obtidas no aparelho de criostato (Leica CM 1850). As secções foram armazenadas em PFA 2% até a realização das colorações de imunohistoquímica.

3.8 Imuno-histoquímica

A tirosina hidroxilase (TH) é a enzima essencial para a síntese de catecolaminas, tal como a dopamina. Nesse processo, o aminoácido tirosina é hidroxilado pela enzima TH e convertido a L-DOPA, esta é descarboxilada pela enzima descarboxilase de ácidos aromáticos, originando a dopamina. Nesta pesquisa, nós utilizamos o procedimento de imunohistoquímica com anticorpo anti-tirosina hidroxilase (anti-TH) para marcação de neurônios dopaminérgicos.

O protocolo constitui-se de retirada das secções encefálicas do PFA 2% para lavagem em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2 - 7,4). Em seguida, as mesmas foram submetidas à inativação da peroxidase endógena, feita em solução contendo 90% de metanol e 10% de H₂O₂ a 30%, por 20 minutos. O material foi retirado, lavado em TF 0,1 M (pH 7,2 - 7,4) e imerso em Triton 5% por 30 minutos. O anticorpo primário anti-TH (Chemicon), feito em coelho, foi diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2 - 7,4) e Triton 5% na titulação de 1:1000; e as secções ficaram incubadas durante 24 horas. Depois, as secções foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2 - 7,4) por três vezes (5 minutos cada) e, então, se realizou a marcação com anticorpo secundário anti-coelho (Jakson Immuno Research), na titulação de 1:500, durante 2 horas. O material foi colocado no complexo avidina-biotina (ABC, Vector), na titulação de 1:500, durante 1 h. O cromógeno utilizado para visualização do complexo formado foi o SG (Vector/SK-4700). Após as reações, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, seguido do processo de desidratação com banhos crescentes de etanol, por 5 minutos cada, e diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com entelan e lamínula.

3.9 Contagem neuronal por estereologia

A estereologia é o método científico ideal para avaliar as alterações morfológicas induzidas por lesões neurotóxicas e verificar as intervenções terapêuticas, pois utiliza técnicas de amostragem e determina estimativas imparciais, com características 3D, para uma dada população a partir de uma amostra aleatória de uma fração da população (Healy-Stoffel et al., 2012; www.stereology.info).

A análise estereológica de neurônios dopaminérgicos imunomarcados com tirosina hidroxilase (TH) tem sido utilizada usada para estudar as alterações morfológicas em diversos modelos animais de DP. Todavia, os resultados morfométricos variam de acordo com o estudo e isso é atribuído às diferenças no local da lesão, na coloração, nos métodos de quantificação histológica, na dose da toxina e na variabilidade biológica (Healy-Stoffel et al., 2012).

Neste estudo, as células TH-positivas foram quantificadas usando o programa Stereologer versão 2.0 (SRC, Maryland, EUA) instalado em microcomputador com processador Pentium dual core 2 GHz. O programa recebe informações de uma câmera CCD colorida de alta resolução (Toshiba IK-C44MD) e de uma platina motorizada nos eixos XYZ (Prior ScientificOptiScan) acopladas a um microscópio trinocular (Nikon Labophot-2).

No momento da análise estereológica, as secções apresentavam uma espessura média final de 15µm. O delineamento da substância negra *pars compacta* foi feito com a objetiva de 2x, utilizando o Atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Franklin (2004) como referência e tendo o cuidado de excluir as outras subdivisões da substância negra e a área tegmentar ventral (VTA – do inglês, *ventral tegmental area*) (FIGURAS 20A, 20B e 20C). Foram feitas duas contagens utilizando secções em sentido rostro-caudal de cada animal. A primeira contagem selecionou 6 secções contendo SNpc (Bregma -1.82 a -3.88). A segunda contagem utilizou 3 secções contendo SNpc (Bregma -2.92 a -3.64). As contagens foram feitas com a objetiva de 40x (FIGURA 20D). Para a identificação e inclusão dos neurônios na contagem foram considerados somente os pericários marcados com TH cujos núcleos eram visíveis.

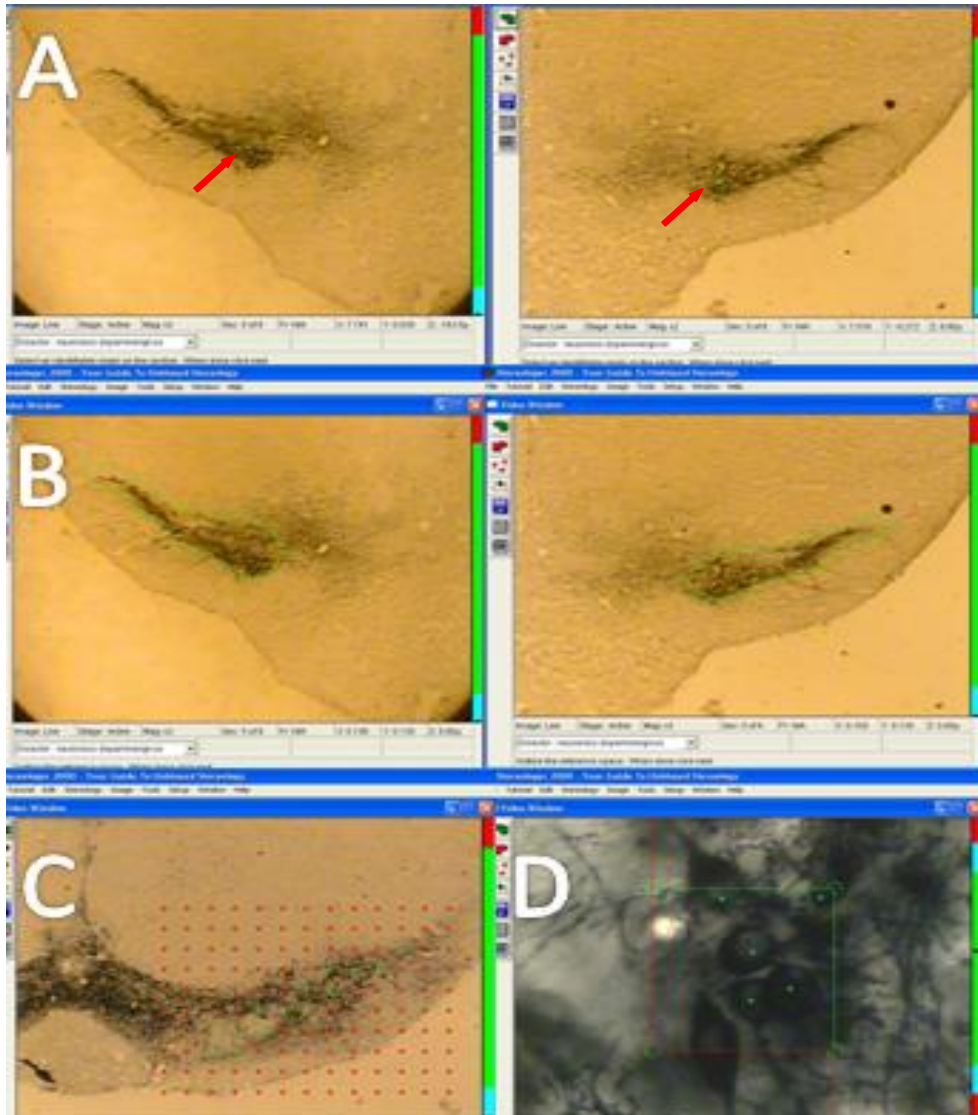


Figura 20 – Contagem neuronal por estereologia. (A) Marcação inicial do local de contagem (seta vermelha). (B) Delimitação da área da substância negra *pars compacta* (linha verde) baseada nas figuras do Atlas de encéfalo de camundongos em coordenadas estereotáxicas (Paxinos e Franklin, 2004). (C) áreas de contagem (pontos verdes) e áreas que foram excluídas da contagem (pontos vermelhos). (D) Local de contagem dos neurônios: o quadrado possui linhas verde e vermelha. Os neurônios que passam pela linha verde e que estão ao centro do quadrado podem ser marcados; os neurônios que passam pela linha vermelha e que estão fora do quadrado não podem ser marcados. As figuras A, B e C estão em objetiva de x2 e a figura D está em objetiva x40.

