



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**AGOMELATINA E NEUROPROTEÇÃO: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA**  
**TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON**

**DAVIS NUNES DE MESQUITA**

**SOBRAL**

**2015**

**DAVIS NUNES DE MESQUITA**

**AGOMELATINA E NEUROPROTEÇÃO: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA  
TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em ciências da saúde.

**Orientador: Prof. Dr..Lissiana Magna  
Vasconcelos Aguiar**

**SOBRAL**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Curso de Medicina de Sobral

---

M543a Mesquita, Davis Nunes de.  
Agomelatina e neuroproteção: uma nova perspectiva para tratamento da doença de  
Parkinson. / Davis Nunes de Mesquita. – 2015.  
60 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina Campus de  
Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2016.

Área de Concentração: Ciências da saúde.

Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

Coorientação: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho.

1. Doença de Parkinson. 2. Oxidopamina. 3. Estresse oxidativo. I. Título.

---

CDD 616.833

**DAVIS NUNES DE MESQUITA**

**AGOMELATINA E NEUROPROTEÇÃO: UMA NOVA PERSPECTIVA PARA  
TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em ciências da saúde.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

---

**Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar**  
**Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral**

---

**Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho**  
**Universidade Federal do Ceará**

---

**Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo**  
**Instituto Superior de Teologia Aplicada**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha esposa Marisa e aos meus filhos Fabricio, Louise e Dayse por terem abdicado do tempo ao meu lado para que este trabalho fosse possível. Aos meus professores e orientadores, em especial à Professora Lissiana pela paciência, atenção e carinho ao me direcionar adequadamente nos caminhos da ciência. Ao Criador no qual deposito minha fé.

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa, caracterizada pela destruição dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos. Há uma busca incessante por agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. Muitos estudos têm contribuído para elucidar a fisiopatologia da doença de Parkinson, e essas descobertas disponibilizam uma variedade de potenciais alvos para terapia neuroprotetora. Estudos demonstraram que a agomelatina (AGO), um naftaleno análogo da melatonina, possui ações neurotróficas, que estariam correlacionadas com possíveis efeitos neuroprotetores demonstrados em alguns estudos com doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a esclerose lateral amiotrófica. O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da agomelatina no modelo animal da doença de Parkinson induzido por 6-OHDA. Ratos Wistar machos (200-250g) foram submetidos à lesão intraestriatal com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo sham, tratado com salina, grupo controle 6-OHDA e os grupos tratados com AGO (5 e 10 mg/kg). Os animais foram tratados 1 hora após a lesão e depois diariamente por 21 dias. No 21º dia, 1 hora após o último tratamento, foi observado o comportamento rotacional induzido por apomorfina, o teste rotarod e o teste de campo aberto e no 22º dia os animais foram sacrificados e as áreas cerebrais retiradas (corpo estriado-NB, hipocampo-HC e córtex pré-frontal-CPF) para a determinação da peroxidação lipídica através do método do TBARS. A Agomelatina reduziu o número de rotações induzida por apomorfina em torno de 20% a 42% em comparação com o grupo controle 6-OHDA. Houve recuperação do déficit motor evidenciado nos testes de rota rod e campo aberto. O tratamento com AGO reduziu o estresse oxidativo, com diminuição dos níveis de nitrito em 55 % em NB na dose de 10 mg/kg em comparação com o grupo controle 6-OHDA. O tratamento com AGO reduziu a peroxidação lipídica no HC em 20 % e 39%, NB em 24 % e 54%, nas doses de 5 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente e no CPF houve redução de 27% na dose de 10 mg/Kg, quando comparado ao grupo 6-OHDA controle. Além de reduzir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica, o tratamento com AGO recuperou os níveis de glutathione. A agomelatina reverteu parcialmente o déficit motor induzido por 6-OHDA e reduziu o estresse oxidativo, mostrando ser um possível agente neuroprotetor.

**PALAVRAS-CHAVES:** Agomelatina, melatonina, doença de Parkinson, estresse oxidativo, parkinsonismo, 6-hidroxi-dopamina.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the destruction of nigrostriatal dopaminergic neurons. There is a constant search for agents capable of inhibiting neuronal degeneration. Many studies have contributed to elucidate the pathophysiology of Parkinson's disease, and these findings provide a variety of potential targets for neuroprotective therapy. Studies have shown that agomelatine (AGO), a naphthalene analog of melatonin, has neurotrophic actions that may be correlated with possible neuroprotective effects shown in some studies with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). This work aims to study the behavioral and neurochemical effects of agomelatine in the animal model of Parkinson's disease induced by 6-OHDA. Male Wistar rats underwent lesion with intrastriatal 6-hydroxydopamine (6-OHDA). The animals were divided into 4 groups: sham group treated with saline; 6-OHDA control group and the groups treated with AGO (5 and 10 mg / kg). The animals were treated one hour after the lesion and daily thereafter for 21 days. At day 21, one hour after the last treatment, apomorphine-induced rotational behavior was observed, the behaviors tests rotarod and openfield were performed and in the 22th day the animals were sacrificed and the brain areas removed (striatum body-NB, hippocampus-HC and prefrontal cortex-CPF) for determination of lipid peroxidation by TBARS method. AGO reduced the number of apomorphine-induced rotations around 20% to 42% compared with the control group 6-OHDA. There was partial recovery of the motor deficit evidenced both the rota rod tests and open field test. Treatment with AGO reduced oxidative stress, with decreased levels of nitrite by 55% in the NB at the dose of 10 mg / kg compared with the 6-OHDA control group. Treatment with AGO reduced lipid peroxidation in HC by 20% and 39%, in NB at 24% and 54% at doses of 5 mg / kg and 10 mg / kg, respectively, and in the CPF there was 27% reduction in the dose of 10 mg / kg, compared to group 6-OHDA control. In addition to reducing oxidative stress and lipid peroxidation, treatment with AGO recovered glutathione levels. Agomelatine partially reversed motor deficits induced by 6-OHDA and reduced oxidative stress, showing that a potential neuroprotective agent.

Keywords: Agomelatine, melatonin, Parkinson's disease, oxidative stress, parkinsonism, 6-hydroxidopamin.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
1.1	Epidemiologia da doença de parkinson .....	8
1.2	Modelo experimental da doença de Parkinson.....	9
1.3	Fisiopatologia da doença de parkinson .....	9
1.3.1	<i>Agregação proteica da alfa sinucleína e comportamento priônico</i> .....	10
1.3.2	<i>Deficiência na proteólise</i> .....	11
1.3.3	<i>Disfunção mitocondrial</i> .....	11
1.3.4	<i>Estresse oxidativo</i> .....	12
1.3.5	<i>Metabolismo do ferro</i> .....	14
1.3.6	<i>Mecanismos imunológicos e inflamatórios</i> .....	14
1.3.7	<i>Neurotransmissão monoaminérgica na Doença de Parkinson</i> .....	15
1.3.8	<i>A hipótese do duplo golpe</i> .....	16
1.3.9	<i>Genética e doença de Parkinson</i> .....	16
1.4	Agomelatina e a doença de Parkinson.....	16
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA</b> .....	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
3.1	Geral.....	20
3.2	Específicos .....	20
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>21</b>
4.1	Animais.....	21
4.2	Aspectos éticos .....	21
4.3	Delineamento experimental .....	21
4.4	Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA .....	23
4.5	Estudo comportamental.....	24
4.5.1	<i>Teste rotacional</i> .....	24
4.5.2	<i>Teste do bastão rotatório (Rotarod)</i> .....	24



4.5.3	<i>Teste do Campo Aberto</i> .....	24
4.6	Dissecação das áreas cerebrais .....	25
4.7	Determinação da concentração de nitrito .....	25
4.8	Determinação da peroxidação lipídica .....	26
4.9	Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).....	26
4.10	Análise estatística.....	27
5	<b>RESULTADOS</b> .....	28
5.1	Teste rotacional: .....	28
5.2	Teste rota rod (bastão rotatório) .....	30
5.3	Teste do campo aberto .....	34
5.4	Dosagem de nitrito.....	37
5.5	Determinação da peroxidação lipídica .....	41
5.6	Glutathiona .....	45
6	<b>DISCUSSÃO:</b> .....	49
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	52
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson é caracterizada por uma degeneração lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, e apresenta como sintomas clínicos principais o tremor de repouso, a rigidez, a bradicinesia-hipocinesia, a postura em flexão, a perda dos reflexos posturais e o fenômeno do congelamento (MOSLEY et al., 2006).

A razão dos pacientes portadores da doença de Parkinson exibirem baixos níveis de dopamina cerebral ocorre devido à degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal, que é composta de neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares estão localizados na substância negra parte compacta e cujos axônios e nervos terminais são encontrados no corpo estriado (PRZEDBORSKI, 2005). É caracterizada patologicamente pela destruição dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos e a presença de inclusões citoplasmáticas denominadas corpúsculos de Lewy. A neuropatologia da DP não está restrita apenas a via nigroestriatal, anormalidades histológicas podem ser encontradas em outros grupos de células dopaminérgicas e até não dopaminérgicas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Cerca de 10% dos pacientes apresentam uma mutação relacionada à doença de Parkinson, o restante não apresenta mutação conhecida, caracterizando a forma esporádica.

### 1.1 Epidemiologia da doença de Parkinson

A frequência da doença de Parkinson depende dos critérios diagnósticos, população estudada e métodos epidemiológicos utilizados. Conhecendo estas considerações, uma metanálise de 47 estudos revelou que a prevalência mundial da Doença de Parkinson foi de 0,3% na população geral acima de 40 anos. Os dados sugerem que existam 7,5 milhões de pessoas com doença de Parkinson atualmente. A prevalência aumenta de 41 por 100.000 pessoas com idades entre 40-49 anos, para 1900 por 100.000 pessoas com idades de 80 anos ou mais. Estima-se que haverá 9 milhões de pessoas com doença de Parkinson em 2030. A incidência varia de 8 a 18,6 casos por 100.000 pessoas (PRINGSHEIM, 2014). A doença de Parkinson é a segunda doença degenerativa mais comum depois da demência de Alzheimer. É uma doença de distribuição universal e atinge todos os grupos étnicos e classes sócio-econômicas.

Um estudo realizado no Brasil estimou uma prevalência de aproximadamente 3% em idosos com idade acima de 64 anos, semelhante ao resultado de outros estudos americanos, europeus e de países orientais (BARBOSA et al, 2006).

## 1.2 Modelo experimental da doença de Parkinson

Para entender melhor a fisiopatologia da doença de Parkinson, e para o desenvolvimento de novos tratamentos, é importante a utilização de modelos animais da doença de Parkinson, onde novas drogas e estratégias terapêuticas podem ser testadas.

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) é uma das neurotoxinas mais comuns utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da substância negra, tanto *in vitro* como *in vivo*. É incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar. A injeção bilateral de 6-OHDA na SNc ou em outras regiões cerebrais provoca uma elevada mortalidade neuronal, principalmente dos neurônios catecolaminérgicos (BLANDINI et al., 2008). Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos. Produz lesões na substância negra pela indução da produção de peróxido de hidrogênio e espécies reativas do oxigênio, como radical hidroxil, e também pela inibição do complexo I mitocondrial (MILLER et al., 2009).

A injeção unilateral de 6-OHDA no estriado provoca a morte de todos os neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo do lado aplicado e redução da concentração de dopamina no lado correspondente do estriado, gerando um modelo válido de uma fase adiantada da DP com intensas alterações motoras. Esses animais apresentam comportamento rotatório contralateral em relação à lesão quando tratados com agonistas da dopamina, tais como a apomorfina. Esse comportamento pode ser explicado pela superexpressão dos receptores dopaminérgicos na porção lesada do estriado. (KIM et al., 1998).

## 1.3 Fisiopatologia da doença de Parkinson

Estudos sugerem que o mecanismo de morte neuronal na DP envolve o acúmulo da proteína  $\alpha$ -sinucleína mutante nos neurônios dopaminérgicos que desencadeia uma cascata de eventos, caracterizada pela participação de vários fatores como os radicais livres, a disfunção mitocondrial, a excitotoxicidade, a inflamação e a apoptose (HIRSCH; JENNER; PRZEDBORSKI et al, 2013).

Collins e colaboradores (2012), baseado em modelos neurotóxicos da DP, sugeriu que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra não resulta da ativação de apenas um único fato deletério, mas da convergência de múltiplos fatores patogênicos.

### ***1.3.1 Agregação proteica da alfa sinucleína e comportamento priônico***

Mutações no gene presente no cromossomo 4q21.3-q22, que codifica a proteína alfa sinucleína emergiu como um dos mais importantes elementos de neurodegeneração (MARIÉS et al., 2003). Esta proteína está presente nos corpúsculos de Lewi, inclusões citoplasmáticas típicas de neurônios em degeneração na doença de Parkinson, na forma de agregados (HISHIKAWA et al, 2003). A presença de alfa sinucleína nos corpúsculos de Lewi é uma evidência do envolvimento desta proteína na doença de Parkinson. Mutações no gene que codifica a alfa sinucleína ocasionam uma forma agressiva de doença de Parkinson (POLYMEROPOULOS et al, 1997.). Acredita-se que esta proteína, quando mal conformada em sua estrutura molecular, apresenta a capacidade de formar agregados com capacidade de danificar membranas celulares de organelas como mitocôndrias e vesículas de dopamina (LASHUEL et al, 2002). Esta alteração da estrutura molecular da alfa sinucleína estaria relacionada a mutações no gene que a codifica ou como um fenômeno associado ao envelhecimento (MEREDITH; HALLIDAY; TOTTERDELL, 2004).

