

CÓD. ACERVO: 66477

R 1383179/04

R#11,40

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA FRAÇÃO TANINO ISOLADA  
DA *MIRACRODRUON URUNDEUVA* E DA CATEQUINA EM  
MODELOS DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELA 6-  
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM CULTURA DE CÉLULAS  
MESENCEFALICAS DE RATO.**

**HÉLIO VITORIANO NOBRE JÚNIOR**

**Fortaleza-CE  
2003**

17  
616.833  
N 672a  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA FRAÇÃO TANINO ISOLADA  
DA *MIRACRODRUON URUNDEUVA* E DA CATEQUINA EM  
MODELOS DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELA 6-  
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM CULTURA DE CÉLULAS  
MESENCEFALICAS DE RATO.**

**HÉLIO VITORIANO NOBRE JÚNIOR**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará,  
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em  
Farmacologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha

Fortaleza-CE

2003

N672a Nobre Junior, Helio Vitoriano.

Atividade neuroprotetora da fração tanino isolada da *Myracrodruon urundeuva* e da catequina em modelos de morte celular induzida pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em cultura de células mesencefálicas de rato / Helio Vitoriano Nobre Junior.

Fortaleza, 2003.

114f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Faculdade de Medicina.

1. Doença de Parkinson. 2. Catequina. 3. 6-hidroxidopamina. 4. Fração tanino isolada - *Myracrodruon urundeuva*. I. Título.

CDD 616-833

**Hélio Vitoriano Nobre Júnior**

**ATIVIDADE NEUROPROTETORA DA FRAÇÃO TANINO ISOLADA  
DA *MIRACRODRUON URUNDEUVA* E DA CATEQUINA EM  
MODELOS DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELA 6-  
HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM CULTURA DE CÉLULAS  
MESENCEFALICAS DE RATO.**

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como resultado parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Data da aprovação: 24 / 07 / 2003

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geanne Matos de Andrade Cunha  
(Orientadora)

---

Prof. Dr. Manoel Ódorico de Moraes Filho

---

Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao

*A Deus por trilhar de maneira tão  
especial a minha vida colocando nela somente pessoas  
especiais*

Aos meus amados pais, Hélio e Jandira, incentivadores e amigos de todas as horas.

## *Agradecimentos*

*À Profa. Geane Matos de Andrade Cunha, minha orientadora, pela paciência e sabedoria na transmissão de seus conhecimentos, essenciais para minha formação acadêmica.*

*À Profa. Cláudia do Ó Pessoa por ter inicialmente me convidado para estagiar no LOE onde me transmitiu os conhecimentos básicos de procedimentos laboratoriais bem como uma inestimável ajuda, incentivo e conselhos que em muito contribuíram tanto de forma direta como de forma indireta para a realização deste trabalho.*

*Ao Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho, meu co-orientador, pela recepção em seu laboratório e pelas importantes contribuições.*

*À Profa. Glauce Socorro Barros Viana, pela recepção em seu laboratório e pelas importantes discussões que em muito contribuíram para a realização desta dissertação.*

*Ao Amigo Iri Sandro, pelo constante apoio e incentivo, que em muito contribuíram nas horas difíceis.*

*Ao Irmão Paulo Queiroz, pelos conselhos e ajuda em todos os momentos e também as minhas irmãs Rafaela e Fabrícia pelo constante apoio.*

*Aos meus avós Paulo Solon e Dedece pela confiança e certeza da vitória.*

*Aos amigos da pós-graduação: Flávio, Maria Luíza, Rivelilson, Paula, Raquel, Márcio e Rômulo, pela paciência e incentivos constantes.*

*Aos Profs. do curso de pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos e constante disponibilidade.*

*À Silvana e Fátima, pela colaboração em todos os momentos.*

*Ao bolsista Ricardo pelo companheirismo e dedicação na execução dos experimentos.*

*A todos que fazem parte do Laboratório de Oncologia Experimental, pela união, amizade e lealdade, que tornam o ambiente de trabalho produtivo, agradável e de fácil convivência.*

*Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelo apoio e cooperação.*

*Ao Prof. Rao, pela inestimável ajuda e incentivo para a realização deste trabalho.*

*Ao Flávio, sempre companheiro e amigo, pela essencial colaboração na realização das análises bioquímicas.*

*À Unidade de Farmacologia Clínica, pelo apoio incondicional e pela realização das análises necessárias.*

*À Dra. Mary Anne, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, por sua colaboração em ceder a fração tanino.*

*À minha namorada, Denise, pelo companheirismo, apoio e incentivo nos momentos mais difíceis.*

*Aos amigos do HEMOCE Marcos, Ana Cláudia e Eunice pelo incentivo e apoio.*

*A Fundação Cearense de Apoio a Pesquisa-FUNCAP, pelo suporte financeiro.*



## SUMÁRIO

Lista de Figuras	xi
Lista de Abreviaturas	xiii
Resumo	xiv
Abstract	xv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 Doença de Parkinson – Epidemiologia e Fatores de risco	1
1.2 Patogênese	2
1.3 Dopamina e Doença de Parkinson	3
1.4 Estresse Oxidativo e Doença de Parkinson	11
1.5 Modelo da Doença de Parkinson	16
1.6 Neuroproteção e Neuroresgate	18
1.7 Plantas medicinais no Brasil	19
1.8 Relevância e Justificativa	25
<b>2. OBJETIVOS</b>	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	27
3.1 Substâncias químicas	27
3.2 Extração da fração tanino (FT) obtido da <i>Myracrodruon urundeuva</i>	27
3.3 Animais	27
3.4 Culturas de células mesencefálicas de rato	28
3.5 Ensaio de neurotoxicidade	28
3.6 Determinação de Nitrito	29
3.7. Determinação da peroxidação lipídica pela medição de tiobarbitúricos (TBARS)	29
3.8 Análise Estatística	31

<b>4. RESULTADOS</b>	32
4.1 Efeito citotóxico da 6-OHDA sobre a viabilidade de células mesencefálicas de rato	32
4.2 Efeito da 6-OHDA sobre a produção de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato	35
4.3 Efeito da 6-OHDA sobre os níveis de TBARS em culturas de células mesencefálicas de rato	37
4.4 Efeito da citarabina e dexferoxamina sobre a viabilidade de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA	39
4.5 Efeito da dexferoxamina sobre a produção de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA	41
4.6 Efeito da dexferoxamina sobre a produção de TBARS em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA	43
4.7 Efeito neuropreventivo da fração tanino (FT) isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA	45
4.8 Efeito de neuroresgate da fração tanino (FT) isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> em células mesencefálicas de ratos expostos a 6-OHDA	48
4.9 Efeito neuropreventivo da catequina em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA	50
4.10 Efeito de neuroresgate da catequina em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA	53
4.11 Efeito da fração Tanino (FT) isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (Modelo de Neuroprevenção)	55
4.12 Efeito da fração Tanino (FT) isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de	

ratos expostos à 6-OHDA (Modelo de Neuroresgate)	57
4.13 Efeito da Catequina sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (Modelo de Neuroprevenção)	59
4.14 Efeito da Catequina sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (Modelo de Neuroresgate)	61
4.15 Efeito fração tanino (FT) isolada da <i>Myracrotruon urundeuva</i> sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada antes da 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo neuroprevenção)	63
4.16 Efeito fração tanino (FT) isolada da <i>Myracrotruon urundeuva</i> sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada após à 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo de neuroresgate)	65
4.17 Efeito da catequina sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada antes da 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo de neuroprevenção)	67
4.18 Efeito da catequina sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada após à 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo de neuroresgate)	69
<b>5. DISCUSSÃO</b>	71
<b>6. CONCLUSÕES</b>	85
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Vias dopaminérgicas no SNC	04
<b>Figura 2-</b>	Corte transversal de mesencéfalo mostrando: (a) redução dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e (b) indivíduo normal	05
<b>Figura 3-</b>	Corpos de Lewy em coloração por HE/Imunoperoxidase.	06
<b>Figura 4-</b>	Mecanismos da degeneração neuronal na doença de Parkinson (DP) familiar.	08
<b>Figura 5-</b>	Formação de radicais livres	11
<b>Figura 6-</b>	Representação estrutural da catequina. Catequina R1=OH; R2=H; R3=H	25
<b>Figura 7-</b>	Citotoxicidade da 6-OHDA (200 µM) em cultura de células mesencefálicas de rato. <b>a</b> grupo controle (40X) <b>b</b> grupo 6-OHDA (40X).	33
<b>Figura 8-</b>	Efeito da 6-OHDA sobre a viabilidade celular mesencefálicas de rato.	34
<b>Figura 9-</b>	Efeito da 6-OHDA sobre os níveis de nitrito em células mesencefálicas de rato.	36
<b>Figura 10-</b>	Efeito da 6-OHDA sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de rato.	38
<b>Figura 11-</b>	Efeito da citarabina e dexferoxamina sobre a viabilidade de células mesencefálicas de rato tratados com 6-OHDA(200µm).	40
<b>Figura 12-</b>	Efeito da dexferoxamina sobre os níveis de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA.	42
<b>Figura 13-</b>	Efeito da dexferoxamina sobre os níveis de TBARS em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA.	44
<b>Figura 14-</b>	Efeito da fração tanino (FT) na cultura de células mesencefálicas de rato na presença de 6-OHDA. <b>a</b> grupo controle (40X) <b>b</b> grupo 6-OHDA (40X) <b>c</b> grupo FT+6-OHDA (40X).	46
<b>Figura 15-</b>	Efeito neuropreventivo da fração tanino (FT) isolada da Myracrodruon urundeuva em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA.	47
<b>Figura 16-</b>	Efeito de neuroresgate da fração tanino (FT) isolada da Myracrodruon urundeuva em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA.	49
<b>Figura 17-</b>	Efeito da catequina na cultura de células mesencefálicas de rato na presença de 6-OHDA.	51
<b>Figura 18-</b>	Ação da Cat sobre a viabilidade celular.	52

<b>Figura 19-</b>	Efeito de neuroresgate da Cat em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA.	54
<b>Figura 20-</b>	Efeito da FT isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroprevenção).	56
<b>Figura 21-</b>	Efeito da FT isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroresgate).	58
<b>Figura 22-</b>	Efeito da Cat sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroprevenção).	60
<b>Figura 23-</b>	Efeito da Cat sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroresgate).	62
<b>Figura 24-</b>	Efeito da FT isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre os níveis de TBARS em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroprevenção).	64
<b>Figura 25-</b>	Efeito da FT isolada da <i>Myracrodruon urundeuva</i> sobre os níveis de TBARS em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroresgate).	66
<b>Figura 26-</b>	Efeito da Cat sobre os níveis de TBARS em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroprevenção).	68
<b>Figura 27-</b>	Efeito da Cat sobre os níveis de TBARS em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroresgate).	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5-HT-** serotonina

**6-OHDA-** 6-hidroxi-dopamina

**ANOVA-** Análise de variância

**CAT-** catequina

**DA-** dopamina

**DP** – doença de Parkinson

**EAE-** extrato etilacetato

**EPM-** Erro padrão da média

**FT-**Fração Tanino

**MDA-** malonil di-aldeído

**MEM-** Meio Essencial de Eagle

**MTT-** 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo

**NI-** nitrito

**TH-** tirosina hidroxilase

**SNC-**sistema nervoso central

**TBARS** – substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas

## RESUMO

**Atividade neuroprotetora da fração tanino isolada da *Myracrodruon urundeuva* e da catequina em modelos de morte celular induzida pela 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em cultura de células mesencefálicas de rato. HÉLIO VITORIANO NOBRE JÚNIOR. Orientadora: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2003.**

