



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

Natália Pontes Lima

Caracterização dos efeitos do extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* em modelo experimental de doença de Parkinson.

BELÉM/PARÁ

2014

**Natália Pontes Lima**

**Caracterização dos efeitos do extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* em modelo experimental de doença de Parkinson.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como pré-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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elizabeth Sumi Yamada.

**BELÉM  
2014**

Lima, Natália Pontes, 1988-

Caracterização dos efeitos do extrato de  
folhas de *Swietenia macrophylla* em modelo  
experimental de doença de Parkinson / Natália  
Pontes Lima. - 2014.

Orientador: José Luiz Martins do  
Nascimento;

Coorientadora: Elizabeth Sumi Yamada.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do  
Pará, Instituto de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e  
Biologia Celular, Belém, 2014.

1. Parkinson, Doença de Tratamento. 2. Mogno  
Análise. 3. Antioxidantes. 4. Plantas Análise.  
5. Modelos animais em pesquisa. I. Título.

CDD 22. ed. 616.833

**Caracterização dos efeitos do extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* em modelo experimental de doença de Parkinson.**

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 pela comissão julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.Dr. Arnaldo Jorge Martins Filho  
Instituto Evandro Chagas

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gilmara de Nazareth Tavares Bastos  
Laboratório de Neuroinflamação Molecular e Celular – ICB/UFPA

A Deus que me ilumina em todos os momentos e  
aos meus pais que são a minha base.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Ana Rosa e João Luiz que são os grandes responsáveis por esta conquista, que em momento algum mediram esforços para me ajudarem. Amo vocês!

As minhas irmãs Raíssa e Isabela por serem pacientes nos momentos de estresse.

Ao meu namorado Affonso por ser meu companheiro, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e sempre dizendo que tudo daria certo. Te amo !

A todos os meus familiares (tios, tias, avós, primos, primas e a minha madrinha Ângela) por estarem sempre torcendo por mim e sempre disponíveis para ajudar.

A professora Elizabeth Yamada pela dedicação, pelo apoio e pela paciência nesses sete anos de parceria e orientação.

Ao professor José Luiz Martins do Nascimento pelo apoio e orientação.

A todos os amigos de Belém (Ideal, Cesupa e Ana Paula) e de São Paulo (aprimoramento, em especial Mariana e Aline) pelo carinho, pelos momentos de lazer e por torcerem pelo meu sucesso.

A Renata Machado pela amizade e pela disponibilidade em me ajudar com as figuras do trabalho.

A Solimar pelo grande companheirismo.

As grandes amigas que encontrei no LANEX (Luciana, Gabriela e Daniela) pelos momentos de aprendizagem e apoio mútuo.

Aos alunos de iniciação científica Anderson e Riky pela ajuda.

Ao Professor Milton Nascimento da Silva pelo fornecimento do extrato de mogno.

Aos professores Arnaldo Filho e Gilmara Bastos por aceitarem o convite para fazerem parte da banca.

A todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram para a realização deste sonho, meu muito obrigado.

O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas serem o que são.

**Aristóteles**

## RESUMO

Estudos prévios indicam que o extrato de folhas de mogno *Swietenia macrophylla* possui composição química rica em substâncias antioxidantes com efeito neuroprotetor em cultura. Um dos principais mecanismos envolvidos na neurodegeneração da Doença de Parkinson (DP) é o estresse oxidativo. Portanto, substâncias antioxidantes são candidatas potenciais para terapias que retardem o processo neurodegenerativo da doença. Este estudo tem por objetivo caracterizar os efeitos do extrato de folhas de mogno frente à degeneração nigroestriatal e alterações comportamentais de camundongos expostos a uma única injeção intraestriatal de 6-OHDA unilateralmente. Foram utilizados camundongos machos, os quais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a injeção de 20 µg de 6-OHDA no estriado esquerdo. Os animais foram subdivididos em 4 grupos, de acordo com a dose de extrato de mogno administrada. O extrato foi aplicado por via intraperitoneal nos 7 primeiros dias após a injeção de 6-OHDA nas doses de 0,0 (controle), 0,5 (G1), 1,0 (G2) e 5,0 mg/kg (G3). O grupo controle (GC) recebeu injeções de salina a 0,9% (veículo). Foi feita análise da ambulação no campo aberto antes, no 7º e no 21º dias e do número de rotações induzidas por apomorfina no 7º e no 21º dias após a cirurgia. Avaliação da neurodegeneração foi realizada através da contagem de neurônios dopaminérgicos TH+ na substância negra por estereologia. Como resultado, encontrou-se diferença estatisticamente significativa no 21º dia, onde os grupos G2 e G3 apresentaram redução no comportamento ambulatorio em relação aos grupos G1 e GC; estes dois últimos tiveram comportamento ambulatorio equivalente entre si. Em relação às rotações induzidas por apomorfina, no 21º dia, o G1 apresentou média de rotações significativamente menor do que os grupos GC, G2 e G3. Na contagem de células, G1 apresentou diminuição na perda dos neurônios dopaminérgicos estatisticamente significativa em relação ao controle. Assim, concluímos que o extrato de mogno na concentração de 0,5 mg/kg promoveu neuroproteção na neurodegeneração do sistema nigroestriatal induzida por 6-OHDA.

**Palavras-Chaves:** Parkinson, *Swietenia macrophylla*, Mogno, 6-Hidroxidopamina.



## ABSTRACT

Previous studies indicate that the leaf extract of *Swietenia macrophylla* has abundant antioxidants in its chemical composition with neuroprotective effects in culture. One of the main mechanisms involved in neurodegeneration of Parkinson's disease (PD) is oxidative stress. Therefore, antioxidants are potential candidates for therapies aiming to slow the neurodegenerative process of the disease. This study aims to characterize the effects of the *S. macrophylla* leaf extract regarding the nigrostriatal degeneration and behavioral changes in mice exposed to a single unilateral injection of 6-OHDA in the striatum. Male mice were used, which underwent stereotactic surgery and were injected 20 µg of 6-OHDA in the left striatum. The animals were divided into 4 groups according to the dose of mahogany extract administered. The extract was administered intraperitoneally in the first 7 days after injection of 6-OHDA at the doses of 0.0 (control) 0.5 (G1), 1.0 (G2) and 5.0 mg/kg (G3). The control group (CG) received 0.9% saline (vehicle). Ambulation analysis in the open field was performed before, on the 7th and 21th days post-surgery and the number of apomorphine-induced rotations, in the 7th and 21th days after surgery. Evaluation of the neurodegeneration was performed by counting TH+ dopaminergic neurons in the substantia nigra by stereology. As a result, we found a statistically significant difference at day 21, where G2 and G3 showed a reduction in the ambulatory behavior in relation to G1 and GC; the latter two groups showed equivalent behavior. by, At day 21, G1 had significantly lower average apomorphine-induced rotations than GC, G2 and G3. In cell counts, G1 presented statistically significant reduction of the dopaminergic neurons loss compared to control. Thus, we conclude that the leaf extract of *S. macrophylla* in the concentration of 0.5 mg/kg provided neuroprotection for the nigrostriatal system neurodegeneration induced by 6-OHDA.

**KeyWords:** Parkinson, *Swietenia macrophylla*, 6-hydroxydopamine.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Neuropatologia da Doença de Parkinson.....	14
Figura 2-	Vias dos Núcleos da Base no estado normal e no Parkinson.....	15
Figura 3-	Estrutura geral dos flavonoides.....	21
Figura 4-	Principais classes dos flavonoides.....	22
Figura 5-	Linha do tempo do tratamento e dos testes comportamentais.....	31
Figura 6-	Aparato do Campo Aberto.....	32
Figura 7-	Teste da Apomorfina.....	33
Figura 8-	Delimitação do estriado na estereologia.....	36
Figura 9-	Distribuição dos pontos a serem contados na estereologia.....	36
Figura 10-	Caixa de contagem demonstrando linhas de inclusão e as linhas de exclusão.....	37
Figura 11-	Teste do campo Aberto em GC.....	40
Figura 12-	Teste do Campo Aberto em G1.....	40
Figura 13-	Teste do Campo Aberto em G2.....	41
Figura 14-	Teste do Campo Aberto em G3.....	41
Figura 15-	Comparação do Teste do Campo Aberto entre Todos os Grupos.....	42
Figura 16-	Teste da Apomorfina no Grupo Controle.....	43
Figura 17-	Teste da Apomorfina em G1.....	44
Figura 18-	Teste da apomorfina em G2.....	44
Figura 19-	Teste da Apomorfina em G3.....	45
Figura 20-	Comparação do Teste da Apomorfina entre Todos os Grupos.....	46
Figura 21-	Fotomicrografias representativas do estriado.....	47
Figura 22-	Comparação entre os números de neurônios dopaminérgicos do lado injetado e do lado não-injetado de cada grupo.....	48

Figura 23-	Fotomicrografias representativas da SN.....	<b>49</b>
Figura 24-	Comparação intergrupo entre os números de neurônios dopaminérgicos do lado não-injetado.....	<b>51</b>
Figura 25-	Comparação intergrupo entre os números de neurônios dopaminérgicos do lado injetado.....	<b>51</b>
Figura 26-	Porcentagem da perda de neurônios dopaminérgicos em cada grupo.....	<b>52</b>
Figura 27-	Grafico de Correlação.....	<b>53</b>

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1.	EPIDEMIOLOGIA.....	12
1.2.	ETIOLOGIA.....	13
1.3.	FISIOPATOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	14
1.4.	MECANISMOS DE MORTE CELULAR NA DOENÇA DE PARKINSON.....	16
1.4.1.	<i>Disfunção Mitocondrial</i> .....	16
1.4.2.	<i>Agregação de Proteínas</i> .....	16
1.4.3.	<i>Inflamação</i> .....	17
1.4.4.	<i>Estresse Oxidativo</i> .....	17
1.4.5.	<i>Excito-toxicidade</i> .....	18
1.4.6.	<i>Apoptose</i> .....	18
1.5.	NEUROPROTEÇÃO.....	19
1.5.1.	<i>Potencial Neuroprotetor de Antioxidantes Naturais</i> .....	20
1.6.	<i>Swietenia macrphylla (Mogno)</i> .....	22
1.7.	MODELOS EXPERIMENTAIS.....	23
1.7.1.	<i>MPTP</i> .....	23
1.7.2.	<i>Rotenona</i> .....	24
1.7.3.	<i>Paraquat</i> .....	25
1.7.4.	<i>6-Hidroxidopamina</i> .....	26
1.8.	JUSTIFICATIVA.....	27
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	28
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1.	ANIMAIS.....	29
3.2.	DROGAS.....	29
3.3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30

3.3.1.	<i>Grupos Experimentais</i> .....	30
3.4.	TRATAMENTO COM MOGNO E SALINA.....	30
3.5.	AVALIAÇÃO MOTORA.....	31
3.5.1.	<i>Teste Do Campo Aberto</i> .....	31
3.5.2.	<i>Rotação Induzida por Apomorfina</i> .....	32
3.6.	CIRURGIA ESTEREOTAXICA.....	33
3.7.	PERFUSÃO E SECCIONAMENTO DOS ENCÉFALOS.....	34
3.8.	IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	34
3.9.	ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	35
3.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	TESTE DO CAMPO ABERTO.....	39
4.2.	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ROTATORIO INDUZIDO POR APOMORFINA.....	42
4.3.	ANÁLISE DA VIA NIGROESTRIATAL.....	46
4.3.1.	<i>Estriado</i> .....	46
4.3.2.	<i>Substância Negra</i> .....	46
<b>5.0.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
5.1.	<i>Swietenia macrophylla</i> .....	54
5.2.	ANÁLISE COMPORTAMENTAL: TESTE DO CAMPO ABERTO.....	55
5.3.	TESTE DA APOMORFINA E CONTAGEM DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA.....	57
5.4.	PRINCIPAIS ACHADOS DO TRABALHO.....	60
<b>6.0.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. EPIDEMIOLOGIA

A doença de Parkinson (DP) é uma das doenças degenerativas mais comuns do sistema nervoso. Estima-se que ela afeta cerca de 6 milhões de pessoas no mundo. (BOVÉ; PERIER, 2012). A DP afeta cerca de 1 a 2% da população acima de 65 anos de idade, sendo considerada o segundo distúrbio neurodegenerativo progressivo mais comum, estando atrás apenas do mal de Alzheimer (SUBRAMANIAN; CHESSELET, 2013).

Na Escócia a prevalência da doença é de 17,9/100.000 hab por ano, sendo em homens 21,1 e em mulheres 14,7, não sendo encontrado diferença na prevalência em relação a posição socioeconômica (CASLAKE *et al.*, 2013). Na Suécia a prevalência é de 19,7/100.000hab, no entanto não houve nenhuma diferença na incidência em relação ao sexo (LINDER; STENLUND; FORSGREN, 2010).

Na Rússia o tempo entre o primeiro sintoma e o diagnóstico da doença é de 8,4 meses. Os primeiros sintomas se desenvolveram em média 2 anos antes nas mulheres. A prevalência da DP foi de 9,95/100.000hab e aumentou continuamente com a idade, atingindo o seu máximo aos 70 anos (WIINTER *et.al.*, 2010).

Na Índia a incidência da DP é de 5,71/100.000 por ano, e a mortalidade alcança 2,89/100,000 por ano tendo como risco relativo o valor de 8,98 (DAS *et al.*, 2010).

A prevalência da DP em pacientes com idade maior que 55 anos é de 0,3, enquanto que em pacientes com idade maior que 85 anos a prevalência aumenta para 4,4, sendo o risco maior para o sexo masculino (LAU *et al.*, 2011).

Um estudo de meta-análise indicou que a mortalidade em pacientes com DP, independente das causas, é maior em 2,22 vezes em comparação com a população em geral (XU *et al.*, 2013).

No Brasil, não há estudos de prevalência e incidência da doença de Parkinson em grande escala, mas um estudo na comunidade de Bambuí (MG) relatou uma prevalência de 3,3% em pessoas acima de 64 anos (BARBOSA *et al.*, 2006).

## 1.2. ETIOLOGIA

A etiologia da DP ainda é desconhecida. Ela vem sendo considerada como uma desordem multifatorial causada pela combinação de vários fatores como a idade, a genética e fatores ambientais. Os principais fatores ambientais implicados são: o uso de pesticidas e herbicidas, químicos industriais, traumatismo craniano e fatores dietéticos (SULZER; SURMEIER, 2013).

A idade é considerada um grande fator de risco para o desenvolvimento e para a progressão da DP devido a mesma afetar muitos processos celulares que predispõem à degeneração como danos somáticos e falha nos mecanismos compensatórios (e.g. oxigenação mitocondrial, ubiquitinação e proteólise mediada por proteassomo), levando a uma aceleração da doença. Mudanças moleculares e celulares que ocorrem com o envelhecimento interagem com genes e fatores ambientais determinando assim a degeneração celular (HINDLE, 2010).

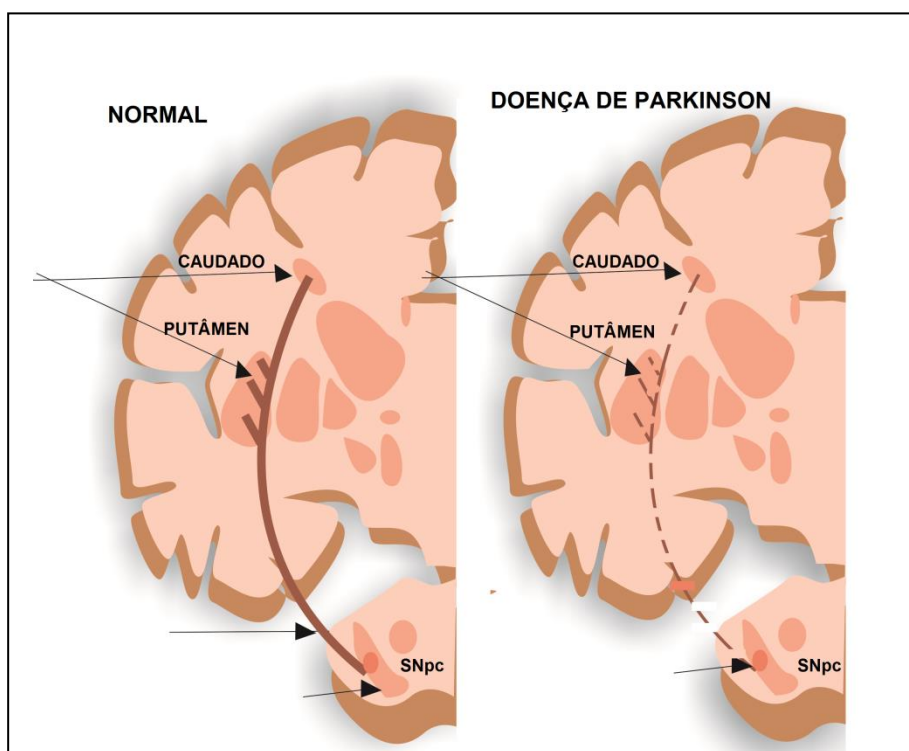
O envelhecimento também está associado com o aparecimento de disfunção mitocondrial, com o aumento na produção de radicais livres e aumento de estresse oxidativo, o que pode propiciar mutações no DNA (MIGLIORE; COPPEDÈ, 2009). Outras alterações associadas com o envelhecimento são uma diminuição na tirosina hidroxilase (TH) e dopamina no estriado, redução no número de neurônios pigmentados na substância negra (SN) e na densidade de receptores dopaminérgicos (RUDOW *et al.*, 2008), alterações essas que favorecem o aparecimento da DP.

A DP atribuída a alterações genéticas aparece em 5% a 10% dos parkinsonianos, e tem sido associada a diversos genes, dentre os quais destacam-se os genes dominantes que codificam as proteínas  $\alpha$ -sinucleína e LRRK2, e os genes recessivos que codificam as proteínas parkina, DJ-1 e PINK1 (JAIN *et al.*, 2005; OLANOW *et al.*, 2007). A mutação na  $\alpha$ -sinucleína seria responsável por gerar uma DP familiar responsiva a dopamina, com presença de corpos de Lewy, enquanto a mutação na parkina resultaria em DP sem a presença dos mesmos (HATTORI *et al.*, 2003).

### 1.3. FISIOPATOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO DA DOENÇA DE PARKINSON

A DP foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em Nova York no ano de 1817. A sua fisiopatologia decorre da perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta (SNpc), com a presença de inclusões proteináceas, citoplasmáticas e eosinofílicas chamadas de corpos de Lewy (THOMAS; BEAL, 2007).

Os neurônios dopaminérgicos que partem da SNpc vão em direção ao estriado, constituindo a via nigroestriatal (Figura 1). A degeneração desses neurônios causa uma alteração funcional e organizacional nos núcleos da base, os quais possuem papel na execução dos movimentos voluntários. Fazem parte dos núcleos da base o estriado (caudado e putamen), o globo pálido, a substância negra e o núcleo subtalâmico (BLANDINI *et al.*, 2000).