Algumas observações em ratos transgênicos, em ratos normais e em seres humanos sugerem que de algum modo a alfa sinucleína de conformação molecular anormal pode ser transmitida de neurônio para neurônio e causar uma neurodegeneração semelhante àquela vista na doença de Parkinson. (LUK et al, 2012).

### ***1.3.2 Deficiência na proteólise***

A homeostase proteica celular, primariamente, é mantida por três processos coordenados: chaperonas moleculares, o sistema ubiquitina-proteossoma e a via lisossômica-autofágica. Juntos, controlam o reparo, a remoção e a renovação proteica. Quando estes processos são inibidos ou funcionam de maneira deficiente, proteínas anormais, tais como a alfa sinucleína mutante, podem ter sua conformação alterada e se agregar, ocasionando disfunção do tráfico molecular intracelular e morte da célula (GHAVAMI et al, 2014).

As proteínas Parkina, Pink 1 e DJ-1 interagem entre si e formam um complexo que promove a degradação de proteínas estruturalmente defeituosas, via sistema ubiquitina-proteossoma. Esta observação é notável uma vez que mutações nos genes da Parkina, Pink 1 e DJ-1 estão associadas com formas recessivas de doença de Parkinson (XIONG et al, 2009).

### ***1.3.3 Disfunção mitocondrial***

O envolvimento da mitocôndria na doença de Parkinson foi inicialmente sugerido pela descoberta de uma associação entre um análogo da meperidina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e parkinsonismo. A oxidação do MPTP produz 1-metil-4-fenilpiridíio (MPP<sup>+</sup>) que é captado pelas terminações dopaminérgicas e inibe seletivamente a atividade do complexo I mitocondrial, alterando a homeostasia do cálcio, induzindo estresse do retículo endoplasmático e resultando em dano celular. (PRZEDBORSKI et al, 2004). Outra evidência do envolvimento direto da disfunção mitocondrial é suportada pelo achado que a atividade do complexo I mitocondrial é reduzida em 32 a 38 por cento na substância negra de pacientes com doença de Parkinson esporádica (SCHAPIRA et al, 1989). A utilização do pesticida Rotenona em ratos ocasiona uma degeneração seletiva da substância negra, culminando em sintomas parkinsonianos. Este pesticida é um inibidor potente do complexo I mitocondrial, resultando na geração de radicais livres e dano celular oxidativo (SHERER et al, 2003).

### **1.3.4 Estresse oxidativo**

A hipótese do estresse oxidativo postula que a produção inapropriada de espécies reativas de oxigênio resulta em neurodegeneração. Fontes de estresse oxidativo incluem a disfunção mitocondrial, processos inflamatórios relacionados à glia, como também processamento anormal da alfa sinucleína e degradação proteica aberrante. Radicais livres são capazes de reagir com diversos compostos ou alvos celulares, causando danos teciduais por interagirem com carboidratos, ácidos nucleicos (DNA), proteínas e lipídios (AHLISKOG, 2005). É possível que o estresse oxidativo também contribua para alterações na estrutura protéica. Esta noção é suportada pelo fato de o óxido nítrico, um radical livre presente em quantidades anormalmente altas em pacientes com doença de Parkinson, reagir com a enzima isomerase dissulfeto, uma chaperona que previne a agregação proteica localizada no retículo endoplasmático e normalmente responsável pelo desdobramento e transporte proteico (UEHARA et al, 2006).

O dano oxidativo ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção dos radicais livres e as defesas antioxidantes celulares. Através da respiração celular normal ou da respiração mitocondrial desregulada, grandes quantidades de espécies reativas do oxigênio podem ser produzidas e desencadear efeitos deletérios no delicado equilíbrio neuronal do SNC. Há diversos sistemas celulares antioxidantes que neutralizam os radicais livres como a glutatona peroxidase e redutase, a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutatona, a vitamina E, a vitamina C, e outras substâncias capazes de inativar ou reduzir a formação dos radicais livres (TEJADA et al, 2007).

Dentre os sistemas antioxidantes endógenos, a glutatona (GSH) é o principal antioxidante endógeno do cérebro, que sequestra radicais livres, reduz os peróxidos e pode ser conjugada a compostos eletrofílicos, portanto protege as células com múltiplas defesas contra as espécies reativas do oxigênio e os seus produtos. Uma redução da atividade dessa enzima antioxidante pode levar ao aumento da concentração do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, que podem gerar radicais hidroxila, resultando na iniciação e propagação da peroxidação lipídica e consequente dano celular (RAZA et al., 2013).

Os mecanismos responsáveis pela neurodegeneração na doença de Parkinson são complexos e ainda não estão totalmente elucidados. Entre os vários tipos de neurônios que degeneram nesta doença, há um consenso que a perda dos neurônios dopaminérgicos na substância negra, parte compacta, é a responsável pelos sintomas motores e tem direcionado os tratamentos sintomáticos (FAHN; SULZER, 2004). Parece haver um pequeno número de

características celulares que conferem vulnerabilidade neuronal na doença de Parkinson, como atividade autônoma, potenciais de ação amplos, axônios longos, muito ramificados e pouco mielinizados e uso de neurotransmissores monoaminérgicos (SULZER; SURMEIER, 2013). Um crescente número de evidências indica que o dano oxidativo e a disfunção mitocondrial contribuem para a cascata de eventos que leva a degeneração destes neurônios (SCHAPIRA; JENNER 2011). Estes fenômenos são suportados por análises de cérebros post-mortem que revelaram níveis aumentados de subprodutos da peroxidação lipídica dano oxidativo em proteínas, no DNA e no RNA (JENNER, 2003). A ligação entre o estresse oxidativo e a degeneração neuronal é, adicionalmente, demonstrada pelos modelos animais em que são utilizadas neurotoxinas que causam estresse oxidativo, como a 6-OHDA (CALLIO; OURY; CHU, 2005), MPTP, Rotenona e Paraquat (PRZEDBORSKI; et al, 2004; PERIER et al, 2003).

Além da doença de Parkinson, outras doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer, doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica são associadas ao estresse oxidativo apesar de possuírem características clínicas e patológicas distintas. Este fato sugere que o estresse oxidativo é um mecanismo comum que contribui para a neurodegeneração (ANDERSEN, 2004).

Evidências apontam que não só o estresse oxidativo, mas também o estresse nitrosativo está relacionado à neurodegeneração (HUNOT et al, 1996). O estresse nitrosativo é mediado pela produção de espécies reativas do nitrogênio, estas geradas pela reação de superóxidos com óxido nítrico, produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase, que se apresenta em três isoformas: endotelial, neuronal e induzível em células gliais, culminando na formação de peroxinitrito (SZABO; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007).

O óxido nítrico inibe várias enzimas, incluindo os complexos mitocondriais I e IV, levando a geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. Reage também com proteínas, alterando sua função e com lipídios levando a peroxidação lipídica. O peroxinitrito que é um agente oxidante mais potente que o óxido nítrico, pode induzir a fragmentação do DNA, a peroxidação lipídica e prejudica a produção de dopamina (CARR; MCCALL; FREI, 2000).

O papel do estresse nitrosativo na doença de Parkinson também é evidenciado através de estudos patológicos que evidenciam um aumento da expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível e óxido nítrico sintase neuronal nos gânglios da base (HUNOT et al, 1996; EVE et al, 1998). A produção de espécies reativas do nitrogênio e, portanto, o estresse nitrosativo podem ser verificadas também em modelos experimentais da doença de Parkinson,

como o modelo MPTP e o modelo 6-OHDA (SCHULZ et al, 1995; GUO; BEZARD; ZHAO, 2005).

### ***1.3.5 Metabolismo do ferro***

Os íons metálicos de ferro ou cobre possuem a habilidade de mover elétrons, o que constitui a base para a iniciação e propagação de muitas das reações de radicais livres mais nocivas. Assim, o radical hidroxila é formado pela interação entre um íon metálico ( $Fe^{3+}$ ), o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, em uma reação denominada reação de Fenton. Além disso, na presença de metais de transição, mais comumente o  $Fe^{2+}$ , o peróxido de hidrogênio é reduzido à radical hidroxil (OH) via reações de Haber-Weiss ou Fenton. Essas reações geram grande quantidade de radicais livres e estão diretamente relacionadas com os danos celulares mediados por estresse oxidativo (NICHOLLS, 2008).

O ferro tem um papel crítico no metabolismo oxidativo e também serve como um cofator na síntese de neurotransmissores. Sua concentração está aumentada em 50% na substância negra de pacientes com Parkinson em relação a controles, sugerindo que o seu metabolismo anormal poderia ser implicado no desenvolvimento da doença de Parkinson (DUSEK; JANKOVIC; LE, 2012).

### ***1.3.6 Mecanismos imunológicos e inflamatórios***

A neuroinflamação é um componente-chave na indução e progressão de processos degenerativos no SNC. Estudos demonstram que a neuroinflamação é um importante mecanismo fisiopatológico das doenças neurodegenerativas no SNC, principalmente através do aumento da expressão de genes relacionados à produção de mediadores inflamatórios e neurotóxicos, que contribuem para a cascata de eventos que levam a lesão e morte celular (TAYLOR et al., 2013).

Mecanismos imunológicos têm sido implicados na patogênese da doença de Parkinson. A evidência é proveniente do achado de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF – alfa, interleucina 1 beta e interferon gama) em pacientes com doença de Parkinson (HIRSCH et al, 2003). Inibição da ciclooxigenase-2 previne a formação de quinonas tóxicas em modelos animais de MTPT (TEISMANN et al, 2003).

Durante a inflamação, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como: a prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas, como a interleucina 1 beta ( $IL1\beta$ ) e o fator de necrose



tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ). A literatura descreve uma regulação positiva do gene da ciclo-oxigenase tipo 2, que possui papel importante na produção de PGE<sub>2</sub>, um importante mediador inflamatório, e atualmente associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (BARTELS; LEENDERS, 2009).

### ***1.3.7 Neurotransmissão monoaminérgica na doença de Parkinson***

A importância da dopamina como o neurotransmissor mais envolvido no controle motor está diretamente associada às consequências clínicas decorrentes da degeneração da via nigroestriatal, como aquelas observadas na doença de Parkinson: tremor, rigidez e acinesia. A doença de Parkinson é caracterizada pela degeneração de estruturas subcorticais, constituídas pelos núcleos da base (também chamado de estriado, que compreende o núcleo caudado, o putâmen e o globo pálido), o subtálamo e a substância negra, que agem como um sistema acessório ao córtex cerebral e ao sistema cortico-espinhal fornecendo informações de padrões complexos de movimento (STOCCHI, 2009).

O sistema dopaminérgico inerva todos os núcleos da base, através da via nigroestriatal e, provavelmente, exerce um importante controle modulatório dos circuitos neuronais (vias direta e indireta). Os núcleos da base fazem parte de um complexo circuito neuronal organizado em paralelo para integrar atividades de diferentes regiões corticais. Além disso, os núcleos da base são intimamente interconectados com o locus ceruleus (núcleo noradrenérgico), núcleo da rafe (neurônios serotoninérgicos) e a formação reticular. O chamado “circuito motor” é, na verdade, o mais importante na fisiopatologia do movimento (OBESO et al., 2008).

A modulação mediada pelos núcleos da base ocorre pelo balanço entre dois circuitos que ligam o estriado ao globo pálido, a via direta e a via indireta. A dopamina estimula a via direta e inibe a via indireta. Desta forma ela funciona como um modulador dos núcleos da base, pois quando liberada no estriado facilita o movimento. Isso explica a lentidão de movimentos e a rigidez muscular na doença de Parkinson, visto que a degeneração dos neurônios nigroestriatais causa a redução da concentração de dopamina no estriado, e conseqüentemente distúrbios de movimento (HAMANI, LOZANO, 2003).

Todas essas alterações podem ter relação com as disfunções que ocorrem principalmente devido à redução das concentrações de dopamina e o conseqüente desequilíbrio dos outros sistemas (como o sistema colinérgico, serotoninérgico, gabaérgico e

glutamatérgico) que estão integrados e onde a dopamina exerce um importante papel modulatório.