No presente trabalho, estudou-se o efeito citoprotetor da catequina e da fração tanino (FT) isolado da *Myracrodruon urundeuva* em cultura primária de células mesencefálicas de ratos, expostas à neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). A FT foi isolada da *Myracrodruon urundeuva*, uma planta medicinal brasileira comumente utilizada como anti-inflamatório no trato genital feminino. Em exposição a 6-OHDA (200  $\mu$ M), as culturas mostraram uma diminuição em 53% (em relação ao controle) na viabilidade celular, aumento na peroxidação lipídica (103%) e nos níveis de nitrito (4400%), como observados pelos ensaios MTT, TBARS e nitrito, respectivamente. Os resultados mostraram que a exposição à catequina (100  $\mu$ g/mL) antes da 6-OHDA (modelo de neuroprevenção) ou depois da 6-OHDA (modelo de neuroresgate) promoveu uma significativa redução da morte celular causada pela 6-OHDA. A catequina não produziu alterações significativas no aumento de nitrito induzido pela 6-OHDA (em ambos os modelos), mas causou uma inibição significativa da peroxidação lipídica (em ambos os modelos). Estes resultados somados a estudos anteriores sugerem que a ação citoprotetora se deva a uma ação antioxidante desta classe de polifenóis. A FT (10 e 100  $\mu$ g/mL) reverteu significativamente a morte neuronal induzida pela toxina 6-OHDA (no modelo de neuroprevenção). No entanto no modelo de neuroresgate conseguiu reverter a morte neuronal apenas na concentração de 100  $\mu$ g/mL. A FT foi também efetiva em reverter a peroxidação lipídica promovida pela 6-OHDA em ambos os modelos. Contudo, a FT não mostrou redução nos índices de nitrito produzidos pela 6-OHDA como observado pelo teste do nitrito (tanto no modelo de neuroprevenção como no modelo de neuroresgate). O mecanismo neuroprotetor da FT parece estar relacionado com proteção mitocondrial e atividade antioxidante, exibida pelos taninos da *M. urundeuva*; a qual pode ter um significado clínico em condições neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (DP).

**Palavras-chaves:** Catequina; culturas de célula mesencefálicas; 6-hidroxi-dopamina; inibição de peroxidação lipídica; neuroproteção; neuroprevenção; neuroresgate; *Myracrodruon urundeuva*.

## ABSTRACT

**Neuroprotective actions of tannin from *Myracrodruon urundeuva* and catequine on models of cell death induced by 6-hydroxidopamine in rat mesencephalic cells. HÉLIO VITORIANO NOBRE JUNIOR. Orientadora: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade Cunha. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2003**

In the present work we showed the neuroprotective effects of catequin and tannin fraction (TF) on rat primary mesencephalic cells culture exposed to 6-hydroxidopamine (6-OHDA). TF was isolated from the stem bark of *Myracrodruoun urundeuva*, Brazilian medicinal plant, largely used as a female genital tract antiinflammatory. Cells exposed to 6-OHDA (200  $\mu$ M) showed 53% reduction on cellular viability and an increase of 53% on lipidic peroxidation and 4400% on nitrite levels as observed by MTT, TBARS and nitrite assays, respectevly. Results showed that catequin (100  $\mu$ g/mL) induced a significant reduction on cell death caused by 6-OHDA on neuroprevention and neurorescue models. Catequin did not interfered with the increased levels of nitrite induced by 6-OHDA. However, catequin inhibited significantly lipid peroxidation on both models. Theses results suggest that neuroprotective action is related to antioxidant action of this polyphenol class. TF (10 e 100  $\mu$ g/mL) significantly reverted neuronal death induced by 6-OHDA (neuroprevention model). However, on neuroprevention model it reverted cell death only in concentrations of 100  $\mu$ g/mL. TF also reverted lipid peroxidation induced by 6-OHDA on both models. Conversely, it did not reduced nitrite levels produced by 6-OHDA. The neuroprotective mechanism of TF is probably related with mitochondrial protection and antioxidant activity presented by tannins from *M. urundeuva* wich may have clinical importance on neurodegenerative disorders as Parkinson's disease.

**Key-words:** Catequin, mesencephalic cell culture, 6-hydroxidopamine, lipid peroxidation, neuroprotection, *Myracrodruoun urundeuva*



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Parkinson – Epidemiologia e Fatores de risco

O aumento da expectativa de vida da população mundial trouxe consigo os problemas que acometem principalmente a velhice. A intensa busca do desenvolvimento de drogas que modifiquem o curso das doenças neurodegenerativas representa um avanço. Assim este trabalho explora o conceito de neuroproteção no contexto da doença de Parkinson (DP) e resume os avanços recentes nesta área, em particular, o papel dos antioxidantes agindo como agentes modificadores da doença (Tanner & Goldman, 1996).

A DP é um dos distúrbios neurológicos mais comuns na prática médica. Diversos estudos encontraram incidências anuais que variam aproximadamente de 16 a 20 casos por 100.000 habitantes, e prevalência média de 120 por 100.000 habitantes. Em todos os estudos epidemiológicos foram detectados aumentos significativos na prevalência com o avanço da idade. Outros fatores de risco observados foram o sexo, (com maior prevalência da DP nos homens, sendo a média das taxas homem para mulher aproximadamente igual a 1,5), raça (uma maior prevalência foi observada na América do Norte e Europa em relação a encontrada no Japão, China e África), predisposição genética, infecções, trauma e estresse emocional (Tanner & Goldman, 1996).

Existem diferentes fatores etiológicos para PD. Estes incluem reconhecidamente fatores genéticos e ambientais e hipoteticamente interações entre estes. Um destes fatores é a geração de radicais livres (Figura 1), os quais têm sido implicados na toxicidade de muitos agentes químicos, como o safrole, o paration, entre outros; na patogênese de muitas doenças inflamatórias, nas doenças de Parkinson, de Alzheimer, na fibrose pulmonar idiopática, nefrose autoimune, na catarata, esclerose múltipla, porfiria, aterosclerose, câncer, e também em uma grande variedade de doenças degenerativas relacionadas com a idade, e com o envelhecimento (Kehrer, 1993 e Reiter et al., 1999b).

Um componente genético de DP foi considerado por Gowers quando observou que a desordem se manifestava mais comumente nas famílias de doentes. Isto foi confirmado por inúmeros estudos casos controle estimando que parentes de primeiro grau de pacientes com DP têm 2 ou 5 vezes mais riscos para o desenvolvimento da doença (Duvoisin, et al., 1969; Martin, et al., 1973; Alonso, et al., 1986; Butterfield, et al., 1943; Marttil & Rinne, 1976; Vieregge & Heverlin, 1992; Semchuk et al., 1993; Payami, et al., 1994; Bonifati, et al., 1995; Vieregge and Heverlin, 1995; DeMichele, et al., 1996; Marder, et al., 1996; Lazzarini, et al., 1994; Gasser, 1998).

Estudos em gêmeos têm tradicional significado como estimativa da contribuição genética para uma desordem. O aumento da frequência da doença em gêmeos monozigóticos em oposição aos dizigóticos é um indicativo de contribuição genética significativa. Em associação os estudos de caso-controle, os recentes estudos de gêmeos confirmam que a contribuição genética para a etiologia da DP a qual é provavelmente mais significativa em pacientes jovens. Inevitavelmente devido a heterogeneidade da etiologia da DP, um componente genético será mais importante em alguns pacientes que em outros (Young, et al., 2000).

## 1.2 Patogênese

A doença de Parkinson - ou parkinsonismo primário - foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817. O Dr. Parkinson (1755-1824) era membro do colégio real de cirurgiões da Inglaterra. Inicialmente a doença foi descrita como "paralisia agitante". A DP é uma doença neurodegenerativa caracterizada por tremor involuntário (mesmo quando em repouso), acinesia, rigidez, anormalidades na postura e episódios de interrupção motora (Barbosa, et al., 1997; Young, et al., 2000).

Além dos sintomas motores, que são os mais importantes, também estão associadas à DP, em menor frequências, sintomas como demência, depressão e disfunção autonômica (Barbosa, et al., 1997). Esses sintomas estão associados principalmente ao déficit de dopamina nos gânglios da base, mas os mecanismos fisiopatológicos de como isso se processa ainda não estão bem esclarecidos (Barbosa, et al., 1997; Oleh, 1998). A DP

compromete severamente a qualidade de vida do paciente, que pode ter dificuldade para ler, escrever e dirigir. Num estágio avançado da doença, os pacientes frequentemente não conseguem sequer realizar as atividades básicas do cotidiano, resultando em perda do emprego e da autonomia do paciente (Young, et al., 2000).

### 1.3 Dopamina e Doença de Parkinson

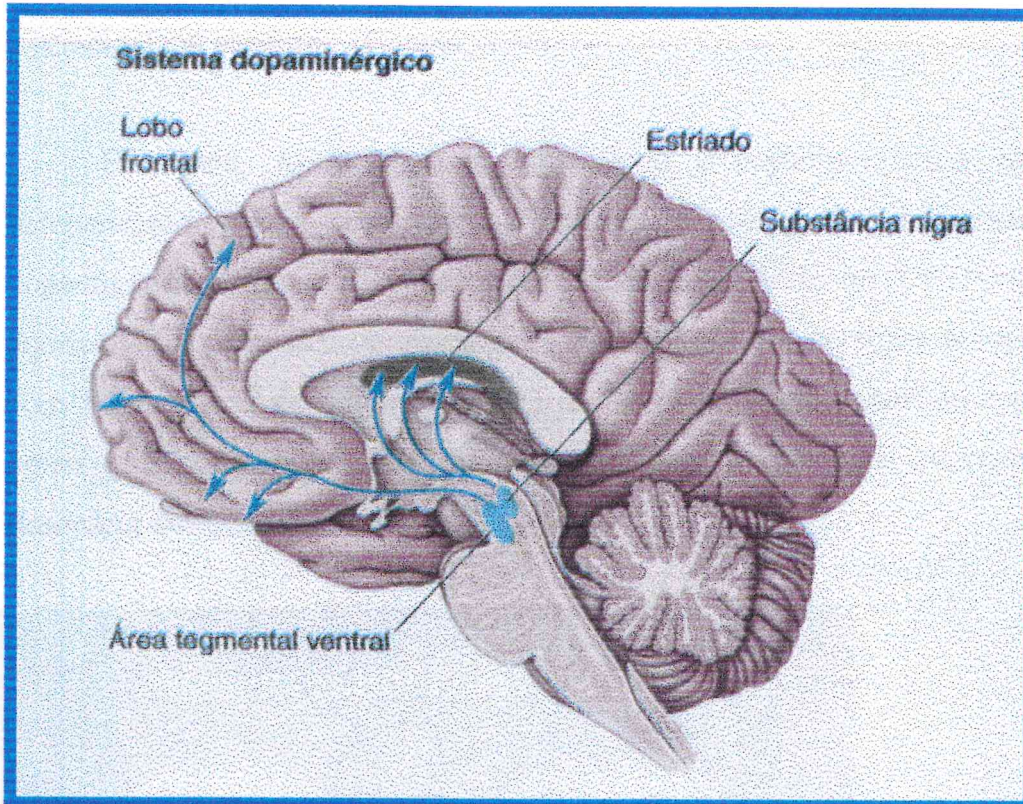
O neurotransmissor dopamina está presente na maioria das regiões do SNC, originando-se de longos axônios que partem da substância negra e área tegumentar ventral e innervam os núcleos da base, partes do sistema límbico e o córtex frontal (figura 2) (Conn, 1994).