3.10 Coloração de Nissl

No método de coloração de Nissl, as secções encefálicas foram retiradas do PFA 2%, montadas em lâminas gelatinizadas e secaram em ar ambiente durante um dia. As lâminas contendo as secções foram imersas em diferentes concentrações de etanol (90%, 70% e 50%) e água destilada com ácido acético 5%, por um período de 5 minutos cada, seguido de banho em violeta de cresil a 0,3%, durante 30 minutos. Então, as lâminas foram mergulhadas três vezes (1 minuto cada) em água destilada e após isso, as secções passaram por processo de desidratação com banhos crescentes de etanol (70%, 90%, 100%) e diafanização em xilol. As lâminas foram montadas com Entelan e lamínula.

Para a contagem, foram incluídas as secções que tinham o estriado com o trajeto da agulha representando o centro do sítio de injeção de veículo ou 6-OHDA. Em cada grupo, foram selecionados três animais, sendo analisada uma secção de cada. A contagem foi feita no microscópio trinocular (Nikon Labophot-2), com a objetiva de x100/1,25 sem câmara clara, com auxílio de uma gradícula posicionada na ocular do microscópio. A ampliação obtida foi de 1250x e uma área de contagem de 10.000 μm^2 .

3.11 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa estatístico GraphPad Prism 6.0. As variáveis do teste de campo aberto (cruzamento de linhas, bipedestação com apoio, bipedestação sem apoio, limpeza, micção, defecação) e a quantificação dos neurônios dopaminérgicos foram analisadas através do teste estatístico Análise de Variância (ANOVA) com dois critérios, seguidas pelo teste de Bonferroni para múltiplas comparações. O teste estatístico ANOVA com um critério (pós-teste de Tukey) foi utilizado na análise do teste comportamental de apomorfina e na contagem de células marcadas com Nissl. Os valores estão expressos como média \pm erro padrão, sendo que alguns dados foram apresentados em percentual com comparação do mesmo animal. A significância estatística foi definida como $p \leq 0.05$.

4 RESULTADOS

4.1 Rotação induzida por apomorfina

Os grupos 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/mogno apresentaram rotação induzida por apomorfina, durante 20 minutos, com média de $141,4 \pm 15,5$ e $167,0 \pm 22,7$, respectivamente ($P < 0,0001$, quando comparado com os grupos que foram injetados com veículo) (FIGURA 21). O grupo 6-OHDA/mogno obteve a maior média de rotação ($8,35 \pm 1,13/\text{minuto}$), indicando um déficit dopaminérgico funcional no estriado ipsilateral à injeção.

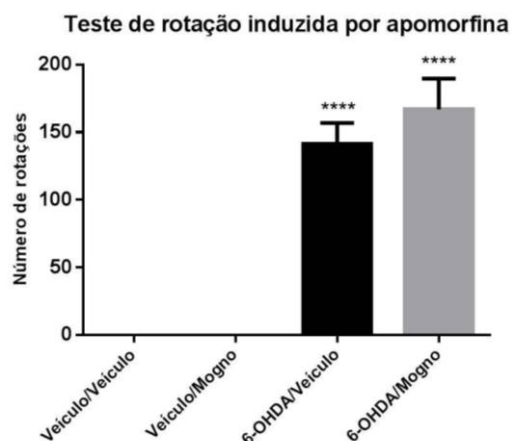


Figura 21 – Rotação contralateral induzida por apomorfina no dia 7. Os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram valores significantes quando comparados com os grupos veículos-injetados ($****P < 0,0001$). Os grupos veículo/veículo e veículo/mogno não apresentaram rotação.

4.2 Análise estereológica dos neurônios dopaminérgicos na substância negra

A análise estereológica foi realizada através da contagem de células imunomarcadas com tirosina hidroxilase em secções contendo a substância negra *pars compacta* (SNpc). A neurodegeneração dos grupos injetados com 6-OHDA era evidente em baixa magnificação

(FIGURAS 22 e 23).

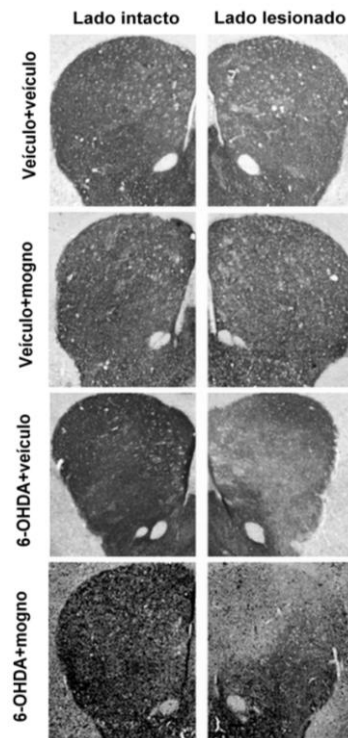


Figura 22 – Densidade das fibras tirosina hidroxilase positivas no estriado.

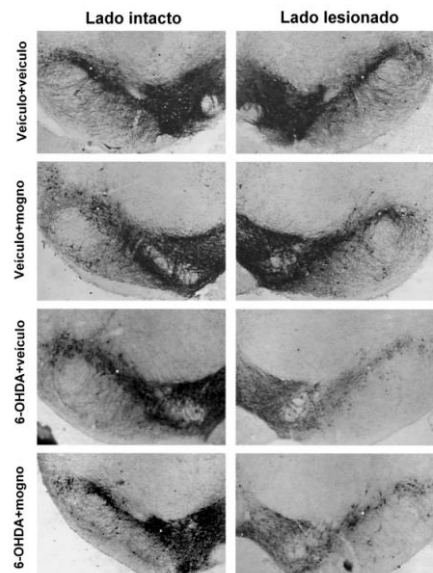


Figura 23 – Mesencéfalos imunomarcados com tirosina hidroxilase.

A contagem de neurônios dopaminérgicos na SNpc foi realizada no sentido rostro-caudal e aferida segundo duas estratégias: (1) contagem em seis secções, abrangendo toda a

SNpc; (2) contagem de três secções, que incluiu apenas a região mais central da SNpc. Na contagem estereológica com seis secções, todos os grupos apresentaram redução do número de neurônios dopaminérgicos na SNpc ipsilateral à injeção intraestriatal em comparação com a SNpc contralateral. No entanto, a degeneração de neurônios dopaminérgicos foi maior nos grupos injetados com 6-OHDA. Comparando-se os quatro grupos quanto ao número de neurônios dopaminérgicos na SNpc no lado injetado, apenas o grupo 6-OHDA/mogno teve uma redução significativa em relação aos grupos injetados com veículo (FIGURA 24). As médias percentuais de células tirosina hidroxilase positiva encontradas na SNpc lesionada foram: $82,4 \pm 3,8\%$ no grupo veículo/veículo ($P=0,0036$); $84,0 \pm 4,6\%$ no grupo veículo/mogno ($P=0,0078$); $57,0 \pm 3,9\%$ no grupo 6-OHDA/veículo ($P<0,0001$); e $49,0 \pm 4,7\%$ no grupo 6-OHDA/mogno ($P<0,0001$).