### ***1.3.8 A hipótese do duplo golpe***

Crescente evidência sugere que a doença de Parkinson tem um longo período de pródromos no qual características não motoras se desenvolvem, em particular, comprometimento da olfação, disfunção vagal e distúrbios do sono. Baseado nestas constatações, a hipótese do duplo golpe postula que um agente neurotrópico e neurotóxico teria acesso ao sistema nervoso central através de duas vias: a via da mucosa nasal e do bulbo olfatório e, ao ser deglutido, entraria em ação a via intestinal, através das aferências vagais. Deriva daí a denominação “duplo golpe”. Agentes suspeitos incluem vírus com tropismo pelas vias aéreas, produtos químicos dentre outros implicados. Este agente neurotóxico ao ter acesso aos neurônios da substância negra causaria uma série de alterações metabólicas nestas células que culminaria na apoptose e neurodegeneração das mesmas, como uma reação em cadeia. (HAWKES; TREDICI; BRAAK, 2007).

### ***1.3.9 Genética e doença de Parkinson***

A pesquisa em genética da doença de Parkinson tem crescido principalmente após a descoberta da primeira mutação responsável pela doença de Parkinson familiar, presente no gene que codifica a proteína alfa sinucleína (POLYMERPOULOS et al, 1997). Desde então mais de duas dúzias de genes que causam a doença de Parkinson ou são fatores de risco para a mesma foram descobertos. Cerca de 10% das pessoas com doença de Parkinson apresentam uma mutação conhecida. Os 90% restantes dos pacientes tem a forma esporádica, onde não se verifica sinais de herança genética clara. (SINGLETON et al, 2013).

## **1.4 Agomelatina e a doença de Parkinson**

A agomelatina, um naftaleno análogo da melatonina, é um potente agonista do receptor da melatonina (MT1 e MT2) e antagonista do receptor 5HT2C da serotonina que possui efeitos antidepressivos em vários modelos animais de depressão (BARDEN et al, 2005) e ansiedade (MILLAN et al, 2005). No Brasil, a agomelatina foi recentemente liberada como antidepressivo pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Segundo a Agência

Europeia de Regulação de Medicamentos (EMA), a agomelatina representa um importante avanço no tratamento da depressão. A agomelatina é um antidepressivo com mecanismo de ação inteiramente novo, uma vez que sua atividade não se baseia em mecanismos clássicos, tais como a inibição do metabolismo ou recaptção de monoaminas. A agomelatina é um agonista dos receptores da melatonina e antagonista dos receptores de serotonina 5HT<sub>2C</sub> (SAN; ARRANZ, 2008).

Embora existam algumas diferenças entre o mecanismo de ação da melatonina e da agomelatina, seus efeitos estão correlacionados e são muito parecidos principalmente devido a semelhança estrutural desses dois compostos (HARDELAND; POEGGELER, 2012). A melatonina apresenta muitos efeitos benéficos contra o dano oxidativo celular, como um aumento da atividade do complexo I mitocondrial e efeito antioxidante (SRINIVASAN et al, 2011). A ação neuroprotetora da Agomelatina tem sido documentada em modelos 6-OHDA em outros estudos (DABBENI-SALA et al. 2001). Em outro estudo, a melatonina demonstrou uma redução da peroxidação lipídica no estriado, hipocampo e mesencéfalo induzidas pelo MPTP (ACUÑA-CASTROVIEJO et al. 1997).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de neurofarmacologia verificaram efeitos neuroprotetores da melatonina no modelo de Parkinson induzido por 6-OHDA, e sendo a agomelatina um análogo da melatonina, com efeitos não só em receptores da melatonina, mas também como antagonista 5HT<sub>2C</sub>, haveria a possibilidade desse composto também apresentar efeitos neuroprotetores (AGUIAR et al., 2002, 2005).

Alguns estudos verificaram possíveis efeitos neuroprotetores da agomelatina, como por exemplo, o estudo realizado por Gressens e colaboradores (2008) demonstrou que a agomelatina e melatonina, ambos agonistas totais nos receptores de melatonina, apresentaram potentes propriedades neuroprotetoras em um modelo de excitotoxicidade na substância branca que mimetiza a leucomalácia humana em camundongos recém-nascidos. Este modelo é preditivo de efeitos neuroprotetores e neurotróficos em situações fisiopatológicas. Segundo os autores, a agomelatina sendo uma droga segura e bem tolerada, com demonstrada eficácia clínica em distúrbios depressivos major, poderia, portanto, fazer parte do arsenal terapêutico disponível em um futuro próximo para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Marinescu e colaboradores (2011) demonstraram que a agomelatina apresentou efeito neuroprotetor em hipocampo e córtex frontal no modelo de depressão induzido por hipercortisolemia. Foi sugerido que esse efeito poderia estar relacionado com inibição do estresse oxidativo.

O tratamento com melatonina no modelo MPTP ocasionou um aumento da atividade do complexo I mitocondrial, reduzindo o grau de disfunção mitocondrial e peroxidação lipídica. Sabe-se que a disfunção mitocondrial é uma característica de várias doenças neurodegenerativas, em especial da doença de Parkinson. A constatação da melhora da atividade do complexo I mitocondrial pela melatonina é relevante para estudos de potenciais terapias na doença de Parkinson (TAPIAS et al. 2009). Estes dados apontam para um efeito antioxidante da melatonina por aumento da atividade do complexo I mitocondrial além do efeito sequestrador de radicais livres (HARDELAND et al. 2011).

A constatação de que a expressão dos receptores da melatonina MT1 e MT2 encontra-se reduzida na amígdala e na substância negra de pacientes com doença de Parkinson indica que há a possibilidade de que o sistema melatonérgico esteja envolvido nos mecanismos de alteração do sono e na fisiopatologia geral da doença de Parkinson (ADI et al. 2010; SRINIVASAN et al, 2011).

Embora os efeitos anti-inflamatórios dos inibidores da receptação da serotonina terem sido os mais extensivamente caracterizados, existem evidências de que outras classes de antidepressivos também possuem propriedades semelhantes. Com relação a agomelatina, assim como outros antidepressivos mais novos, mais estudos são necessários para comprovar essa atividade anti-inflamatória (WALKER, 2013).

Mais estudos, portanto devem ser desenvolvidos para verificar o possível efeito neuroprotetor da agomelatina em outros modelos de lesão cerebral para comprovar essa hipótese.

## 2 RELEVÂNCIA

Em contraste com outras doenças neurodegenerativas, há uma boa resposta à terapia sintomática na doença de Parkinson, pelo menos nas fases precoces. Em estágios iniciais as medicações podem proporcionar uma boa qualidade de vida. À medida que a doença evolui, no entanto, estas terapias perdem sua eficácia e os efeitos colaterais sobrepõem os benefícios do tratamento. Atualmente não há tratamentos para a doença de Parkinson que modifiquem a evolução da doença ou previnam a morte neuronal (BEZARD et al., 2013). É necessário e urgente, portanto, o desenvolvimento de novas terapias que possam modificar o curso da doença e não apenas tratar temporariamente os sintomas. Diante deste fato, o presente estudo se propôs a verificar os possíveis efeitos neuroprotetores da Agomelatina, um análogo da melatonina em modelo experimental da doença de Parkinson em ratos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar os efeitos comportamentais e neuroquímicos da agomelatina no modelo experimental da doença de Parkinson induzido por injeção intraestriatal unilateral de 6-hidroxi-dopamina em ratos.

#### **3.2 Específicos:**

- a) verificar e mensurar o desempenho, nos testes comportamentais, dos animais submetidos à lesão intraestriatal com 6-hidroxi-dopamina;
- b) avaliar os efeitos da agomelatina no estresse oxidativo, através da determinação dos níveis de derivados do estresse nitrosativo (nitrito) em hipocampo, córtex pré-frontal e núcleos da base dos animais submetidos à lesão intraestriatal com 6-OHDA;
- c) determinar os efeitos da agomelatina sobre o grau de peroxidação lipídica através da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo, córtex pré-frontal e núcleos da base dos animais submetidos à lesão intraestriatal com 6-OHDA;
- d) determinar os efeitos da agomelatina sobre os sistemas antioxidantes endógenos através da determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, no córtex pré-frontal e nos núcleos da base dos animais submetidos à lesão intraestriatal com 6-OHDA.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso variando entre 250-300g provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de prolipropileno com no máximo 6 animais, à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água a vontade.

### **4.2 Aspectos éticos**

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, com número 04/2016 e os experimentos realizados de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

### **4.3 Delineamento experimental**

Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo falso operado ou sham, grupo controle, e dois grupos de intervenção, tratados com Agomelatina nas doses de 5 mg/Kg e 10mg/Kg respectivamente. Todos os grupos foram submetidos à cirurgia com injeção estereotóxica unilateral no corpo estriado e em seguida receberam tratamentos via intraperitoneal. O grupo sham foi operado com injeção estereotóxica unilateral no corpo estriado de solução aquosa a 1% de hidroxietilcelulose (HEC) e, após uma hora da cirurgia, tratados também com esta mesma solução administrada por via intraperitoneal diariamente. O Grupo controle foi operado com injeção estereotóxica unilateral no corpo estriado de 6-OHDA e, uma hora após a cirurgia, foi tratado com solução aquosa de HEC a 1% via intraperitoneal diariamente. Os dois grupos intervenção foram operados com injeção estereotóxica unilateral no corpo estriado de 6-OHDA e uma hora após o término da cirurgia os animais receberam Agomelatina (Valdoxan 25mg Servier ®) diluída em solução aquosa com 1% de hidroxietilcelulose (HEC), nas doses de 5 e 10 mg/kg, respectivamente, via intraperitoneal diariamente. Todos os animais foram tratados durante 21 dias. Após o período de tratamento (1 hora após a administração do último tratamento via intraperitoneal), os animais foram submetidos aos testes comportamentais: teste rotacional, teste do campo aberto

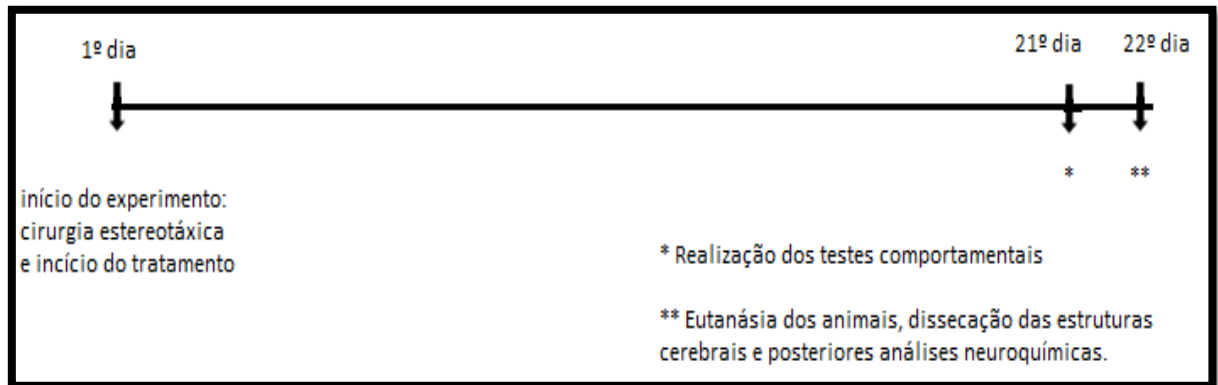
e teste do bastão rotatório (ou rotarod test). No 22º dia, os animais foram sacrificados e tiveram as seguintes áreas cerebrais dissecadas: córtex pré-frontal (CPF), núcleos da base (NB) e hipocampo (HC) para posteriores análises neuroquímicas. Para estas análises foram utilizadas as amostras do lado operado. Adiante, dois quadros de resumos dos experimentos.

**Tabela 1 – Protocolo de Tratamento Experimental**

Grupo	Tratamento	Dose (mg/Kg)	Administração	Duração (dias)
Sham	AD		i.p.	21
Controle	AD		i.p.	21
Grupo 5	Ago	5	i.p.	21
Grupo 10	Ago	10	i.p.	21

Fonte: elaborada pelo autor. HEC: Hidroxietilcelulose; i.p: intraperitoneal. Grupo 5: grupo intervenção tratado com agomelatina 5mg/kg; Grupo 10: grupo intervenção tratado com agomelatina 10mg/Kg. Ago: Agomelatina (Servier) diluída em solução 1% de HEC. AD: Água destilada em solução 1% de HEC.

**Quadro 1 – Delineamento**



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: No 1º dia os animais foram operados com injeção unilateral no corpo estriado de solução de HEC ou de 6-OHDA, a depender do grupo. Em seguida tratados com solução de HEC ou Agomelatina por 21 dias. No 21º dia foram realizados testes comportamentais para avaliar o desempenho motor. No 22º dias os animais foram sacrificados e tiveram amostras do sistema nervoso recolhidas para análises neuroquímicas.



#### **4.4 Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA**

Os animais foram anestesiados com ketamina (Cetamin 10%, Syntec®, 100 mg/kg, i.p.) e com xilasina (Xilazin 2%, Syntec®, 5 mg/kg, i.p.) e receberam uma injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA (duas injeções de 1µl de uma solução de 6-OHDA dissolvido em salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico em uma concentração final de 12 µg/µl dentro do corpo estriado direito (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 a partir do bregma), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON 1986), usando uma seringa Hamilton de 5 ml . A seringa foi deixada no local de aplicação por 2 minutos para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente e depois ela foi retirada cuidadosamente (KIM, et al, 1998).