Neurônios dopaminérgicos produzem dopamina (DA), a partir do aminoácido tirosina, obtido através da dieta. A tirosina é transportada para dentro do neurônio dopaminérgico onde posteriormente sofre ação enzimática (Cooper, 1991). As enzimas que catalisam esta síntese são produzidas e estocadas no corpo celular dos neurônios. A primeira enzima que atua na síntese de DA é a tirosina hidroxilase (TH). Essa é inibida pelo produto final da via de biossíntese, a DA, constituindo o mecanismo de regulação contínua da velocidade de síntese (etapa limitante). É encontrada no citoplasma e cataliza a conversão da tirosina para o aminoácido L-Dopa (1-3,4-diidroxifenilalanina) que sofre a ação rápida de outra enzima a dopa descarboxilase produzindo a DA (Rang, 2001).

Os neurônios, então, estocam DA em vesículas nos terminais de seus axônios. Quando um neurônio dopaminérgico é ativado, a mudança resultante nas cargas elétricas em ambos os lados da membrana celular (despolarização) induz a liberação de DA na fenda sináptica através de um processo denominado exocitose. Para terminar o processo sinalizador, os neurônios recaptam DA através de um sistema carreador específico localizado na membrana celular (Rang, 2001).

Para afetar as células alvo, a DA interage com moléculas receptoras específicas na superfície de células alvo. Os subtipos de receptores dopaminérgicos se dividem em duas famílias: a família D<sub>1</sub>-símile, a qual inclui os subtipos D<sub>1</sub> e D<sub>5</sub> e a família D<sub>2</sub>-símile, que

inclui os subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> e D<sub>4</sub>. Esses receptores realizam suas ações por se acoplarem e ativarem diferentes complexos de proteínas G. Os receptores D<sub>1</sub>-símile interagem com o complexo de proteínas G<sub>s</sub>, resultando em ativação da adenilil ciclase e aumento nos níveis de AMPc intracelular. Os receptores D<sub>2</sub>-símile interagem com um complexo de proteínas G<sub>i</sub> com conseqüente inibição da produção de AMPc (Cooper, 1991; De Keyser, 1993; Civelli, 1993).



**Figura 1:** Vias dopaminérgicas no SNC.

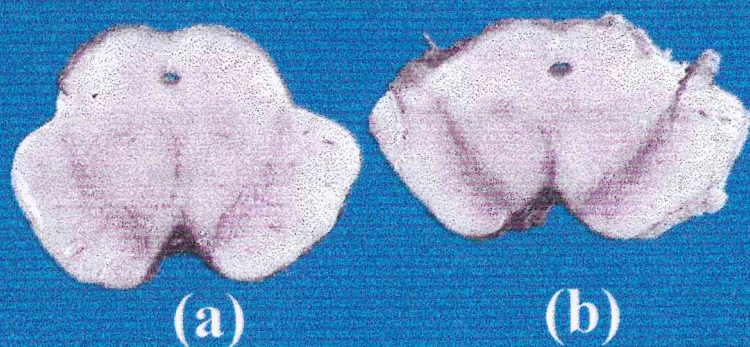
Os neurônios dopaminérgicos têm origem em três grupos celulares localizados no cérebro. Estes são classificados em A8, A9 e A10 (Dahlstrom & Fuxe, 1964, Bjorklund & Lindvall, 1984), correspondendo às regiões cerebrais denominadas campo retrorubral (A8), substância nigra pars compacta (A9) e área tegmentar ventral (A10). Os axônios dos neurônios dopaminérgicos provenientes destes grupos celulares se estendem para regiões do mesencéfalo, formando três sistemas neuronais, sistema nigroestriatal, o sistema mesolímbico e o sistema mesocortical.

A degradação metabólica da DA é feita no SNC principalmente por duas enzimas: a monoamina oxidase (MAO) e a catecol-O-metil transferase (COMT). A MAO existe em

duas formas moleculares semelhantes, codificadas por genes separados (MAO- tipo A e tipo B). A MAO-A possui preferência de substrato para a serotonina. A MAO-B possui preferência de substrato para a feniletilamina. Ambas as isoformas atuam sobre a dopamina. Assim, a degradação da dopamina é feita pela MAO que converte a DA em DOPAC (ácido 3,4 dihidroxifenilacético) a nível neuronal e pela COMT (catecol-O-metil transferase) que converte DA em HVA (ácido homovanílico) dentro do terminal sináptico (Rang, 2001). O HVA é o principal produto do metabolismo da DA nos seres humanos, enquanto DOPAC é o principal em roedores (Cooper, 1991).

Em 1958, Arvid Carlsson identificou a dopamina como um neurotransmissor independente. Cinco anos depois, foi descoberto que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos era a base etiológica da Doença de Parkinson (DP) (Grace, 1993). Entre as anormalidades nos neurotransmissores encontradas em cérebros autopsiados de pacientes com DP, a perda de dopamina (DA) no striatum (núcleo caudado e putamen) destaca-se como o achado bioquímico mais proeminente, e que está intimamente relacionado a desordem motora da DP (Figura 3).

### Mesencéfalo/ corte transversal

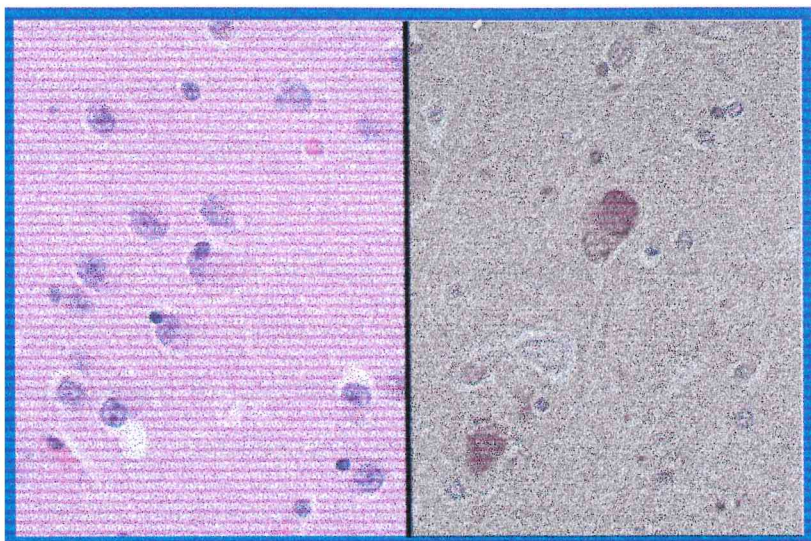


**FIGURA 2:** Corte transversal de mesencéfalo mostrando: (a) mesencéfalo de indivíduo com parkinson onde podemos observar claramente a redução da população de neurônios dopaminérgicos da substância negra (b) mesencéfalo de indivíduo normal onde podemos observar a integridade da substância negra.

Fonte - [medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html](http://medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html)

Em estágios avançados da doença, a perda de DA no striatum excede os 80%, estando os níveis de DA no putamen consideravelmente mais reduzidos que no núcleo

caudado (Oleh, et al.,1998). Essa perda da dopamina está associada a degeneração de neurônios que contêm melanina e o aparecimento de corpúsculos de Lewy (fig. 4) principalmente na pars compacta da substância negra, mas também em outras estruturas do tronco encefálico e basais (Barbosa, et al.,1997). Outros neurotransmissores, como a noradrenalina (NA) e 5-hidroxitriptamina (5-HT), estão moderadamente reduzidos em áreas específicas do cérebro na DP. Embora anormalidades da NA e da 5-HT não estejam relacionadas a distúrbios motores, elas podem estar envolvidas em alguns sintomas cognitivos e psiquiátricos comumente vistos na DP (Barbosa, 1997; Oleh, et al.,1998).



**FIGURA 3:** Corpos de Lewy são encontrados em neurônios nas áreas de degeneração. Corpos de Lewy em coloração por HE/Imunoperoxidase.

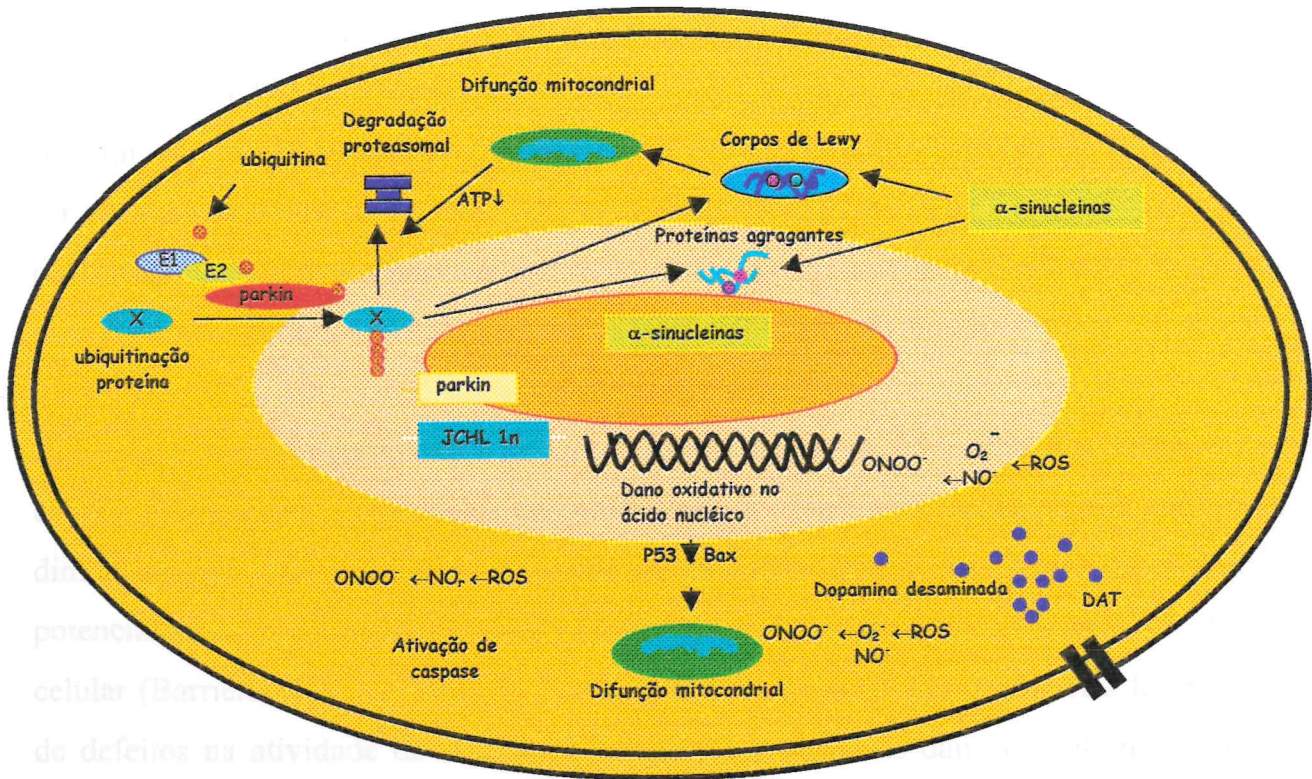
Fonte - [medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html](http://medlib.med.utah.edu/WebPath/webpath.html)

A  $\alpha$ -synucleína foi inicialmente caracterizada como um componente não amilóide das placas senis presentes na doença de Alzheimer, sendo uma proteína abundante no cérebro (Ueda, et al.,1993). É sintetizada em ribossomos citosólicos e, entre outros eventos, transportada através dos axônios para os terminais sinápticos onde é armazenada nas vesículas (Ueda, et al.,1993; Maroteaux, et al.,1988; Maroteaux, et al.,1991). A função precisa da  $\alpha$ -synucleína é desconhecida. Camundongos knockout que não produzem  $\alpha$ -synucleína não têm características fenotípicas óbvias ou patológicas e expressam somente uma pequena mudança na liberação dos neurotransmissores em resposta a estimulação repetitiva (Abeliovich, et al.,2000; Conway, et al.,1998). A relevância da  $\alpha$ -synucleína para a grande maioria dos pacientes com PD está no fato de ela estar presente nos chamados copos de Lewy na DP idiopática (Spillanitini, et al.,1997).