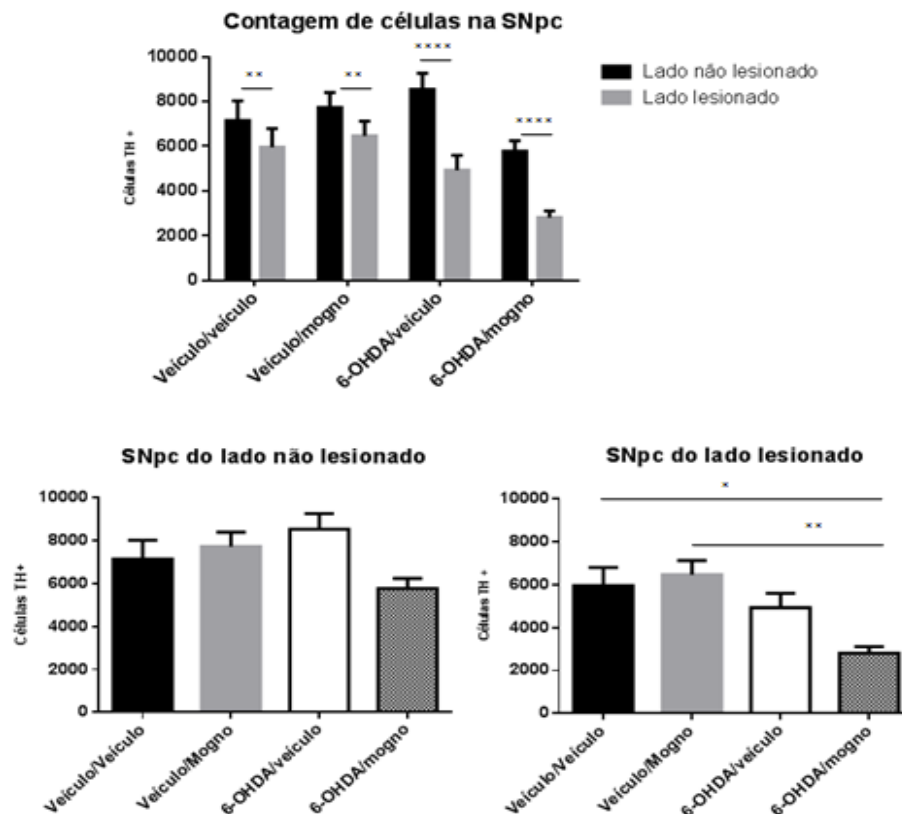


Figura 24 – Contagem estereológica com seis secções. Todos os grupos apresentaram diferença entre o lado não lesionado e o lado lesionado de cada animal (** $P<0,01$ **** $P<0,0001$). Sendo que, o lado não lesionado dos grupos não é diferente, mas o lado lesionado do grupo 6-OHDA/mogno é diferente do grupo veículo/veículo (* $P=0,0167$) e veículo/mogno (** $P=0,0054$).

Na análise estereológica com três secções, apenas o grupo veículo/veículo não possui diferença significativa entre o lado lesionado em relação ao lado não lesionado. Assim como na contagem com seis secções, apenas o lado lesionado do grupo 6-OHDA/mogno apresentou valores estatisticamente significantes em relação aos grupos injetados com veículo (FIGURA 25). A média percentual de células dopaminérgicas do lado lesionado em comparação com o lado não lesionado é de: $84,0 \pm 6,2\%$ no grupo veículo/veículo ($P=0,1167$), $80,4 \pm 2,2\%$ no grupo veículo/mogno ($P=0,0389$), $70,2 \pm 3,9\%$ no grupo 6-OHDA/veículo ($P=0,0016$) e $56,8 \pm 9,9\%$ no grupo 6-OHDA/mogno ($P<0,0001$) (FIGURA 26).

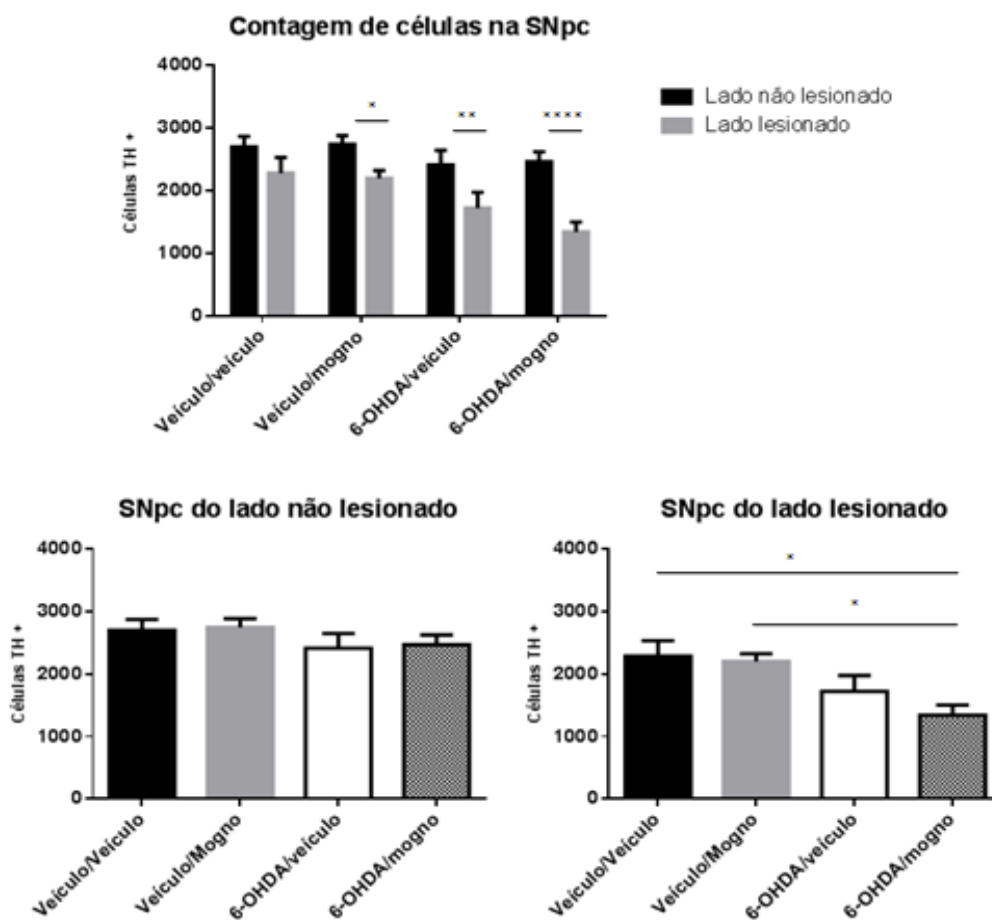


Figura 25 – Contagem estereológica com três secções. Apenas o grupo veículo/veículo não apresentou diferença significativa entre o lado não lesionado e o lado lesionado (veículo/mogno $*P=0,0257$, 6-OHDA/veículo $**P=0,0043$, 6-OHDA/mogno $****P<0,0001$). No lado lesionado, apenas o grupo 6-OHDA/mogno apresentou valores significantes, em comparação com os grupos veículo/veículo ($*P=0,0239$) e veículo/mogno ($*P=0,0415$).