## 4.5 Estudo comportamental

### 4.5.1 *Teste rotacional*

Os animais foram submetidos ao teste rotacional no vigésimo primeiro dia após a lesão com 6-OHDA, uma hora após o último tratamento. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3 mg/kg, i.p., que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral)) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo foi observado durante 60 minutos (KIM et al, 1998).

### 4.5.2 *Teste do bastão rotatório (Rotarod)*

O teste do *Rota Rod* mede o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas em animais (OLIVEIRA et al, 2008). Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm, por um período de 5 minutos, após 1 hora da administração de Agomelatina (5 e 10 mg/Kg; *per os*) ou veículo (salina 0,9% *per os*). Foram registrados: tempo de latência (tempo até a primeira queda, em segundos), o tempo de permanência na barra giratória (tempo total que o animal permaneceu na barra, em segundos) e o número total de quedas (DUNHAM; MIYA, 1957).

### 4.5.3 *Teste do Campo Aberto*

Este teste é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validado por Archer (1973), e permite uma avaliação da atividade locomotora do animal. Os animais serão colocados no centro da arena, 60 minutos após o último tratamento, em um campo-aberto confeccionado em acrílico com 60 cm de comprimento, 60 cm de largura, 60 cm de altura, dividido em 12 arenas. Estes animais permanecerão nesse campo-aberto durante 5 minutos, serão avaliados a atividade exploratória (número total de cruzamentos), o número total do levantar e ficar sobre as duas patas traseiras (rearing). Este teste será desenvolvido em um ambiente tranquilo e desprovido de barulho, sendo aplicada ao local uma iluminação

vermelha. Após o tempo estipulado o animal testado será retirado e o campo-aberto será limpo, para evitar o cheiro do animal anterior.

#### **4.6 Dissecação das áreas cerebrais**

No 22º dia após a cirurgia, os animais foram devidamente sacrificados e, logo em seguida, os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo. Em seguida o hipocampo (HC), os núcleos da base (NB), consistindo no corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido) e o córtex pré-frontal (CFP), foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento. Após a dissecação, cada área foi colocada em papel alumínio sobre gelo, pesada e armazenada a -20 °C.

#### **4.7 Determinação da concentração de nitrito**

Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorvância em 540 nm.

Para a determinação da produção de Nitrito/Nitrato, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de  $\text{NaNO}_2$  e dissolvidos em 10 mL de água destilada. Em seguida foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 0,625  $\mu\text{M}$ , 0,312  $\mu\text{M}$ . Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN; TANNEMBAUN; GOLDMAN, 1981). Para a determinação da concentração de nitrito em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (w/v) em solução de fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4, após centrifugação (11000 g por 15 min à 4°C), os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess [sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1%/  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1%/diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorvância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

#### 4.8 Determinação da peroxidação lipídica

Teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo de lipídios é o malonildialdeído.

O grau de lipoperoxidação em corpo estriado de ratos foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado levado ao banho maria 37 °C por 1 hora e precipitado com 400 µL de ácido perclórico 35%, após centrifugação (14000 g por 15 min à 4°C), o sobrenadante foi transferido e acrescido 200 µL de solução de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Após banho de água fervente (95-100 °C por 30 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de tecido.

#### 4.9 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona é o maior agente antioxidante produzido por células animais, e o qual pode ser encontrado em sua forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH) (SCHOLZ *et al.*, 1989; POMPELLA *et al.*, 2003).

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412 nm, a concentração da glutathiona reduzida foi expressa em nanograma de GSH/g de tecido, conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1968).

Para a determinação da concentração de GSH, foi construída uma curva padrão a partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), a qual foi preparada em triplicata de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Para a determinação da equação da curva padrão de GSH, foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01 M) e, logo após, feita a leitura da absorbância a 412 nm.

Preparou-se o homogenato a 10% em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido

tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado (3000 g/15 min/4 °C). Em seguida foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB 0,01 M. Após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro. A concentração da glutatona reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

#### **4.10 Análise estatística**

Todos os valores numéricos foram apresentados como erro padrão da média (EPM) e submetidos a análises de diferenças estatísticas através da análise de variância (*One-way ANOVA*), seguido pelo teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. Consideraram-se os valores com  $P < 0,05$  como estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 4.0, (San Diego, CA, EUA). Adicionalmente, todos os experimentos foram realizados por observadores “cegos”.

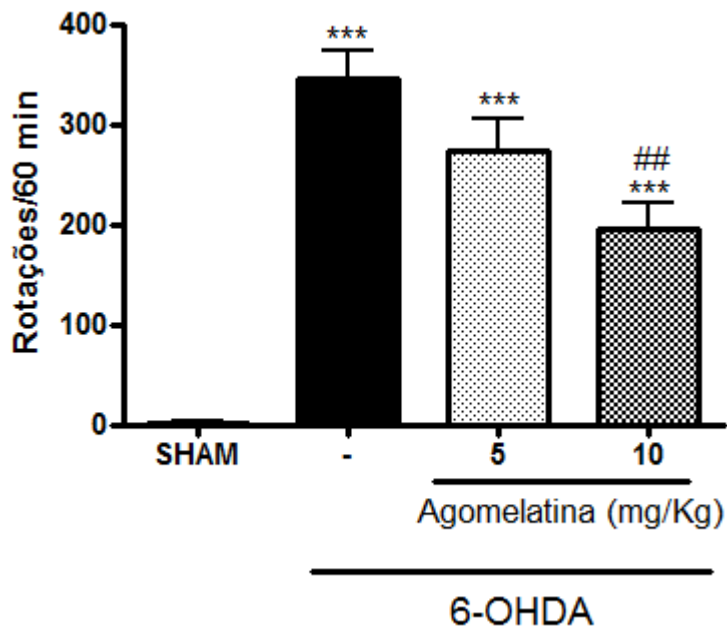
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Teste rotacional:

Foi administrada apomorfina (3 mg/kg, i.p.) 21 dias após a injeção intraestriatal de 6-OHDA e os animais exibiram comportamento rotacional na direção oposta ao lado da lesão (rotação contralateral). Um aumento significativo no número de rotações induzidas por apomorfina foi observado nos animais controles lesionados com 6-OHDA, quando comparado ao grupo falso operado (sham) ( $344,8 \pm 28,3$  vs.  $2 \pm 0,5$  rotações/h; [F (3, 35)=25,21;  $p < 0.0001$ ]).

Uma recuperação motora parcial foi observada nos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com agomelatina na dose de 10 mg/kg (AGO 5), que reduziu significativamente o número de rotações induzidas por apomorfina em torno de 43 %, quando comparados com o grupo controle lesionado com 6-OHDA (Gráfico 1).

Figura 1 – Comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



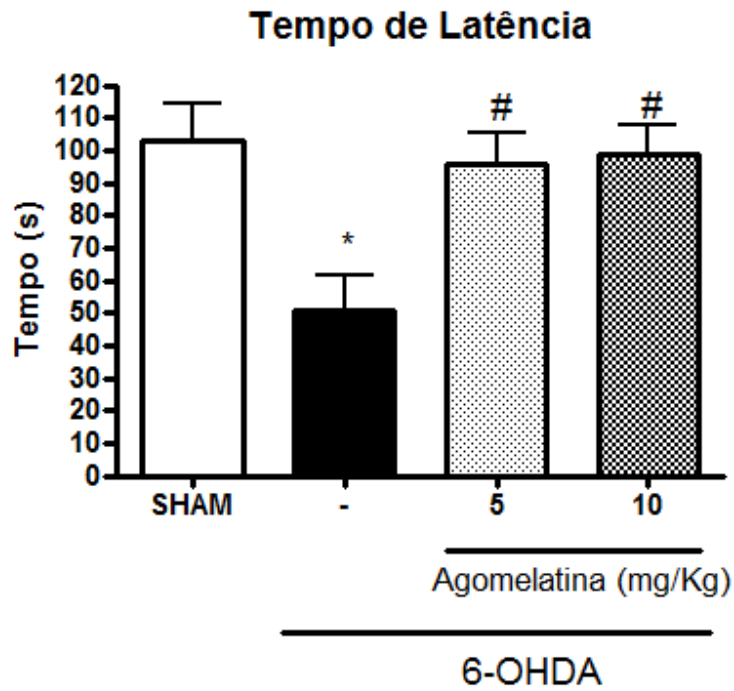
Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham; ##:  $p > 0,01$  em relação ao grupo controle.

## 5.2 Teste rota rod (bastão rotatório)

No teste rotarod observou-se que os animais tratados com a agomelatina apresentaram um tempo de latência até a queda 100% maior em relação ao grupo controle, tanto no grupo que recebeu a dose de 5mg/kg como no que recebeu a dose de 10mg/kg (Figura 2). O tempo de permanência total embora maior no grupo tratado, não apresentou significância estatística com relação ao grupo controle, mas o tempo de permanência no grupo controle em relação ao grupo Sham foi 40% menor (Figura 3). Com relação ao número de quedas, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e o grupo sham, nem entre o grupo tratado e o grupo controle (Figura 4).

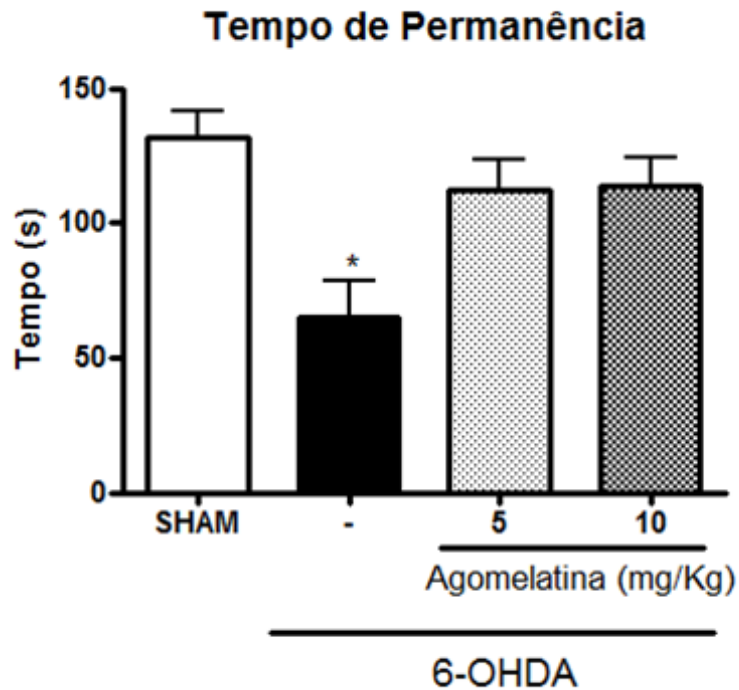


Figura 2 – Tempo de latência de queda no rota rod em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



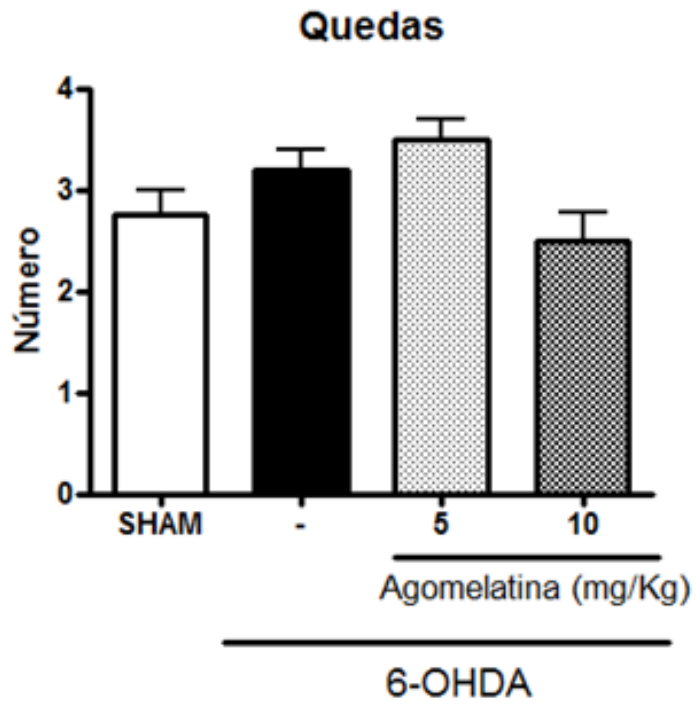
Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg; \*:p<0,05 em relação ao grupo sham; #p<0,05 em relação ao grupo controle.

**Figura 3 – Tempo de permanência no rota rod de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).**



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*:p<0,05 em relação ao grupo sham.

Figura 4 – Número de quedas no rota rod em ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg.