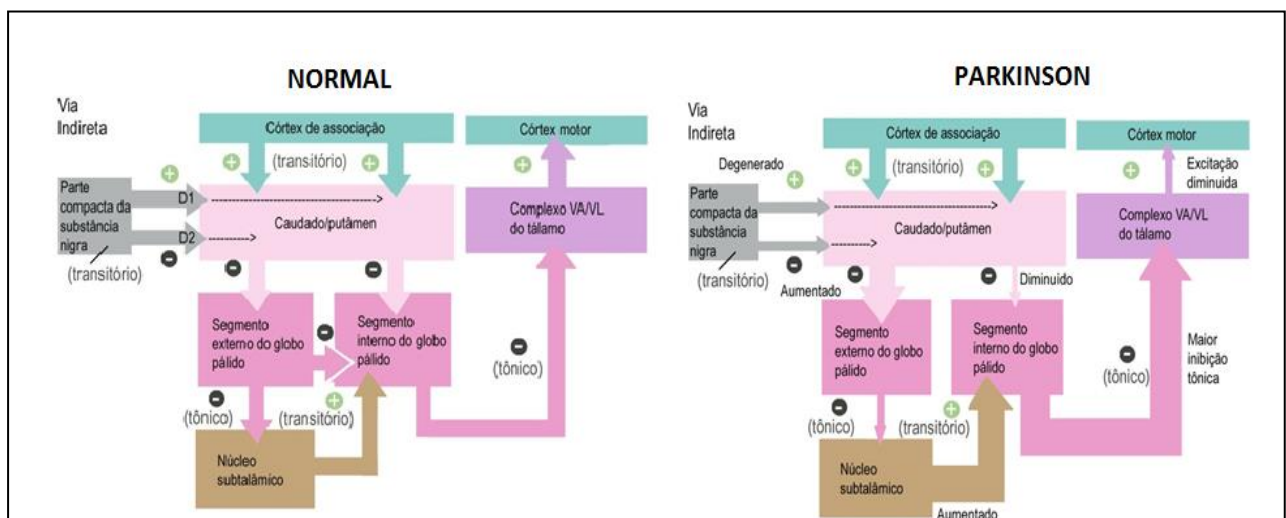
**Figura 1:** Neuropatologia da doença de Parkinson

**Fonte:** Adaptado de DAUER, W ; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, vol.39, p.889-909, 2003.



A aferência da parte compacta da substância negra ao estriado tem como função excitar os neurônios espinhosos médios, que se projetam diretamente ao globo pálido interno; e inibir os neurônios espinhosos médios que se projetam para o globo pálido externo. Em condições normais, ambas as aferências dopaminérgicas servem para diminuir o efluxo inibitório dos núcleos da base, aumentando a excitabilidade dos neurônios motores superiores. No entanto, quando as células da SNpc são destruídas, como ocorre na DP, o efluxo inibitório dos núcleos da base aumenta consideravelmente e a ativação talâmica dos neurônios motores superiores do córtex motor fica comprometida e mais difícil de ser obtida (Figura 2) (BLANDINI *et al.*, 2000; PURVES, 2005).

Acredita-se que o processo neurodegenerativo na DP inicie mais ou menos 20 anos antes da ocorrência das manifestações motoras clássicas, o que é denominado o período pré-clínico da doença. Neste período, o paciente poderia apresentar sintomas não-motores como constipação, ansiedade, dano olfatório, depressão e o distúrbio comportamental do sono (SAVICA *et al.*, 2010). Acredita-se que estes sintomas motores iniciam-se na fase tardia da doença, quando 50 a 80% dos neurônios dopaminérgicos já estão degenerados (BEZARD *et al.*, 2001).



**Figura 2:** Vias dos Núcleos da Base no estado normal e no Parkinson  
**Fonte:** Adaptado de Purves, **Neurociências**. 2005.

#### 1.4. MECANISMOS DE MORTE CELULAR NA DOENÇA DE PARKINSON

Nas últimas décadas, inúmeros estudos têm implicado vários fatores na patogênese e morte neuronal na DP idiopática. Dentre eles destacam-se: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, inflamação, excitotoxicidade, estresse proteolítico, e apoptose. As várias mutações genéticas associadas com a DP familiar, tais como as dos genes da alfa-sinucleína, da parkina, da hidrolase C-terminal da ubiquitina (UCH-L1), PINK1, DJ1 e LRRK2, em geral, estão associadas aos casos de DP de início precoce, e os estudos dos mecanismos fisiopatogênicos subjacentes a tais mutações têm fornecido pistas adicionais de fatores que contribuem para a DP. Apesar desses avanços, fica claro que, por enquanto, nenhum desses fatores isoladamente pode ser responsabilizado pela degeneração neuronal que ocorre na DP idiopática. Abaixo, são revistos alguns aspectos relacionados aos fatores patogênicos que têm sido implicados na DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

##### 1.4.1 *Disfunção Mitocondrial*

A disfunção mitocondrial tem sido considerada um dos principais mecanismos que contribuem para o início da morte celular dopaminérgica na DP. Esta disfunção ocorre devido à inibição do complexo I, que com o aumento do consumo de oxigênio pela mitocôndria, acaba resultando em acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que geram radicais hidroxilas ou reagem com óxido nítrico formando peroxinitrito, levando assim ao estresse oxidativo. O aumento de espécies reativas de oxigênio resultaria no aumento de proteínas danificadas (DAWSON; DAWSON, 2003). Em alguns casos, suspeita-se que o déficit no complexo I seria herdado do genoma mitocondrial ou ocorreria por uma toxicidade sistêmica que levaria a uma mutação do DNA mitocondrial. Entretanto, nenhuma mutação mitocondrial específica foi encontrada em paciente com DP (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; SCHAPIRA, 2007).

##### 1.4.2 *Agregação de Proteínas*

Em células eucariontes, proteínas mutadas, danificadas ou com defeitos no seu enovelamento são normalmente degradadas pelo sistema de degradação ubiquitina-proteassoma (UPS). Uma produção excessiva dessas proteínas pode exceder a capacidade do UPS de degradá-las, resultando

assim no seu acúmulo e agregação, gerando estresse proteolítico (OLANOW, 2007). Esse estresse também pode surgir se algo interferir na função do proteassoma, ou ainda pela combinação dos dois fatores (OLANOW, 2007). Outra forma de evitar o acúmulo de proteínas modificadas ocorre através das proteínas chaperonas que atuam no desnovelamento de proteínas com configuração incorreta (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

A agregação de proteínas danificadas pode ser neurotóxica por vários mecanismos. Proteínas agregadas podem causar danos diretos como pela deformação celular ou pela interferência no tráfico intracelular nos neurônios, ou ainda podem sequestrar proteínas importantes para a sobrevivência celular. Esse mecanismo ficou particularmente evidenciado em formas familiares de DP envolvendo as mutações nos genes da UCH-L1 e da parkina, que ocasionam uma disfunção no sistema ubiquitina-proteassoma, gerando o acúmulo de proteínas defeituosas, e culminando na morte neuronal (DAUER, 2003; OLANOW 2007).

#### 1.4.3. *Inflamação*

Exames em encéfalos pós-morte de pacientes parkinsonianos revelaram a presença de microglias ativadas e aumento na expressão de citocinas e outros fatores pró-inflamatórios no estriado e líquor de paciente com DP (OLANOW, 2007). A liberação de mediadores inflamatórios potentes como o fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucinas e interferons têm sido vistos como importantes mediadores da morte celular de neurônios dopaminérgicos (BLUM *et al.*, 2001).

#### 1.4.4. *Estresse Oxidativo*

O excesso de espécies reativas de oxigênio pode levar ao estresse oxidativo. O aumento na degradação de dopamina pode resultar na formação em excesso de peróxidos, quinonas e radicais hidroxila (OLANOW, 2007). Em suporte ao possível envolvimento desse mecanismo da patogênese da DP são os achados de deficiência significativa nos níveis de glutathiona reduzida, o principal anti-oxidante cerebral, e o aumento nos níveis de ferro, o qual é um pró-oxidante que promove a reação de Fenton, com a formação de radicais

hidroxila altamente reativos (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIERE, 2002; OLANOW, 2007).

#### *1.4.5. Excito-Toxicidade*

A excito-toxicidade resulta do aumento dos níveis de glutamato que desencadeia o aumento no cálcio citosólico, o qual promove a ativação da sintase de óxido nítrico (NOS). Esta enzima cataliza a conversão de arginina em citrulina, formando óxido nítrico (NO), os quais reagem com radicais superóxidos, formando peroxinitrite e hidroxil, poderosos agentes oxidantes (OLANOW; TATTON, 1999; OLANOW, 2007). Em tese, a ocorrência da excito-toxicidade na doença de Parkinson poderia surgir a partir de uma redução da energia metabólica (consequente a uma disfunção mitocondrial), o que causaria a abertura do canal de N-metil-D-aspartato (NMDA) bloqueado por Mg, e conseqüentemente o aumento do fluxo de cálcio para dentro da célula (OLANOW; TATTON, 1999; OLANOW, 2007).

#### *1.4.6. Apoptose*

A apoptose é um tipo de morte celular programada, caracterizada por cascatas de eventos morfológicos e bioquímicos, resultantes da ativação de uma família de proteases de cisteína/ácido aspártico denominadas de caspases. Células que evoluem para a morte apoptótica exibem características morfológicas como: condensação da cromatina, fragmentação nuclear, condensação citoplasmática e formação de corpos apoptóticos. A ativação da caspase-3 é um dos principais fatores indicativos de apoptose. As evidências indicam que pelo menos uma fração da morte celular na DP ocorre por mecanismos apoptóticos, reforçando a importância de se pesquisar terapias anti-apoptóticas (OLANOW, 2007). Alguns autores defendem que a ativação de BAX, um fator pró-apoptótico que antecede a ativação das caspases, teria um papel importante na morte de neurônios dopaminérgicos na DP, e que essa etapa poderia ser um bom alvo para terapias neuroprotetoras (VILA; PERIER, 2008).

## 1.5. NEUROPROTEÇÃO

A neuroproteção é um termo designado para estratégias terapêuticas que visem diminuir, parar ou reverter o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Com base nos mecanismos fisiopatogênicos e de morte celular já citados na DP, estratégias neuroprotetoras deveriam reduzir o estresse oxidativo, combater a excitotoxicidade, melhorar a função mitocondrial, neutralizar a inflamação e/ou inibir a apoptose (FAHN; SULZER, 2004; OLANOW *et al.*, 2008).

O dano causado pelo estresse oxidativo é a característica mais importante das doenças neurodegenerativas, por isso é o maior alvo farmacológico das terapias neuroprotetoras. Até o momento, alguns compostos foram desenvolvidos para aplicação clínica, mas poucos estão sendo bem sucedidos, devido a sua toxicidade e o seu potencial cancerígeno. Por outro lado, o uso de compostos antioxidantes usados na dieta é atraente, no entanto seu uso está sendo limitado pela dificuldade em atingir uma concentração ativa no cérebro (ALBARRACIN *et al.*, 2012).

As atuais terapias são ditas como sintomáticas (diminuem sinais e sintomas) e são baseadas na estratégia de substituição da dopamina. Não há dúvida que essas estratégias vêm melhorando a qualidade de vida, a independência, a empregabilidade e até mesmo a sobrevida desses pacientes, no entanto com a doença em progressão, outras características clínicas emergem que ainda não são passíveis de controle (KIEBURTZ; 2003).

Algumas terapias farmacológicas vem sendo estudadas quanto ao seu potencial neuroprotetor para DP, tais como os inibidores da monoamino oxidase B (MAO-B), coenzima Q10, vitamina E, e a própria levodopa, com resultados promissores em estudos com modelos animais. No entanto nenhuma dessas terapias foi estabelecida como neuroprotetora realmente, pois ainda não se conseguiu mimetizar os efeitos das mesmas em pacientes com DP (OLANOW *et al.*, 2008; OLANOW, 2009).

Estudos com vitamina E mostram que o seu uso como pré-tratamento da lesão com 6-OHDA, diminui os efeitos tóxicos ocasionado pela neurotoxina através da diminuição de radicais livres e pelo seu efeito de estabilizar as membranas celulares contra os efeitos deletérios ocasionados pela

peroxidação lipídica subsequente ao estresse oxidativo (PERUMAL *et al.*, 1992; CADET *et al.*, 1998).

A Coenzima Q10 é um popular suplemento dietético e que pode prevenir a perda de neurônios dopaminérgicos devido a sua propriedade de aceptora de elétrons, que permite a manutenção da correta transferência dos elétrons na mitocôndria. Além disso, possui o poder antioxidante pois, reduz o alfa-tocoferol oxidado, o que é importante na peroxidação lipídica (BEAL *et al.*, 1998; CLEREN *et al.*, 2008).

A Levodopa desde sua aparição em 1961 tem sido tida como a droga mais eficaz para o tratamento sintomático da DP. Sua prescrição se baseia na sua habilidade de como precursor da dopamina conseguir realizar a compensação da mesma no cérebro. Sua eficácia clínica declina após longo tempo de tratamento, adicionalmente começa a aparecer flutuações motoras como a discinesia. O surgimento deste fenômeno irá depender da integridade dos terminais dopaminérgicos, da sua capacidade de síntese e recaptação da dopamina. Até o momento a levodopa é ineficaz contra a morte de células dopaminérgicas (RADAD *et al.*, 2005; KATZENSCHLAGER; LEES, 2002) .

#### *1.5.1. Potencial Neuroprotetor de Antioxidantes Naturais*

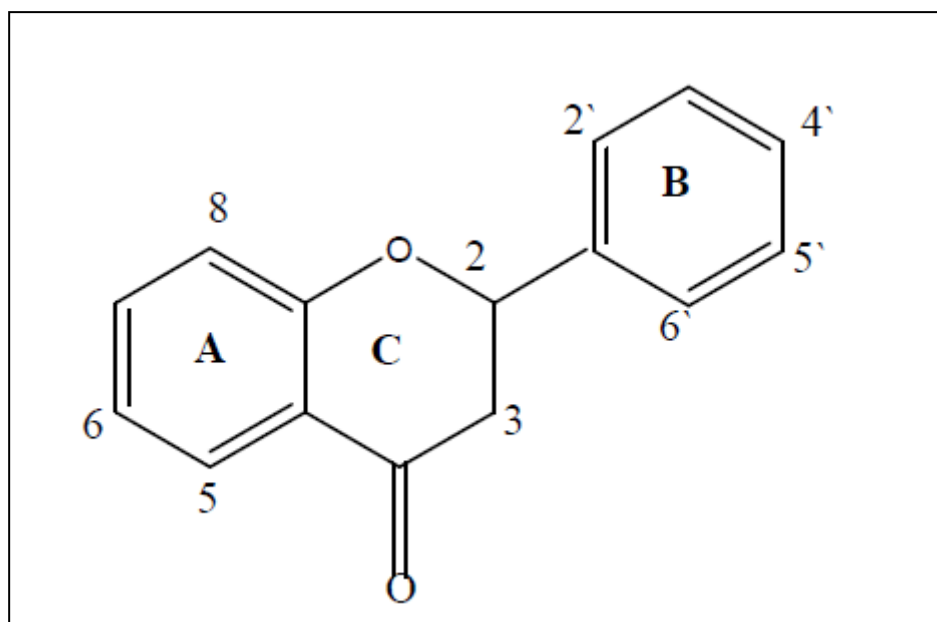
O uso de produtos naturais como medicamento é uma realidade vivida desde os tempos antigos, quando os seres humanos tinham apenas a natureza como fonte de cura para as suas doenças. Após séculos de exploração apenas como produto comercial, os produtos naturais passam da posição de commodities, para produtos com alto valor agregado para fins industriais relacionados a saúde humana (CRAGG *et al.*, 1997).

A busca por novos medicamentos tem causado um interesse renovado pelo potencial terapêutico de produtos naturais. O estudo sistemático dessas plantas é fundamental para a comprovação de seus benefícios terapêuticos e dos mecanismos bioquímicos subjacentes, além de identificar os possíveis riscos à saúde devido às ações tóxicas (CAMPOS *et al.*, 2011)

Antioxidantes naturais, como os polifenóis podem ser neuroprotetores devido a variedade de suas ações biológicas tais como: interação com metais de transição, inativação de radicais livres, modulação na atividade de diversas

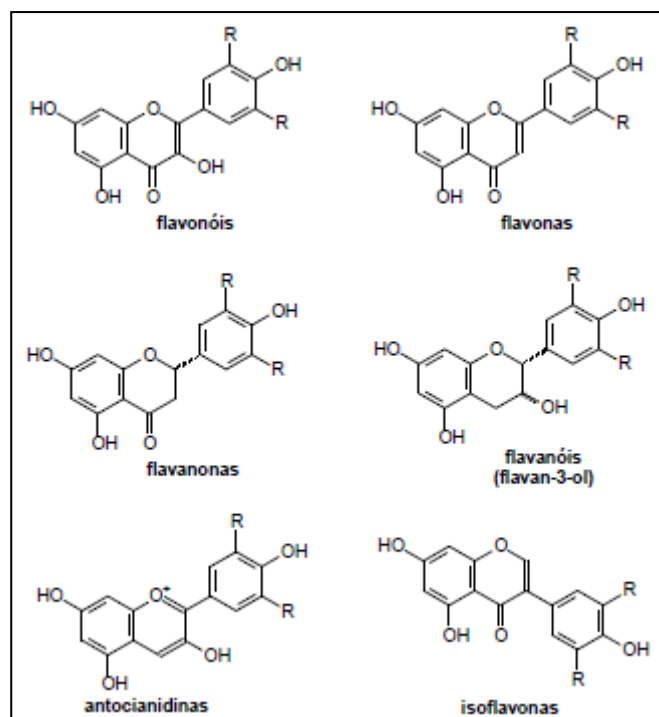
enzimas, efeitos na sinalização intracelular e na expressão gênica (ALBARRACIN *et al.*, 2012).

A classe mais abundante de componentes fenólicos em plantas são os flavonoides. Os flavonoides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir das vias dos fenilpropanóides e do acetato, precursores de vários grupos de substâncias como aminoácidos alifáticos, terpenóides, ácidos gráxicos dentre outros. Mais de 8.000 flavonóides já foram identificados e sua estrutura básica consiste em um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 3) (DONAS *et al.*, 2007).



**Figura 3:** Estrutura geral dos flavonóides

Os principais flavonoides são: flavonóis, flavonas, flavavonas, isoflavonas e antocianidinas (Figura 4) (ALBARRACIN *et al.*, 2012).