A partir dessa observação tem se sugerido que a agregação e a acumulação de  $\alpha$ -synucleína pode interferir na função proteossomal e resultar em uma disfunção celular relacionada com o acúmulo dos corpos de Lewy (Tanaka, et al.,1997; Sherman, et al.,2001). Além de esta hipótese parecer atrativa existem também evidências de que agregados protéicos são uma resposta protetora ao metabolismo anormal da  $\alpha$ -synucleína. A  $\alpha$ -synucleína também parece ser um alvo específico para a nitração, (Giasson, et al., 2000) o que aumentaria o dano dos radicais livres (Kandan, et al.,2000; Hashimoto, et al.,1999).

Estudos recentes sugeriram que mutações na  $\alpha$ -Synucleína podem aumentar a expressão de radicais livres ou prejudicar a atividade mitocondrial (Hsu, 2000 e Ko, 2000). Hiperexpressão de  $\alpha$ -Synucleína humana em células de mesencéfalo de rato resulta em aumento da morte celular (Zhou, et al.,2000; Forloni, et al.,2000).

A segunda mutação associada com DP foi identificada em grupos de pacientes jovens autossômicos recessivos no Japão. O locus responsável pela mutação nestas famílias foi encontrado no cromossomo 6 e foi posteriormente caracterizado por deleções como um gene que codifica um proteína desconhecida, posteriormente denominada denominada Parkina (Matsumine, et al.,1997; Kitada, et al.,1998; Hattori , et al.,1998). Em contraste com as mutações na  $\alpha$ -synucleína, as quais muito raramente causam DP, mutações na parkina têm sido descritas em uma alta proporção de pacientes jovens com DP (<20 anos) e em pequenos grupos familiares que apresentam padrões autossômicos recessivos de herança (Lucking, et al.,2000). Assim, mutações na parkina podem responder por uma proporção significativa (se bem que não a maioria) de casos de DP juvenil. A função da parkina não é conhecida, embora alguns estudos recentes tenham reforçado possíveis ações potenciais no desenvolvimento da DP (Shimura, et al.,2000) (fig.5).



**Figura 4** - Mecanismos da degeneração neuronal na doença de Parkinson (DP) familiar. Em DP esporádicas, alterações no metabolismo da dopamina e/ou exposição a toxinas ambientais tais como MPTP e rotenona podem induzir estresse oxidativo em neurônios dopaminérgicos resultando em sua disfunção e morte. A DP familiar pode ser causada por mutações na  $\alpha$ -sinucleína ou parkin. Mutações na  $\alpha$ -sinucleína podem interferir com a degradação proteica pelos proteossomas. Tanto na DP esporádica como na familiar, neurônios dopaminérgicos estão sujeitos a um aumento do estresse oxidativo que pode levar a apoptose. Fonte: (Mark, et al., 2002)

O desenvolvimento de drogas neuroprotetoras é dependente do conhecimento dos fatores etiológicos e patogênicos que contribuem para a disfunção e morte neuronal na substância negra. Várias anormalidades bioquímicas foram identificadas na substância negra de pacientes com DP. Existem claras evidências do aumento na produção de radicais livres e dano oxidativo em lipídios e proteínas, incluindo o DNA, na DP. (Kish, et al., 1985; Riederer, et al., 1989; Sian, et al., 1994; Perry, et al., 1982; Saggiu, et al., 1989; Marttila, 1988; Ceballos, et al., 1990; Hirsch, et al., 1989; Dexter, et al., 1986; Jenner, et al., 1991; Sanchez-Ramos, et al., 1994). Também foi observada uma elevação no percentual de ferro na substância negra, embora outros processos secundários possam aumentar o estresse oxidativo (Sofic, 1991; Dexter, et al., 1987; Jellinger, et al., 1990; Jellinger, 1992; Hirsch, et al., 1991; Dexter, et al., 1990; Mann, et al., 1994).



A descoberta da deficiência no complexo mitocondrial I na substância negra de pacientes com DP promoveu uma ligação direta entre os modelos tóxicos de MPTP e rotenona na doença idiopática (Schapira, et al.,1989). O corpo estriado ou striatum parece ser um sítio particularmente sensível para a disfunção mitocondrial e o local de maior dano oxidativo. Estes achados provavelmente decorrem da alta atividade metabólica desta região e da dependência da fosforilação oxidativa para a obtenção de energia.

O defeito no complexo I na DP constitui a causa de 35 a 40% dos defeitos que de acordo com cálculos de modelos de células híbridas tem implicações significativas para a diminuição na síntese de ATP, aumento na produção de radicais livres, diminuindo do potencial de membrana mitocondrial e da taxa de crescimento celular e incremento da morte celular (Barrientos, et al.,1999). O fato do aumento na produção de radicais livres resultar de defeitos na atividade do complexo I sugere que parte de dano oxidativo na DP pode aparecer como uma consequência da disfunção mitocondrial. Esta seqüência é mais provável que o inverso, pois o dano induzido por radicais livres resulta para a mitocôndria em deficiências dos complexos I-IV, mais não em defeitos específicos do complexo I observados na DP (Schapira, et al.,1999).

Anormalidades adicionais na substância negra de pacientes com DP incluem evidências da produção de citocinas inflamatórias, provavelmente microglia reativa (McGeer, et al.,1988; Hirsch, et al.,1998; Benveniste, et al.,1992; Hopkins, et al.,1995). Tais mudanças não são específicas para DP e podem ser vistas em outras doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e doença de Huntington (HD), embora em lugares diferente que a substancia negra. Portanto, mudanças inflamatórias são provavelmente secundárias embora possam contribuir para a patogênese.

Existem ramificações glutamatérgicas provenientes do núcleo subtalâmico para a substância negra. Isto cria a oportunidade para um dano celular mediado por excitotoxinas. Em suporte a isso existem evidências de resíduos protéicos nitrotirosinas em corpos de Lewy (Giasson, et al.,2000). Contudo, o dano promovido pela nitrotirosina em proteínas também pode ser mediado pela liberação de óxido nítrico (NO) dos neurônios da glia produtores de NO.

As variadas anormalidades bioquímicas na substância negra de pacientes com DP são capazes de danificar o metabolismo celular, tanto direta como indiretamente, afetando processos adicionais tais como homeostase de cálcio, bombas de canal, replicação de DNA, e síntese de proteína. O modelo celular híbrido de deficiência na cadeia respiratória demonstra precisamente como este elemento pode causar disfunção celular bem como morte. Portanto, é possível, se não provável, que fatores patogênicos envolvidos com a DP poderão causar disfunção neuronal antes da morte (Schapira, et al.,1999). Este conceito tem dado suporte para o estudo de outras doenças neurodegenerativas. Se o conceito de disfunção celular neuronal precedendo a morte celular estiver correto teremos importantes implicações para a neuroproteção e neuroresgate na DP.

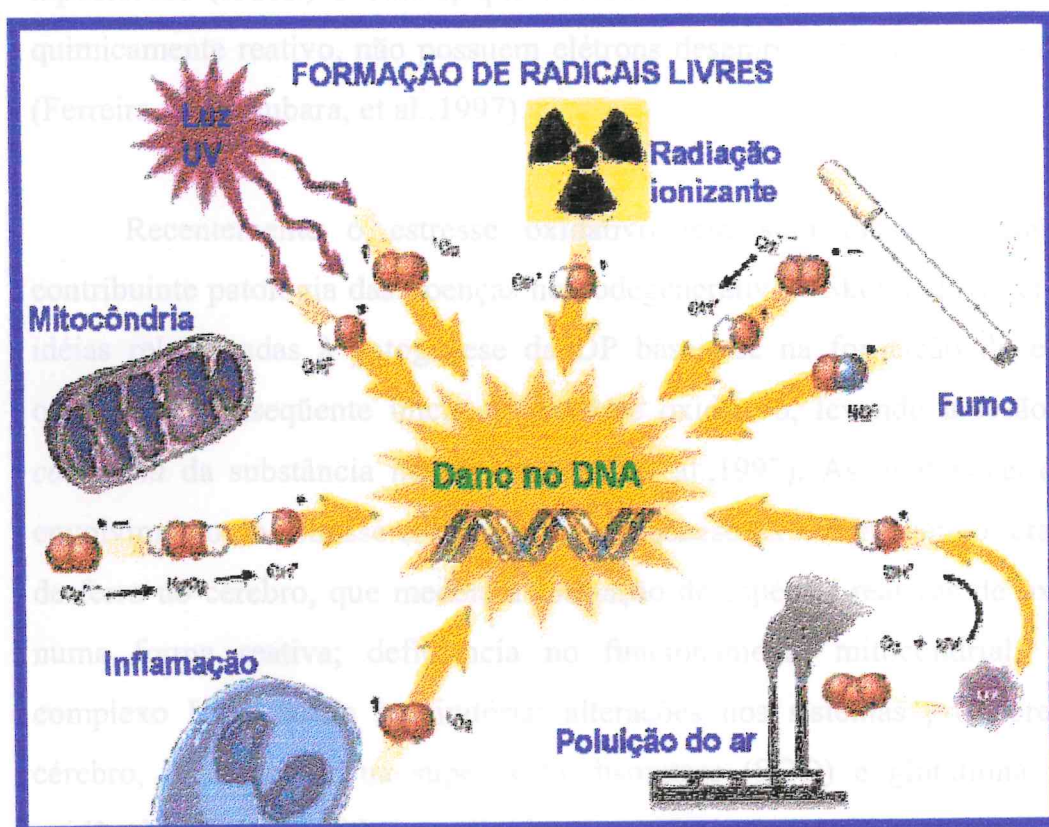
Podem existir múltiplos modos de perda de células neuronais na PD, incluindo apoptose, necrose, e outras formas, incluindo a degeneração de células negras. A morte celular por apoptose é particularmente relevante para a neuroproteção. A apoptose é uma forma de morte celular programada que é importante para o desenvolvimento embriológico. Contudo, a morte por apoptose nem sempre é programada e pode ser induzida por uma variedade de estímulos. Neste processo, as mitocôndrias têm um papel central e atuam como transdutores de um número de vias induzidas por apoptose (Zamzami, et al.,1997; Susin, 1998; Susin, 1999).