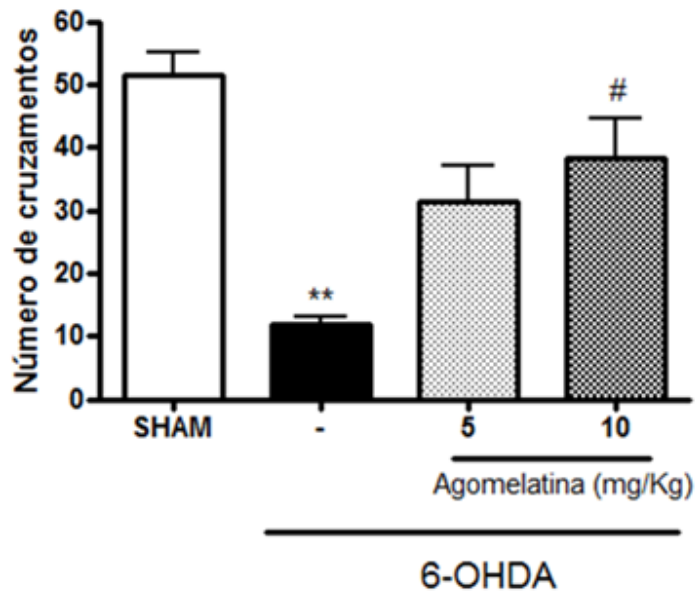
### 5.3 Teste do campo aberto

A análise estatística indicou diferenças significativas no número de cruzamentos no teste de campo aberto. O grupo lesionado com a 6-OHDA apresentou um declínio de cerca de 78% sobre na atividade locomotora quando comparado ao grupo falso operado

O tratamento com agomelatina na dose de 10 mg/kg, promoveu aumento da atividade exploratória horizontal em 4 vezes, quando comparado com o grupo controle lesionado com 6-OHDA (Figura 5).

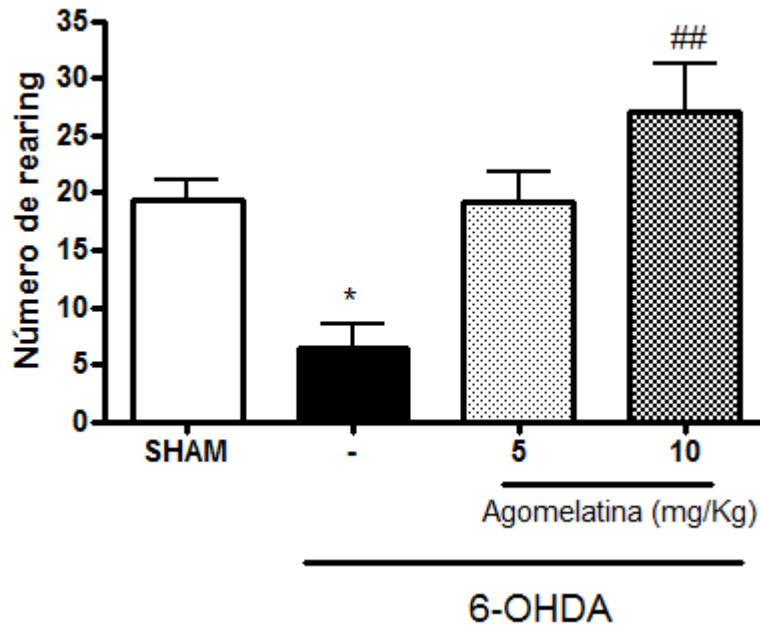
Na avaliação da atividade exploratória vertical (*rearing*), os resultados mostraram que os animais do grupo falso operado (sham) apresentaram uma maior frequência de *rearing* quando comparado ao grupo 6-OHDA controle. Com relação aos grupos tratados com agomelatina houve um aumento em cerca de 5 vezes na atividade exploratória na dose de 10 mg/kg, i.p., quando comparado ao grupo 6-OHDA controle (Figura 6).

**Figura 5 – Número de cruzamentos no campo aberto de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).**



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*:  $p < 0,01$  em relação ao grupo sham; # $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Figura 6 – Número de rearing no campo aberto de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*: $p < 0,05$  em relação ao grupo sham; ##:  $p > 0,01$  em relação ao grupo controle.

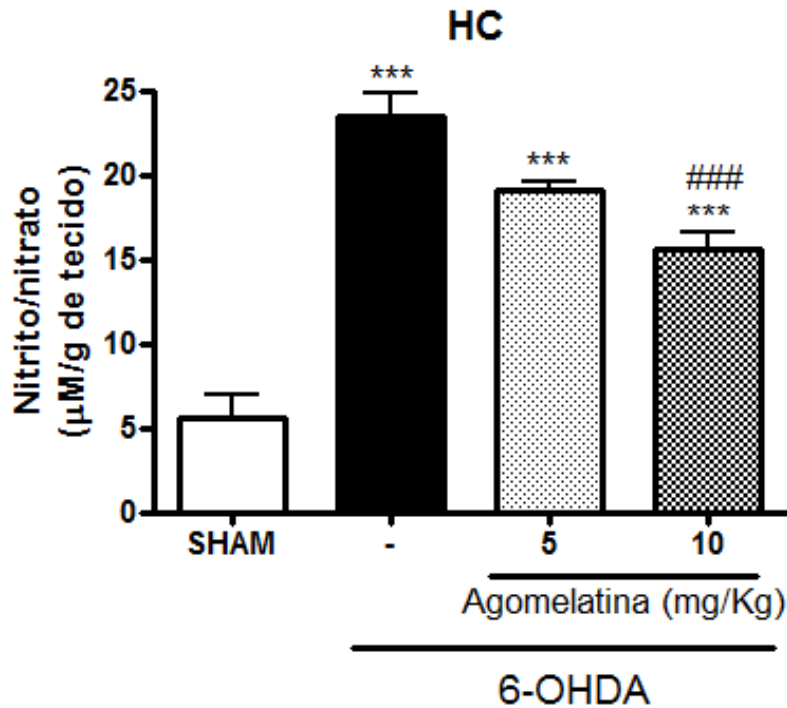
#### 5.4 Dosagem de nitrito

A concentração de nitrito em condições fisiológicas é baixa, entretanto, quando há estresse oxidativo esse valor se eleva muito acima do normal. Isso é o que acontece em áreas cerebrais expostas a 6-OHDA como mostram os resultados do HC, NB, e CPF que apresentaram um aumento de 380 %, 187 % e 133 % respectivamente (Falso operado:  $5,6 \pm 1,3$ ;  $7,96 \pm 0,56$ ;  $8,42 \pm 1,2$ ; 6-OHDA:;  $23,49 \pm 1,4$ ;  $23,3 \pm 3,4$ ;  $20,87 \pm 1,5$  , respectivamente) (Figuras 7, 8 e 9).

O tratamento com agomelatina na dose de 10 mg/kg, promoveu redução na concentração de nitrito, apenas no hipocampo (34 %) e nos núcleos da base (38 %), quando comparados ao grupo 6-OHDA controle de cada área cerebral correspondente (Figuras 7 e 8).

O tratamento com agomelatina na dose de 5 mg/kg, não reduziu a concentração de nitrito em nenhuma das áreas testadas, quando comparados ao grupo 6-OHDA controle de cada área cerebral correspondente (Figuras 7, 8 e 9).

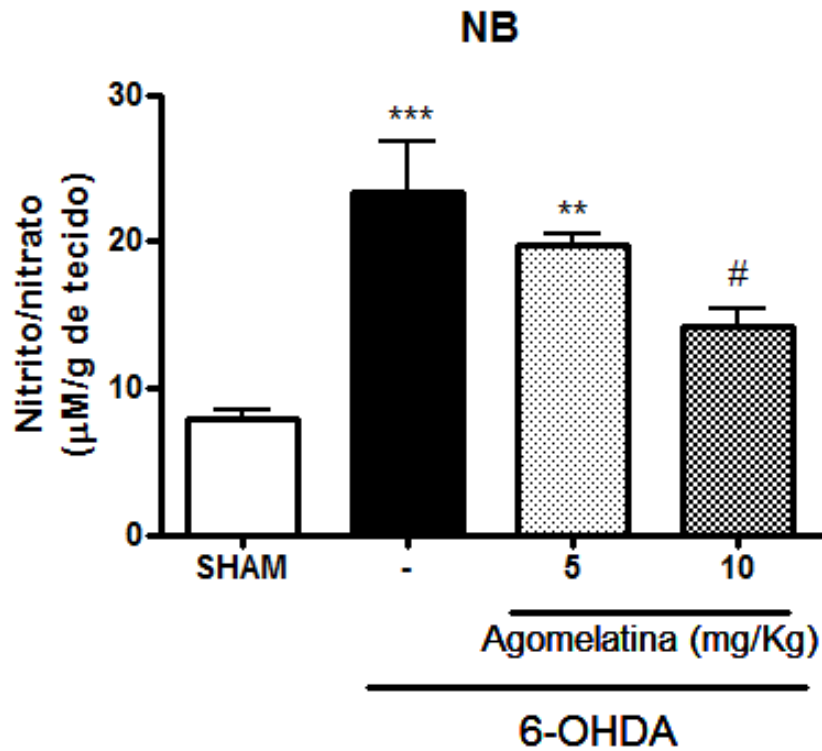
Figura 7 – Concentração de nitrito em hipocampo de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham; ### $p < 0,001$  em relação ao grupo controle

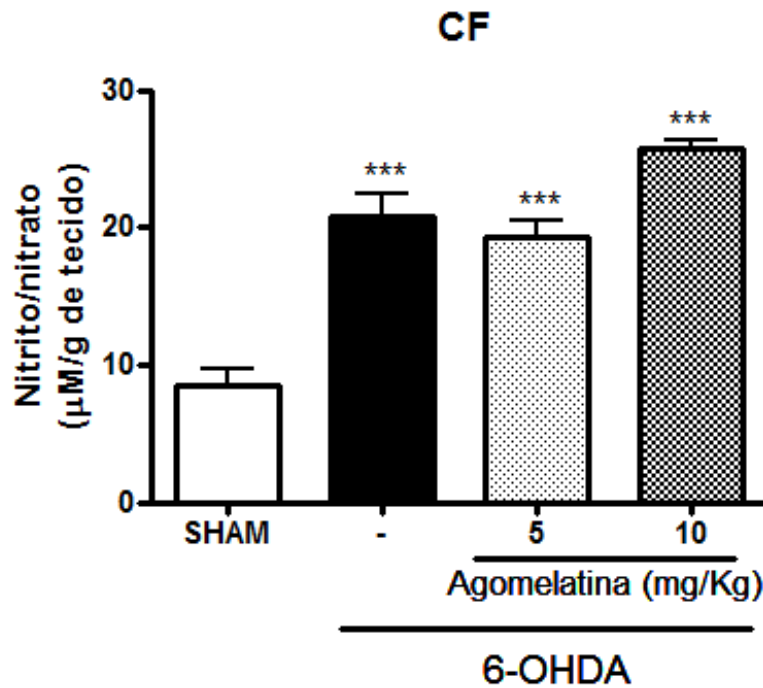


Figura 8 – Concentração de nitrito em núcleos da base de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham; \*\*:  $p < 0,01$  em relação ao grupo sham; #:  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle.

Figura 9 – Concentração de nitrito em córtex pré-frontal de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham.

## 5.5 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada através da determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com a finalidade de demonstrar a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA e os efeitos da agomelatina sobre o estresse oxidativo.

As figuras 10, 11 e 12 mostram os efeitos da administração da agomelatina nas doses de 5 mg/Kg e 10 mg/Kg sobre o conteúdo de malonildialdeído (MDA) no hipocampo (HC), núcleos da base e córtex pré-frontal (CPF) respectivamente.

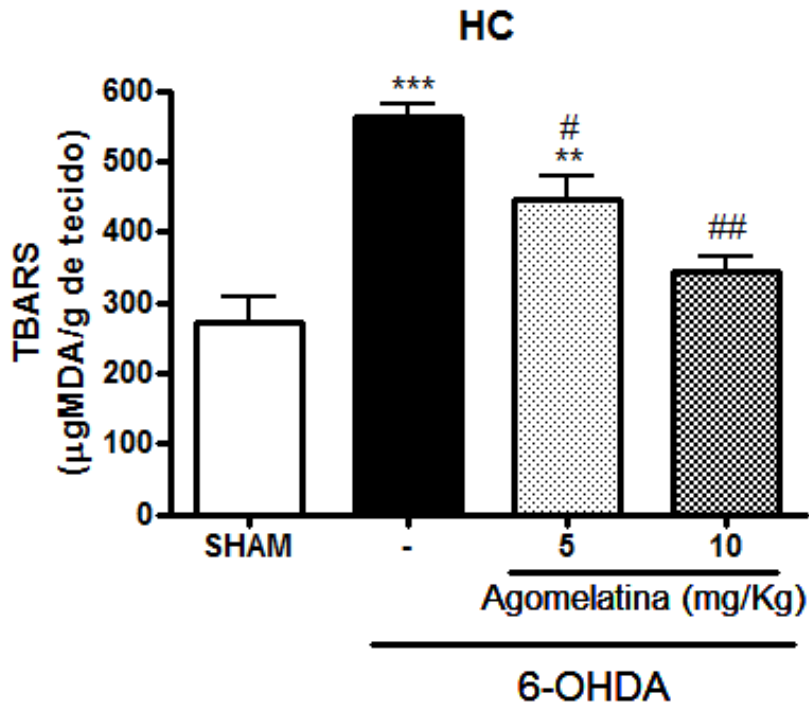
Os resultados mostraram que a exposição das áreas cerebrais HC, NB e CPF, a 6-OHDA (6 $\mu$ g/ $\mu$ l) causou um aumento no conteúdo de MDA de 100%, 175% e 102% respectivamente quando comparado com o grupo sham, demonstrando que o estresse oxidativo tem um papel importante no mecanismo de lesão induzida pela 6-OHDA.