**Figura 4:** Principais classes dos flavonoides.

Os flavonóis (quercetina e catequina) são os mais comuns utilizados na dieta, encontrados em maçãs, chás, alcaparras e cebolas (ALBARRACIN *et al.*, 2012).

#### 1.6. *Swietenia macrophylla*

A floresta amazônica com sua gigantesca biodiversidade oferece um cenário fabuloso para a descoberta de novos fármacos. Sob esse ponto de vista, a *S. macrophylla* é uma das espécies com maior valor comercial e uma das mais valiosas espécies da floresta tropical brasileira (ANGELO *et al.*, 2001).

Ele é da família Meliaceae, é conhecido por vários nomes vulgares como: mogno, mogno-brasileiro, aguano, araputanga, cedrorana e cedroí (JÚNIOR; GALVÃO, 2005).

O *S. macrophylla* é uma árvore robusta que domina o dossel da floresta. Seu tronco pode atingir 3,5 metros de diâmetro e uma altura total de 70 metros. Sua área de ocorrência estende-se do México, passando pela costa atlântica da América Central, até a um amplo arco ao sul da Amazônia, através da Venezuela, Colômbia, Equador, Bolívia e a porção oriental da Amazônia Brasileira. No Brasil ocupa áreas do Estado do Pará, Tocantins, Mato Grosso, Amazonas, Rondônia e Acre (GROGAN *et al.*, 2002).



Na literatura há poucos estudos que avaliem os efeitos antioxidantes dos compostos do mogno. Falah et al.(2008) isolaram 3 compostos antioxidantes do caule de *Swietenia macrophylla*: catequina, epicatequina e uma nova catequina fenilpropanoato substituída.

Em 2006, foram isolados dois limonóides, L3 e L4, obtidos do extrato hexânico das folhas de mogno e dois flavonóis, F1 e F2, isolados do extrato metanólico das folhas (Lobo *et al.*, 2006).

A análise através de espectrofotometria de massa -cromatografia líquida (LC-MS) das folhas de *Swietenia macrophylla* demonstraram a presença de compostos fenólicos, entre ácidos fenólicos (gentístico, siríngico, gálico, p-hidroxi-benzóico, benzóico, p-cumárico, o-cumárico, cinâmico e protocatéquico), resveratrol e flavonóides (epicatequina, quercetina, miricetina, apigenina, naringenina, epigallocatequina, crisina e galocatequina) (SÁ, 2010). Estudos preliminares indicam que o extrato de folhas de mogno possui determinadas propriedades bioquímicas e farmacológicas que sugerem um potencial neuroprotetor (LOPES, 2009; SÁ, 2010).

## 1.7. MODELOS EXPERIMENTAIS

Existem dois tipos de modelos animais desenvolvidos para a análise da degeneração neuronal da DP. Os modelos genéticos e os que se baseiam em intoxicar os animais com toxinas que mimetizam alguns eventos patológicos e comportamentais. Algumas das toxinas usadas são: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), rotenona, Paraquat (PQ) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (HIRSH, 2007).

### 1.7.1.MPTP

O aparecimento do MPTP como toxina causadora do parkinsonismo foi em 1982 na Califórnia, onde alguns indivíduos fizeram uso intravenoso de heroína sintética contendo 1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine (MPPP), do qual o MPTP é subproduto (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Em poucas semanas após esta administração, os indivíduos desenvolveram parkinsonismo.

O MPTP, por ser lipofílico, consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica sem dificuldade. Ele é metabolizado em MPDP+ pela

enzima monoaminoxidase-B nas glias e nos neurônios serotoninérgicos. Após isso ele é convertido para a sua forma ativa MPP<sup>+</sup> que tem alta afinidade pelo transportador de dopamina (DAT), bem como para transportadores de noropinefrina e serotonina (HODAIE et al., 2007). Dentro dos neurônios dopaminérgicos o MPP<sup>+</sup> pode seguir 3 vias. Na primeira via ele pode se ligar ao transportador de monoamina vesicular (VMAT2), que transporta o MPP<sup>+</sup> para dentro de vesículas sinápticas; na segunda via ele pode ser concentrado na mitocôndria, pelo mecanismo que se baseia no potencial de membrana mitocondrial; na terceira via ele pode permanecer no citosol, para interagir com citocinas citosólicas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Ele é usualmente sistemicamente administrado, por via subcutânea, intraperitoneal, intravenoso ou intramuscular. A sua toxicidade em primatas replica os principais sinais clínicos encontrados na DP: tremor, rigidez acinesia e instabilidade postural (BEAL, 2001).

Na mitocôndria o MPP<sup>+</sup>, e não o MPTP prejudica a fosforilação oxidativa pela inibição do complexo I da cadeia de transporte de elétrons (NICKLAS et al., 1985). Em 1986, o primeiro estudo *in vivo* com camundongos obteve como resultado que o MPTP inibe o complexo I mitocondrial e não o complexo II e III (MIZUNO et al., 1986).

Estudos com camundongos pré-tratados com mazindol (bloqueador de absorção de dopamina) não evidenciou diminuição nos níveis de ATP, demonstrando a preferência do MPTP por neurônios dopaminérgicos (CHAN et al., 1991).

### 1.7.2- Rotenona

A rotenona é o mais potente membro da família dos rotenóides, os quais são citotóxicos naturais extraídos de plantas leguminosas. Ela é comumente usada como inseticidas e pesticidas (HODAIE et al., 2007). Ela é altamente lipofílica, por isso consegue ultrapassar facilmente a barreira hematoencefálica, não necessitando de transportadores. Após uma simples injeção intravenosa, a rotenona atinge a máxima concentração no sistema nervoso central em 15 minutos. Ela atravessa livremente as membranas celulares, podendo se acumular nas organelas subcelulares como a mitocôndria. Na

mitocôndria a rotenona impede a fosforilação oxidativa pela inibição do NADH-ubiquinona (HODAIE *et al.*, 2007).

Ela é responsável pela formação de inclusões positivas de ubiquitina e  $\alpha$ -synucleína nas células nigrais morfológicamente similares aos corpos de lewy na DP (BETARBET; GREENAMYRE, 2007).

Estudos em culturas demonstraram que a microglia possui um papel importante na degeneração de células neuronais induzidos pela rotenona, devido a suscetibilidade para culturas mistas neurônio/glia (MARTINS-FILHO, 2006).

Seu método de administração pode ser sistemicamente por infusão intrajugular ou subcutâneo. Seu efeito neurotóxico ainda é muito discutido. Alguns autores acreditam na degeneração seletiva para neurônios dopaminérgicos (BETARBET *et al.*, 2000; ANTONY; DIEDERICH; BALLING, 2011), no entanto outros estudos verificaram degeneração neuronal em diversas áreas do encéfalo e em diferentes populações neuronais (HOGLINGER *et al.*, 2003; ALAM; SCHMIDT, 2002). Seu uso em modelos de neuroproteção é limitado devido a grande variabilidade na sensibilidade dos animais frente a sua lesão (BEAL, 2001).

### 1.7.3- Paraquat

Paraquat (PQ) (1,1´dimetil 4,4´bipiridino) é um dos herbicidas mais usados no mundo. O seu uso para induzir a DP teve origem na sua similaridade estrutural com o MPP<sup>+</sup> (BETARBET; GREENAMYRE, 2007).

Experimentos com ratos demonstram que o PQ não ultrapassa a barreira hematoencefálica por destruição da mesma e sim por um sistema de transporte de aminoácidos, sendo transportado para as células neurais por um mecanismo dependente de sódio (SHIMIZU *et al.*, 2001).

Estudo em 2004, realizado tanto *in vitro* quanto *in vivo* sugere que o PQ não utiliza o transportador de dopamina (DAT) para entrar nas células e nem é um inibidor do complexo I mitocondrial (RICHARDSON *et al.*, 2005).

Ao contrário do MPP<sup>+</sup> em que sua toxicidade ocorre devido a diminuição da respiração mitocondrial pela inibição do complexo I, a toxicidade do PQ envolve o ciclo redox celular, havendo a produção de superóxidos (BONNEH-BARKAY., 2005).

A mitocôndria seria o primeiro sítio envolvido na produção de superóxidos ocasionado pelo PQ, sendo o complexo III da mitocôndria participante desta produção (CASTELLO *et al.*, 2007).

Estudo em camundongos sem o gene *Ndufs4*, que faz com que seja abolido a atividade do complexo I mitocondrial, confirma que a toxicidade do PQ independe do complexo I mitocondrial, pois houve morte de neurônios estriatais mesmo sem a atividade do mesmo (CHOI *et al.*, 2008).

#### 1.7.4. 6-hidroxidopamina

A 6-OHDA é um agente químico com efeito neurotóxico específico em neurônios catecolaminérgicos, sendo um análogo do neurotransmissor dopamina; é encontrada em encéfalos humanos, como resultado da auto-oxidação da dopamina. Para se observar seus efeitos tóxicos é preciso que seja administrada por via intracerebral, pois a mesma não consegue ultrapassar a barreira hematoencefálica. A 6-OHDA é preferencialmente injetada na SNpc ou no estriado, onde promove a degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos (BETARBET *et al.*, 2002) .

Quando injetada no estriado produz uma degeneração retrógrada e prolongada dos neurônios nigro-estriatais, levando a diminuição da concentração da dopamina ao longo de várias semanas, com o mais importante declínio das células ocorrendo após 7 dias de lesão (FISCHER *et al.*, 2008).

Estudos após 12hs de lesão da toxina demonstraram a degeneração apenas do corpo celular neuronal, com ausência da degeneração das fibras. A partir do 7º dia, a morte de neurônios da SNpc é acompanhada da degeneração de fibras no estriado. Observa-se ainda que não ocorre alteração da morfologia do neurônio tanto na fase inicial da lesão quanto na fase tardia, sugerindo que o mecanismo responsável pela morte neuronal se mantém durante todo o curso da lesão (JEON; LEWIS; BURKE, 1995) .

O processo exato de morte celular induzido pela 6-OHDA ainda não é muito bem esclarecido. Sabe-se que esta toxina inibe o complexo I da mitocôndria, o que leva a diminuição da função metabólica, conseqüentemente há uma diminuição na produção de ATP e um aumento na produção de

radicais livres, os quais levarão a quebra e mutações no DNA e desorganização do citoesqueleto (WOODGATE *et al.*, 1999).

A injeção intracerebral unilateral de 6-OHDA produz um comportamento rotatório nos animais em resposta a apomorfina e anfetamina, sendo que a magnitude e o sentido deste comportamento depende do tamanho e do local da lesão na via nigroestriatal (HISAHARA; SHIMOHAMA, 2010). Dentro dos neurônios, a 6-OHDA fica acumulada no citosol, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), inativando macromoléculas biológicas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). A sua lesão não resulta na presença de corpos de lewy na SN (BEAL, 2001).

#### 1.8. JUSTIFICATIVA

Os modelos animais que utilizam a injeção de 6-OHDA no estriado, induzem morte neuronal retrógrada, lenta e progressiva, mimetizando melhor a morte celular progressiva da DP. Uma característica interessante desse modelo é a alteração comportamental rotatória estereotipada que ele é capaz de gerar nos animais lesados após indução farmacológica. Por isso, o modelo da 6-OHDA continua sendo bastante utilizado para se testar o potencial neuroprotetor de certas drogas ou terapias celulares (NISHIMURA *et al.*, 2003; CANNON; GREENAMYRE, 2010).

Como o estresse oxidativo parece ser um dos principais mecanismos envolvidos no desenvolvimento da DP, o uso do mogno como agente neuroprotetor poderia ser promissor, visto que o mesmo possui em sua composição agentes antioxidantes (SA, 2010).

Desta forma o presente trabalho teve por objetivo caracterizar os efeitos do extrato de folhas de mogno em modelo de DP que utiliza injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos do extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* frente à degeneração nigroestriatal e alterações comportamentais em um modelo de DP baseado na injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA em camundongos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Caracterizar os efeitos do extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* sobre a degeneração dopaminérgica nigroestriatal 7 e 21 dias após a injeção de 6-OHDA através de parâmetros comportamentais.

2.2.2. Caracterizar os efeitos do extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* sobre a degeneração dopaminérgica nigroestriatal 7 e 21 dias após a injeção de 6-OHDA através de parâmetros histológicos.

2.2.3. Verificar se o tratamento com extrato de *Swietenia macrophylla* promoveu efeito neuroprotetor.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

No presente trabalho foram utilizados 20 camundongos machos adultos, da linhagem suíço albino, com idades entre 10 e 12 semanas, provenientes do biotério do Instituto Evandro Chagas. Durante todo o período dos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neuropatologia Experimental em gabinetes próprios para animais, com temperatura controlada a  $24^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro/escuro natural de 12/12h, com água e ração a vontade. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPa), com o número BIO015-11. Nossa taxa de mortalidade foi de 15%, sendo nossa amostra final de 17 animais.

#### 3.2. DROGAS

Foram utilizados em nossos experimentos:

- 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Sigma-Aldrich- H4381): foi dissolvida em solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) contendo ácido ascórbico a 0,02% (Sigma-Aldrich). A solução foi preparada minutos antes da cirurgia estereotáxica e armazenada em recipientes protegidos da luz até o seu uso.
- Apomorfina (Sigma-Aldrich-A4393): foi dissolvida em solução salina fisiológica, preparada minutos antes do teste comportamental e armazenada em recipientes protegidos da luz até o seu uso.
- Extrato de folhas de *S.macrophylla*: foi cedido na forma liofilizada 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 flavonóides. Ele foi dissolvido em solução salina sendo congelado em seguida. O mesmo só foi descongelado no momento da aplicação nos animais.

### 3.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### 3.3.1. Grupos Experimentais

Os 17 animais foram divididos em 4 grupos. Todos os grupos receberam dose única de 2µl contendo 10µg de 6-OHDA no estriado esquerdo e tiveram sobrevida de 21 dias. Os grupos foram divididos como mostra a Tabela 1.

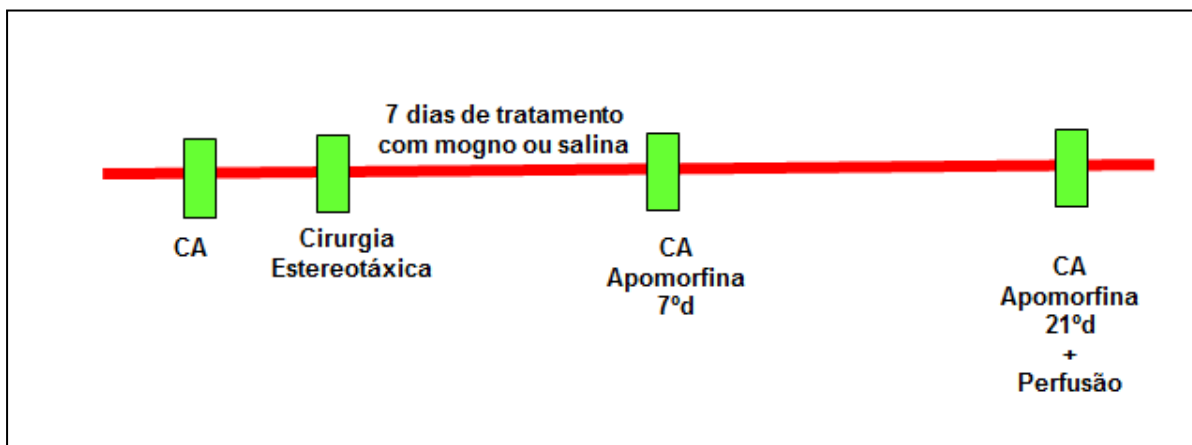
Tabela 1- Delineamento experimental.

GRUPOS	n	6-OHDA	Extrato (dose)	Salina
G1	4	10mg/2ul	0,5	-
G2	5	10mg/2ul	1,0	-
G3	4	10mg/2ul	5,0	-
GC	4	10mg/2ul	-	+

### 3.4. TRATAMENTO COM *S.macrophylla* E SALINA

O extrato de *S.macrophylla* ou a salina 0,9% (veículo) foram injetados intraperitonealmente nos animais nos sete primeiros dias após a cirurgia estereotáxica, sendo a primeira dose injetada 1 hora depois da cirurgia. A salina foi utilizada como controle da injeção de mogno (Figura 5).



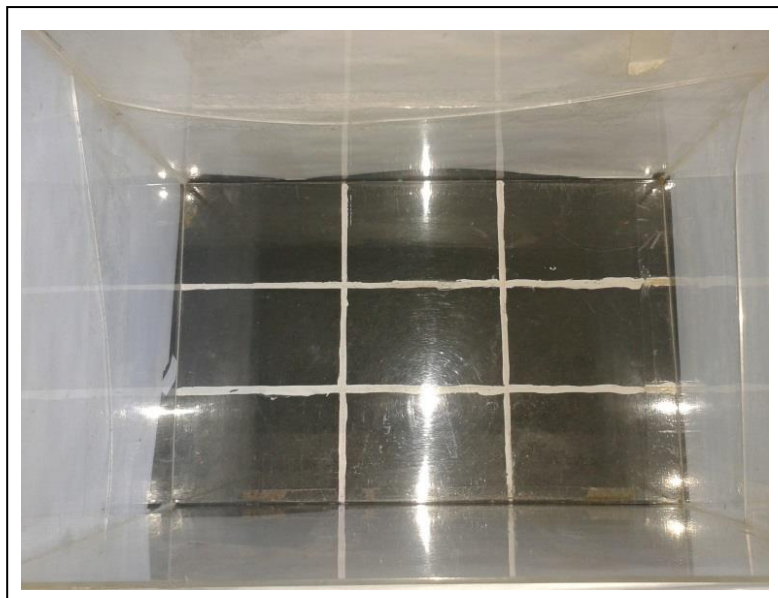


**Figura 5:** Linha do tempo do tratamento e dos testes comportamentais. CA: Campo Aberto.

### 3.5. AVALIAÇÃO MOTORA

#### 3.5.1. Teste do Campo Aberto

Para se avaliar o desempenho motor antes e depois da administração da 6-OHDA, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto por 5 minutos (Figura 6). O aparato do teste era retangular, transparente e com 21 cm de largura x 30 cm de comprimento x 20 cm de altura e sendo sua base (assoalho) dividida em 9 campos. A ambulação foi avaliada através da quantificação do número de vezes que o animal cruzava as linhas do assoalho. Os grupos foram submetidos ao teste antes da cirurgia, 7 e 21 dias depois. O teste foi filmado para análise posterior.



**Figura 6:** Aparato do Campo Aberto

### *3.5.2. Rotação Induzida por Apomorfina*

Os animais também foram submetidos ao teste da apomorfina com o intuito de avaliar, comportamentalmente, o grau de degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, pois a medida que as mesmas se degeneram, os animais tendem a girar para o lado contralateral a lesão após injeção de apomorfina. Os grupos foram submetidos ao teste 7 e 21 dias após a cirurgia. A injeção de apomorfina foi na dose de 0,6 mg/kg sendo injetada por via subcutânea. Após a sua administração, os animais foram colocados em um aparato circular. O teste teve a duração de 30 minutos, sendo filmado para análise posterior. Foram contabilizados giros de 360° tanto para o lado ipsilateral, quanto para o lado contralateral (Figura 7).