Tabela 5 – Efeitos da *Swietenia macrophylla* na expressão da tirosina hidroxilase na substância negra *pars compacta* do modelo animal de DP induzido por 6-OHDA.

Grupo	Cirurgia/Tratamento	Lado não injetado/ Lado injetado (6 secções)	Lado não injetado/ Lado injetado (3 secções)
I	Veículo/veículo	7151 ± 879.8/5951 ± 848.2 **(P= 0.0095)	2697 ± 169.9/ 2280 ± 252.4
II	Veículo/mogno	7726 ± 675.7/6463 ± 658.9 **(P= 0.0064)	2740 ± 142.6/ 2199 ± 124.5 *(P= 0.0257)
III	6-OHDA/veículo	8549 ± 719.0/4931 ± 665.3 ****(P< 0.0001)	2411 ± 234.8/1723 ± 250.7 **(P= 0.0043)
IV	6-OHDA/mogno	5775 ± 467.0/2815 ± 297.9 ****(P< 0.0001)	2465 ± 157.5/ 1342 ± 159.9 ****(P< 0.0001)

Análise estereológica do lado não injetado

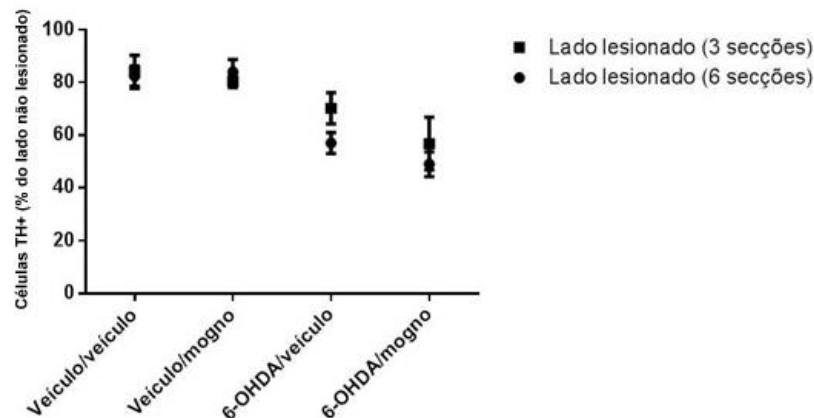


Figura 26 – Porcentagem de perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc do lado lesionado, na contagem de três e seis secções. O lado não lesionado foi utilizado como controle dos animais.

Tabela 6 – Porcentagem de neurônios dopaminérgicos encontrados na SNpc do lado lesionado

Grupo	Cirurgia/Tratamento	6 secções	3 secções
I	Veículo/veículo	82,4 ± 3,8	84,0 ± 6,2
II	Veículo/mogno	84,0 ± 4,6	80,4 ± 2,2
III	6-OHDA/veículo	57,0 ± 3,9	70,2 ± 5,8
IV	6-OHDA/mogno	49,0 ± 4,7	56,8 ± 9,9

4.3 Análise das células marcadas com Nissl no estriado lesionado

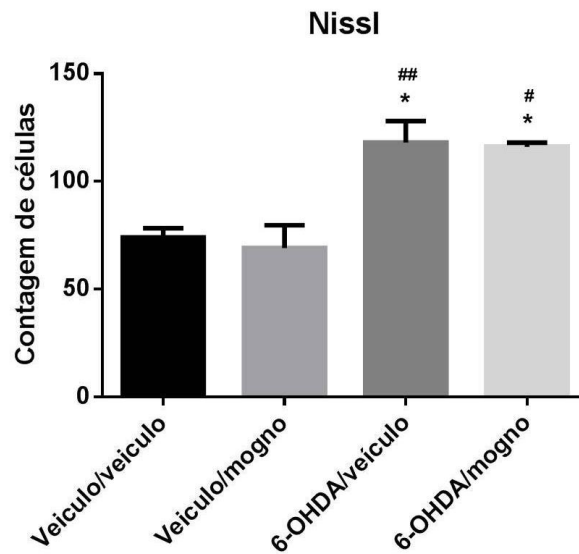


Figura 27 – Contagem de células marcadas com Nissl demonstra que os grupos com infusão de 6-OHDA apresentaram aumento da expressão de células nas proximidades da injeção, representando o infiltrado inflamatório (* $P < 0,05$ em comparação com o grupo veículo/veículo; # $P < 0,05$ em comparação com o grupo veículo/mogno; ## $P < 0,01$ em comparação com o grupo veículo/mogno)

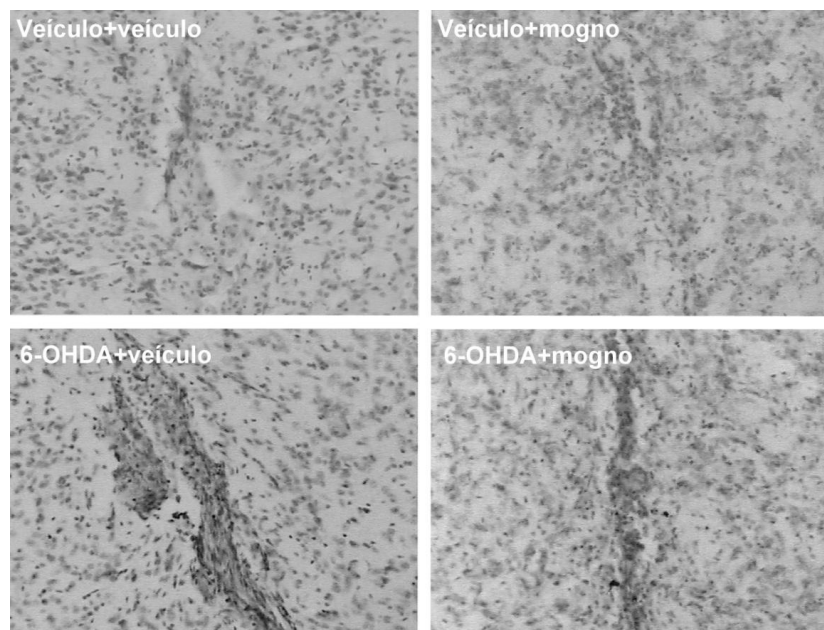


Figura 28 – Coloração com Nissl no estriado. Magnificação x10.

4.4 Teste de campo aberto

4.4.1 Ambulação

A ambulação foi aferida pelo número de linhas cruzadas no aparato do campo aberto, durante 5 minutos, antes da cirurgia e 7 dias após. Os grupos veículo/mogno, 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/mogno apresentaram diminuição significativa no número de cruzamento de linhas no 7º dia comparado ao dia 0. Todavia, apenas os grupos injetados com 6-OHDA apresentaram uma diminuição significativa no dia 7 em relação ao grupo veículo/veículo (FIGURA 29 e TABELA 7).