No HC o grupo lesionado e tratado com agomelatina na dose de 5 mg/kg apresentaram uma redução de 27% nos níveis de MDA e o grupo tratado com agomelatina na dose de 10 mg/kg apresentou uma redução de 49% nos níveis de MDA quando comparado com o grupo 6-OHDA controle (612,7 $\pm$ 5,1) (Figura 10).

No NB o tratamento com agomelatina nas doses de 5 e 10 mg/kg reduziu significativamente a concentração de MDA em cerca de 25% e 40%, respectivamente (Figura 11).

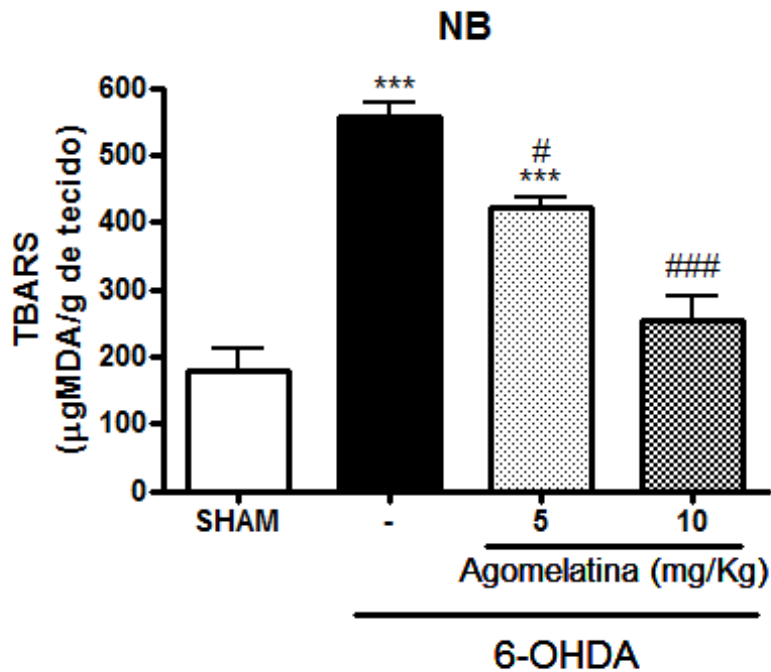
O tratamento com agomelatina foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica no CPF em 12%, na dose de 10 mg/Kg, respectivamente, o mesmo não ocorrendo na dose de 5mg/Kg (Figura 12).

Figura 10 – Determinação do TBARS em hipocampo de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



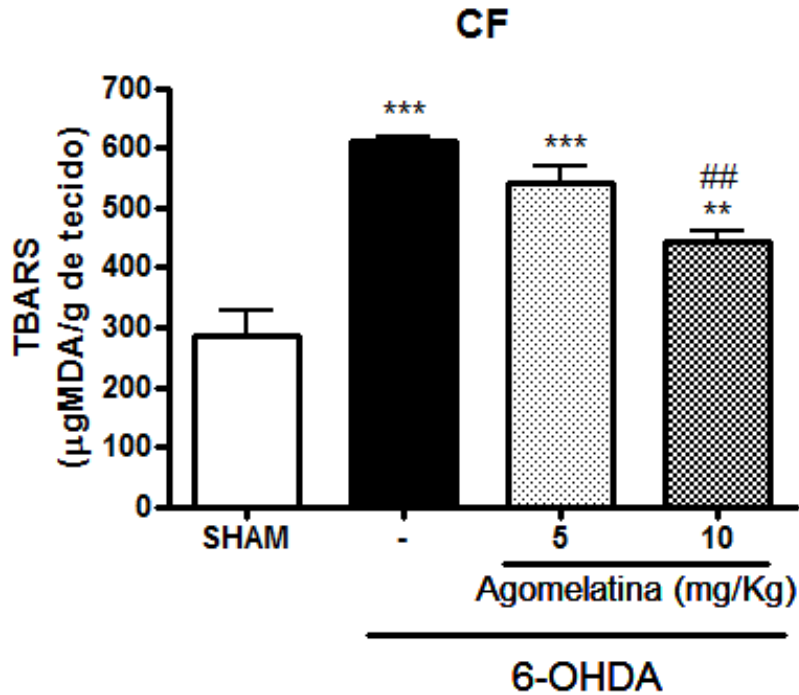
Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham; \*\*:  $p < 0,01$  em relação ao grupo sham; #:  $p < 0,05$  em relação ao grupo controle #:  $p > 0,01$  em relação ao grupo controle.

Figura 11 – Determinação do TBARS em núcleos da base de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham; # $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; ### $p < 0,001$  em relação ao grupo controle

Figura 12 – Determinação do TBARS em córtex pré-frontal de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos. Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; AGO 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg AGO 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham; \*\*:  $p < 0,01$  em relação ao grupo sham; #:  $p > 0,01$  em relação ao grupo controle.

## 5.6 Glutathione

O estresse oxidativo foi avaliado também pela dosagem dos níveis de glutathione, um tripeptídeo aceito tradicionalmente como participante dos mecanismos de defesa celular contra radicais livres.

As figuras 13, 14 e 15 mostram os efeitos da administração da agomelatina nas doses de 5 mg/Kg e 10 mg/Kg sobre os níveis de glutathione no hipocampo (HC), núcleos da base e córtex pré-frontal (CPF) respectivamente.

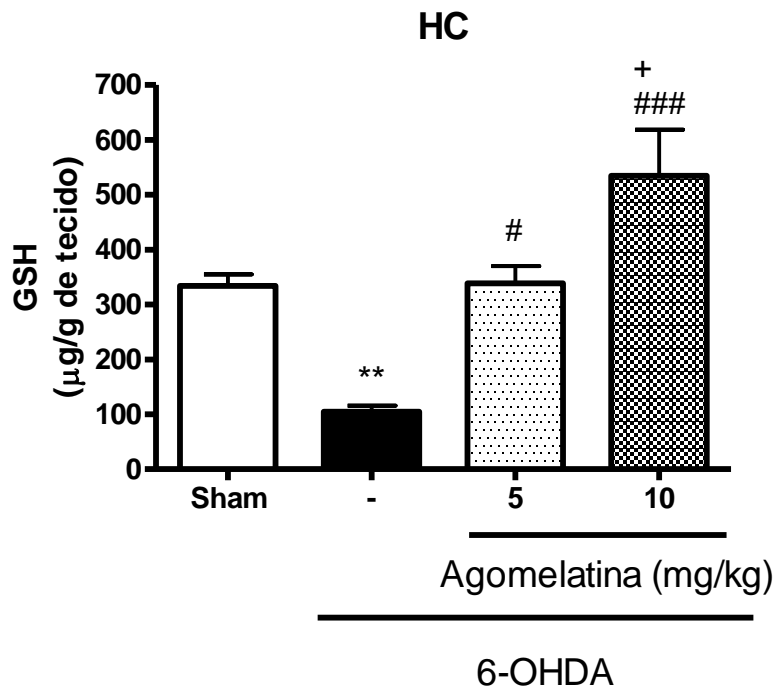
Os resultados mostraram que a exposição das áreas cerebrais HC, NB e CPF, a 6-OHDA (6 $\mu$ g/ $\mu$ l) causou uma redução no conteúdo de glutathione de 67 %, 73% e 57% (falso operao HC: 334,2  $\pm$  20,58; NB 252  $\pm$  31,79; CPF 402,0  $\pm$  56,4; 6-OHDA HC: 104,8  $\pm$  10,9; NB: 68,97  $\pm$  3,2; CPF 189,7  $\pm$  16,22) respectivamente quando comparado com o grupo sham, comprovando que o estresse oxidativo tem um papel importante no mecanismo de lesão induzida pela 6-OHDA.

No HC os grupos lesionados e tratados com agomelatina na dose de 5 mg/kg apresentaram um aumento de 3x nos níveis de glutathione ( 338,6  $\pm$  31,84) e o grupo tratado com agomelatina na dose de 10 mg/kg apresentou um aumento de 5x (534,6  $\pm$  83,77) nos níveis de glutathione quando comparado com o grupo 6-OHDA controle (104,8 $\pm$ 10,9). O grupo tratado com agomelatina na dose de 10 mg/kg apresentou ainda um aumento nos níveis de glutathione de 57% em relação ao grupo tratado com agomelatina 5 mg/kg (Figura 13).

No NB os grupos lesionados e tratados com agomelatina na dose de 5 mg/kg apresentaram um aumento de 4x nos níveis de glutathione ( 288,9  $\pm$  24,93) e o grupo tratado com agomelatina na dose de 10 mg/kg apresentou um aumento de 6x (418,5  $\pm$  24,33) nos níveis de glutathione quando comparado com o grupo 6-OHDA controle (68,97 $\pm$ 3,21). O grupo tratado com agomelatina na dose de 10 mg/kg apresentou ainda um aumento nos níveis de glutathione de 45% em relação ao grupo tratado com agomelatina na dose de 5 mg/kg (Figura 14).

No CPF os grupos lesionados e tratados com agomelatina 5 mg/kg apresentaram um aumento de 94% nos níveis de glutathione ( 367,2  $\pm$  48,4) e o grupo tratado com agomelatina na dose de 10 mg/kg apresentou um aumento de 150% (475,9  $\pm$  30,9) nos níveis de glutathione quando comparado com o grupo 6-OHDA controle (189,7 $\pm$ 16,22) (Figura 15).

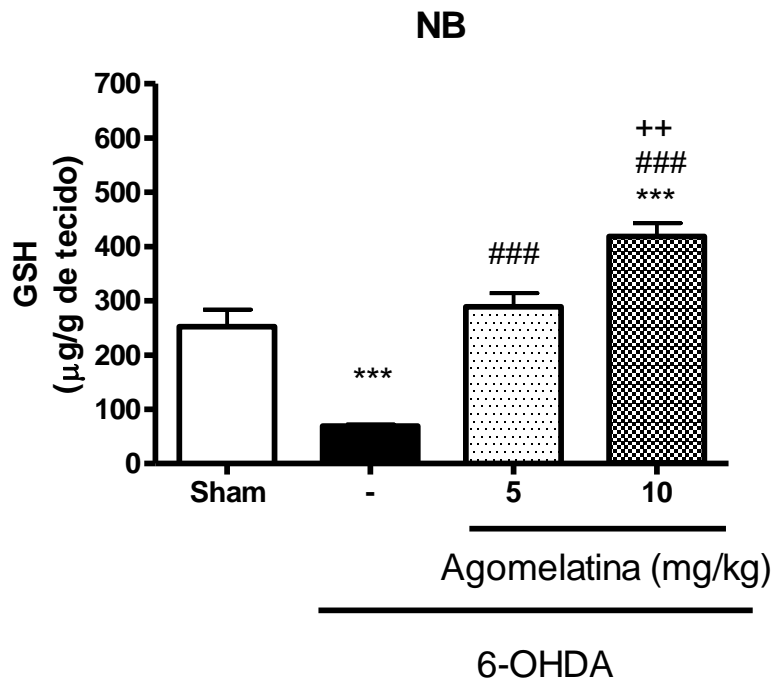
**Figura 13 – Concentração de glutatona (GSH) em hipocampo de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).**



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*:  $p < 0,01$  em relação ao grupo sham; # $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; ###:  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle; + :  $p < 0,05$  em relação ao grupo 5.

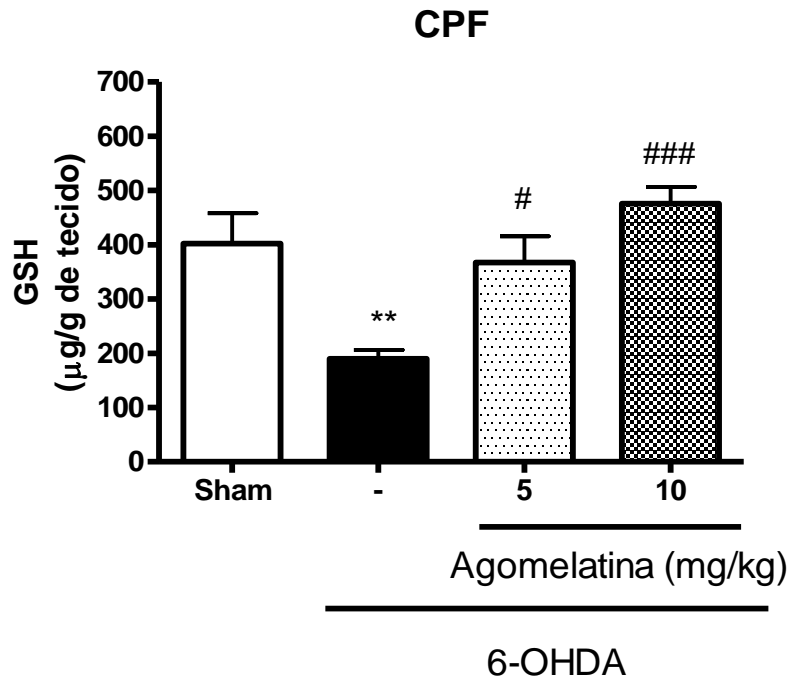


**Figura 14 – Concentração de glutatona (GSH) em núcleos da base de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).**



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg. \*\*\*:  $p < 0,001$  em relação ao grupo sham; ###  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle; ++  $p < 0,01$  em relação ao grupo tratado 5.