**Figura 7:** Aparato do teste da Apomorfina

### 3.6. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Antes da cirurgia, os animais receberam doses anestésicas de 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.). O nível anestésico foi avaliado através do reflexo flexor e reflexo corneano. Após nos certificarmos de que o animal estava profundamente anestesiado, o mesmo foi imobilizado no aparelho estereotáxico através de duas barras intra-auriculares e uma barra de fixação dos incisivos. Em seguida foi feita a tricotomia da cabeça para expor a superfície craniana entre o bregma e o lâmbda, onde se realizou um orifício do lado esquerdo, com o auxílio de uma broca elétrica, a partir das seguintes coordenadas: antero-posterior (A-P), 0,8 mm a partir do bregma; médio-lateral (M-L), 1,8 mm a partir da linha média; e dorso-ventral (D-V), 3,0 mm a partir da calota craniana. Estas coordenadas foram baseadas no Atlas de Estereotaxia para camundongos de Paxinos e Franklin (2004). Através deste orifício, em todos os animais foram injetados com 2  $\mu$ l de 6-OHDA, por um período de 10 min, usando seringa de Hamilton de 10  $\mu$ l, a taxa de infusão foi de 0,2  $\mu$ l/min.

A área exposta da superfície craniana foi fechada com fio de sutura. Após a cirurgia os animais receberam injeção profilática de pentabiótico 60.000 u.i (0,02 ml) por via intramuscular, e depois foram colocados em suas gaiolas com água e ração *ad libitum*.

### 3.7. PERFUSÃO E SECCIONAMENTO DOS ENCÉFALOS

Após o período de sobrevivência os animais foram perfundidos com a ajuda de uma bomba peristáltica com uma pressão de 30 cm/H<sub>2</sub>O. Cada camundongo foi perfundido com 100 ml de tampão fosfato salina (TFS) 0,1 M durante 5 minutos com pH entre 7,2 - 7,4, seguido de 250 ml de solução fixadora de paraformaldeído (PFA) a 4% em TFS a 0,1 M, com pH entre 7,2 - 7,4 durante um período entre 5 - 10 minutos. Terminada a perfusão foi realizada a craniotomia, o encéfalo foi removido e pós-fixado em PFA a 2% em TFS a 0,1 M por 10 - 12h, a 4 °C. Depois de pós-fixado o encéfalo foi transferido para solução crioprotetora de sacarose a 30% em TFS a 0,1 M, onde permaneceu por 72 h. Após isso os animais sofreram um processo de congelamento rápido no solvente metilbutano mantido à temperatura de -30°C com gelo seco, e em seguida foram armazenados em congelador a -20°C.

Na etapa seguinte, os encéfalos foram seccionados para a obtenção de secções na espessura de 40 µm, com auxílio de um criostato (Leica CM 1850), sendo coletadas 6 séries intercaladas. As secções ficaram armazenadas em PFA a 2% até o processo de imunistoquímica.

### 3.8. IMUNOISTOQUÍMICA

As secções foram marcadas com coloração imunistoquímica para TH, utilizando anticorpo primário anti-tirosinohidroxilase (Chemicon- T8700), com o objetivo de identificar os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal.

Antes dos procedimentos relativos à coloração propriamente dita, as secções foram submetidas a etapas de recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e permeabilização do tecido, na sequência a seguir: incubação em tampão borato à 60° por 30min; incubação em solução contendo 90% de metanol e 10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% por 20 minutos; incubação em detergente tritona 5% por 30 min, divididos em duas vezes de 5 minutos e uma vez de 20 minutos.

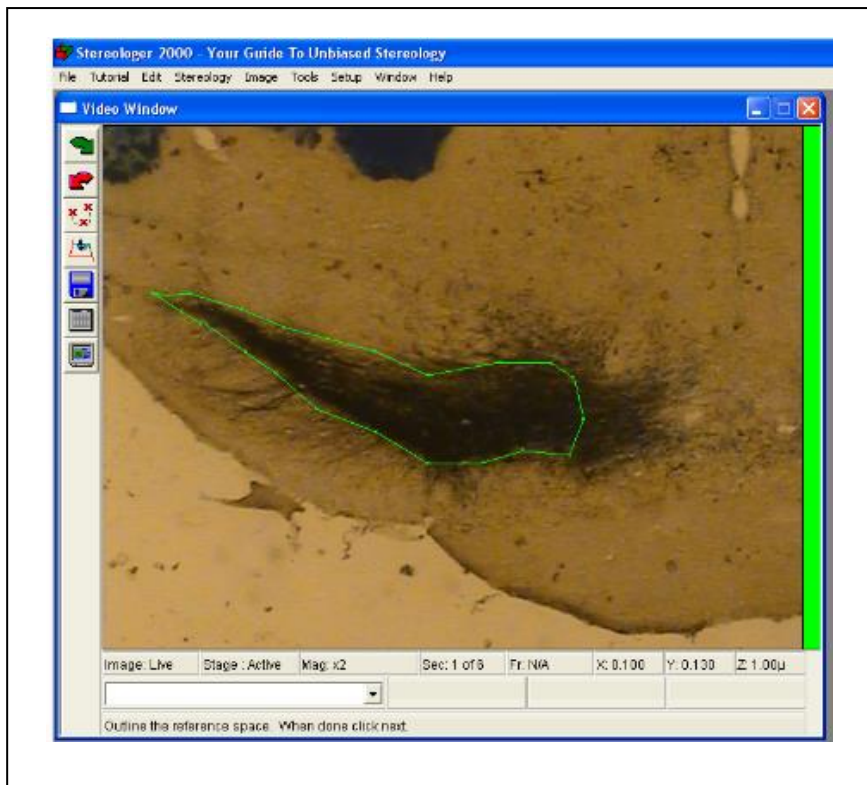
O procedimento de imunistoquímica foi realizado da seguinte forma: incubação em soro normal de jumento (SNJ) a 5% por 30 minutos; incubação em anticorpo primário TH na titulação de 1:1000 por cerca de 12 h; incubação em anticorpo secundário na titulação de 1:500 durante 2 horas; incubação no ABC (complexo avidina-biotina – Vector- PK-4000 ), na titulação de 1:500 durante 1 h. O SG (Vector/SK-4700) foi o substrato utilizado para visualização do complexo formado. Nesta etapa, as secções ficaram cerca de 10 minutos da solução de SG. Após cada etapa as secções foram lavadas 3 vezes por 5 minutos, com TFS 0,1 M com pH 7,2 - 7,4. Após as reações, as secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas.

### 3.9. CONTAGEM DO NÚMERO DE NEURÔNIOS

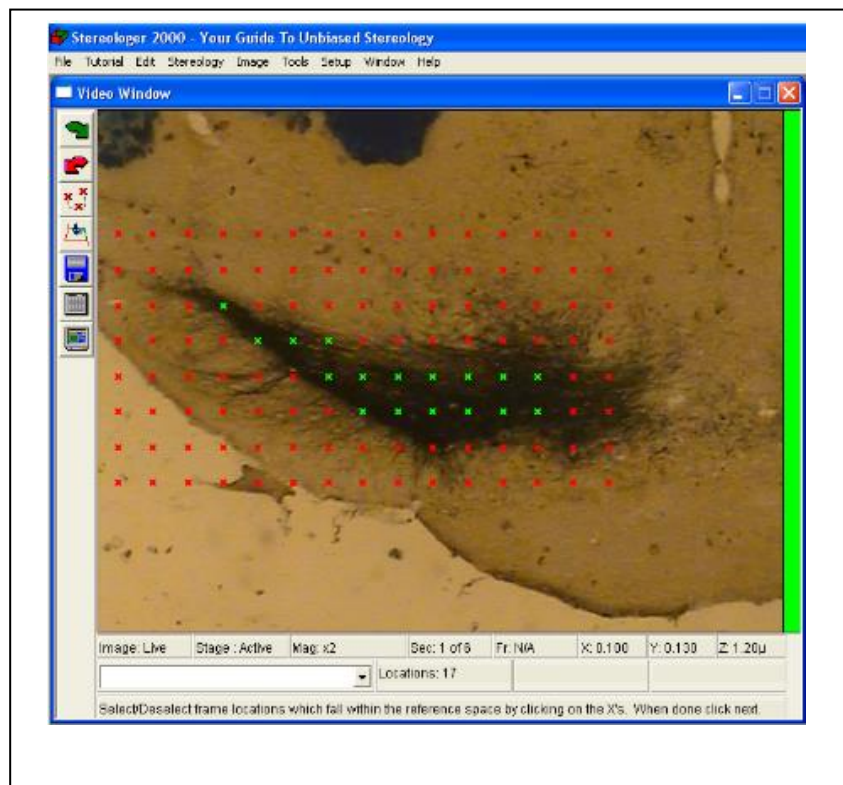
A análise do número total de neurônios dopaminérgicos na substância negra foi feita por meio de estereologia com o método do fracionador óptico.

A estereologia fornece descrições quantitativas significativas da geometria das estruturas tridimensionais a partir de medições que são feitas em imagens bidimensionais. É uma contagem realizada através de uma amostragem sistemática para no final ser realizada uma estimativa do número total de células. Esta contagem é tida como imparcial, pois independe do tamanho, forma, orientação espacial e distribuição espacial do tecido ([www.stereology.info](http://www.stereology.info)).

A delimitação das estruturas de interesse, SNpc e estriado, foram feitas utilizando-se a objetiva de 2x; para a contagem utilizou-se a objetiva de 40X em um microscópio (Nikon Labophot-2), dotado de platina motorizada com movimentos nos eixos X, Y e Z, e câmera CCD (Toshiba IK – C44MD), acoplados a um computador o qual possui o programa Stereologer versão 2.0. A delimitação da SNpc foi feita pelo atlas de coordenadas estereotáticas de Paxinos e Franklin (2004), sendo excluídas as outras regiões da SN (Figuras 8 e 9).



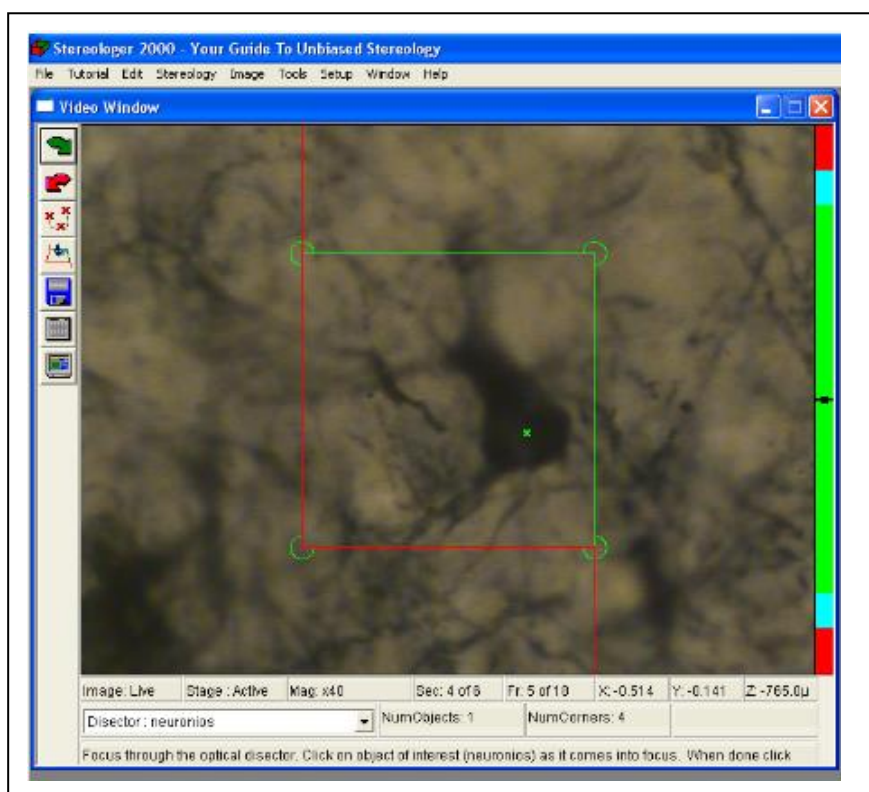
**Figura 8:** Delimitação da substância negra parte compacta no programa de estereologia.



**Figura 9:** Distribuição dos pontos (em verde) a serem contados na estereologia.

Foram contadas 32 secções por animal adotando-se uma caixa de contagem de  $2500\mu\text{m}^2$ , com uma altura de  $15\mu\text{m}$ , espessados por  $125\mu\text{m}$ .

As células dopaminérgicas foram reconhecidas pelo seu padrão de imunoreatividade para TH e o critério para a definição da contagem foi a visualização do corpo celular. Foram contadas as células cujo corpo celular localizava-se totalmente dentro da caixa de contagem ou que interceptasse as linhas de inclusão (linhas verdes) não tocando nas de exclusão (linhas vermelhas) (Figura 10).



**Figura 10:** Caixa de contagem demonstrando linhas de inclusão (verde) e as linhas de exclusão (vermelha).

### 3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi feita através do programa GraphPad Prism versão 6 adotando um nível de significância  $p < 0,05$ . Os testes do campo aberto e da apomorfina, assim como o número de células foram representados em valores de média  $\pm$  erro padrão. As comparações dos testes comportamentais tanto intragrupos e intergrupos; e as comparações realizadas intergrupos dos lados injetados e os lados não-injetados da SNpc foram analisados através da análise de variância (ANOVA) um critério, seguido do teste de Newman-Keuls. A análise intragrupo da SNpc foi realizada através do Teste t. A correlação entre a perda de neurônios dopaminérgicos com o campo aberto e com a apomorfina foi feita pela correlação de Pearson.



#### 4. RESULTADOS

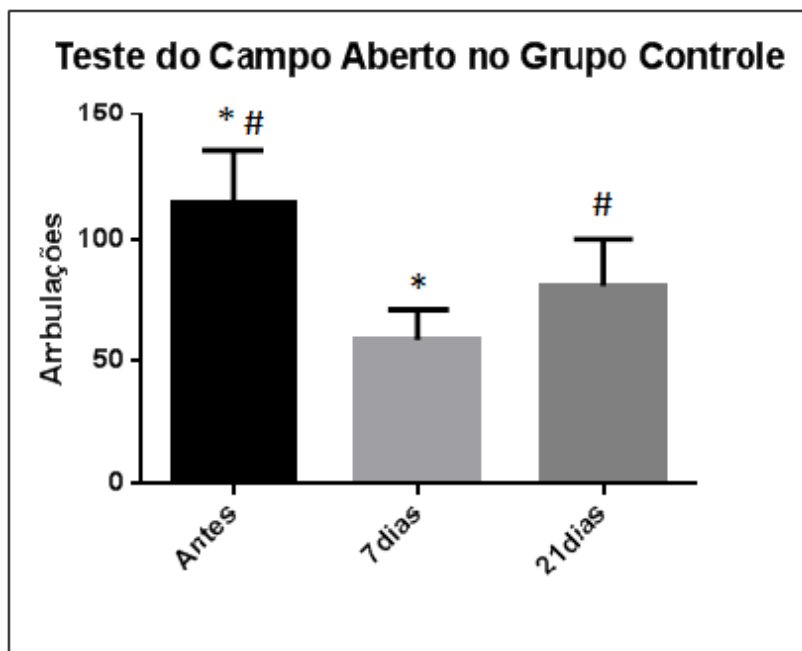
Em nosso estudo avaliamos os efeitos de diferentes doses de mogno no comportamento de camundongos injetados unilateralmente com 6-OHDA no estriado. Utilizamos os testes do campo aberto e rotação induzida por apomorfina. Os grupos analisados foram: grupo 6-OHDA + mogno 0,5 mg/kg (G1), grupo 6-OHDA + mogno 1,0 mg/kg (G2), grupo 6-OHDA + mogno 5,0 mg/kg (G3) e grupo controle (6-OHDA + Salina 0,9%). Todos os grupos eram constituídos de uma amostra de 4 animais, exceto o grupo 2 que continha 5 animais.

##### 4.1. TESTE DE CAMPO ABERTO

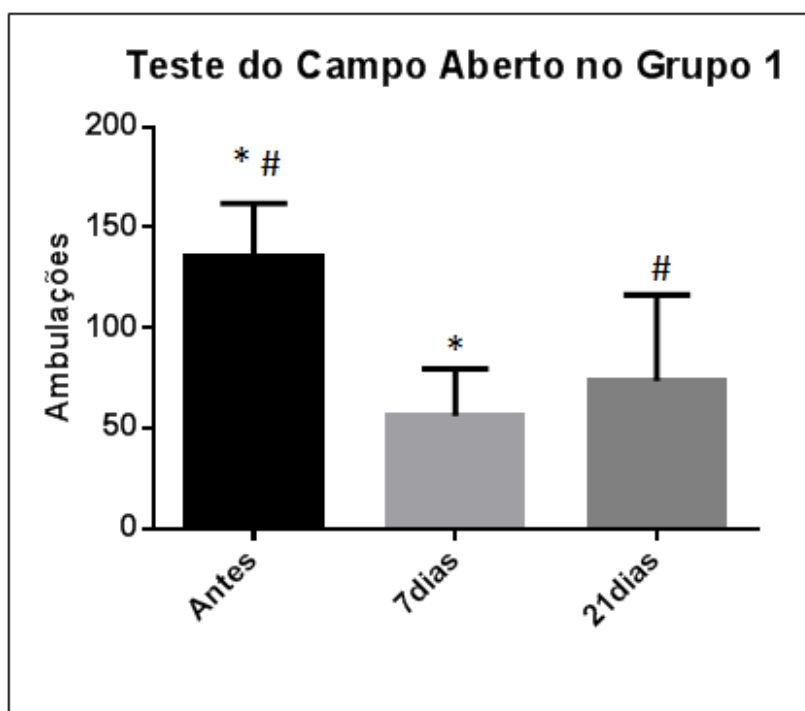
Avaliou-se a ambulação dos camundongos no teste de campo aberto antes, 7 dias e 21 dias depois da injeção de 6-OHDA. Foi feita uma análise intragrupo e intergrupo do teste nos diferentes tempos.

Na análise intragrupo, o grupo controle (Figura 11) apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado o teste antes com os testes 7 dias e 21 dias, (antes:  $114 \pm 20$ ; 7 dias:  $59 \pm 11$ ; 21 dias:  $80 \pm 19$ ), comportamento também apresentado pelo grupo 1 (antes:  $142 \pm 24$ ; 7 dias:  $59 \pm 25$ ; 21 dias:  $79 \pm 47$ ) (Figura 12).