Esse processo é mediado via abertura ou fechamento dos poros mitocondriais responsáveis pela permeabilidade. Esses poros são multiproteínas que atravessam a membrana mitocondrial e incluem transportadores de adenina nucleotídeo, receptor benzodiazepínico periférico, hexoquinases e sítios de ligação para Bcl2 e Bax. A abertura do poro e o decréscimo no potencial de membrana estão associados com a liberação de citocromo C, fatores iniciadores de apoptose e ativação da cascata das caspases que termina em morte celular (Susin, et al.,1999).

O papel das mitocôndrias na apoptose tem se tornado um foco para o desenvolvimento de agentes neuroprotetores e de neuroresgate. De particular interesse é a possível associação entre anormalidades bioquímicas na substância negra de paciente com

DP e sua habilidade em diminuir o potencial de ação, incluindo defeitos no complexo I e geração de radicais. Isto iria, com efeito, diminuir o limiar para a apoptose e poderia explicar o porque de uma proporção relativamente alta de células apoptóticas ser encontrada em exames de cérebros de pacientes com DP (Anglade, et al.,1997). As anormalidades bioquímicas envolvidas na patogênese podem causar um decréscimo no potencial de ação em uma proporção de células e uma conseqüente diminuição no limiar para apoptose.

#### 1.4. Estresse Oxidativo e Doença de Parkinson



**Figura 5:** Formação de radicais livres.

Os seres humanos estão constantemente expostos a radicais livres e espécies reativas do oxigênio geradas por radiações ionizantes, agentes tóxicos, poluentes ambientais, etc. Porém, as células também são capazes de produzir espécies reativas do oxigênio, tais como: o peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido, hidroxila e óxido nítrico. Fonte - [www.webpath.com](http://www.webpath.com)

Radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Em geral, são instáveis e têm vida muito curta devido à natureza livre de seus elétrons que

os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons (Halliwell, 1994). Essas moléculas causam danos teciduais por interagirem com carboidratos, DNA, lipídios e proteínas.

Além dos radicais livres, existem também as chamadas "espécies reativas do oxigênio" que são agentes potencialmente patogênicos derivados do metabolismo do oxigênio ( $O_2$ ): radicais livres e moléculas, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso (HClO) e outras, que embora tenham grupos funcionais contendo oxigênio quimicamente reativo, não possuem elétrons desemparelhados e portanto, não são radicais (Ferreira & Matsubara, et al.,1997).

Recentemente o estresse oxidativo tem sido discutido como um importante contribuinte patologia das doenças neurodegenerativas (Skoumalova, et al.,2003). Uma das idéias relacionadas à patogênese da DP baseia-se na formação de espécies reativas de oxigênio e conseqüente início de estresse oxidativo, levando a lesão oxidativa na *pars compacta* da substância negra (Barbosa, et al.,1997). As evidências que dão suporte ao envolvimento do estresse oxidativo na patogênese da DP incluem alterações na quantidade de ferro no cérebro, que medeia a formação de espécies reativas de oxigênio quando está numa forma reativa; deficiência no funcionamento mitocondrial, particularmente no complexo I da cadeia respiratória; alterações nos sistemas protetores antioxidantes do cérebro, notadamente na superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH); e evidências de dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA (Knekt, et al.,1996).

O ferro pode induzir estresse oxidativo, e injeções intranigrais podem induzir um modelo de parkinsonismo progressivo. A perda de GSH, que está associada à doença de corpúsculo de Lewy, representa um dos símbolos iniciais da perda de células da substância negra, podendo aumentar a suscetibilidade a exposições a tóxicos ou radicais livres. A natureza das espécies de radicais livres responsáveis pela morte celular na DP não está bem definida, mas acredita-se no envolvimento de radicais hidroxila ( $OH^-$ ), peroxinitrito e óxido nítrico (Hsieh, et al.,2000).

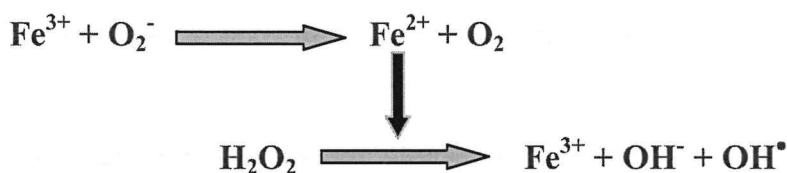
Visto que participam de reações essenciais ao organismo as espécies reativas do oxigênio são constantemente formadas e podem ser prejudiciais, quando sua produção foge do controle exercido pelos antioxidantes de defesa endógenos, como as enzimas superóxido dismutase, as catalases e a glutathione peroxidase e outros antioxidantes como a albumina (Halliwell & Gutteridge, et al.,1990), a vitamina E (Muller & Gross-Sampson, et al.,1990).

Os radicais livres mais destrutivos gerados no organismo derivam do oxigênio ( $O_2$ ). Portanto, a molécula mais importante para a manutenção da vida pode também provocar danos celulares, levando à destruição de órgãos e do próprio organismo. O acúmulo dos danos, ao longo da vida, causado por moléculas vitais em órgãos está relacionado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (Reiter, 1998).

Outro radical de grande relevância é o radical superóxido ( $O_2^-$ ), produto da adição de um elétron a uma molécula de oxigênio (Halliwell & Gutteridge, 1986). Muitas outras moléculas biológicas reagem com o  $O_2$  convertendo-o em  $O_2^-$ , como por exemplo a hemoglobina (Misra & Fridovich, 1972a), mioglobina (Gotoh & Shikama, 1976), catecolaminas (Misra & Fridovich, 1972b) e alguns constituintes dos sistemas de transporte de elétrons mitocondriais (Turrens, et al.,1985) e microssômicos (Jakoby & Ziegler, 1990). Fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) podem ainda gerar  $O_2^-$  em grande quantidade, com o objetivo de destruir microorganismos estranhos ao organismo. Tal mecanismo de proteção natural pode tornar-se nocivo nos processos de inflamação crônica (Halliwell, et al.,1988).

A espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos é o radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) este, age rapidamente no local em que é produzido, sendo potencialmente capaz de causar alterações nas bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou a mutação do DNA, inibir diversas proteínas (constituintes das membranas celulares e enzimas) através da oxidação dos seus grupamentos sulfidrílica (-SH) a pontes dissulfeto (-SS) e iniciar a peroxidação de lipídeos, especialmente ácidos graxos poliinsaturados de membranas e lipoproteínas (Halliwell & Gutteridge, 1986). Este é gerado nos sistemas biológicos principalmente por radiações ionizantes e através da reação que envolve um metal de transição, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio.

Devido ao alto teor de água das células, sua exposição às radiações ionizantes (raios X e gama), pode resultar na formação do radical hidroxila, através do processo de radiólise da água (Halliwell, et al.,1994). 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  $\text{OH}^\bullet$  é formado pela interação entre um íon metálico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), o  $\text{O}_2^-$  e o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$ , só apresenta toxicidade quando presente em altas concentrações nas células, outra característica dessa molécula é que ela possui a capacidade de se difundir rapidamente através das membranas celulares podendo então se distribuir por sítios distantes dos quais ela foi gerada. Além disso, na presença de metais de transição, mais comumente o  $\text{Fe}^{2+}$ , mas também o  $\text{Cu}^+$ , o peróxido de hidrogênio é reduzido à radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) via reações de Haber-Weiss ou Fenton (Reiter, et al.,1998).



(reação de Fenton)

Embora a via de produção do  $\text{OH}^\bullet$  esteja bem estabelecida e seu papel patológico não esteja bem determinado, a existência de proteínas de transporte para o ferro e o cobre, utilizadas pelas células para minimizar a presença de íons metálicos livres indicam que tais reações podem ser prejudiciais para os sistemas biológicos (Liochev e Fridovich, 1994).

Um mensageiro intracelular de produção endógena que desempenha um papel em praticamente todos os sistemas do organismo é o óxido nítrico (NO) (Eiserich, et al.,1998a), embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, em excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o  $\text{O}_2^-$  podem interagir, resultando em um produto muito tóxico, o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). O  $\text{ONOO}^-$  é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição,  $\text{OH}^\bullet$ , dióxido de nitrogênio e outros, possuem semelhante potencial deletério, conseqüentemente, a toxicidade do NO pode ser explicada,

pelo menos em parte, por sua reação com o  $O_2^-$ . O aumento da produção de  $ONOO^-$  tem sido associado a diversos processos patológicos (Demiryurek, 1998 e Eiserich, et al.,1998).

A peroxidação lipídica é um processo envolvendo a oxidação de ácidos gordurosos poliinsaturados, os quais são componentes básicos de membranas biológicas. Compostos reativo eletrofilicos são formados durante a peroxidação lipídica, principalmente aldeídos  $\alpha$  e  $\beta$ -não-saturados. Estes compostos geram ligações com o DNA. Entre elas, propeno e propano substituído e deoxiguanosina com malondialdeído (MDA), acroleína, crotonaldeído e eteno, resultantes de reações de bases de DNA com epoxi aldeídos, são um importantíssimo grupo de complexos. Os epoxi aldeídos são mais reativos para DNA do que aldeídos saturados. Os compostos resultantes da peroxidação lipídica reagem principalmente com DNA mostrando ação genotóxica e mutagênica ; entre eles, 4-hidroxinonenal é o mais genotóxico, enquanto MDA é o mais mutagênico (Luczaj, et al.,2003).

Como possíveis agentes lesivos que atuam através da formação de radicais livres, teríamos: lipopolissacarídeo bacteriano (Sewerynek, et al.,1995), tetracloreto de carbono (Daniels, et al.,1995), cianeto de potássio (Yamamoto e Tang, 1996), cainato (Melchiorri, 1995), reagentes de Fenton ( $FeSO_4 + H_2O_2$ ) (Barlow-walden, 1995; Chen, et al.,1995) e L-cisteína (Yamamoto e Tang, 1996). Além disso, os danos causados pela isquemia de reperfusão (Sewerynek, 1996), ingestão de álcool (Melchiorri, et al.,1997), exercício excessivo (Hara, et al.,1996), proteína  $\beta$ -amilóide (Pappolla, et al.,1997), 6-OHDA (6-hidroxi dopamina), MPTP (1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridino) (Acuna-castroviejo, 1997; Reiter, et al.,1998) também são mediados por radicais livres.

Portanto estresse oxidativo pode ser definido como o dano causado pelos radicais livres e espécies reativas do oxigênio. Clinicamente, o estresse oxidativo pode causar lesão tecidual relacionado com muitas desordens fisiopatológicas como a hipóxia, a inflamação e a isquemia tecidual e de reperfusão. Outras teorias afirmam que o estresse oxidativo pode estar relacionado com disfunção neurológica associada com doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson, Alzheimer e outras (Beyer, et al.,1998).

Diversos sistemas de defesa endógenos incluem enzimas e outros antioxidantes que inativam os radicais livres e as espécies reativas do oxigênio (ERO) que são produzidos no organismo. A superóxido dismutase (SOD), enzima presente na mitocôndria e citosol, converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Halliwell e Gutteridge, 1998). Outra enzima encontrada nos perissomos na maioria dos tecidos é a catalase, esta, remove o peróxido de hidrogênio catalizando a sua redução em água e oxigênio molecular (Scott, et al., 1991). A principal enzima responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio gerado pela SOD no citosol e mitocôndria é a glutathione peroxidase (GPx), esta, promove a redução do  $H_2O_2$ , às custas da glutathione reduzida (GSH), para formar a glutathione oxidada (GSSG) e água (Gaté, et al.,1999).