**Figura 15 – Concentração de glutatona (GSH) em córtex pré-frontal de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA, tratados com agomelatina (5 e 10 mg/kg, i.p. diariamente durante 21 dias).**



Fonte: Elaborada pelo autor. Nota: Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM do número de experimentos (5-7). Foi usado o teste ANOVA e Bonferroni como teste *post hoc*. Sham: grupo sham; -: grupo controle; 5: grupo tratado com agomelatina 5mg/Kg; 10: grupo tratado com agomelatina 10mg/kg; \*\*:  $p < 0,01$  em relação ao grupo sham; # $p < 0,05$  em relação ao grupo controle; ### $p < 0,001$  em relação ao grupo controle

## 6 DISCUSSÃO:

No presente estudo a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) foi a neurotoxina utilizada experimentalmente para induzir a doença de Parkinson nos animais, foi utilizada a lesão intraestriatal unilateral, nela as fibras nigroestriatais são destruídas unilateralmente através da injeção de 6-OHDA, e os animais respondem a agonistas dopaminérgicos, incluindo a apomorfina, apresentando rotações contralaterais (no sentido contrário ao da lesão) (BLANDINI et al., 2008).

Os resultados do teste rotacional mostraram que a injeção unilateral com 6-OHDA no estriado produziu rotações induzidas por apomorfina, corroborando com os dados de literatura descritos que apontam esse parâmetro como indicativo de estabelecimento da lesão e indução do modelo. Esse efeito provavelmente envolve supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos causada pela perda dos terminais dopaminérgicos, resultando em uma significativa redução da concentração de dopamina no estriado lesionado com 6-OHDA (JOGHATAIE et al., 2004).

Os resultados obtidos nos testes comportamentais apontam para um efeito de melhora da função motora dos animais submetidos ao tratamento com agomelatina. De acordo com Busquet, 2001, este efeito pode estar relacionado com a sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, que culminou com a proteção dos neurônios dopaminérgicos contra a ação lesiva dos radicais livres produzidos pela auto-oxidação da 6-OHDA, ativação do processo inflamatório e redução da morte neuronal com consequente redução da hipersensibilização dos receptores dopaminérgicos e recuperação dos níveis de dopamina, levando assim, a essa recuperação motora.

Gupta e Sharma,(2014) verificaram efeito neuroprotetor da agomelatina em um modelo experimental de doença de Huntington, eles sugeriram que esse efeito poderia ser atribuído a modulação dos receptores melatoninérgicos, especialmente o MT1 exercida pela agomelatina e com isso indução de proteção contra o estresse oxidativo, dano oxidativo mitocondrial, apoptose e neurodegeneração.

A 6-OHDA provoca destruição nigroestriatal causando disfunção motora nos animais que pode ser evidenciada através da redução da atividade locomotora no campo aberto e redução do desempenho motor no teste de rota rod. O déficit motor causado por 6-OHDA está diretamente relacionado ao grau de lesão e destruição neuronal que ocorre através de alguns mecanismos, entre eles o desequilíbrio oxidativo que cursa geralmente com

aumento da ação dos radicais livres, peroxidação lipídica e redução da ação dos sistemas antioxidantes endógenos (DIDONET et al., 2014).

Kumar *et al.* (1995) utilizando o modelo experimental de lesão estriatal por 6-OHDA em ratos, mostraram que no corpo estriado desses animais houve aumento de cerca de 40 % na concentração de MDA (malonildialdeído), indicando altos níveis de peroxidação lipídica. Esses efeitos estavam associados à redução dos conteúdos de enzimas antioxidantes como GSH, SOD e GSH-Px (glutationa peroxidase), juntos esses fatores podem levar ao aumento da geração de radicais livres e a morte neuronal.

Mansouri e colaboradores (2013) demonstraram que a lesão com 6-OHDA provocou aumento das concentrações de MDA e redução das concentrações de enzimas do sistema antioxidante endógeno, como catalase, glutationa peroxidase e superóxido dismutase. Esses efeitos foram reduzidos com o tratamento com ácido gálico, e os autores sugeriram que houve uma ação neuroprotetora desse composto contra o estresse oxidativo induzido por 6-OHDA através da melhora da defesa antioxidante celular.

No presente trabalho os animais que receberam a 6-OHDA tiveram um aumento do conteúdo de MDA em todas as áreas anatômicas estudadas, assim como redução dos níveis de glutationa, corroborando o estresse oxidativo induzido por 6-OHDA. Houve também aumento nas concentrações de nitritos indicando a ocorrência de estresse nitrosativo.

O tratamento com a agomelatina na dose de 10mg/Kg ocasionou uma redução dos níveis de MDA em todas as áreas cerebrais testadas. Foi também verificada uma maior concentração de glutationa em todas as áreas cerebrais estudadas, onde o melhor efeito foi observado com a maior dose. Estes resultados estão provavelmente associados à uma ação anti-oxidante da agomelatina e, além disso, podem estar associados também à capacidade deste fármaco de melhorar a atividade do complexo I mitocondrial, contribuindo para redução da neurotoxicidade da 6-OHDA.

Os resultados mostram também uma menor concentração de nitritos no hipocampo e nos núcleos da base na dose de agomelatina 10mg/Kg. Um dos efeitos antiinflamatórios mais potentes da melatonina consiste na downregulation e na inibição da oxido nítrico sintase induzida e neuronal (iNOS e nNOS), e sendo a agomelatina um análogo da melatonina agindo nos mesmos receptores e com a mesma afinidade, a redução dos níveis de nitrito e nitrato pode estar correlacionada possivelmente com esses efeitos (HARDELAND et al., 2015) . Esses resultados mostram que a redução do desequilíbrio oxidativo pode estar relacionados com um possível efeito neuroprotetor levando a uma redução da degeneração neuronal e conseqüentemente a recuperação motora observada nos testes comportamentais.

A melatonina é um antioxidante lipofílico, com potente ação sequestradora de radicais livres e propicia uma proteção contra a redução da atividade do complexo I mitocondrial (TAPIAS et al, 2009). A melatonina previne a apoptose neuronal causada por radicais livres e é efetiva em reduzir a peroxidação lipídica em amostras cérebros de ratos (SEWERYNEK et al, 1995). A opção por se utilizar a agomelatina, respalda-se em estudos realizados com melatonina em modelos de doença de Parkinson, que fornecem maior parte da evidência do efeito neuroprotetor deste hormônio.

A agomelatina é um análogo da melatonina recentemente introduzido na clínica como antidepressivo, que age em ambos os receptores melatonérgicos MT1 e MT2 com afinidade similar a melatonina (CARDINALI et al., 2013). A agomelatina apresenta alguns efeitos similares aos da melatonina. Estudos mostram que a agomelatina também está evolvida com ações antiexcitatórias, imunomodulação, inclusive propriedades anti-inflamatórias, ações antioxidantes, equilíbrio do metabolismo energético, influência no fluxo de elétrons mitocondrial, no poro de transição de permeabilidade mitocondrial e na biogênese mitocondrial (SRINIVASAN et al., 2011).

Além disso, foi demonstrado que a agomelatina é capaz de modular fatores neurotróficos, como aumentar a expressão do fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF), aumentar a neurogenese hipocampal e ativar vários sinais celulares relacionados com regeneração celular (GUMUSLU et al., 2011).

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que os animais tratados com a agomelatina tiveram melhor desempenho nos testes comportamentais. A agomelatina reverteu as alterações neuroquímicas induzidas por 6-OHDA que foram analisadas Estes resultados provavelmente ocorreram devido a efeitos como a inibição do desequilíbrio oxidativo, que pode estar relacionado com um possível efeito neuroprotetor.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo sugerem que pode haver um efeito neuroprotetor ocasionado pela administração da agomelatina em modelo de doença de Parkinson induzido pela 6-Hidroxiopamina provavelmente através da interferência em processos relacionados à geração de espécies reativas do oxigênio, assemelhando-se aos resultados de estudos realizados com a melatonina, tornando mais robusta a evidência positiva do efeito neuroprotetor e contribuindo para aumentar o leque de opções de drogas a serem estudadas em humanos e que possam interferir favoravelmente na doença de Parkinson.

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; COTO-MONTES, A.; GAIA, M. M.; ORTIZ, G. G.; REITER, R. J. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 60: L23–L29, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9000122>>. Acesso em 22 Abr 2014.
- ADI, N.; MASH, D. C.; ALI, Y.; SINGER, C.; SHEHADEH, L.; PAPAPETROPOULOS, S. Melatonin MT<sub>1</sub> and MT<sub>2</sub> receptor expression in Parkinson's disease. *Med Sci Monit* 16: 61–67, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19437546>> Acesso em 03 Fev 2014.
- AGUIAR, L. M.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Melatonin reverses neurochemical alterations induced by 6-OHDA in rat striatum. *Life Sci.*, v. 70, p. 1041-1051, 2002. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11862988>> Acesso em 14 Mar 2015.
- AGUIAR, L. M.; VASCONCELOS, S. M.; MACÊDO, D. S.; FREITAS, R. M.; ALBUQUERQUE, A. O.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Protective effects of N-acetylisero-tonin against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Life Sci.*, v. 76, p. 2193-2202, 2005. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733934>> Acesso em 21 Mar 2015.
- AHLISKOG, J. E. Challenging conventional wisdom: the etiologic role of dopamine oxidative stress in Parkinson's disease. *Mov Disord.*, 20(3) p. 271-82, Mar 2005. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580550>> Acesso em: 21 Mar 2014.
- ANDERSEN, J. K. Oxidative stress in neurodegeneration: Cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*. Vol 5(Supplement):S18–S25, 2004. Disponível em:< <http://www.nature.com/nm/journal/v10/n7s/full/nrn1434.html>> Acesso em: 6 Mai 2015.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, v.21, n.2, p.205-235, 1973. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000334727380065X>> Acesso em: 23 Mar 2015.
- BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C.; 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). *Mov Disord*, 21(6), p.800-8, Jun 2006. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482566>> Acesso em 21 Nov 2014.
- BARDEN, N.; SHINK, E.; LABBE´, M.; VACHER, R.; ROCHFORD, J.; MOCAER, E. Antidepressant action of agomelatine (S 20098) in a transgenic mouse model. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, v. 29, p. 908-916, 2005. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16005135>> Acesso em: 22 Nov 2014.

BARTELS, A. L.; LEENDERS, K. L. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex*, 45(8), pag. 915-921, Sep. 2009. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19095226>> Acesso em: 14 Set 2014.

BEZARD, E.; YUE, Z.; KIRIK, D.; SPILLANTINI, M. G. Animal models of Parkinson's disease: limits and relevance to neuroprotection studies. *Mov Disord*, 28, p. 61–70, 2013. Disponível em:< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mds.25108/abstract>> Acesso em: 05 Nov. 2015.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism Relat. Disord.*, v. 2, p. 124-129, 2008. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18595767>> Acesso em: 14 Fev 2014.

CALLIO, J.; OURY, T.; CHU, C. Manganese superoxide dismutase protects against 6-hydroxydopamine injury in mouse brains. *J Biol Chem*. 6, 280(18), May 2005. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755737>> Acesso em 8 Mar 2015.

CARDINALI, D. P.; PAGANO, E. S.; SCACCHI BERNASCONI, P.A.; REYNOSO, R.; SCACCHI, P. Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Horm Behav*. Vol. 63 Ed.2, pag:322-30. Feb 2013. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22391273>> Acesso em: 21 Jan 2015.

CARR, A.C.; MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: Reaction pathways and antioxidant protection. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.; 20:1716–1723. 2000. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10894808>> Acesso em: 17 Jul 2014.

COLLINS L. M.; TOULOUSE, A.; CONNOR, T. J.; NOLAN, Y. N. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, v. 62, p. 2154-2168, 2012. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361232>> Acesso em 1 Mar 2014.

DABBENI-SALA, F.; DI SANTO, S.; FRANCESCHINI, D.; SKAPER, S. D.; GIUSTI, P. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. *FASEB J*. Jan; 15(1):164-170. 2001. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11149904>> Acesso em 15 Abr. 2014.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. v. 39, p. 889-909, 2003. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12971891>> Acesso em: 07 Mar. 2015.

DIDONET, J. J. et al. Neuropeptide S counteracts 6-OHDA-induced motor deficits in behavioural Brain Research, Volume 266, Pages 29-36. 2014. Disponível em< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24613977>> Acesso em: 21 Fev 2015.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. *Methods in enzymology*. Vol 186, p 421-431, 1990. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799086135I>> Acesso em 14 Fev 2015.



DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S.; A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm.* Vol 46, ed. 3. pag: 208-209. 1957. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.3030460322/pdf>> Acesso em 09 Fev 2015

EVE, D. J. N. A. et al. Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 63(1):62–71. Dec 10, 1998. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9838046>> Acesso em: 21 Ago 2014.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *Neuro Rx.* v.1, ed.1, p 139-54 Jan 2004. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC534919/>> Acesso em: 4 Mai 2014.

GHAVAMI, S. et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders.; *Prog Neurobiol.*;112:24-49, Jan 2014. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24211851>> Acesso em 28 Abr 2014.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science.* Vol 212, Ed. 4490, p. 56–58, Apr 3: 1981. Disponível em:<<http://science.sciencemag.org/content/212/4490/56.full-text.pdf+html>> Acesso em 11 Fev 2015.

GRESSENS, P.; SCHWENDIMANN, L.; HUSSON, I.; SARKOZY, G.; MOCAER, E.; VAMECQ, J.; SPEDDING, M. Agomelatine, a melatonin receptor agonist with 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist properties, protects the developing murine white matter against excitotoxicity. *European journal of pharmacology*, v. 588, n. 1, p. 58-63, Jun 24, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299908004123>> Acesso em: 21 Jan 2015.

GUMUSLU, E.; MUTLU, O.; SUNNETCI, D.; ULAK, G.; CELIKYURT, I. K.; CINE, N.; AKAR, F.; SAVLI, H.; ERDEN, F. The Antidepressant Agomelatine Improves Memory Deterioration and Upregulates CREB and BDNF Gene Expression Levels in Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS)-Exposed Mice. *Drug Target Insights.* 2014 Mar 5;8:11-21. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24634580>> Acesso em 12 Mar 2015.

GUO, S.; BEZARD, E.; ZHAO, B. Protective effect of green tea polyphenols on the SH-SY5Y cells against 6-OHDA induced apoptosis through ROS-NO pathway. *Free Radic. Biol. Med.*, 39, pag. 682–695, 2005. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16085186>> Acesso em: 7 Ago 2014.

GUPTA, S.; SINGH, P.; SHARMA, B. M.; SHARMA, B. Neuroprotective Effects of Agomelatine and Vinpocetine Against Chronic Cerebral Hypoperfusion Induced Vascular Dementia. *Curr Neurovasc Res.*; Vol 12(3), p240-52, 2015. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26036976>> Acesso em 24 Set 2015.

HAMANI, C.; LOZANO, A. M. Physiology and pathophysiology of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991 pag. 15-21, Jun 2003. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12846970>> Acesso em: 11 Mar 2015.

HARDELAND, R.; CARDINALI, D. P.; BROWN G. M.; PANDI-PERUMAL, S.R. Melatonin and brain inflammaging. Review Article Progress in Neurobiology, Volumes 127–128, , Pag 46-63 Abr 2015. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697044>> Acesso em 22 Ago 2015.

HARDELAND, R.; CARDINALI D. P.; SRINIVASAN V.; SPENCE, D. W.; BROWN, G. M.; PANDI-PERUMAL, S. R. Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule.; Prog Neurobiol. 93(3):350-84, Mar 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21193011>> Acesso em: 21 Jun 2014

HARDELAND, R.; POEGGELER, B. Melatonin and Synthetic Melatonergic Agonists: Actions and Metabolism in the Central Nervous System. Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry,12(3), 189-216, 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/101631/article#>> Acesso em: 17 Jun 2014

HAWKES, C.H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK H. Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. Neuropathol Appl Neurobiol. 33(6):599-614, Dec 2007. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17961138>> Acesso em: 19 Fev 2015.

HIRSCH, E. C. et al. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. Ann N Y Acad Sci. 991:214–228, 2003. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12846989>> Acesso em: 21 Nov 2014.

HIRSCH, E. C.; JENNER, P.; PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of Parkinson's disease. Mov Disord 2013; 28:24. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=22927094>> Acesso em 22 Jan 2014.

HISHIKAWA, N. et al. Clinical and neuropathological correlates of Lewy body disease. Acta Neuropathol., 105:341-350, 2003. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624787>> Acesso em: 21 Jun 2014.

HUNOT, S. et al. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Neurosci.; 72:355–363, 1996. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8737406>> Acesso em 13 Abr 2014.

DUSEK, P.; JANKOVIC, J.; LE, W. Iron dysregulation in movement disorders. Neurobiol Dis; 46:1, 2012. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996112000095>> Acesso em 06 Jun 2014.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease. Ann Neurol., 53(Suppl. 3):S26–S36, discussion S36-S28, 2003. Disponível em:< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ana.10483/full>> Acesso em 14 Jan 2015.

JOGHATAIE, M.T. et al. Protective effect of caffeine against neurodegeneration in a model of Parkinson's disease in rat: behavioral and histochemical evidence. Parkinsonism Relat Disord. 10(8):465-8, Dec 2004. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542005>> Acesso em 12 Jan 2015.

- KIM, Y.S. et al. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport*, v. 9, p. 2387-2390, 1998. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9694233>> Acesso em 28 Jan 2014.
- KUMAR, R.; AGARWAL, A.K.; SETH, P.K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem*. Vol 64(4); p1703-7. Apr 1995. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7891098>> Acesso em 22 Fev 2015.
- LASHUEL H.A. et al. Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils.; *Mol Biol.*, 322(5):1089, 2002. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367530>> Acesso em: 14 Abr 2014.
- LUK, K. C. et al. Pathological  $\alpha$ -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science*, 338(6109):949-53; Nov 2012. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23161999>> Acesso em 07 Abr 2014.
- MANSOURI, M. T. et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Original Research Article Food Chemistry, Volume 138, Edições 2–3, Pag. 1028-1033; 1 June 2013*. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612017499>> Acesso em: 03 Mar 2015.
- MARIES, E. et al. The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: insights from animal models. *Nat Rev neurosci*, 4(9):727. 2003. Disponível em:< <http://www.nature.com/nrn/journal/v4/n9/full/nrn1199.html>> Acesso em: 13 Fev 2014.
- MARINESCU, D.; MOGOANTA, L.; UDRISTOIU, T.; UDRISTOIU, I.; PIRICI, D. The neuroprotective potentially of agomelatine animal model. *European Psychiatry, Volume v. 26, supplement 1, p.1256, 2011*. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924933811729613>> Acesso em 22 Mai 2014.
- MEREDITH, G. E.; HALLIDAY, G. M.; TOTTERDELL S. A critical review of the development and importance of proteinaceous aggregates in animal models of Parkinson's disease: new insights into Lewy body formation; *Parkinsonism Relat Disord*. 2004;10(4):191. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120093>> Acesso em 21 Abr 2014.
- MILLAN, M. J.; BROCCO, M.; GOBERT, A.; DEKEYNE, A. Anxiolytic properties of agomelatine, an antidepressant with melatonergic and serotonergic properties: role of 5-HT<sub>2C</sub> receptor blockade. *Psychopharmacology (Berl)*, 177(4), pag. 448-458, Feb 2005. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289999>> Acesso em 14 Mar 2015.
- MILLER, R. L et al. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem. Res.*, v. 34, p. 55-65, 2009. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18363100>> Acesso em: 21 Mar 2014.
- MOSLEY, R. L. et al.. Neuroinflammation, oxidative stress and pathogenesis os Parkinson's disease. *Clin Neurosci Res*. v. 6, p. 291-311, 2006. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1831679/>> Acesso em 7 Set 2014.

NICHOLLS, D. G. Oxidative stress and energy crises in neuronal dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* Dec. 1147:53-60, 2008. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>> Acesso em 9 Dez 2014.

OBESO, J. A. et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, v. 23, p. 548-559, 2008. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18781672>> Acesso em: 21 Mar 2015.

OLIVEIRA, R. B. et al. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Rev. Bras. de Ciências Farmacêuticas.* Vol 44, n. 3, Pag. 485-91, jul/set 2008. Pag 487

PAXINO, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 2dn Edn, 1986.

PERIER, C.; BOVÈ, J.; VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. The rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2003; 26:345–346. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166223603001449>> Acesso em 15 Abr 2014.

POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mutation in the alpha synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science.* 1997;276:2045-2047. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9197268>> Acesso em 02 Fev 2014.

POMPELLA, A. et al. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* Vol 66, Ed. 08, p. 1499–1503. 2003. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295203005045>> Acesso em: 20 Fev 2015.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. D. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord.* 2014;29(13):1583. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24976103>> Acesso em 21 Mai 2015.

PRZEDBORSKI, S.; TIEU, K.; PERIER, C.; VILA, M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease.; *J Bioenerg Biomembr.* Aug;36(4):375-9, 2004. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377875>> Acesso em: 09 Jan 2015.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord*, v. 11, p. 3-7, 2005. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885625>> Acesso em 02 Fev. 2015.

RAZA S.S. et al. Neuroprotective effect of naringenin is mediated through suppression of NF- $\kappa$ B signaling pathway in experimental stroke. *Neuroscience*, 29;230 p157-71, Jan 2013. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452212010561>> Acesso em 30 Abr 2014.

SAN, L.; ARRANZ, B. Agomelatine: a novel mechanism of antidepressant action involving the melatonergic and the serotonergic system. *European psychiatry*, v. 23, n. 6, p. 396-402, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>> acesso em 11 Abr. 2014

SCHAPIRA, A. H. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet*, v. 1 ed. 8649 p.1269, 1989. Disponível em:<  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673689923660>> Acesso em 29 Abr. 2014.

SCHAPIRA, A. H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord*, v. 26, ed.6, p. 1049-55, 2011. Disponível em:<  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21626550>> Acesso em: 6 Mai 2014.

SCHOLZ, R. W.; GRAHAM, K. S.; GUMPRICHT, E.; REDDY, C. C. Mechanism of interaction of vitamin E and glutathione in the protection against membrane lipid peroxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 570, 514–517. 1989. Disponível em<  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1749-6632.1989.tb14973.x/pdf>> Acesso em 22 Fev 2015.

SCHULZ, J.B. et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem.* 64:936–939, 1995. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7530297>> Acesso em: 13 Abr 2014.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, proteinbound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25(1):192-205. 1968

SEWERYNEK, E.; MELCHIORRI, D.; ORTIZ, G. G.; POEGGELER, B.; REITER, R. J. Melatonin reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lipid peroxidation in homogenates of different rat brain regions. *J. Pineal Res*, Vol 195, número 3, p 203-205; Ago 1995. Disponível em:<  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8584210>> Acesso em 4 Mar 2015

SHERER, T.B. et al. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 23(34):10756, 2003. Disponível em:<  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645467>> Acesso em: 29 Abr 2014.

SIELGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. *J. Psychol.*, v.21, p.227-236, 1946.

SINGLETON, A. B.; FARRER, M. J.; BONIFATI, V. The genetics of Parkinson's disease: progress and therapeutic implications. *Mov Disord*, 28(1), pag. 14-23, 2013. Disponível em:<  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389780>> Acesso em: 10 Jan 2015.

SRINIVASAN, V. et al. Therapeutic potential of melatonin and its analogs in Parkinson's disease: focus on sleep and neuroprotection. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders.*;4(5) pag. 297-317, 2011. Disponível em:<  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3187674/>> Acesso em 23 Fev 2014.

STOCCHI, F. The hypothesis of the genesis of motor complications and continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.*, v.15, p. 9-15, 2009. Disponível em:<  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131046>> Acesso em: 21 Jun 2014.

SULZER, D.; SURMEIER, D. J. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. *Mov Disord.*, v.28, ed.6, p 715-724, Jun 2013. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791686>> Acesso em 5 Mai 2014.

SZABO, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 6:662–680, 2007. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17667957>> Acesso em 12 Dez 2014.

TAPIAS, V. et al. Melatonin and its brain metabolite *N*<sup>1</sup>-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 87: 3002–3010, 2009. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19437546>> Acesso em 16 Jan 2015.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: co-inspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 62(5), pag. 803-819, Apr 2013. Disponível em:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197018612004147>> Acesso em 13 Set 2014.

TEISMANN, P. et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:5473. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154369/>> Acesso em 9 Ago 2014.

TEJADA, S.; SUREDA, A.; ROCA, C.; GAMUNDI A.; ESTEBAN S. Antioxidant response and oxidative damage in brain cortex after high dose of pilocarpine. *Brain Res Bull*, 9, 71(4) p372-5, Jan 2007. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208654>> Acesso em 04 Mai 2014.

UEHARA, T.; NAKAMURA, T.; YAO, D.; SHI Z, Q.; GU Z.; MA, Y.; MASLIAH, E.; NOMURA Y.; LIPTON S.A. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*, 25; 441(7092):513-7, May 2006. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16724068>> Acesso em 02 Mai 2014.

WALKER, F. R. A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptake inhibitors: Do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevant is this in the treatment of depression? *Neuropharmacology*, v. 67, p. 304-317, 2013. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23085335>> Acesso: 19 Jun 2014.

XIONG, H. et al. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation.; *J Clin Invest.*, 119(3):650, 2009. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19229105>> Acesso em 30 Abr 2014.