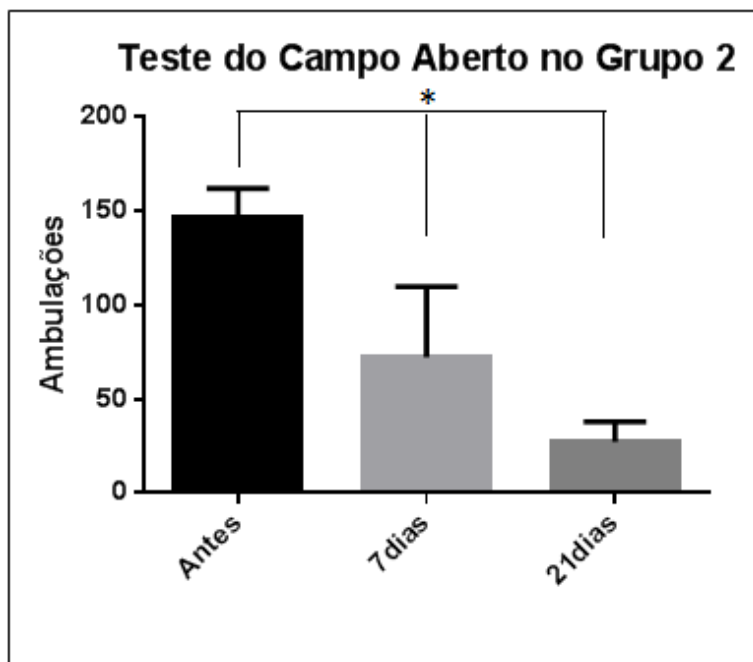
O grupo 2 apresentou índices significativos entre todos os tempos de teste (antes:  $146 \pm 15$ ; 7 dias:  $72 \pm 37$ ; 21 dias:  $27 \pm 10$ ), comportamento apresentado também no grupo 3 (antes:  $163 \pm 48$ ; 7 dias:  $91 \pm 58$ ; 21 dias:  $20 \pm 6$ ) (Figuras 13 e 14, respectivamente).



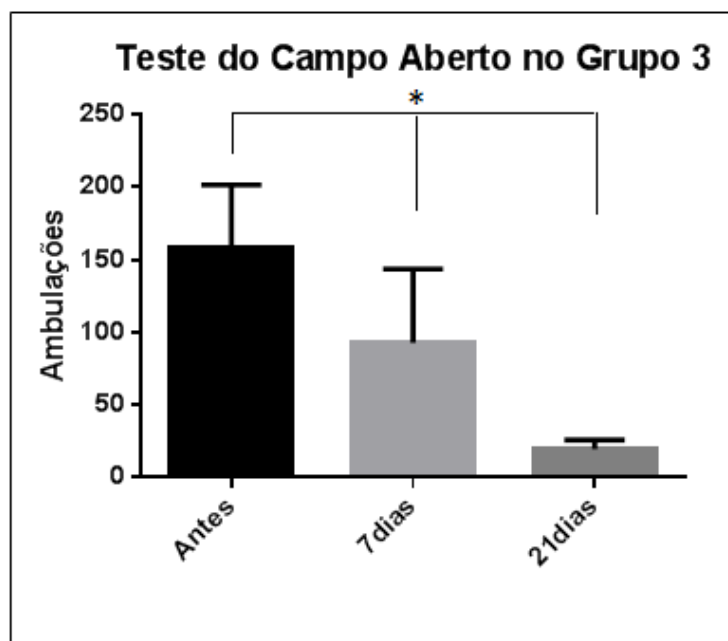
**Figura 11:** Comportamento ambulatorio de animais com lesão por 6-OHDA e tratamento com salina. A barra preta representa a média de ambulações antes da cirurgia, barra cinza claro 7 dias e barra cinza escura 21 dias. Nota-se diferença estatisticamente significativa entre Antes e 7 dias e Antes e 21 dias ( $p^{*#} < 0.05$ ).



**Figura 12:** Comportamento ambulatorio de animais com lesão por 6-OHDA e tratamento com *S. macrophylla* 0,5 mg/kg. A barra preta representa a média de ambulações antes da cirurgia, barra cinza claro 7 dias e barra cinza escura 21 dias. Nota-se diferença estatisticamente significativa entre Antes e 7 dias e Antes e 21 dias ( $p^{*#} < 0,05$ ).

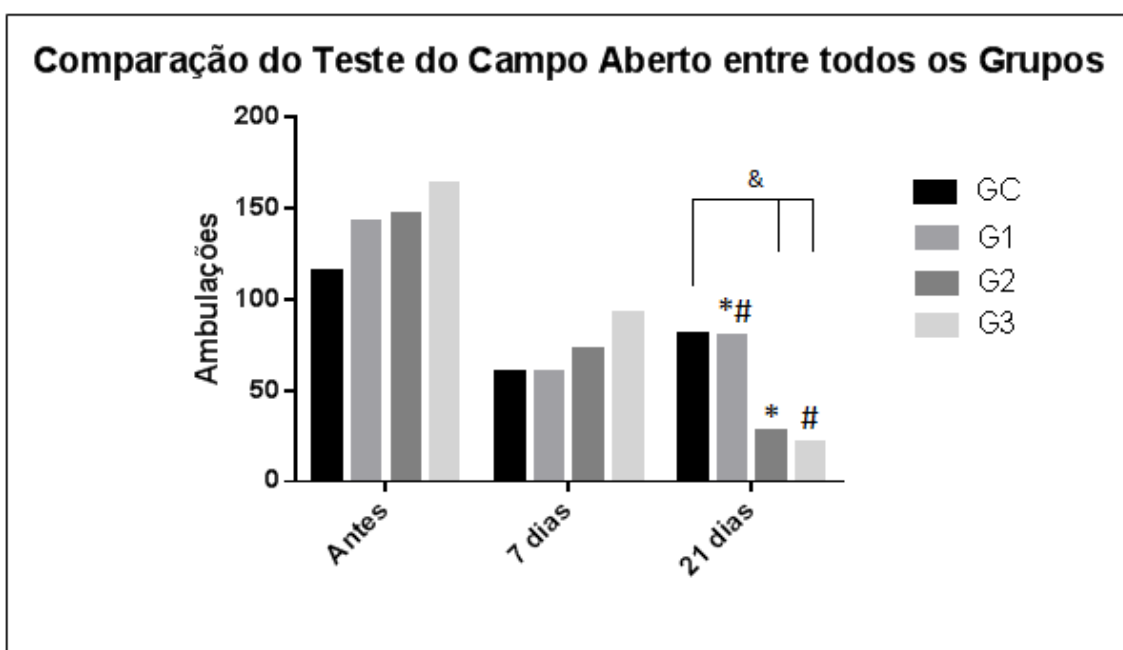


**Figura 13:** Comportamento ambulatorio de animais com lesão por 6-OHDA e tratamento com *S.macrophylla* 1,0 mg/kg. A barra preta representa a média de ambulações antes da cirurgia, barra cinza claro 7 dias e barra cinza escura 21 dias. Nota-se que ocorreu diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos do teste ( $p^* < 0,05$ ).



**Figura 14:** Comportamento ambulatorio de animais com lesão por 6-OHDA e tratamento com *S.macrophylla* 5,0 mg/kg. A barra preta representa a média de ambulações antes da cirurgia, barra cinza claro 7 dias e barra cinza escura 21 dias. Nota-se que ocorreu diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos do teste ( $p^* < 0,05$ ).

Além da análise intragrupo, foi feita também uma análise intergrupos da ambulação no teste de campo aberto. Foi realizada uma comparação conservando o mesmo tempo nos diferentes grupos (Figura 15). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os testes antes e 7 dias nos diferentes grupos. No teste feito em 21 dias após a cirurgia, não houve diferença entre o grupo 1 e o grupo controle, mas encontrou-se diferença estatisticamente significativa quando se comparou tanto o grupo controle quanto o grupo 1 com os grupos 2 e 3.

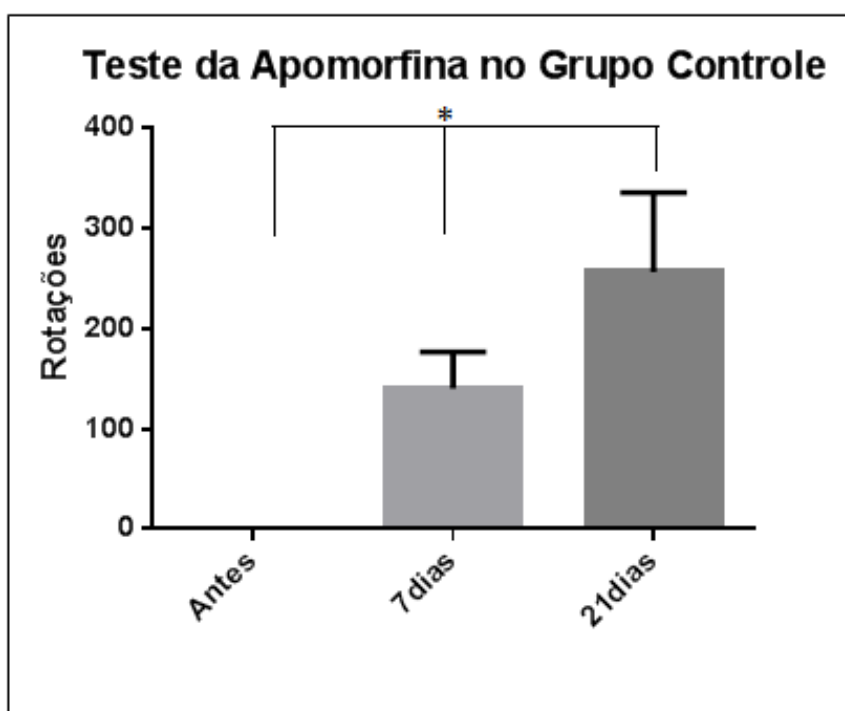


**Figura 15:** Comparação entre os grupos nos mesmos tempos de teste do campo aberto. GC (6-OHDA+ Salina); G1 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 0,5 mg/kg); G2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0 mg/kg); G3 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 5,0 mg/kg). Nota-se diferença estatisticamente significativa apenas no teste de 21 dias, entre o grupo controle versus G2 ou G3; e G1 versus G2 ou G3 ( $p^{&*\#} < 0,05$ ).

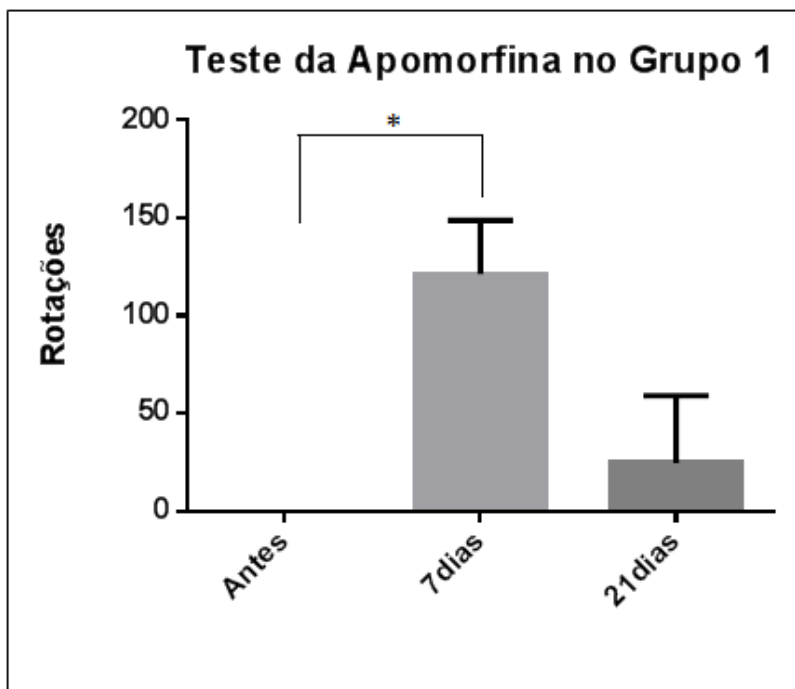
#### 4.2. ANÁLISE DO COMPORTAMENTO ROTATÓRIO INDUZIDO POR APOMORFINA

O teste de rotações induzidas por apomorfina foi feito 7 e 21 dias após a cirurgia. Para questão de comparação, foi considerado o teste antes da cirurgia como zero, visto que animais normais sem lesão não apresentam rotações após injeção de apomorfina. Todos os animais apresentaram comportamento contraversivo.

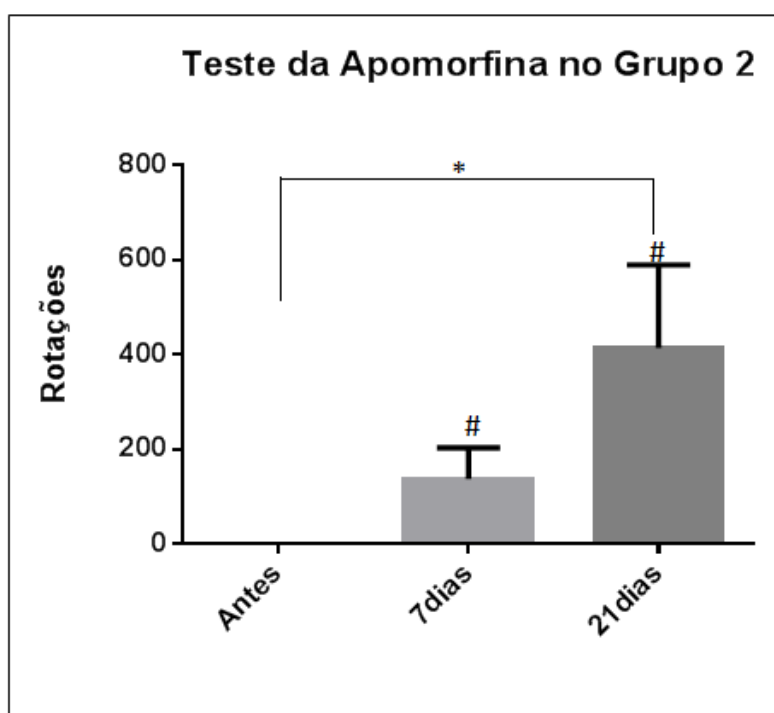
Na análise intragrupo, o grupo controle (Figura 16) apresentou diferenças significativas entre todos os tempos do teste: 7 dias ( $140\pm 35$ ) e 21 dias ( $256\pm 79$ ). O grupo 1 (Figura 17) apresentou diferença estatisticamente significativa entre as médias de rotações antes e 7 dias (7d:  $121 \pm 27$ ; 21d:  $24\pm 34$ ). O grupo 2 (Figura 18) apresentou índices estatisticamente significativos quando comparamos o antes e o 7 dias ( $137\pm 65$ ), e o 7 dias com o 21 dias ( $414\pm 174$ ). O grupo 3 (Figura 19) apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado o teste antes e o 21 dias (7d:  $144\pm 84$ ; 21d:  $236\pm 193$ ).



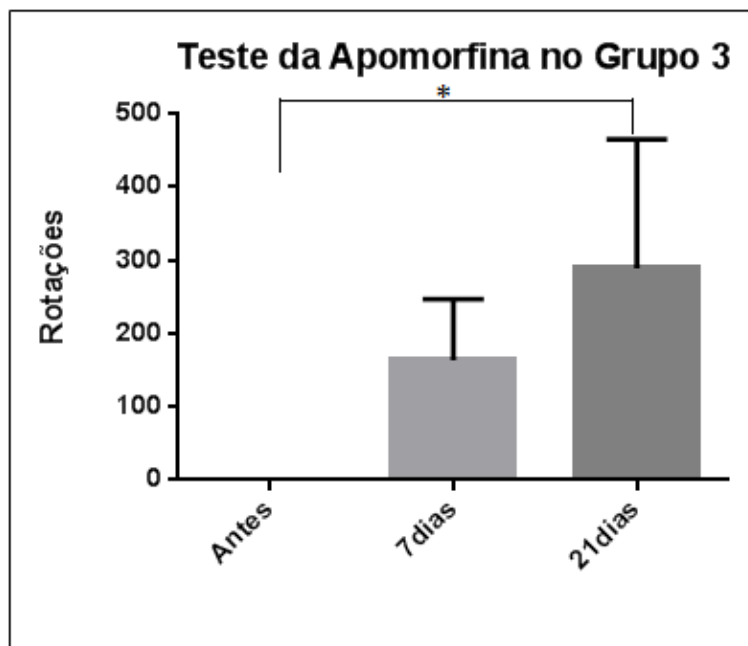
**Figura16:** Média de rotações do grupo controle (6-OHDA + Salina) após injeção de apomorfina. O teste antes da cirurgia não está com a barra visível devido ter sido considerado zero. As barras cinza claro e cinza escuro representam os testes aos 7 e 21 dias depois da cirurgia, respectivamente. Nota-se diferença estatisticamente significativa entre todos os tempos do teste ( $p^* < 0,05$ ).



**Figura 17:** Média de rotações do grupo 1 (6-OHDA + *S.macrophylla* 0,5 mg/kg) após injeção de apomorfina. O teste antes da cirurgia não está com a barra visível devido ter sido considerado zero. As barras cinza claro e cinza escuro representam os testes 7 e 21 dias depois da cirurgia respectivamente. Nota-se diferença estatisticamente significativa entre Antes e 7 dias ( $p^* < 0,05$ ).

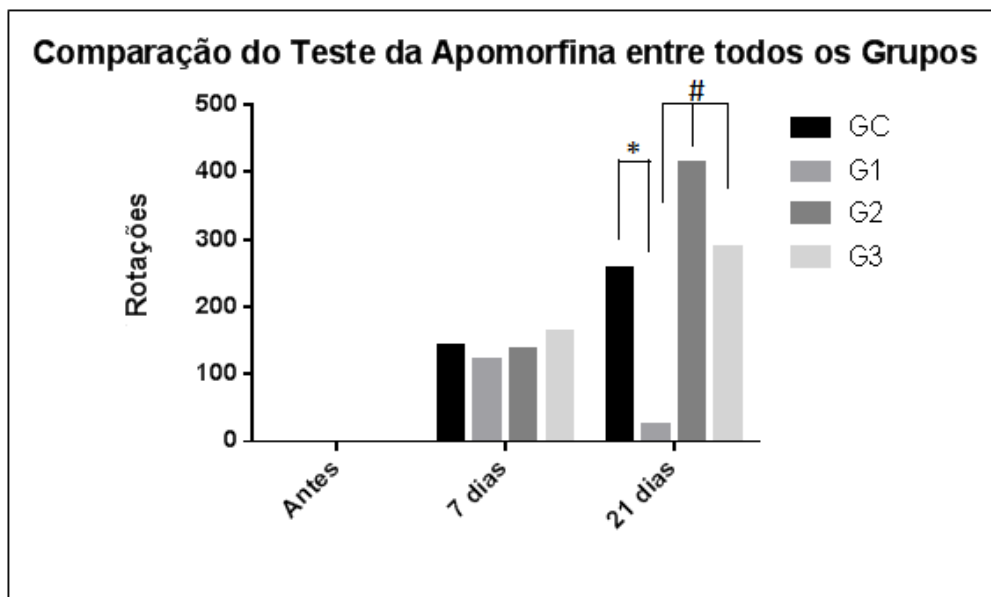


**Figura 18:** Média de rotações do grupo 2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0 mg/kg) após injeção de apomorfina. O teste antes da cirurgia não está com a barra visível devido ter sido considerado zero. As barras cinza claro e cinza escuro representam os testes 7 e 21 dias depois da cirurgia, respectivamente. Nota-se diferença estatisticamente significativa entre antes e 21 dias e entre 7 dias e 21 dias ( $p^{*#} < 0,05$ ).