### **1.5. Modelo da Doença de Parkinson**

A causa da morte crônica de células da substância negra na DP e os mecanismos envolvidos neste processo permanecem obscuros. O esclarecimento parcial do processo de morte celular é comumente estudado em modelos que utilizam neurotoxinas tais como 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) ou 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). Hipóteses que explicam os mecanismos de como agem estas neurotoxinas foram relacionados com a patogênese da morte de células da substância negra na DP. (Gerlach, et al.,1996).

A neurotoxina 6-OHDA é uma droga comumente utilizada na investigação de compostos com atividade protetora em doenças neurodegenerativas em humanos, incluindo a doença de Parkinson. Evidências demonstram que a 6-OHDA gera espécies reativas de oxigênio, induzindo apoptose de células dopaminérgicas na substância negra de ratos (Cohen, et al.,1974; Walkinshaw e Waters, et al.,1984; He, et al.,2000), embora seu mecanismo molecular não esteja bem evidenciado, estudos recentes sugerem o envolvimento de mecanismos de estresse oxidativo que facilitam a conversão de neurotoxinas em uma quinona com a formação de  $H_2O_2$ , iniciando assim uma sinalização de morte celular específica por ativação de fatores de transcrição tais como caspase-3, NFkB, P53 e C-Jun (Del Rio e Velez-Pardo, et al.,2002).



A 6-OHDA atua possivelmente induzindo lesão dopaminérgica nigro-estriatal por geração de peróxido de hidrogênio e seus radicais hidroxila derivados, (Sachs, et al.,1975) presumivelmente iniciado por um metal de transição tal como ferro. A prevenção parcial, ou até completa dos efeitos da neurotoxina 6-OHDA e ferro por uma prévia administração de agentes quelantes de ferro, (Bem-Shachar, et al.,1991) vitamina E, (Cadet, et al.,1989) e inibidores da MAO-B como a selegilina (Knoll, et al.,1986), pode relacionar seu mecanismo de ação.

A neurotoxina catecolaminérgica 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) foi encontrada como produto endógeno em pacientes com DP. Isso sugere que ela pode desempenhar um papel na patogênese da doença de Parkinson (Glinka, et al.,1997; Jellinger, et al.,1995). A 6-OHDA forma radicais livres e é um potente inibidor dos complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial (Glinka, et al.,1997). Quando injetada na substância negra de ratos, a 6-OHDA produz uma perda acentuada dos neurônios dopaminérgicos Nigro-estriatais, e uma infusão estriatal contínua pode produzir uma axotomia terminal de neurônios dopaminérgicos topograficamente limitada e uma prolongada debilidade comportamental (Jonis, et al.,1996).

Um modelo animal da doença de Parkinson levando a uma degeneração similar dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, pode ser produzida pela injeção estereotáxica unilateral da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (Ichitani, et al.,1991, Przedborski, et al.,1995). Como consequência temos uma destruição imediata e quase completa dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, resultando em uma depleção dos níveis de dopamina no estriado ipsilateral a injeção. Após a injeção de 6-OHDA ocorrem mudanças unilaterais na via nigroestriatal que levam a uma assimetria funcional a qual é quantificada utilizando-se um teste rotacional induzido por agonistas dopaminérgicos diretos (apomorfina) e indiretos (anfetamina) (Przedborski, et al.,1995).

A apomorfina é um agonista dopaminérgico que estimula diretamente os receptores D1 e D2, e de acordo com o modelo de teste comportamental rotacional, os animais lesionados com 6-OHDA e tratados com apomorfina giram em torno do próprio eixo em direção ao lado contralateral (não lesionado). Labandeira-Garcia, (1996) verificaram que

existe uma perda marcante e progressiva dos terminais dopaminérgicos em apenas alguns dias após a lesão intraestriatal com 6-OHDA. A utilização da 6-OHDA para produzir um modelo que possa replicar as mudanças neuroquímicas, morfológicas e comportamentais observadas em pacientes com DP é comprovada, e é excelente para testar e determinar o mecanismo de ação de drogas (Gerlach, et al.,1996; Tolwani, et al.,1999).

Esse modelo é útil na monitorização dos efeitos de diferentes tratamentos, e a relevância do período de tempo para a aplicação do tratamento pode depender da estratégia, portanto, tratamentos preventivos ou protetores devem ser realizados pouco antes da lesão ou um pouco depois, quando a perda neuronal está acontecendo (Przedborski, et al.,1995).

Também contribuem para a hipótese de estresse oxidativo na perda neuronal na substância negra da doença de Parkinson análises que mostram uma alta concentração de espécie reativas de oxigênio, incluindo dopamina, neuromelanina, ácidos graxos poliinsaturados e ferro, e um conteúdo baixo de antioxidantes, principalmente glutathione (Kidd, et al.,2000 e Carvey, et al.,2001). Assim, o estresse oxidativo pode facilmente subjugar doenças naturais, resultantes da produção de espécies reativas de oxigênio, as quais apresentam tanto estresse oxidativo como início e propagação de apoptose de neurônios dopaminérgicos.

## **1.6. Neuroproteção e Neuroresgate**

"Neuroproteção" e "neuroresgate" são termos que podem ser interpretados de várias maneiras. No contexto do nosso trabalho é provavelmente melhor defini-los em termos bioquímicos e funcionais. Neuroproteção pode ser definida como proteção das células neuronais da morte induzida por várias anormalidades bioquímicas associadas com a etiologia e a patogênese. Neuroresgate pode ser definido como o retorno de algumas ou todas as funções bioquímicas e restauração da função neuronal normal das células danificadas. (Schapira, 1999)

Um importante avanço potencial das terapias neuroprotetoras e de neuroresgate é que elas provavelmente não são seletivas para neurônios dopaminérgicos. Assim, sintomas da DP que são refratários à terapia dopaminérgica podem responder aos tratamentos de

neuroresgate. Com o possível sucesso das terapias neuroprotetoras e de neuroresgate na DP posteriormente estas drogas seriam utilizadas em outras doenças neurodegenerativas com vias patogênicas similares, mais isso certamente será uma área de investigação.

## 1.7 Plantas medicinais no Brasil

Apesar do uso de produtos derivados de plantas e animais ter sido bem documentado por séculos, suas ações bioquímicas não foram observadas e analisadas cientificamente até os meados dos séculos XVIII e XIX, particularmente no início de 1800 quando um importante número de substâncias com ações farmacológicas foram identificadas (Clark, et al.,1996).

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, 80% da população mundial usa os recursos das medicinas populares para suprir as necessidades de assistência médica primária (Farnsworth, et al.,1985). A medicina tradicional, baseada no uso de produtos obtidos a partir de plantas, vem sendo responsável por aproximadamente 85% dos medicamentos utilizados em países desenvolvidos (Budd, et al.,1983).

No Brasil, o uso de plantas medicinais e preparações caseiras assumem fundamental importância no tratamento das doenças que afetam as populações de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (Matos, et al.,1989).

Os flavonóides existem na natureza a mais de um bilhão de anos (Swain, et al.,1975) e assim tem evoluído juntamente com organismo durante esse período. Os flavonóides apresentam alguns propósitos importantes na natureza, tem sobrevivido em plantas vasculares durante a evolução (Swain, et al.,1975). A associação muito longa de flavonóides de plantas como várias espécies animais e outros organismos ao longo da evolução pode contribuir para a extraordinária gama de atividades bioquímicas e farmacológicas destes compostos em mamíferos e outros sistemas biológicos.

Flavonóides tem efeitos importantes na bioquímica e fisiologia das plantas, atuando como antioxidantes, inibidores enzimáticos, precursores de substâncias tóxicas e pigmentos

de plantas (McClure, et al.,1986). Mais de 400 estruturas de flavonoides únicos têm sido isoladas de plantas (Harborne, 1988b, et al.,1986). Os flavonóides têm sido a muito tempo reconhecidos por possuírem atividade antiinflamatória, antioxidante, antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral e atividade anticarcinogênica ( Selway, et al.,1986 e Welton, et al.,1988).

Primariamente reconhecidas como pigmentos responsáveis pela coloração de flores e frutos (Timberlake e Henry, et al.,1986; Brouillard e Cheminant, et al.,1988), os flavonóides são encontrados em frutos, vegetais, ervas, flores, especiarias, troncos, sementes bem como em chás e vinhos tinto. Eles são componentes proeminentes de frutas cítricas (Kefford e Chandler, et al.,1966) e são consumidos regularmente na dieta humana. Dentre os principais flavonóides, destacamos o flavanol (chá verde, chá preto e vinho tinto), flavanona (casaca de frutas cítricas, frutas cítricas), flavonol (alho-porró, uva, chá preto, cebola, alface, brócolis, cas de maçã, azeitona, vinho tinto), flavona (casca de frutas, aipo, salsa), antocianidinas (uva roxa, vinho tinto, framboesa, cereja, morango e casca de frutas coloridas) (Wilhelm et al., 2001). Essas substâncias de baixo peso molecular, encontradas em todas as plantas vasculares, são fenilbenzoil-pironas (fenilcromonas) com um sortimento de estruturas baseadas em um núcleo comum formado por três anéis. Eles são usualmente subdivididos de acordo com seus substituintes.

Flavonóides e tocoferol (vitamina E) mostram uma estrutura em comum isto é um anel cromona. Tem sido realizados grandes esforços para quantificar as quantidades de diferentes flavonóides em plantas de consumo alimentar (Rice-Evans e Packer, et al.,1998) .

Os componentes estruturais da molécula, incluem dois anéis benzênicos de cada lado de um anel de 3 carbonos. Combinações múltiplas de grupos hidroxilas, açucars, oxigênio, e grupos metilas ligados a essas estruturas dão origem as várias classes de flavonóides a saber: flavanóis, flavanonas, flavonas, flavan-3-óis (catequinas), antocianinas e isoflavonas. Vários estudos mostraram que os flavonóides são potentes antioxidantes, capazes de seqüestrar radicais hidroxilas, ânions superóxidos e radicais peroxilipídicos. Dois estudos epidemiológicos recentes (Hertog, et al.,1993; Knekt, et al.,1996) revelaram uma correlação inversa entre os flavonóides da dieta e a mortalidade por doenças cardíacas. Assim, um

desses estudos realizado na Finlândia com 5133 homens e mulheres encontrou que aqueles indivíduos com conteúdo alto de flavonóides na dieta apresentaram um risco menor para doenças coronárias. Um outro estudo realizado na Alemanha (The Zutphen Elderly Study) com 805 homens notou uma relação inversa entre flavonóides da dieta e doenças cardíacas.

Flavonoides obtidos de plantas em geral são bem conhecidos antioxidantes e, além de suas propriedades antioxidantes, tem também sido relatadas ações queladores de metal e antiinflamatórias (Bravo, et al.,1998 e Middleton, et al.,2000). Portanto, a natureza multifuncional destes compostos os torna fortes candidatos para a terapia contra a DP. Recentemente, o chá verde que contém vários componentes polifenólicos demonstrou atenuar a morte celular induzida pela 6-OHDA em feocromocitoma e neuroblastoma. (Levite, et al.,2002).