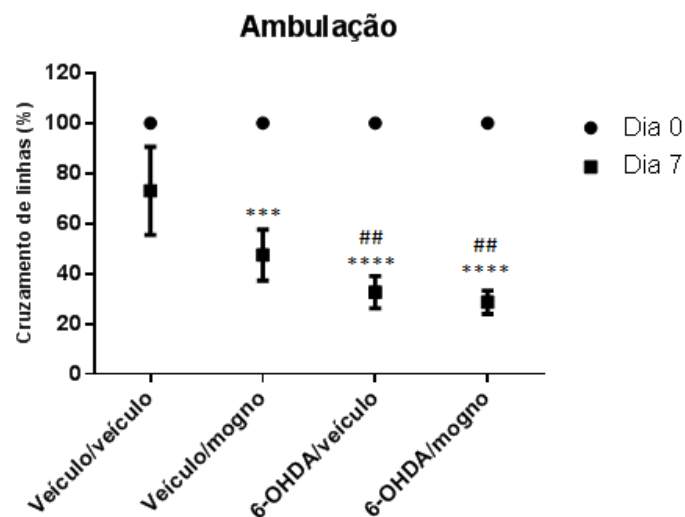


Figura 29 – Análise da ambulação. Os animais do grupo veículo/mogno, 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/mogno apresentaram diminuição estatisticamente significativa no dia 7 em comparação com o dia 0 ($***P=0,0007$, $****P<0,0001$, $****P<0,0001$, respectivamente). Na comparação entre os grupos, houve diferença significativa na ambulação do 7º dia nos grupos veículo/veículo *versus* 6-OHDA/veículo ($## P=0,0046$) e veículo/veículo *versus* 6-OHDA/mogno ($## P=0,0046$).

Tabela 7 – Teste de campo aberto: média de cruzamento de linhas

Grupo	Cirurgia/Tratamento	Dia 0	Dia 7
I	Veículo/veículo	130,4 ± 18,2	85,8 ± 11,1
II	Veículo/mogno	131,2 ± 16,8	58,4 ± 7,3
III	6-OHDA/veículo	123,8 ± 12,3	39,0 ± 8,6 *
IV	6-OHDA/mogno	91,0 ± 6,4	25,8 ± 4,6 **

(* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado com o grupo veículo/veículo)

4.4.2 Bipedestação

Todos os grupos tiveram um decréscimo na bipedestação com apoio no 7º dia (FIGURA 30 e TABELA 8). Na bipedestação sem apoio, apenas o grupo 6-OHDA/mogno apresentou uma redução significativa no dia 7 ($15,0 \pm 9,3\%$) em comparação com o dia 0 (FIGURA 31 e TABELA 9).

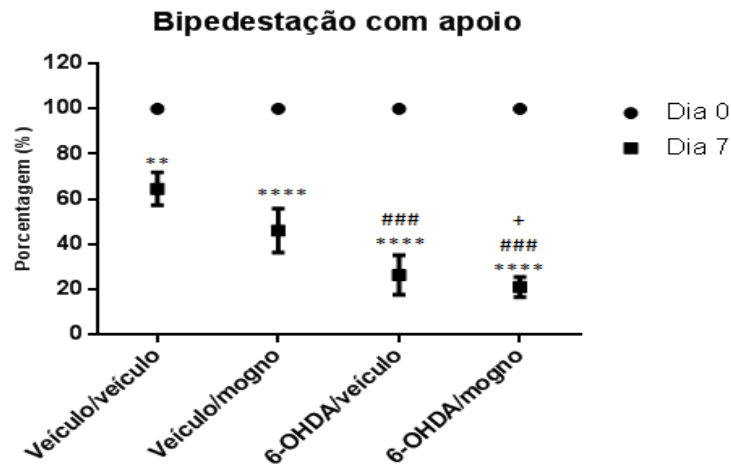


Figura 30 – Bipedestação com apoio. Todos os animais tiveram uma redução de bipedestação com apoio no 7º dia (** $P=0,0013$, **** $P < 0,0001$). No dia 7, os grupos 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/mogno apresentaram diferença significativa em relação ao grupo veículo/veículo (#### $P=0,0002$, ##### $P < 0,0001$). Além disso, verificou-se redução no grupo 6-OHDA/mogno *versus* veículo/mogno ($^+P=0,0183$).

Tabela 8 – Número de bipedestação com apoio

Grupo	Cirurgia/Tratamento	Dia 0	Dia 7
I	Veículo/veículo	44,8 ± 3,5	28,8 ± 3,8 *
II	Veículo/mogno	42,2 ± 4,6	18,4 ± 3,6 ***
III	6-OHDA/veículo	31,2 ± 4,3	7,4 ± 2,0 ***
IV	6-OHDA/mogno	28,6 ± 2,6	5,8 ± 1,2 ***

(* $P < 0,05$, *** $P < 0,001$ comparado o dia 0 com o dia 7, de cada grupo)

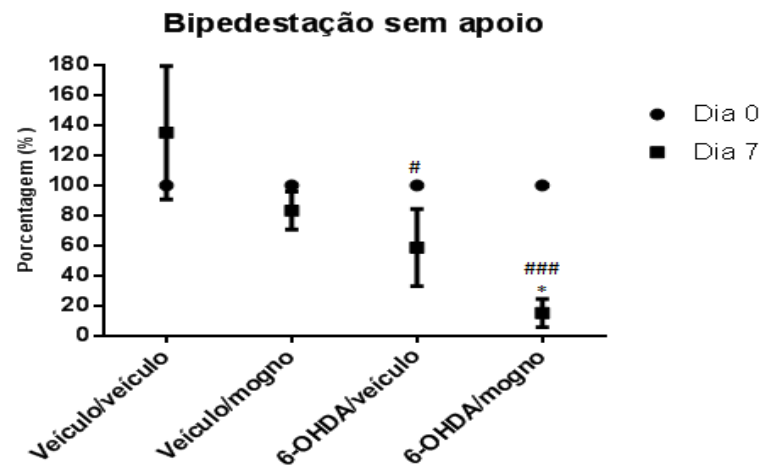


Figura 31 – Bipedestação sem apoio. O grupo veículo/veículo apresentou aumento na bipedestação sem apoio ($135,0 \pm 44,35\%$) no 7º dia, mas os valores não foram significantes. Apenas o grupo 6-OHDA/mogno obteve valores significantes na comparação do dia 7 com o dia 0 (* $P = 0,0237$). Os grupos 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/mogno apresentaram redução da bipedestação sem apoio no 7º dia em comparação com o grupo veículo/veículo (# $P = 0,0454$, ### $P < 0,0005$, respectivamente).

Tabela 9 – Número de bipedestação sem apoio

Grupo	Cirurgia/Tratamento	Dia 0	Dia 7
I	Veículo/veículo	16,2 ± 5,4	16,0 ± 4,8
II	Veículo/mogno	15,0 ± 2,1	12,2 ± 2,0
III	6-OHDA/veículo	9,4 ± 1,5	4,4 ± 1,5
IV	6-OHDA/mogno	15,4 ± 1,7	2,6 ± 1,5*

(* $P < 0,05$, comparado o dia 0 com o dia 7, de cada grupo)

4.4.3 Limpeza, micção e defecação

O grupo veículo/mogno foi o único que teve diferença estatística no parâmetro limpeza entre o dia 0 e o dia 7 ($3,4 \pm 1,4$; $15,2 \pm 4,4$, respectivamente) e, em comparação com o grupo 6-OHDA/veículo ($P < 0,05$) (FIGURA 32 e TABELA 10). Não houve diferença significativa na micção (FIGURA 33 e TABELA 11) e defecação (FIGURA 34 e TABELA 12) dos animais.