**Figura 19:** Média de rotações do grupo 3 (6-OHDA + *S.macrophylla* 5,0 mg/kg) após injeção de apomorfina. O teste antes da cirurgia não está com a barra visível devido ter sido considerado zero. As barras cinza claro e cinza escuro representam os testes 7 e 21 dias depois da cirurgia, respectivamente. Nota-se diferença estatisticamente significativa entre Antes e 21 dias ( $p^* < 0,05$ ).

Na análise intergrupo igualmente como foi feito no teste do campo aberto, foi realizada comparação entre os 4 grupos conservando-se a variável tempo dos testes (Figura 20). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os testes antes e 7 dias nos diferentes grupos. No teste feito em 21 dias após a cirurgia, encontrou-se diferença estatisticamente significativa quando se comparou o grupo 1 com todos os grupos, e entre os grupos 2 e 3.



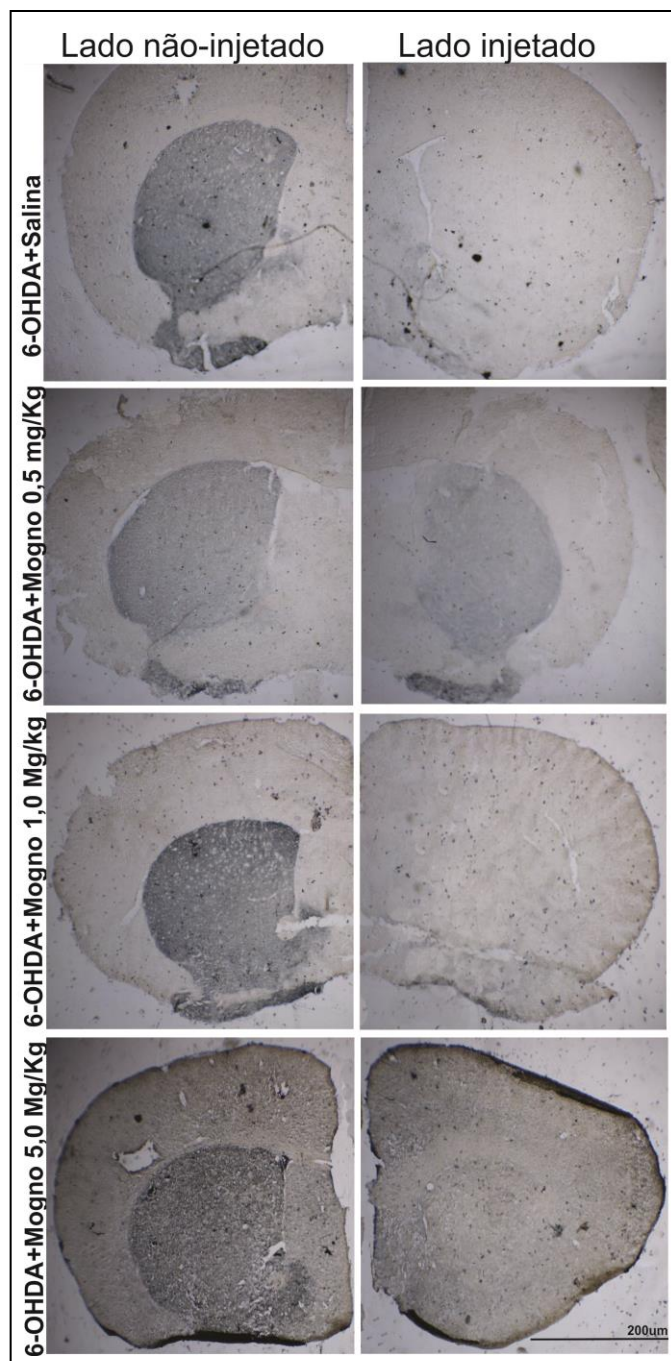
**Figura 20:** Comparação entre as médias dos grupos no teste da apomorfina, conservando os mesmos tempos de sobrevivência. GC (6-OHDA + Salina), G1 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 0,5mg/kg), G2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0 mg/kg), G3 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 5,0mg/kg). Nota-se diferença estatisticamente significativa apenas no teste de 21 dias entre o grupo G1 e todos os outros grupos. ( $p^{*#} < 0,05$ ).

### 4.3. ANÁLISE DA VIA NIGROESTRIALTAL

#### 4.3.1 Estriado

Na análise qualitativa do estriado observamos a perda acentuada na reatividade das fibras dopaminérgicas do estriado esquerdo no grupo controle, nos grupos tratado com *S.macrophylla* 1,0 mg/kg e com 5,0 mg/kg e uma perda discreta no grupo tratado com *S.macrophylla* 0,5 mg/kg (Figura 21).



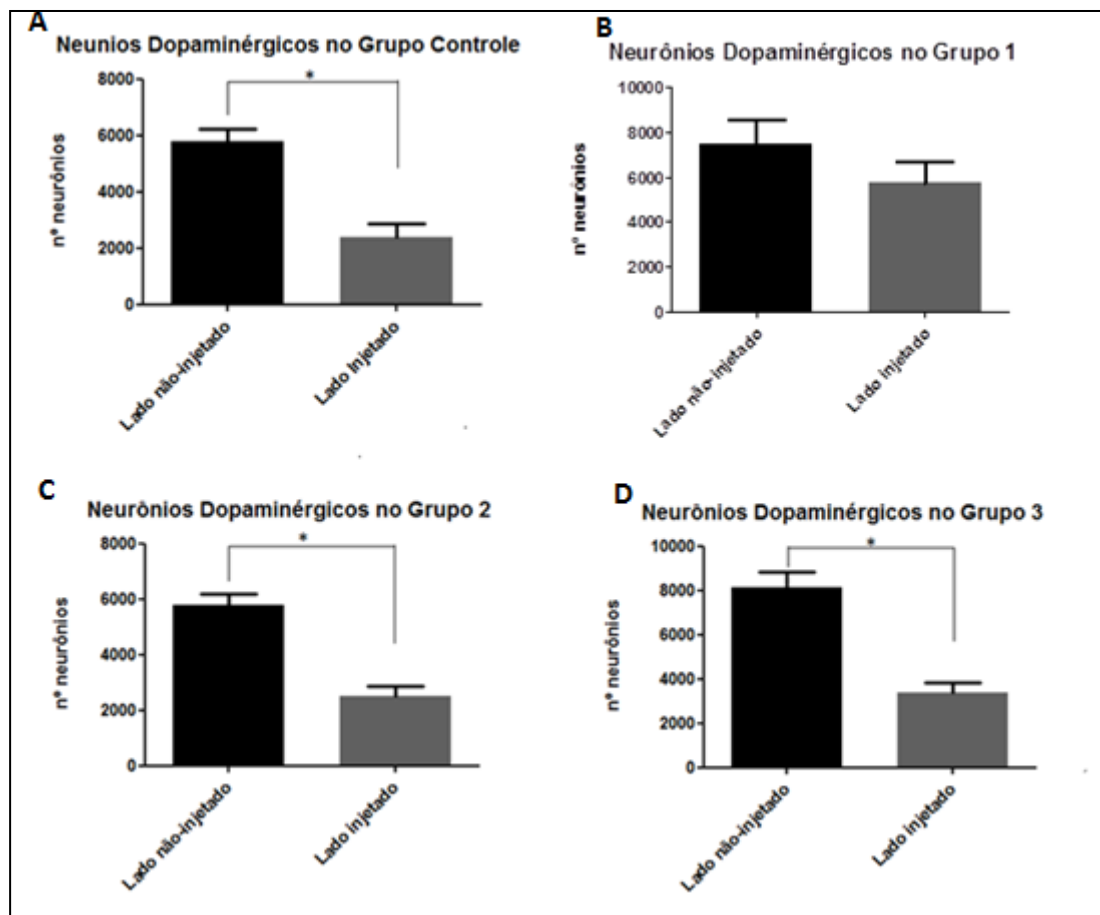


**Figura 21** : Fotomicrografias representativas do estriado do lado não-injetado (esquerda) e lado injetado (direito). De Cima para baixo, grupo controle (6-OHDA +salina), G1 (6-OHDA + *S.macrophylla* 0,5 mg/kg), G2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0 mg/kg) e G3 (6-OHDA + *S.macrophylla* 0,5 mg/kg).

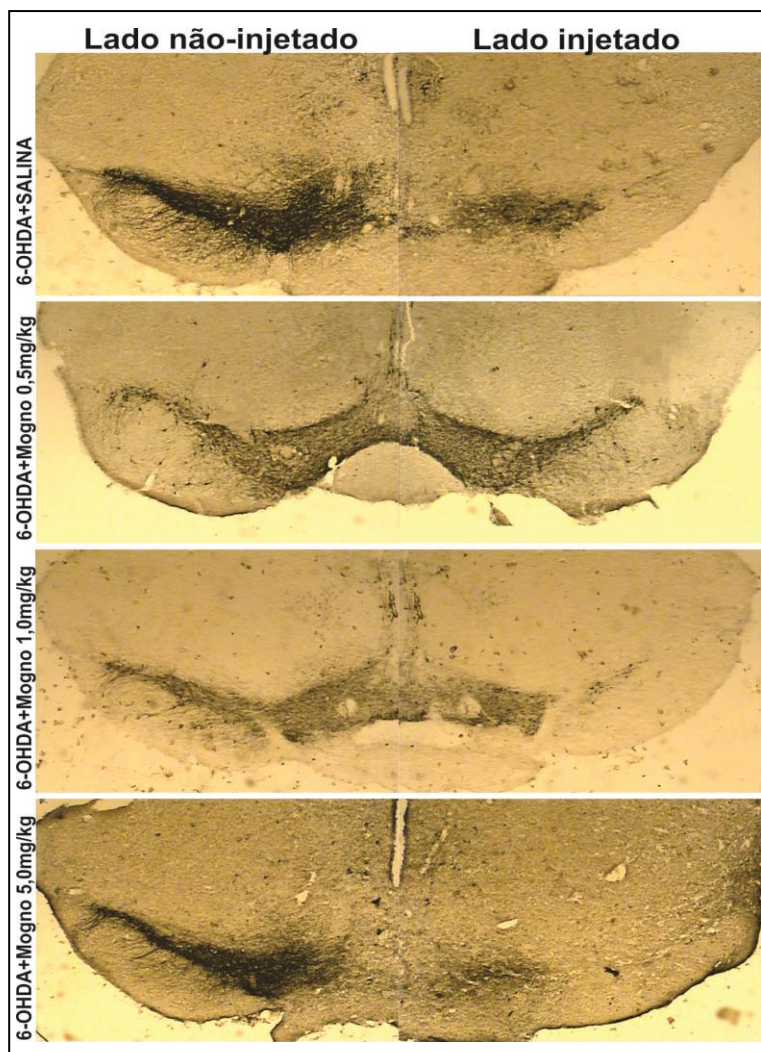
#### 4.3.2 Substância Negra

Na análise dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, quando comparamos o do lado injetado e o lado não-injetado de cada grupo, podemos observar diferença estatisticamente significativa no grupo controle, no grupo

tratado com *S.macrophylla* 1,0 mg/kg e no grupo tratado com *S.macrophylla* 5,0 mg/kg. Não havendo diferença no grupo tratado com *S.macrophylla* 0,5 mg/kg (Figura 22 e 23) (Tabela 2).



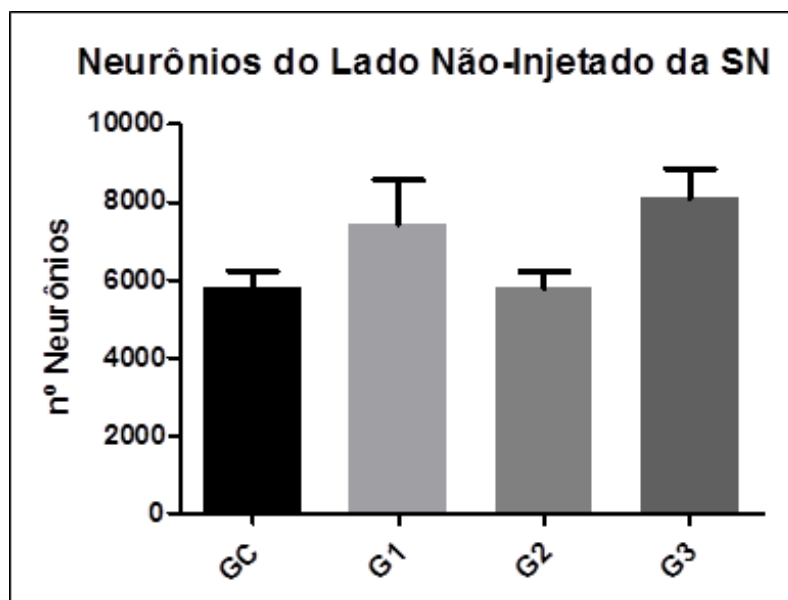
**Figura 22:** Comparação entre os números de neurônios dopaminérgicos do lado injetado e do lado não-injetado de cada grupo. A: Grupo Controle (6-OHDA + Salina), B: Grupo 1 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 0,5mg/kg), C:Grupo 2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0mg/kg), D: Grupo 3(6-OHDA+ *S.macrophylla* 5,0mg/kg). Nota-se diferença estatisticamente significativa no grupo controle, no grupo 2 e 3. ( $p^* < 0,05$ ).



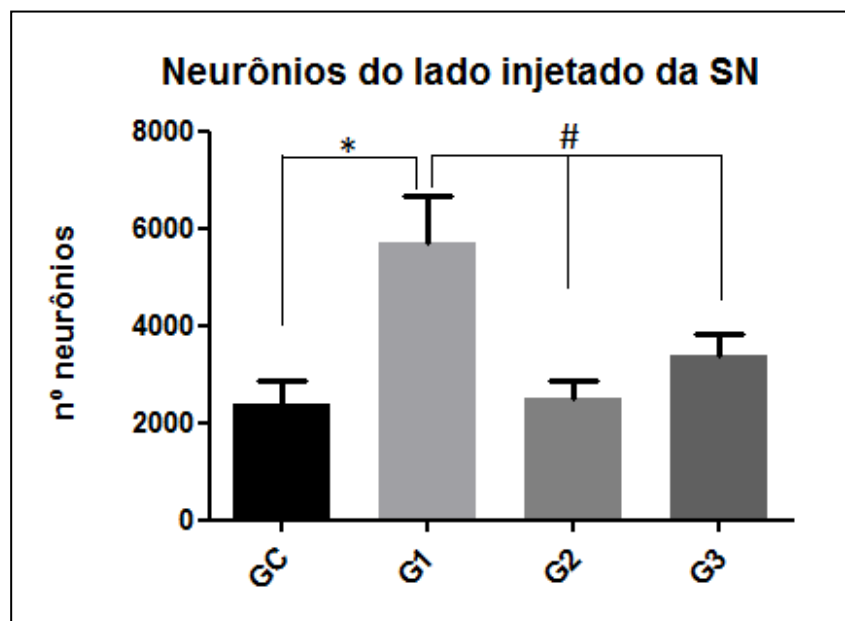
**Figura 23** : Fotomicrografias representativas da SN do lado não-injetado (esquerda) e lado injetado (direito). De Cima para baixo, grupo controle (6-OHDA +salina), G1 (6-OHDA + *S.macrophylla* 0,5 mg/kg), G2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0 mg/kg) e G3 (6-OHDA + 0,5 mg/kg).

	GC (4 animais)	G1 (4 animais)	G2 (5 animais)	G3 (4 animais)
<b>Lado Não-Injetado (Média)</b>	5784	7438	5790	8116
<b>Lado Injetado (Média)</b>	2370	5722	2494	3392
<b>Valor de P</b>	p= 0,02	p=0,3	p=0,007	p= 0,02

Quando realizada a análise intergrupo dos neurônios dopaminérgicos do lado não-injetado, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 24). No entanto, na análise do lado injetado encontramos diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e todos os outros grupos (Figura 25), com o G1 apresentando maior número de neurônios dopaminérgicos do que os demais grupos

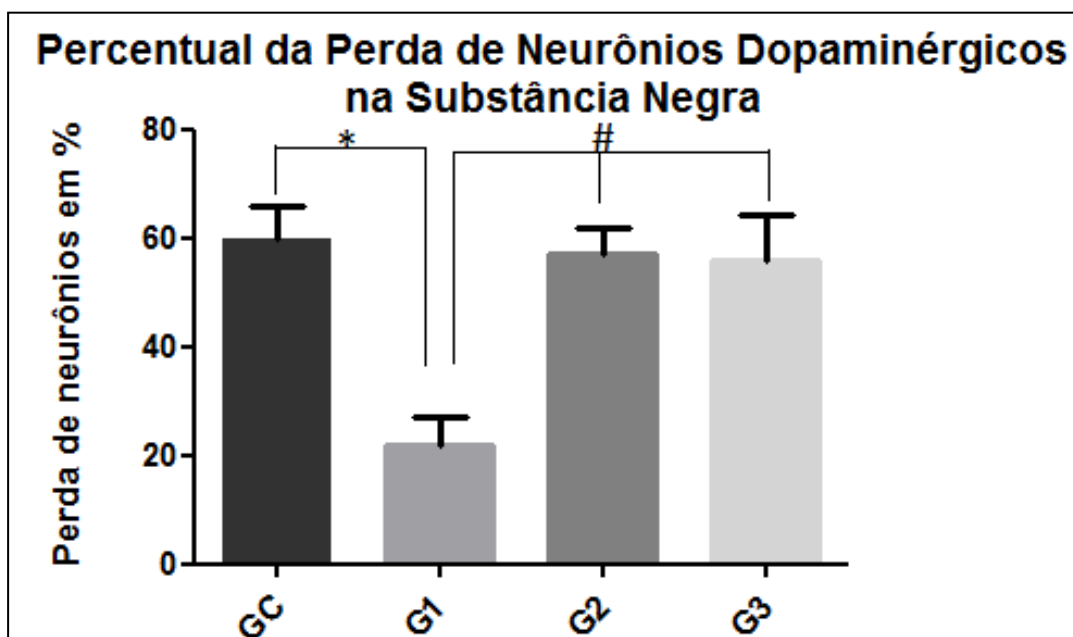


**Figura 24:** Comparação intergrupo do número de neurônios dopaminérgicos do lado não-injetado. GC: Grupo Controle (6-OHDA + Salina), G1: Grupo 1 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 0,5mg/kg), G2: Grupo 2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0mg/kg), G3: Grupo 3 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 5,0mg/kg). Não houve diferença estatisticamente significativa. ( $p > 0,05$ ).