A palavra tanino foi usada pela primeira vez, em 1796, para definir o princípio adstringente da casca de carvalho que possui a propriedade de transformar a pele dos animais, de a tornar imputrescível e resistente à água fervente, evitando a sua gelatinização. Os taninos vegetais não se definem propriamente por sua composição química, demesiadamente variável, mas por um conjunto de propriedades devidas, em grande parte, a presença de hidroxilas fenólicas nas suas moléculas. Não se conhece a distribuição exata dos taninos nas plantas, pela deficiência dos métodos químicos e pelo estudo ainda imperfeito ainda realizado; todavia, foram já reconhecidos em todos os grandes agrupamentos estabelecidos no Reino Vegetal. São raros nos grupos inferiores (Costa, et al.,1999).

Os taninos aparecem em todas as regiões, em todos os órgãos da planta, desde a raiz aos frutos e, ainda, nas galhas. A mesma planta possui, simultaneamente, taninos hidrolisáveis e condensados, mas com o predomínio de um deles pelo menos em determinadas regiões. A riqueza relativa varia de acordo com os órgãos (folhas, raízes, cascas, lenhos), a idade (cascas de ramos novos, ou idosos, camadas externas ou internas do lenho), estado de desenvolvimento (frutos verdes e maduros), etc. Caracterizam-se por suas propriedades adstringentes (dolatim *ad*, para e *stringere*, apertar), que se explica por os taninos precipitarem a superfície das células superficiais das mucosas e dos tecidos a

descoberto, formando revestimento protetores. Deste modo diminui-se o volume das secreções, atenua-se a sensibilidade, anula-se a propriedade de absorver substâncias irritantes ou tóxicas e contraria-se o desenvolvimento de agentes infecciosos. Internamente, atuam de igual modo, graça a precipitação das proteínas (Costa, et al.,1999).

Dentre as plantas do nordeste brasileiro, a *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), popularmente conhecida como aroreira do sertão, é rica em taninos. O extrato aquoso obtido da casca é popularmente usado em ginecologia como um antiinflamatório no trato genital feminino. A planta é também usada no tratamento de doenças do trato respiratório e trato urinário, hemoptise, hemorragias e diarreias como uma infusão ou decocção. Trabalhos recentes (Menezes, et al.,1986) mostram uma significativa atividade antiinflamatória, com propriedades antiulcerosas e cicatrizantes de extratos aquosos e hidroalcoólicos da planta. Estudos de fracionamento químico (Viana, et al.,1995) revelaram que o extrato acetato de etila contém duas frações principais, as primeiras com predomínio de compostos chalconicos e a segunda com predominância de catequinas e taninos pirogalicos.

Plantas contendo tanino podem apresentar uma grande variabilidade de efeitos fisiológicos e são conhecidos por apresentar várias propriedades biológicas tais como ação antiinflamatória, analgésica anti-linfocítica (Okoli, et al.,2000; Kapu, et al.,2001; Giovannelli, et al.,2000; Chen, et al.,2000) antimicrobiano e antiviral (Ho, et al.,2001; Akiyama, et al.,2001; Silva, et al.,2002; Elegami, et al.,2002; Cheng, et al.,2002) anti-leishmaniosa e imunomodulatória, (Kiderlen, et al.,2001) anti-diarreico (Abdullahi, et al.,2001) entre outros. Estudos farmacológico (Viana, 1995) demonstram que a fração tanino obtida da *M. urundeuva* apresenta uma potente atividade analgésica e antiinflamatória em vários modelos experimentais. Contudo, provavelmente a propriedade melhor estudada dos taninos é sua habilidade em prevenir peroxidação lipídica, formação de superóxido e sua propriedade supressora de radicais livres. (Giovannelli, et al., 2000; Lin, 2001; Kaplan, et al.,2001; Ying, et al.,2001; Bhattacharya, et al.,2002; Wei, et al.,2002; Dufour, et al.,2002; Bors, et al.,2002; Gyamfi, et al.,2002; Mullen, 2002; Nakagawa, et al.,2002; Lin, et al.,2001).

A sensação articular que deixa na boca, de secura e constrictão, dita adstringente, explica-se, ainda por terem precipitado as proteínas das células superficiais do epitélio bucal e, simultaneamente, as glicoproteínas exclusivas da saliva e que lhe comunicam propriedades lubrificantes adequadas. O poder anti-séptico revelado pelos taninos explica-se, ainda, pelo referido revestimento precipitado impedir o desenvolvimento de microorganismos, associado a própria ação desinfetante que lhe confere o seu caráter fenólico (Costa, et al.,1999).

Possuem também propriedades hemostáticas nas hemorragias de origem capilar, por precipitarem as proteínas do soro, originando coágulos. Atuam de modo análogo, os sais metálicos como os cloretos de ferro, de zinco, alumínio, etc. Uma outra utilidade importante dos taninos: como antídoto nos envenenamentos, por via oral, com alcalóides, sais metálicos tóxicos, etc. (Costa, et al.,1999).

As principais dificuldades relacionam-se com o seu estado amorfo, que impede o isolamento de substâncias puras; geralmente obtêm-se extratos com diversos constituintes, mais durante os processos usados alteram-se as substâncias originais, simplificando-se por hidrólise ou, pelo contrário, oxidando-se e polimerizando-se; ainda dissolvem-se na água, em conjunto, várias substâncias polifenólicas com polaridades elevadas, que favorecem a dissolução de outros constituintes pouco solúveis, resultando assim misturas separáveis dificilmente pelo processo dos solventes, habitual nos laboratórios (Costa, et al.,1999).

Para tornar mais complexo o problema, verificou-se que em cada planta existem diversos taninos e que a sua composição variava de acordo com as regiões onde se localizavam, umas vezes só no seu aspecto quantitativo (os galhotaninos acumulam-se em particular nas galhas), mais outras também no qualitativo (os taninos das cascas e do lenho dos carvalhos pertencem a grupos diferentes) (Costa, et al.,1999).

Os taninos formam um grupo heterogêneo ainda mal definido sob o ponto de vista químico: princípios fenólicos que possuem propriedades características destes compostos aromáticos, amorfos, raramente cristalinos, circunstância que dificulta o seu isolamento e estudo. Acompanham-se, em geral, outros compostos aromáticos, como

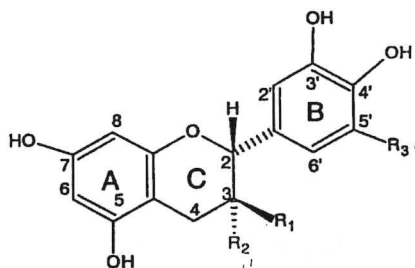
fenóis, ácidos fenólicos, catequinas, leucoantocianidinas, e etc., de pesos moleculares baixos, que não possuem as propriedades dos taninos, mas podem aparecer integrados nas suas moléculas; o seu reconhecimento relativamente fácil pode esclarecer-nos, portanto, sobre a natureza química das substâncias tânicas fundamentais (Costa, et al.,1999).

Costumam dividir-se os taninos em dois grupos: os hidrolisáveis e os condensados ou não hidrolisáveis. Taninos condensados são os mais freqüentes na natureza, mais são também aqueles menos conhecidos, dadas as dificuldades oferecidas ao seu estudo. Em conjunto, quando extraídos dos vegetais, apresentam-se em massas coradas de tons castanhos ou vermelhos, amorfas bastantes solúveis no álcool, alcalis, sulfitos, e etc., menos na água (Costa, et al.,1999).

Dificultaram o estabelecimento da sua estrutura, os obstáculos de ordem prática levantados ao isolamento dos seus constituintes. Todavia, os analistas certificaram-se que certos componentes mais simples das misturas encontravam-se sempre presentes; e quando eram aquecidos a seco ou com ácidos minerais em solução aquosa, formavam-se compostos insolúveis semelhantes aos próprios taninos: atribuíram-lhes então, a qualidade de seus precursores na natureza. E desenvolveu-se a idéia de que deviam possuir, os taninos, a estrutura de polímeros de unidades fundamentais. Os primeiros monômeros isolados que satisfizeram esta exigência foram as catequinas ou catequóis isolados dos extratos denominados catos e depois reconhecidos nas próprias plantas (Costa, et al.,1999).

As catequinas são compostos cristalinos, incolores, solúveis na água, álcool, acetona, porém dificilmente no éter (figura 6). Coram-se de verde pelos sais de ferro; precipitam-se das suas soluções pelo bromo, cafeína e brucina, resultando em combinações cristalinas. Não possuem propriedades adstringentes, não precipitam a gelatina e também não curtem as peles dos animais, todavia são adsorvidas por estas, mas basta a lavagem simples com água para recuperar as catequinas. Portanto, correspondem ainda as propriedades características dos taninos (Costa, et al.,1999). A catequina demonstra ainda possuir atividade antioxidante e anti-apoptotica (Nanjo, 1996; Morel, 1999; Chan et al., 2002; Nie et al., 2002).





**Figura 6** – Representação estrutural da catequina. A capacidade antioxidante destes compostos vai estar relacionada com a presença dos grupamentos catecol. Os quais vão estabilizar radicais livres e se autoestabilizar em decorrência dos híbridos de ressonância formados.

Catequina R<sub>1</sub>=OH; R<sub>2</sub>=H; R<sub>3</sub>=H

### 1.8 Relevância e Justificativa

Desde que o estresse oxidativo é o mecanismo primário envolvido na patogenia da DP (Fahn and Cohen, 1992), compostos antioxidantes de ocorrência natural tem atraído atenção particular devido sua abundância em chá (*Camellia sinensis*) extratos (Chan et al., 2002), sua habilidade para atravessar a barreira hematoencefálica (catequinas fenólicas) (Nakagawa and Miyazawa, 1997), e devido a sua capacidade antioxidante relativamente alta oferecendo neuroproteção (Nanjo et al., 1996).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Tendo em vista que na DP ocorre perda de neurônios dopaminérgicos, possivelmente em decorrência de um geração de radicais livres, e pelo fato de a fração tanino obtida da *Myracrodruon urundeuva* e a catequina possuírem atividade antioxidante, o objetivo deste trabalho foi estudar a atividade neuroprotetora destes compostos em modelo de degeneração celular induzido pela 6-OHDA em cultura de células mesencefálicas de rato.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar um método de cultura de células mesencefálicas de rato.
- Estudar os efeitos neuroprotetores da FT e catequina em modelo de morte neuronal induzida pela 6-OHDA em células mesencefálicas de ratos.
- Avaliar a ação neuropreventiva e de neuroresgate da FT e catequina sobre a viabilidade celular pelo método do MTT.
- Verificar a ação a FT e catequina sobre os níveis de nitrito e TBARS produzidos pela 6-OHDA no modelo de neuroprevenção e de neuroresgate

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1. Substâncias químicas

Catequina, glutamina, citarabina, 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), naftiletenodiamina, e ácido tiobarbiturico, poli-lisina e sulfanilamida foram adquiridos da Sigma, St. Louis, MO, USA. Meio essencial mínimo de Eagle (MEM) e soro de cavalo foram obtidos da Gibco BRL. Bromidrato de 6-Hidroxiopamina (Sigma-USA), Dexferoxamina mesilato (Sigma-USA), N-(1-naftil)-etilenodiamina diidroclorato (Merck-USA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

#### 3.2. Extração da fração tanino (FT) obtido da *Myracrodruon urundeuva*

O extrato etilacetato (EAE) foi preparado de acordo com método previamente descrito (Viana, et al., 1995) no Departamento de Química Orgânica pela professora Mary Anne. O EAE foi extraído da casca da planta a partir de prévio tratamento com hexano para remover de lipídios. A separação cromatográfica da EAE em uma coluna de sílica resultou em sete frações das quais duas delas (F8-13) e (F18) mostraram atividade antiinflamatória (Bandeira, 2002) por monitoramento farmacológico. A análise química destas duas frações mostrou que a primeira fração apresentava componentes chalconicos, ao passo que a segunda possuía taninos (FT) onde o percentual da fração tânica nesse extrato é de 56,22% a qual foi o objeto do presente trabalho.