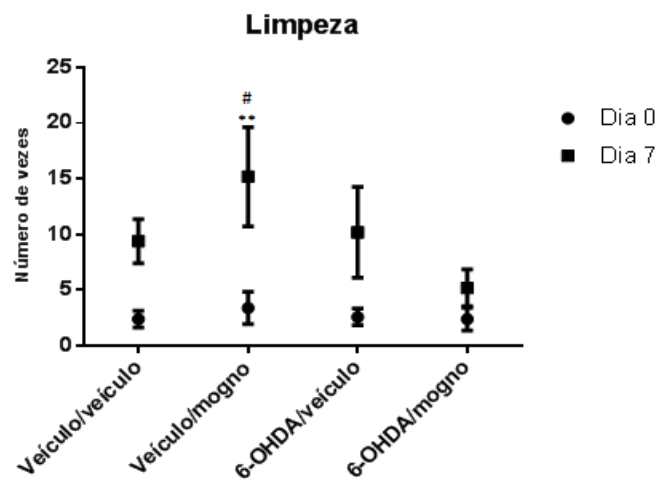


Figura 32 – O parâmetro comportamental de limpeza estava aumentado no 7º dia. Porém, foi verificado valores significantes apenas no grupo veículo/mogno (dia 0 vs dia 7 $**P=0,0054$, 6-OHDA/mogno vs veículo/mogno $\#P=0,0397$).

Tabela 10 – Limpeza dos animais no teste de campo aberto

Grupo	Cirurgia/Tratamento	Dia 0	Dia 7
I	Veículo/veículo	$2,4 \pm 0,7$	$9,4 \pm 1,9$
II	Veículo/mogno	$3,4 \pm 1,4$	$15,2 \pm 4,4$ **
III	6-OHDA/veículo	$2,6 \pm 0,7$	$10,2 \pm 4,0$
IV	6-OHDA/mogno	$2,4 \pm 1,0$	$5,2 \pm 1,6$

(** $P < 0,01$, comparado o dia 0 com o dia 7, de cada grupo)

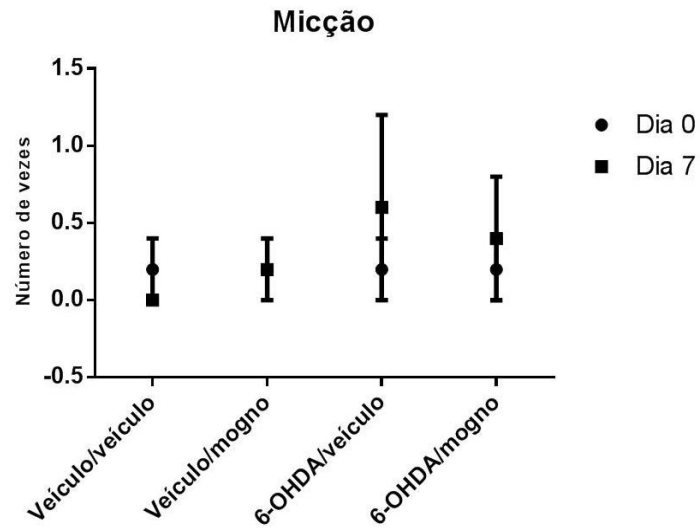


Figura 33 – Análise da micção dos animais antes e 7 dias após a cirurgia.

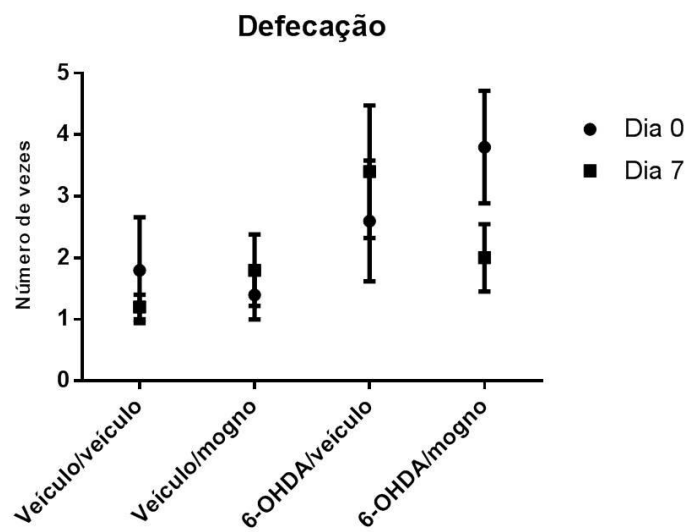


Figura 34 – Análise da defecação dos animais antes e 7 dias após a cirurgia.

5 DISCUSSÃO

5.1 Modelo da 6-OHDA e terapias antioxidantes

O modelo de doença de Parkinson com lesão pela 6-hidroxidopamina é conceituado na comunidade científica como um modelo experimental para indução de degeneração de neurônios dopaminérgicos. Através desse modelo pode-se quantificar a perda de neurônios dopaminérgicos, avaliar o comportamento dos animais e investigar a ação de novas terapias. A DP ainda não possui etiologia conhecida e o tratamento dos pacientes apenas promove alívio dos sintomas, com isso, o curso progressivo da patologia não é inibido ou atenuado. A busca por terapias que promovam a prevenção e inibição da neurodegeneração de células dopaminérgicas na DP tem como alvo os eventos moleculares que ocorrem no encéfalo dos portadores da DP. O estresse oxidativo é um desses efeitos moleculares e que consegue ser reproduzido no modelo de DP com 6-hidroxidopamina, visto que essa neurotoxina é considerada um composto autooxidável, sendo capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (Dauer e Przedborski, 2003; Faust et al., 2009).

Na literatura, vários estudos investigaram a ação de antioxidantes no tratamento da DP (Datla et al., 2007; Hu et al., 2011; Sengupta et al., 2011; Somayajulu-nitu et al., 2009). Nas terapias antioxidantes, as plantas possuem um papel importante já que podem fornecer princípios ativos para novos medicamentos. A exemplo disso, o pré-tratamento com extratos de plantas ricas em flavonoides em modelo de DP com 6-OHDA em ratos indicou que os extratos da casca de tangerina ($P < 0,05$), cocoa-2 ($P < 0,02$) e trevo vermelho ($P < 0,05$) atenuaram a perda de neurônios dopaminérgicos induzidos por 6-OHDA. Estudo *in vitro* demonstrou que o tratamento com extrato aquoso de ginseng (*Panax ginseng* C.A Meyer) aumentou a viabilidade celular, reduziu a porcentagem de células apoptóticas e preveniu a deterioração morfológica das células induzidos por exposição de MPP⁺ (500 μ M) em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Hu et al., 2011). Entretanto, o pré-tratamento com extratos ricos em catequinas de semente de uva (vermelha ou branca) e cocoa-1 não obtiveram efeito neuroprotetor em modelo de DP com 6-OHDA (Datla et al., 2007).