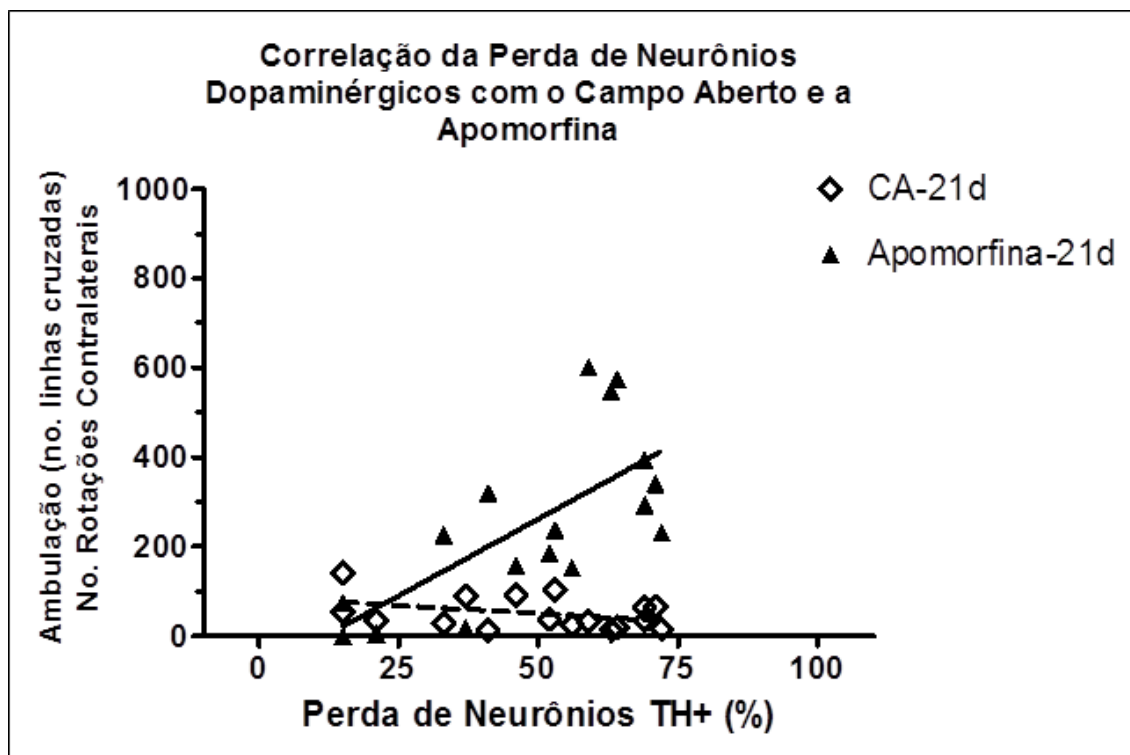
**Figura 25:** Comparação intergrupo do número de neurônios dopaminérgicos do lado injetado. GC: Grupo Controle (6-OHDA + Salina), G1: Grupo 1 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 0,5mg/kg), G2: Grupo 2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0mg/kg), G3: Grupo 3 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 5,0mg/kg). Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e todos os outros grupos. ( $p^{*#}<0,05$ ).

Quando calculada a porcentagem de perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra, observou-se que o grupo controle e os grupos tratados com 1,0 mg/kg ou 5,0 mg/kg de *S.macrophylla* apresentaram cerca de 60% de perda no lado injetado, contra 20% do grupo tratado com *S.macrophylla* 0,5 mg/kg (Figura 26).



**Figura 26:** Cálculo em porcentagem da perda de neurônios dopaminérgicos em cada grupo, considerando o lado não-injetado como 100%. GC: Grupo Controle (6-OHDA + Salina), G1: Grupo 1 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 0,5mg/kg), G2: Grupo 2 (6-OHDA + *S.macrophylla* 1,0mg/kg), G3: Grupo 3 (6-OHDA+ *S.macrophylla* 5,0mg/kg). Nota-se que houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1 e todos os outros grupos. ( $p^{*#}<0,05$ ).

Quando realizamos a correlação entre a perda neuronal, e os parâmetros comportamentais de ambulação e rotação no 21º dia, foi encontrado que apenas o comportamento rotatório da apomorfina apresentou correlação com a perda neuronal ( $p < 0,05$ ;  $r^2: 0,69$ ) (Figura 27). A perda neuronal em porcentagem do lado injetado foi calculada em relação ao lado não-injetado.



**Figura 27:** Correlação entre a perda de neurônios dopaminérgicos em porcentagem do lado injetado e parâmetros comportamentais do campo aberto (CA) e da apomorfina no 21º dia. Nota-se correlação apenas com o teste da apomorfina ( $p < 0,05$ ;  $r^2: 0,69$ ).

## 5- DISCUSSÃO

Em nosso estudo, camundongos suíços sofreram lesão através de uma única injeção no estriado esquerdo e foram tratados com veículo ou com extrato de folhas de *S.macrophylla* nas doses de 0,5, 1,0 e 5,0 mg/kg durante 7 dias após a lesão com 6-OHDA. A ambulação foi avaliada pelo teste de campo aberto enquanto que a neuroproteção no sistema nigroestriatal foi aferida pelo teste das rotações induzidas por apomorfina e pela análise histológica dos neurônios nigroestriatais. Os resultados obtidos são discutidos a seguir.

### 5.1- *Swietenia macrophylla*

A *Swietenia macrophylla* é uma importante planta medicinal utilizada nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (MOGHADANTOUSI *et al.*, 2013). Alguns estudos demonstram que seus principais compostos são limonóides e componentes fenólicos, como os flavonoides, os quais lhe conferem uma característica antioxidante (LOBO *et al.*, 2006; SÁ, 2010).

Em diversos países a *Swietenia macrophylla* vem sendo usada para tratar diversas doenças devido a seus efeitos antimicrobial, anti-inflamatório e antioxidante (MOGHADANTOUSI *et al.*, 2013).

Na Malásia, seu caule é usado tradicionalmente para tratar hipertensão, diabetes e alívio da dor (MOGHADANTOUSI *et al.*, 2013). Em uma comunidade na Bolívia, seu uso foi retratado para tratamento de leishmaniose (BOURDY *et al.*, 2000). Na Indonésia há relatos do seu uso em diabetes, hipertensão e malária (KADOTA, 1990).

Estudo prévio em culturas mistas de cerebelo expostas a metilmercúrio (MeHg) mostrou que o tratamento realizado durante a lesão em regime subcrônico do extrato aquoso de mogno, resultou em evidente proteção ante a perda celular induzida por MeHg, restaurando os valores de viabilidade celular para valores próximos encontrados em poços-controle. Por sua vez, estratégias de pré-exposição ao extrato resultaram em efeitos mais discretos, enquanto que a pós-exposição não mostrou efeitos significativos (LOPES, 2009).

### 5.2- ANÁLISE COMPORTAMENTAL: TESTE DO CAMPO ABERTO

Em nossos resultados encontramos uma diminuição na ambulação dos animais, avaliada pelo teste do campo aberto, em todas as concentrações de



mogno utilizadas. Ramos (2012) ao fazer uso do extrato aquoso de *S.macrophylla* na concentração de 0,5 mg/kg em camundongos com modelo de 6-OHDA como pós-tratamento, também encontrou diminuição na ambulação dos animais após 7 dias de lesão. Este resultado também foi encontrado por Tapias *et al.* (2013) ao utilizarem o suco de pomegranato (romã) que possui polifenóis em seus constituintes na concentração de 0,6-0,7 mg via oral 7 dias antes da lesão com rotenona.

No entanto outros estudos de neuroproteção e modelo de DP com 6-OHDA encontraram resultados diferentes do nosso. Chaturvedi *et al.* (2006), por exemplo, utilizou o chá preto via oral, que possui em sua composição catequinas e flavonóides, em ratos antes e após a injeção de 6-OHDA, totalizando 42 dias de tratamento e no outro grupo o chá era dado somente depois da injeção (21 dias de tratamento). Eles encontraram um grau de melhora maior na atividade locomotora, na diminuição da perda de neurônios TH<sup>+</sup> e na diminuição de expressão dos receptores D2 no grupo que recebeu tratamento antes e depois da 6-OHDA. Nesse trabalho, o chá utilizado no tratamento possui alguns constituintes do mogno, mas seus resultados são diretamente comparáveis já que o mesmo foi realizado em ratos, recebeu tratamento pré e pós lesão, além da duração do tratamento ter sido maior do que no nosso estudo.

Shobana *et al.* (2012) utilizaram extrato alcoolico de *Bacopa Monniera Linn* (planta medicinal utilizada para epilepsia e ansiedade) por via oral na concentração de 20 e 40 mg/kg, 21 dias antes da cirurgia com 6-OHDA, também encontraram melhora na atividade locomotora dos animais, com diminuição da glutathione redutase, glutathione-s-transferase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase. Esse estudo foi realizado em ratos, sendo a via de administração do extrato diferente da nossa.

Ahmad *et al.* (2005;2006) em seus dois trabalhos utilizaram os extratos de *Ginkgo biloba* e *Nardostachy jatamansi* nas concentrações de 50, 100, 150 e 200, 400 e 600 mg/kg, respectivamente, por três semanas em ratos antes da injeção de 6-OHDA, obtiveram como resultado uma melhora na atividade locomotora, sendo esta melhora associada a um aumento da densidade das fibras TH<sup>+</sup> para os dois tratamentos.

A maioria dos estudos de neuroproteção (AHMAD *et al.*, 2005; 2006; SHOBANA *et al.*, 2012; CHATURVEDI *et al.*, 2006) utilizam o campo aberto para avaliar melhora ou piora da atividade locomotora dos animais. No entanto, o campo aberto foi criado por Hall em 1934 para o estudo da emocionalidade em ratos. Portanto, um baixo grau de ambulação dos animais poderia refletir uma resposta de medo ou de ansiedade frente à exposição de um novo ambiente (PRUT; BELZUNG, 2003). Alguns autores propõem o emprego deste modelo na avaliação da ansiedade, considerando-se que uma diminuição na ambulação do animal poderia ser indicativo de uma redução da mesma (CAROLA *et al.*, 2002). Neste contexto, nossos resultados demonstraram uma diminuição na ambulação dos animais, especialmente acentuada com as doses maiores de extrato de *S. macrophylla* (1,0 e 5,0 mg/kg), o que pode sugerir que o mogno tenha tido algum efeito ansiolítico nos mesmos visto que não houve, nesses grupos, incremento na morte de neurônios dopaminérgicos que pudesse indicar um efeito tóxico. Seria fundamental confirmar esse efeito em futuros estudos utilizando mais testes para aferição de ansiedade.

### 5.3 - TESTE DA APOMORFINA E CONTAGEM DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS DA SUBSTÂNCIA NEGRA

O teste comportamental com apomorfina, um agonista dopaminérgico, tem como objetivo avaliar o grau de degeneração da via nigroestriatal, pois em modelos de hemiparkinsonismo, ocorre um aumento da expressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado, ou seja, os agonistas dopaminérgicos terão seus efeitos potencializados pela hipersensibilização dos receptores de dopamina nos neurônios pós-sinápticos estriatais do lado injetado (BETARBET *et al.*, 2002; PRZEDBORSKI *et al.*, 1995).

Em nossos resultados encontramos que o *S. macrophylla* na concentração de 0,5 mg/Kg provocou diminuição no número de rotações contralaterais, associada com diminuição da perda de neurônios dopaminérgicos em relação ao controle, enquanto que as concentrações 1,0 e 5,0 mg/kg não aumentaram as rotações, e nem a perda neuronal em relação ao grupo controle injetado com 6-OHDA e tratado com veículo. Ramos (2012), em seu estudo com extrato de folhas de *S. macrophylla* (0,5 mg/kg) em hemiparkinsonismo com 6-OHDA também não encontrou aumento no número

de rotações, ou diminuição no número de neurônios dopaminérgicos no grupo tratado com o extrato em comparação ao grupo 6-OHDA veículo após sobrevivência de 7 dias. Portanto, os efeitos neuroprotetores com a dose de 0,5 mg/kg só ficaram evidentes após 21 dias de sobrevivência, sugerindo que o extrato de *S.macrophylla* potencializou a recuperação dos neurônios e impediu a progressão da morte celular. As doses maiores, de 1,0 e 5,0 mg/kg usadas neste trabalho não protegeram mas também não aumentaram a toxicidade da 6-OHDA.

Estudo em culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo ventral, onde as mesmas foram expostas a rotenona e ao extrato de folhas de *S.macrophylla* nas doses de 1, 10, 15, 20 e 30 µg/ml descreveram um efeito tóxico apenas na concentração de 30 µg/ml. As demais concentrações não ocasionaram redução significativa na viabilidade celular, quando comparadas ao controle (MARTINS-FILHO, 2011).

Vários estudos de neuroproteção com o modelo de 6-OHDA têm relatado resultados positivos. Por exemplo, Cadet *et al.* (1989) encontraram diminuição no número de rotações com o pré-tratamento com vitamina E 14 dias após lesão com 6-OHDA em ratos. Ahmad *et al.* (2005; 2006) como já citado anteriormente, em seus dois trabalhos utilizaram os extratos *Ginkgo biloba* e *Nardostachy jatamansi* nas concentrações de 50, 100, 150 e 200, 400 e 600 mg/kg, respectivamente, por três semanas em ratos antes da injeção de 6-OHDA, também encontraram uma diminuição de rotações dose-dependentes.

Estudos testando o efeito de drogas antimicrobianas, como a doxiciclina e a minociclina, em modelos de 6-OHDA, também demonstram neuroproteção já com 14 dias de tratamento (LAZZARINI *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2001).

Pesquisas com modelos com MPTP, utilizando extratos de plantas com polifenol, curcuminóide e *Acorus gramineus*, demonstram que a diminuição na perda de neurônios dopaminérgicos, vem sendo associado com diminuição da expressão da proteína GFAP, das citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (OJHA *et al.*, 2012; JIANG *et al.*, 2012).

As concentrações de *S.macrophylla* 1,0 e 5,0 mg/kg, como já citado anteriormente, aumentaram a perda de neurônios dopaminérgicos dose-dependentes, que apesar de não serem estatisticamente diferentes do controle,

potencializaram os efeitos da 6-OHDA. Tapias *et al.* (2013), ao utilizarem o suco de pomegranato (romã), que possui polifenóis em sua constituição, na concentração de 0,6 mg via oral 7 dias antes da lesão com rotenona, encontraram um aumento da perda de neurônios TH+, o que foi associado ao aumento de nitrotirosina, à indução da formação de óxido nítrico e à ativação de caspase 3 nos neurônios dopaminérgicos, o que eles colocam como consistente com um potencial pró-oxidante.

Zbarsky *et al.* (2005) utilizaram os flavonoides curucumina (50 mg/kg), quercetina (20 mg/kg), naringenina (50 mg/kg) e fisetina (20 mg/kg) em um esquema de 4 dias de pré-tratamento à injeção de 6-OHDA em ratos e obtiveram como resultados que a curucumina e a quercetina conseguiram neuroproteger. No entanto a naringenina e a fisetina não alcançaram a mesma finalidade, o que foi associado à variabilidade do metabolismo, à flora intestinal, à disponibilidade sistêmica e à capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Na espectrofotometria de massa das folhas de mogno, como já citado anteriormente, foi encontrada a presença dos flavonoides quercetina e naringenina (Sá, 2010).

Estudos que envolvem o uso de terapias para câncer demonstram que o uso de polifenóis para este objetivo envolve a característica pró-oxidante dos mesmos. Eles estariam envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio, na disfunção mitocondrial, efeitos esses que levariam a apoptose dos tumores (GALATI; O'BRIAN, 2003; HADI *et al.*, 2007; HANIF *et al.*, 2008 ).

Não sabemos quais mecanismos estão envolvidos na terapia com mogno, mas Cao *et al.* (2007) observou a atividade antioxidante e próoxidante de algumas flavonas através da capacidade de absorção de espécies reativas de oxigênio e propôs que a eficácia dos mesmos para as duas atividades dependia do número de hidroxilas substituídas no anel principal. Em geral aquele composto que tem maior número de hidroxilas substituídas possui maior atividade tanto antioxidante quanto próoxidante. Ao analisarem diversas flavonas, entre elas a quercetina e a miricetina, que estão presentes no extrato de mogno, viram que são as duas com maior poder antioxidante e pró-oxidante (5 e 6 OH substituídas, respectivamente), atuando como antioxidantes quando estavam na presença de radicais peroxilas e hidroxilas, e pró-oxidantes na presença de  $\text{Cu}^+$ .

Segundo Babich *et al* (2011) pode-se esperar três respostas celulares distintas da exposição a polifenóis, com cada resposta dependente da natureza e da concentração da atividade pro-oxidante dos mesmos. A primeira seria, frente a uma exposição moderada, tem-se um estresse oxidativo leve, e assim inflamação nos sistemas de defesa antioxidantes celulares. A segunda, uma exposição de intermediária para alta, domina gradualmente o sistema de defesa e induz a morte celular por apoptose. A terceira, uma exposição muito elevada, rapidamente domina a defesa de antioxidantes celulares, causando dano oxidativo, e assim levando a morte celular por necrose. Portanto, dependendo da dose utilizada, o extrato de *S.macrophylla* poderia ter efeito pró- ou anti-oxidante.

Bouayed e Bohn em uma revisão de 2010 ressaltam que o equilíbrio entre a oxidação e a antioxidação é essencial para a manutenção das condições fisiológicas normais. Nossos sistemas de defesa antioxidante endógeno são incompletos sem a presença do sistema de defesa exógeno originários de compostos como: vitamina C, vitamina E, carotenoides e polifenóis; portanto há uma demanda contínua por antioxidantes exógenos, com a finalidade de prevenir o estresse oxidativo, entretanto doses elevadas de compostos isolados podem ser tóxicos, levando a alteração do equilíbrio redox.

#### 5.4 PRINCIPAIS ACHADOS DO TRABALHO

Resumidamente, o tratamento com *S.macrophylla* nas concentrações de 0,5, 1,0 e 5,0 mg/kg durante 7 dias após a lesão com 6-OHDA provocou diminuição na ambulação dos animais, avaliada pelo teste do campo aberto em todas as concentrações. Quando analisamos o teste da apomorfina, a concentração de mogno 0,5 mg/kg causou diminuição no número de rotações contralaterais em relação ao grupo controle, sendo confirmado pela análise histológica, onde também encontramos diminuição na perda de neurônios dopaminérgicos nesta concentração.

Por outro lado, as concentrações de 1,0 e 5,0 mg/kg não conferiam neuroproteção, sendo o número de rotações contralaterais e percentual de perda dopaminérgica equivalente ao observado no grupo controle (6-OHDA/veículo).

## 6- CONCLUSÃO

O nosso estudo demonstrou que todas as concentrações de extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* utilizadas, ocasionaram uma diminuição na ambulação dos camundongos, sugestiva de um possível efeito ansiolítico.

Encontramos ainda que a concentração de 0,5 mg/kg promoveu um efeito neuroprotetor na via nigroestriatal, ocasionando uma diminuição no número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina, associado com uma diminuição significativa na neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos no modelo de doença de Parkinson com 6-hidroxidopamina em camundongos.

Sugerimos que outros estudos para a análise dos mecanismos do tratamento com *Swietenia macrophylla* em modelo de Parkinson devem ser desenvolvidos, para melhor avaliarmos seus efeitos.

## REFERÊNCIAS

AHMAD M et al. Attenuation by *Nardostachys jatamansi* of 6-hydroxydopamine induced parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical and immunohistochemical studies. **Pharmacology Biochemistry Behavior**. v.83, p. 150-160, 2006.

AHMAD M et al. *Ginkgo biloba* affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats : neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. **Journal of Neurochemistry**. v.93, p. 94-104, 2005.

ALAM M; SCHMIDT WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioural Brain Research**. v.136, p.317-324, 2002.

ALBARRACIN SL; STAB B; CASAS Z; SUTACHAN JJ; SAMUDIO I; GONZALEZ J; GONZALO L; CAPANI F; MORALES L; BARRETO GE. Effects os natural antioxidants in neurodegenerative disease. **Nutritional Neuroscience**. v.15, n.1, 2012.

ANGELO H; BRASIL A.A; SANTOS J.Madeiras tropicais: Análise econômica das principais espécies florestais exportadas. **Acta Amazônica**. v.31, n.2, p. 237-248,2001.

ANTONY PMA; DIEDERICH NJ; BALLING R. Parkinson´s disease mouse models in translational research.**Mamm Genome**. 2011.

BABICH H et al. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals. **Journal of Toxicology**. v.2011. 2011.

BARBOSA M.T; CARMELLI P; MAIA D.P; CUNNINGHAM M.C.Q; GUERRA H.L; LIMA-COSTA M.F; CARDOSO F. Parkinsonism and Parkinson´s disease in the elderly: a community- based survey in Brazil (The bambuí study). **Movement Disorders**. v.21, n.6, p. 800-808, 2006.

BEAL MF. Experimental models of parkinson´s disease. **Nature**. v.2,p.325-332, 2001.

BEAL MF; MATTHEWS RT; TIELEMAN A; SHULTS CW. Coenzyme Q10 attenuates the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,tetrahydropyridine (MPTP) induced loss of striatal dopamine and dopaminergic axons in aged mice. **Brain Research**. v.783, n.1, p-109-114, 1998.

BETARBET, R. SHERER, T.B. AND GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**, v.4, p.308-318, 2002.

BETARBET, R, GREENAMYRE, J. T. Parkinson´s disease: animal models. **Handbook of Clinical Neurology**. v.83, p.265-287, 2007.

BETARBET R et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience**. v.3, p.1301-1306, 2000.

BEZARD E; DOVERO S; PRUNIER C; RAVENSCROFT P; CHALON S; GUILLOTEAU D; CROSSMAN AR; BIOULAC B; BROTCHE JM; GROSS CE. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-lesioned macaque model of parkinson's disease. **Journal of Neuroscience**. v.21, p.6853-6861, 2001.

BLANDINI F; NAPPI G; TASSORELLI C; MARTIGNONI E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**. V.62, p. 63-68, 2000.

BONNEH-BARKAY D; REANEY SH; LANGSTON WJ; DI MONTE DA. Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial culture. **Molecular Brain Research**. v.134, p.52-56, 2005.

BOUAYED J; BOHN T. Exogenous antioxidants-double-edged swords in cellular redox state. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.3, n.4, p-228-237, 2010.

BOURDY C et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**. v.70, p. 87-109, 2000.

BOVÉ J; PROU D; PERIER C; PRZEDBORSKI. Toxin-induced models of parkinson's disease. **The Journal of American Society for Experimental Neurotherapeutics**. v.2, p. 484-494, 2005.

CADET JL; KATZ M; LEWIS VJ; FAHN S. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. **Brain Research**. v.476, p-10-15, 1989.

CAMPOS HC; ROCHA MD; VIEGAS FP; NICASTRO PC; FOSSALUZZA PC; FRAGA CAM; BARREIRO EJ; VIEGAS CJ. The role of natural products in the Discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders I: Parkinson's disease. **CNS e Neurological Disorders- Drug Targets**. v.10, n.2, 2011.

CANON J.R; GREENAMYRE J.T. Neurotoxic in vivo models of parkinson's disease recent advances. **Prog Brain Res**. v.184, p. 17-33, 2010.

CAO G et al. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free radical Biology and Medicine**. V.22, n.5, p. 749-760, 1997.

CAROLA V et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests of assessment of anxiety related behavior inbred mice. **Behavioural Brain Research**. v.134, p. 49-57, 2002.



CASLAKE R; TAYLOR K; SCOTT N et.al. Age-gender-, and socioeconomic status-specific incidence of Parkinson´s disease and parkinsonism in North East Scotland: The PINE study. **Parkinsonism and Related Disorders**. v.19, p.515-521, 2013.

CASTELLO PR; DRECHSELL DA; PATEL M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. **The Journal of Biological Chemistry**.v.282, n.19, p. 14186-14193, 2007.

CHAN P; DELANNEY LE; IRWIN I; LANGSTON W; DI MONTE D. Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4phenyl-1,3,5,6-tetrahydropyridine in mouse brain. **Journal of Neurochemistry**. 1991.

CHATURVEDI RK et al. Neuroprotective and neurorescue effect of black tea extract in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson´s disease. **Neurobiology of Disease**. v.22, p-421-434, 2006.

CHOI WS; KRUSE SE; PALMITER RD; XIA Z. Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+ , or paraquat. **PNAS**. v. 105, n.39, p. 15136-15141, 2008.

CLEREN C; YANG L; LRENZO B; CALINGASAN NY; SCHOMER A; SIRECI A; WILLE EJ; BEAL MF. Therapeutics effects of coenzyme Q10 (C0Q10) and reduced C0Q10 in the MPTP model of parkinsonism. **Journal of Neurochemistry**.v.104, p.1613-1621, 2008.

CRAGG GM; NEWMANN DJ; SNADER, KM. Natural products in drug discovery and development. **J.Nat.Prod**. v.60, p. 52-60, 1997.

DAS S.K; MISRA A.K; RAY B.K; HAZRA A; GHOSAL M.K; CHAUDHURI A; ROY T; BANERJEE T.K; RAUT D.K. Epidemiology of Parkinson disease in the city of Kolkata. **India Neurology**. v.75, n.1362, 2010.

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

DAWSON,T.M; DAWSON, V.L. Molecular pathways of neurodegeneration in parkinson´s disease. **Science**, v.302, 2003.

DORNAS WC et al. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v.28, n.3, p.241-249, 2007.

DUNCAN G.W; KHOO T.K; COLEMAN S.Y et al. The incidence of parkinson´s disease in the North-East of England. **Age and Ageing**. p.1-7,2013.

FAHN S; SULZER D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics**. v 1, p. 139-154, 2004.

FALAH S et al. **Chemical constituents from Swietenia macrophylla bark and their antioxidant activity.** Pakistan Journal of Biological Sciences. . v.11, n.16, p.2007-2012, 2008.

FISCHER DA; HENZE C; STRENZKE C; WESTRICH J; FERGER B; HOGLINGER GU; OERTEL WH; HARTAMANN A. Characterization of the striatal 6-OHDA model of parkinson's disease in wild type and  $\alpha$ -synuclein-deleted mice. **Experimental Neurology.** v.210, p.182-193, 2008.

FLEURY, M; MIGNOTTE, B; VAYSSIÈRE, J. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. **Biochimie.** v.84, p.131-141, 2002.

GALATI G; O'BRIEN PJ. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology e Medicine.** v.37, n.3, p.287-303, 2004.

GROGAN, J; BARRETO, P; VERÍSSIMO, A. **Mogno na Amazônia Brasileira: Ecologia e Perspectiva de Manejo.** Belém: Imazon, 2002.

HADIS M et al. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. **Seminars in Cancer Biology.** v.17, p. 370-376, 2007.

HALDI A; LOTHARIUS J. Oxidative stress and inflammation on Parkinson's disease: Is there a cause link? **Experimental Neurology.** v.193. p.-279-290. 2005.

HANIF S et al. The anthocyanidin delphinidin mobilizes endogenous copper ions from human lymphocytes leading to oxidative degradation of cellular DNA. **Toxicology.** v.249, p.19-25, 2008.

HATTORI N; KOBAYASHI H; SASAKI-HATANO Y; SATO K; MIZUNO Y. Familial parkinson's disease: a hint to elucidate the mechanisms of nigral degeneration. **J Neurol.** v.250, n.03, 2003.

HE Y; APPEL S; LE W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. **Brain Research.** v.909, p. 187-193, 2001.

HEIM K.E; TAGLIAFERRO A.R; BOBILYA D.J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of nutritional biochemistry.** v.13, p. 572-584, 2002.

HINDLE J.V. Ageing, neurodegeneration and parkinson's disease. **Age and Ageing.** v.37, p. 156-161, 2010.

HIRSCH E.C. Animals models in neurodegenerative diseases. **Journal of Neural Transmission.** v.72, p. 87-90, 2007.

HISAHARA S; SHIMOHAMA S. Toxin induced and genetic animal models of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**. v.2011, 2010.

HODAIE M; NEIMAT J.S; LOZANO A.M. The dopaminergic nigrostriatal system in parkinson's disease: Molecular events in development, disease, and cell death, and new therapeutic strategies. **Neurosurgery**, v.60, n.1, 2007.

HOGLINGER GU et al. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. **Journal of Neurochemistry**. v.84, p.491-502, 2003.

JAIN S; WOOD N.W; HEALY D.G. Molecular genetic pathways in parkinson's disease: a review. **Clinical Science**. v.109, p. 355-364, 2005.

JEON BS; LEWIS VJ; BURKE RE. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: Time course and morphology of cell death. **Neurodegeneration**.v4, p.131-137, 1995.

JIANG J et al. *Acorus gramineus* inhibits microglia mediated neuroinflammation and prevents neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- induced mouse model in Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**. v.144, p. 506-513, 2012.

JÚNIOR MJVL; GALVÃO MS. **Mogno *Swietenia macrophylla* King**. Informativo Técnico Rede de Sementes da Amazônia. n.8, 2005.

KATZENSCHLAGER R; LEES AJ. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. **J Neurol**. v.249, n 2, 2002.

KIEBURTZ K. Designing neuroprotection trials in parkinson's disease. **Ann Neurol**. v.53, n.3, p.100-109, 2003.

LAU L.M.L; GIESBERGEN P.C.L.M; RIJK M.C; HOFMAN A; KOUDSTAAL P.J; BRETELER M.M.B. Incidence of parkinsonism and Parkinson disease in a general population: The Rotterdam Study. **Neurology**. v.63, n.1240, 2011.

LAZZARINI M et al. Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. **Wiley periodicals**. v.000, n.000, 2013.

LINDER J.L; STENLUND H; FORSGREN L. Incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in Northern Sweden: A population based-study. **Movement Disorders**. v.25,n.3,p.341-348, 2010.

LÔBO LT et al. Limonóides de *Swietenia macrophylla* king. In: 29ª Reunião anual da sociedade brasileira de química, 29.,2006, Águas de Lindóia. **Anais...Águas de Lindóia**: SBQ, 2006.

LOPES, DCF. Efeitos citoprotetores do extrato aquoso de folhas do mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo in vitro de exposição mercurial. 2009.

Dissertação (Mestrado em Neurociências) – Programa de Pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular. Universidade Federal do Pará.

MACHADO, A. **Neuroanatomia Funcional**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

MIGLIORE L; COPPEDÉ F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutation Research**. v. 674, p. 73-84, 2009.

MARTINS-FILHO, AJM. **Modelo in vitro da doença de Parkinson: Efeitos neurotóxicos da rotenona em diferentes populações neuronais**. 2006. 126 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém. 2006.

MARTINS-FILHO, AJM. **Modelo in vitro de parkinsonismo experimental induzido por rotenona: investigação de mecanismos de ação, neuroproteção e morte celular**. 2011. 142 f. Tese (Doutorado em Neurociências e Biologia celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém. 2011.

MIZUNO Y; SUZUKI K; SONE N; SAITOH T. Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain in vivo. **Neuroscience**. v.91, p. 349-353, 1988.

MOGHADAMTOUSI SZ et al. Biological activities and phytochemicals of *Swietenia macrophylla* king. **Molecules**, v.18, 2013.

MOON YJ et al. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicology in Vitro**. v.20, p. 187-210, 2006.

NICKLAS W.J; VYAS I; HEIKKILA R.E. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6-Tetrahydropyridine. **Life Sciences**. v.36, p. 2503-2508, 1985.

NISHIMURA F; YOSHIKAWA M; KANDA S; NONAKA M; YOKOTA H; SHIROI A; NAKASE H; HIRABAYASHI H; OUJI Y; BIRUMACHI J.I; ISHIZAKA S; SAKAKI, T. Potential Use of Embryonic Stem Cells for the Treatment of Mouse Parkinsonian Models: Improved Behavior by Transplantation of In Vitro Differentiated Dopaminergic Neurons from Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**. v. 21, p.171-180, 2003.

NITHIANANTHARAJAH J; HANNAN A.J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Neuroscience**. v.7, n.9, p.697-709, 2006.

OJHA RP et al. Neuroprotective effect of curcuminoids against inflammation-Mediated dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. **J Neuroimmune Pharmacol**. v.7, p. 619-618, 2012.

OLANOW,C.W; TATTON,W.G. Etiology and pathogenesis of parkinson's disease. **Annu.Rev.Neurosci**. v.22, p.123-144,1999.

OLANOW, C.W. The pathogenesis of cell death in parkinson's disease. **Movement Disorders**. v.22, n.17, p.335-342, 2007.

OLANOW C.W; KIEBURTZ K; SCHAPIRA A.H.V. Why have we failed to achieve neuroprotection in parkinson's disease? **Ann Neurol**. v. 64, p. 101-110, 2008.

OLANOW C.W. Can we achieve neuroprotection with currently available anti-parkinsonian interventions? **Neurology**. v. 72, n 59, 2009.

PERUMAL AS; GOPAL VB; TORDZRO WK; COOPER TB; CADET JL. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. **Brain Research**. vol.29, p.699-701, 1992.

PRUT L; BELZUNG C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**. v.463, p. 3-33, 2003.

PURVES, D. **Neurociências**. 2. Ed. São Paulo: Artmed, 2005.

RADAD K; GILLE G; RAUSCH WD. Short review on dopamine agonists: insight into clinical and research studies relevant to parkinson's disease. **Pharmacological Reports**. v.57, p. 701-712; 2005.

RAMOS, LFP. **Efeito do extrato aquoso de folhas de mogno (*Swietenia macrophylla*) em modelo in vivo de doença de Parkinson com lesão com 6-hidroxidopamina**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém. 2012.

RICHARDSON JR; QUAN YU; SHERE TB; GREENAMYRE JT; MILLER GW. Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. **Toxicological Sciences**. v.88, n.1, p.193-201, 2005.

RUDOW G; O'BRIEN R; SAVONENKO A.V; RESNICK S.M; ZONDERMAN A.B; PLETNIKOVA O; MARSH L; DAWSON T.M; CRAIN B.J; WEST M.J; TRONCOSO J.C. Morphometry of the human substantia nigra in ageing and parkinson's disease. **Acta Neuropathol**. v.115, n.4, p. 461-470, 2008.

SÁ P.R.C. **Avaliação do efeito citoprotetor e da capacidade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Swietenia macrophylla* e identificação de ácidos fenólicos e flavonóides por HPLC-DAD e LC-MS/MS**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química)-Programa de pós-graduação em química. Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Universidade Federal do Pará. SAVICA R; ROCCA W.A; AHLSSKOG E.J. When does Parkinson disease start? **Arch Neurol**. v.67, n.7, p.798-801, 2010.

SHIMIZU K; OHTAKI K; MATSUBARA K; AOYAMA K; UEZONO T; SAITO O; SUNO M; OGAWA K; HAYASE N; KIMURA K; SHIONO H. Carrier-mediated

processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Research**. v.906, p.135-142, 2001.

SHOBANA C et al. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. Protects against 6-hydroxydopamine- Induced changes in behavioral and biochemical aspects: A pilot study. **Cell Mol Neurobiol**. v.32, p. 1099-1112, 2012.

SUBRAMANIAM SR; CHESSELET MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**. v.1271,p.1-16, 2013.

SULZER D; SURMEIER DJ. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. **Movement Disorders**. v.28, n.1, 2013.

TAPIAS V et al. Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**. p.1-15. 2013.

THOMAS B; BEAL MF. Parkinson's disease. **Human Molecular Genetics**. v.16, n.2, 2007.

TSENG YT et.al. The Chinese herbal formula Liuwei dihuang protects dopaminergic neurons against parkinson's toxin through enhancing antioxidative defense and preventing apoptotic death. **Phytomedicine**. 2014.

VILA M; PERIER C. Molecular pathways of programmed cell death in experimental Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**. v.14, n.2, p. 176-179, 2008.

WINTER Y; BEZDOLNYY Y; KATUNINA E. Incidence of Parkinson's disease and atypical parkinsonism: Russian population-based study. **Movement Disorders**. v.25,n.3,p.349-356, 2010.

WOODGATE A; MACGIBBON G; WALTON M; DRAGUNOW M. The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and P19 cells. **Molecular Brain Research**. v.69, p.84-92,1999.

XU J et al. Parkinson's disease and risk of mortality: meta-analysis and systematic review. **Acta Neurologica Scandinavica**. 2013.

YADAV et al. *Mucuna pruriens* seed extract reduces oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in paraquat- induced Parkinsonian mouse model. **Neurochemistry International**. v.62, p. 1039-1047, 2013.

ZBARSKY V et al. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Free Radical Research**. v.39, n.10, p.-119-1125, 2005.