Estudo recente revelou que o extrato aquoso de folhas de *Swietenia macrophylla*

(mogno) possui elevada capacidade antioxidante e presença de ácidos fenólicos e flavonoides (Sá, 2010), tornando-o muito interessante para a investigação de possíveis propriedades citoprotetoras. De fato, estudos prévios mostraram que o pré-tratamento em regime subcrônico com extrato aquoso de mogno (10, 50 e 100 µg/ml) em culturas mistas de cerebelo expostas a metilmercúrio (MeHg) aumentou a viabilidade celular em relação ao grupo tratado apenas com MeHg (Lopes, 2009). Em experimentos utilizando o pós-tratamento com extrato de mogno, a concentração de 50 µg/ml também aumentou a viabilidade celular em culturas expostas ao MeHg, desta forma, atenuando os efeitos citotóxicos desencadeados pelo MeHg ($P < 0,01$ em relação ao grupo exposto a MeHg) (Lopes, 2009).

Em resumo, o extrato aquoso de mogno apresentou efeitos citoprotetores em modelo de culturas celulares cerebelares (Lopes, 2009). Por outro lado, o estudo com culturas primárias mistas de mesencéfalo expostas à rotenona (40 nM) e ao extrato aquoso de folhas de mogno (20 µg/ml), por sete dias, mostrou-se mais tóxica do que as culturas que foram expostas apenas à rotenona (40nM), com valores de morte celular de $26,16 \pm 3,90\%$ e $19,98 \pm 2,49\%$, respectivamente (Martins-Filho, 2011).

Nós utilizamos o modelo de hemiparkinsonismo com infusão intraestriatal de 6-OHDA (10µg) no estriado para testar o potencial neuroprotetor do extrato de mogno *in vivo*. A quantificação dos neurônios dopaminérgicos foi feita através estudo estereológico com três e seis secções contendo SNpc. Os resultados mostraram que: (1) não houve diferença entre o lado intacto dos grupos, (2) o grupo 6-OHDA/mogno foi o único que apresentou perda estatisticamente significativa do lado lesionado em relação aos grupos veículo/veículo e veículo/mogno. Esses dados foram confirmados através do cálculo da porcentagem do lado lesionado, tendo o lado intacto como controle, onde os percentuais não apresentam diferenças estatísticas entre as estratégias distintas de contagem, com três ou seis secções. Portanto, nas condições utilizadas e analisadas, o extrato aquoso de mogno não forneceu neuroproteção em modelo *in vivo* de DP, e ao contrário, potencializou o efeito neurotóxico da 6-OHDA. Não sabemos qual o mecanismo envolvido nesse feito, mas a análise do infiltrado inflamatório no sítio da lesão indica que não houve contribuição de qualquer efeito anti- ou pró-inflamatório do extrato de mogno, visto que a exposição ao mesmo não modificou a intensidade da reação nas proximidades da injeção quando comparado com o grupo 6-OHDA/veículo.

5.2 Perda neuronal na substância negra

A substância negra de humanos com 80 anos de idade contém cerca de 550.000 neurônios pigmentados e 250.000 neurônios não pigmentados. A análise estereológica da substância negra de sete pacientes com DP encontrou uma redução de 66% de neurônios pigmentados e de 24% de neurônios não pigmentados (Pakkenberg et al., 1991). No nosso estudo, a perda neuronal dopaminérgica variou de 16 a 20% para os animais injetados intraestriatalmente com veículo, e de 43 a 51% para os animais lesionados com 6-OHDA, dependendo do tipo de tratamento e do número de secções contadas. Na literatura, os modelos com lesão intraestriatal unilateral de 6-OHDA apresentam um valor percentual de degeneração dopaminérgica na SN de 27 a 80% (Deumens et al, 2002), variando de acordo com o local de lesão, da dose da toxina, do tempo de sobrevivência dos animais, do método de contagem e da variabilidade genética dos animais (Deumens et al., 2002; Healy-Stoffel et al., 2012; Kirik et al., 1998).

Kirik e colaboradores (1998) contaram duas secções da parte central da SN de ratos e não encontraram diferenças significantes entre o lado intacto e o lado lesionado dos animais injetado com veículo, todavia, a injeção intraestriatal unilateral de 20 µg de 6-OHDA (grupos com 1, 2 ou 3 aplicações) promoveu redução de aproximadamente 50% nos neurônios tirosina hidroxilase-positivos na substância negra (incluindo *pars reticulata e lateralis*). Os nossos resultados da contagem com três secções, apresentam resultados semelhantes, onde não há diferença significativa entre o lado intacto e o lado lesionado no grupo veículo/veículo. Além disso, o percentual de perda neuronal dopaminérgica na SNpc foi de aproximadamente 30% no grupo 6-OHDA/veículo e de 44% no grupo 6-OHDA/mogno.

Na contagem da SNpc com seis secções, todos os grupos apresentaram diferenças entre o lado intacto e o lado injetado, sendo que os grupos lesionados com 6-OHDA apresentam a maior significância estatística ($P < 0,0001$). Healy-Stoffel e colaboradores (2012) realizaram um estudo estereológico com a contagem de seis secções de SNpc, em modelo de DP com 6-OHDA (12,5 µg) em ratos (14 dias de sobrevivência), e verificaram diminuição de 54% de neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH+) no lado injetado. No nosso estudo, o percentual de neurônios encontrado no lado lesionado foi de $57,0 \pm 3,9\%$ no grupo 6-OHDA/veículo e $49,0 \pm 4,7\%$ no grupo 6-OHDA/mogno após 7 dias de sobrevivência.

5.3 Avaliação comportamental

O teste comportamental de rotação induzida por agonistas dopaminérgicos é um método frequentemente utilizado nos modelos de hemiparkinsonismo e tem como objetivo avaliar a magnitude da lesão nigroestriatal (Deumens et al., 2002; Tieu, 2011). A apomorfina é um agonista dopaminérgico pós-sináptico que induz a rotação contralateral à lesão e seu efeito está correlacionado principalmente com a diminuição dos níveis de dopamina no estriado e com a redução do número de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) (Deumens et al., 2002).

De acordo com Deumens e colaboradores (2002), para os animais apresentarem rotação induzida por apomorfina é necessário que haja uma lesão extensa no estriado (perda de 90% da densidade de fibras dopaminérgicas) e na SN (perda de 50% dos neurônios dopaminérgicos). Em concordância, os nossos resultados demonstraram que os animais injetados com 6-OHDA obtiveram uma diminuição de aproximadamente 43-51% número de neurônios dopaminérgicos na SNpc e apresentaram comportamento rotacional induzido por apomorfina ($P < 0,0001$ quando comparado com os animais injetado com veículo).

Na análise comportamental do teste de campo aberto, os grupos veículo/mogno, 6-OHDA/veículo e 6-OHDA/mogno apresentaram diminuição significativa na ambulação do 7º dia em comparação com o dia 0. Além disso, os animais lesionados com 6-OHDA (10 µg) e tratados com extrato aquoso de mogno (0,5mg/kg/dia) apresentaram o maior decréscimo na bipedestação com apoio e reduziram em 85% a bipedestação sem apoio no 7º dia. Nenhum grupo apresentou alterações significativas na micção e defecação.

Estudo recente demonstrou que o extrato metanólico aquoso de semente de *Hyoscyamus niger* (125, 250 e 500 mg/kg), uma planta com propriedades antioxidantes (quercetina, rutina e kaempferol), conseguiu reverter o quadro de acinesia, catalepsia e déficit de natação de animais lesionados com MPTP (2 x 30 mg/kg, intraperitoneal) (Sengupta et al., 2011). Todavia, os nossos dados revelaram uma hipoatividade acentuada no grupo 6-OHDA/mogno, demonstrando que o extrato de mogno promoveu piora no quadro motor dos animais com DP.

6 CONCLUSÃO

O nosso estudo demonstrou que, no modelo de hemiparkinsonismo com infusão intraestriatal de 6-hidroxi-dopamina, o extrato aquoso de *Swietenia macrophylla* (mogno), na concentração utilizada e nas condições testadas, potencializou a degeneração das células dopaminérgicas da substância negra *pars compacta* e acentuou a redução da atividade motora dos animais.

REFERÊNCIAS

1. Andersen, ML et al. (2004). Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: Cromosete Gráfica e Editora, 179.
2. Betarbet, R et al. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, vol 3, n. 12, 1301-1306.
3. Blandini, F; Armentero, MT; Martignoni, E (2008). The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism and Related Disorders* 14, 124-129.
4. Carvalho, PER (2007). Mogno *Swietenia macrophylla*. Embrapa - Circular Técnica 140, ISSN 1517-5278, 1-12.
5. Cenci, MA; Konradi, C (2010). Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Prog Brain Res* 183, 209-233.
6. Cenci, MA; Lundblad, M (2006). Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of Neurochemistry* 99, 381-392.
7. Chimeli, AB; Boyd, RG (2009). A ilegalidade do mercado e a oferta do mogno brasileiro. Programa de Pós-graduação em economia aplicada – FE/UFJF.
8. Cleren, C; Calingasan, NY; Chen, J; Beal, MF (2005). Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry* 94, 995-1004.
9. Datla, KP et al. (2007). Short-term supplementation with plant extracts rich in flavonoids protect nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of the American College of Nutrition*, vol. 26, nº 4, 341-349.

10. Dauer, W; Przedborski, S (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, vol. 39, 889-909.
11. Deumens, R; Blokland, A; Prickaerts, J (2002). Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesion of the nigrostriatal pathway. *Experimental Neurology* 175, 303-317.
12. Falah, S; Suzuki, T; Katayama, T (2008). Chemical constituents from *Swietenia macrophylla* bark and their antioxidant activity. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11(16), 2007-2012.
13. Farooqui, T; Farooqui, AA (2011). Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, doi:10.4061/2011/247467.
14. Faust, K; Gehrke, S; Yang, Yufeng; Yang, L; Beal, MF; Lu, B (2009). Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *BMC Neuroscience* 10:109.
15. Goetz, CG (2007). Early Iconography of Parkinson's Disease. In: Pahwa R; Lyons, KE. *Handbook of Parkinson's disease*. 4 ed. New York, 1-18.
16. Goetz, CG (2011). The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 1:a008862.
17. Halliwell, B (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *Journal of Neurochemistry* 97, 1634-1658.
18. Healy-Stoffel, M; Ahmad, SO; Stanford, JA; Levant, B (2012). A novel use of combined tyrosine hydroxylase and silver nucleolar staining to determine the effects of

a unilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra: A stereological study. *Journal of Neuroscience Methods*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.07.013>.

19. Henry, V et al. (2009). Kinetics of Microglial Activation and Degeneration of Dopamine-Containing Neurons in a Rat Model of Parkinson Disease Induced by 6-Hydroxydopamine. *J Neuropathol Exp Neurol*. Vol. 68, No. 10, 1092-1102.
20. Hirsch, EC (2006). How to judge animal models of Parkinson's disease in terms of neuroprotection. *J Neural Transm [Suppl]* 70: 255–260
21. Jardim, ICSF; Andrade, JA (2009). Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. *Quim. Nova*, vol. 32, n.4, 996-1012
22. Kirik, D; Rosenblad, c; Bjorklund, A (1998). Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. *Experimental neurology*; 152; 259-77.
23. Klein, C; Westenberger, A (2012). Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 2:a008888.
24. Kojima, K; Isaka, K; Ogihara, Y (1998). Tetranortriterpenoids from *Swietenia macrophylla*. *Chem. Pharm. Bull.* 46(3), 523-525.
25. Langston, JW (2006). The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. *Annals of Neurology*. Vol. 59, n.4, 591-96.
26. Lau, LML; Breteler, MMB (2006). Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*; 5; 525-35.

27. Lopes, DCF (2009). Efeitos citoprotetores do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo *in vitro* de exposição mercurial. Universidade Federal do Pará (Dissertação de mestrado).
28. Marsden, CD (1992). Parkinson's disease. *Postgrad Med* 68, 538-543.
29. Martins-Filho, AJ (2011). Modelo *in vitro* de parkinsonismo experimental induzido por rotenona: investigação de mecanismos de ação, neuroproteção e morte celular. Universidade Federal do Pará (Tese de doutorado).
30. Massano, J; Bhatia, KP (2012). Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harb Perspect Med*.
31. McCormack, AL; Atienza, JG; Johnston, LC; Andersen, JK; Vu, S; Di Monte, DA (2005). Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Journal of Neurochemistry* 93: 1030-1037.
32. Melo, A; Monteiro, L; Lima, RMF; de Oliveira, DM; de Cerqueira, MD; El-Bachá, RS (2011). Oxidative stress in neurogenerative diseases: mechanism and therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity*, doi:10.1155/2011/467180.
33. Organização Mundial da Saúde (2009). The WHO recommended classification of pesticide by hazard and guidelines to classification. *WHO Library Cataloguing*, 76.
34. Pakkenberg, B; Moller, A; Gundersen, HJG; Mouritzen Dam, A; Pakkenberg, B (1991). The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 54, 30-33.
35. Patel, VP; Chu, CT (2011). Nuclear transport, oxidative stress, and neurodegeneration. *Inj J Clin Exp Pathol*; 4 (3): 215-229.

36. Sá, PRC (2010). Avaliação do efeito citoprotetor e da capacidade antioxidante do extrato aquoso de folhas de *Swietenia macrophylla* e identificação de ácidos fenólicos e flavonoides por HPLC-DAD e LC-MS/MS. Universidade Federal do Pará (Dissertação de mestrado).
37. Salama, M; Arias-Carrión, O (2011). Natural toxins implicated in the development of Parkinson's disease. *Ther Adv Neurol Disord*; 4(6); 361-73.
38. Schapira, AHV (2010). Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. *Experimental Neurology* 224, 331-335.
39. Sengupta, T et al. (2011). Antiparkinsonian effects of aqueous methanolic extract of *Hyoscyamus niger* seeds result from its monoamine oxidase inhibitory and hydroxyl radical scavenging potency. *Neurochem Res* 36, 177-186.
40. Shukla, V; Mishra, SK; Pant, HC (2011). Oxidative stress in neurodegeneration. *Advances in Pharmacological Sciences*. doi:10.1155/2011/572634.
41. Sies, H; Stahl, W (1995). Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62(suppl):1315-1321.
42. Somayajulu-Nitu, M; Sandhu, JK; Cohen, J; Sikorska, M; Sridhar, TS; Matei, A; Borowy-Borowski, H; Pandey, S (2009). Paraquat induces oxidative stress, neuronal loss in substantia nigra region and Parkinsonism in adult rats: Neuroprotection and amelioration of symptoms by water-soluble formulation of Coenzyme Q₁₀. *BMC Neuroscience*; 10:88.
43. Sun, AY; Wang, Q; Simonyi, A; Sun, GY (2008). Botanical phenolics and brain health. *Neuromolecular Med* 10(4), 259-274.

44. Teive, HAG (1998). O papel de Charcot na Doença de Parkinson. Arq. Neuro-Psiquiatr. Vol.56 n.1 São Paulo.
45. Tieu, K (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine; 1:a009316.