#### 3.3. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar grávidas, (200 – 240g) provenientes do biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Ceará. Os animais foram mantidos a 23-25 °C com ciclo claro/escuro, e alimentados com uma dieta padrão e água *ad libitum*.

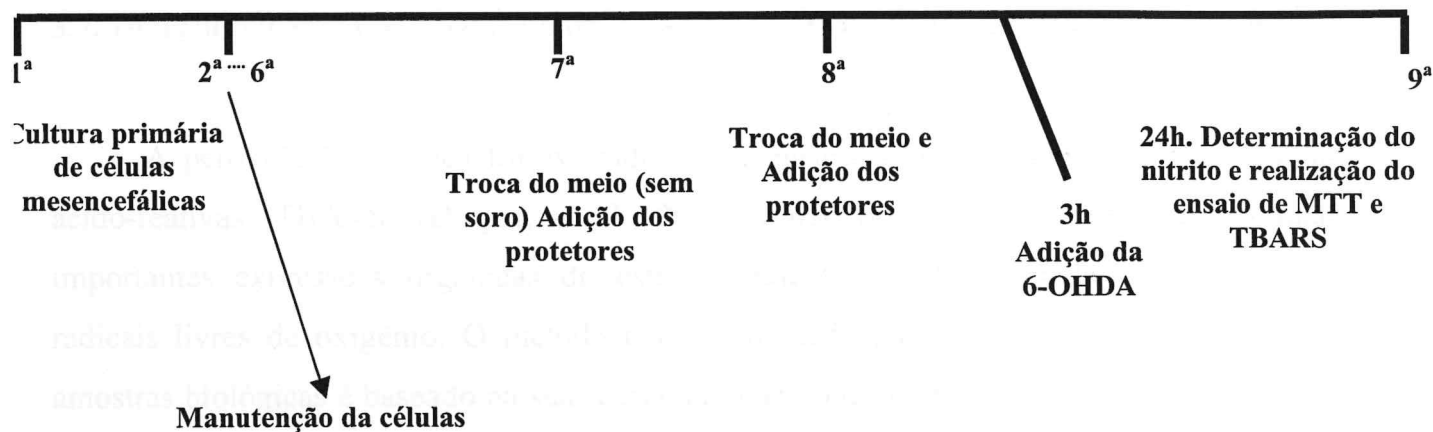
### 3.4. Culturas de células mesencefálicas de rato

Os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical e sua área abdominal foi aberta para a retirada dos embriões. As culturas de células mesencefálicas contendo células neuronais e gliais foram obtidas de mesencéfalo de embriões de rato Wistar de 17-20 dias de gravidez como descrito por Choi cols., (1987). As células mesencefálicas foram então dissecadas mecanicamente e suspensas em Meio Essencial de Eagle (MEM) completado com soro de cavalo 10%, estreptomicina (100 mg/ml), penicilina (1000 UI/ml), actinomicina C (2.5 mg/ml), bicarbonato de sódio (24 mM) e glicose (11 mM). A suspensão de células foi plaqueada em placas multi-well de 96 poços previamente tratadas com poly-lisina com uma concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço. As culturas foram mantidas a 37 °C em estufa a 5% CO<sub>2</sub>. Sete dias depois do plaqueamento, as culturas foram utilizadas para experimentação.

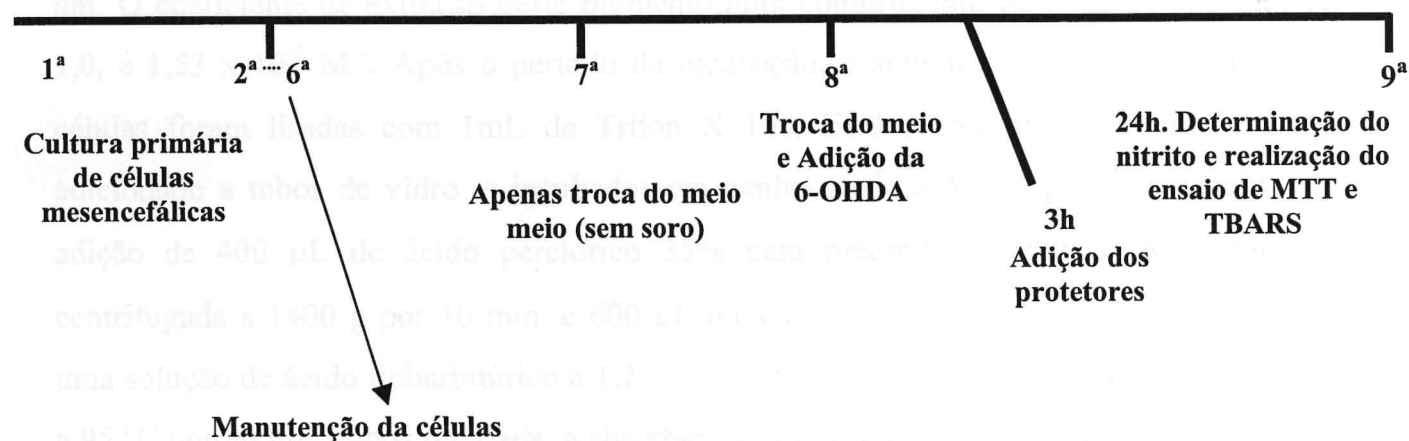
### 3.5. Ensaio de neurotoxicidade

A neurotoxicidade foi avaliada usando o ensaio MTT (Mosmann , 1983), que se baseia no fato de este sal (MTT) ser reduzido pelas mitocôndrias das células viáveis a um sal (sal de Formazan), sendo a quantidade deste sal um indicativo da viabilidade celular. Decorridos 7 dias de cultura, foram utilizados 2 protocolos experimentais. No primeiro, a FT e catequina usados nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml e dexferoxamina (40 µM) (usada como controle positivo) foram adicionados a cultura, 24 h antes da 6-OHDA (200 µM) (modelo de neuroprevenção). No segundo ensaio, os compostos foram adicionadas a cultura 3 h depois da 6-OHDA (modelo de neuroresgate). Decorridas 24h de incubação, foi adicionado 200 µL de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT), na concentração de 5mg/mL em cada poço, onde estas células foram incubadas por mais 3h. Após este período, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se então 150 µL de DMSO puro para a lise das células e solubilização do formazan e, decorridos 15 min de agitação, a absorbância foi medida com leitor de microplacas em 540 nm. A inibição da redução do MTT indica a diminuição da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em sextuplicata e repetidos em três diferentes dias.

## Modelo de neuroprevenção



## Modelo de neuroresgate



### 3.6. Determinação de Nitrito

Após o período de incubação, a concentração de nitrito foi determinada segundo o método de Green cols., (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm. Para esta experiência 100  $\mu$ L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0.1% /  $H_3PO_4$  em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100  $\mu$ L do sobrenadante da cultura de célula e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de  $NaNO_2$  (variando de 0,75 à 100  $\mu$ M) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100  $\mu$ L do reativo de

Griess a 100  $\mu\text{L}$  do meio de cultura e a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm.

### **3.7. Determinação da peroxidação lipídica pela medição de tiobarbituricos (TBARS)**

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) (Draper, et al.,1990). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um pigmento róseo, que tem absorbância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste pigmento num comprimento de onda de 535 nm, pH 1,0, é  $1,53 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ . Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 1mL de Triton X 100. Então, 250  $\mu\text{L}$  do homogenato foi adicionado a tubos de vidro, e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h, seguido por adição de 400  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 35% para precipitar proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 g por 10 min. e 600  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionado a 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 1,2%. A mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95 °C por 30 min. Após resfriada, a absorbância foi medida em um leitor de microplacas a 535 nm.

### 3.8 Análise Estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa Graph Pad prism 3.0 Para comparação entre as médias foi feita uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ . Os valores foram expressos como Média  $\pm$  EPM.

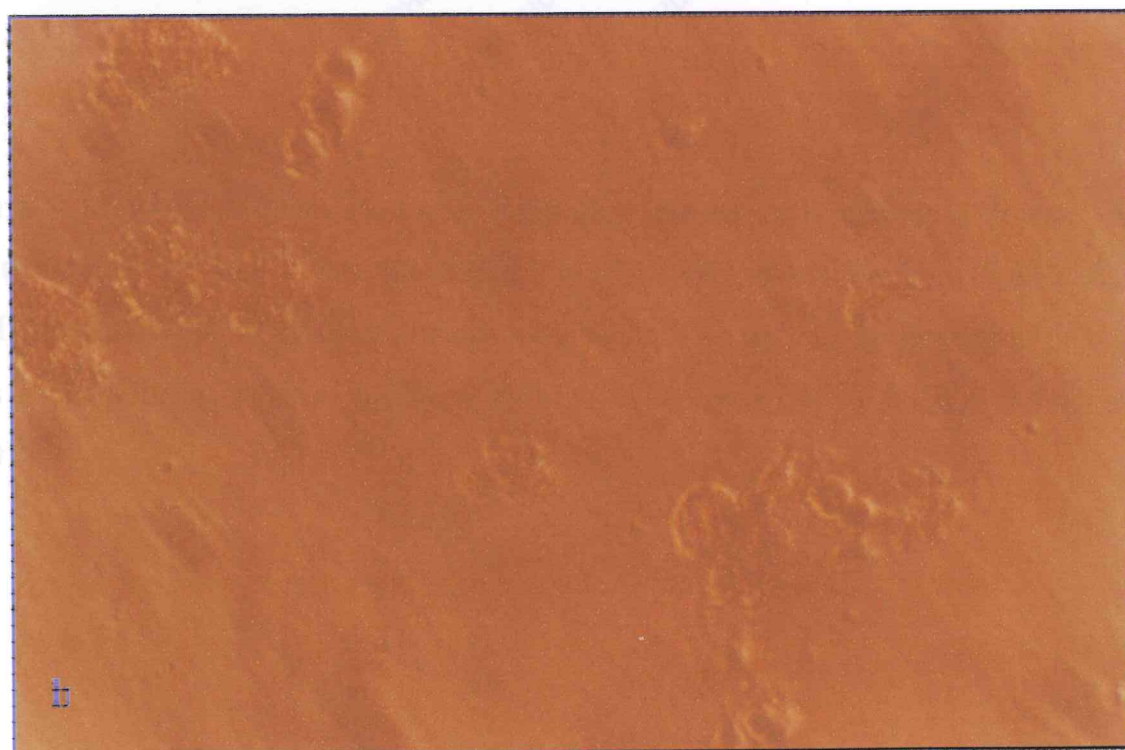
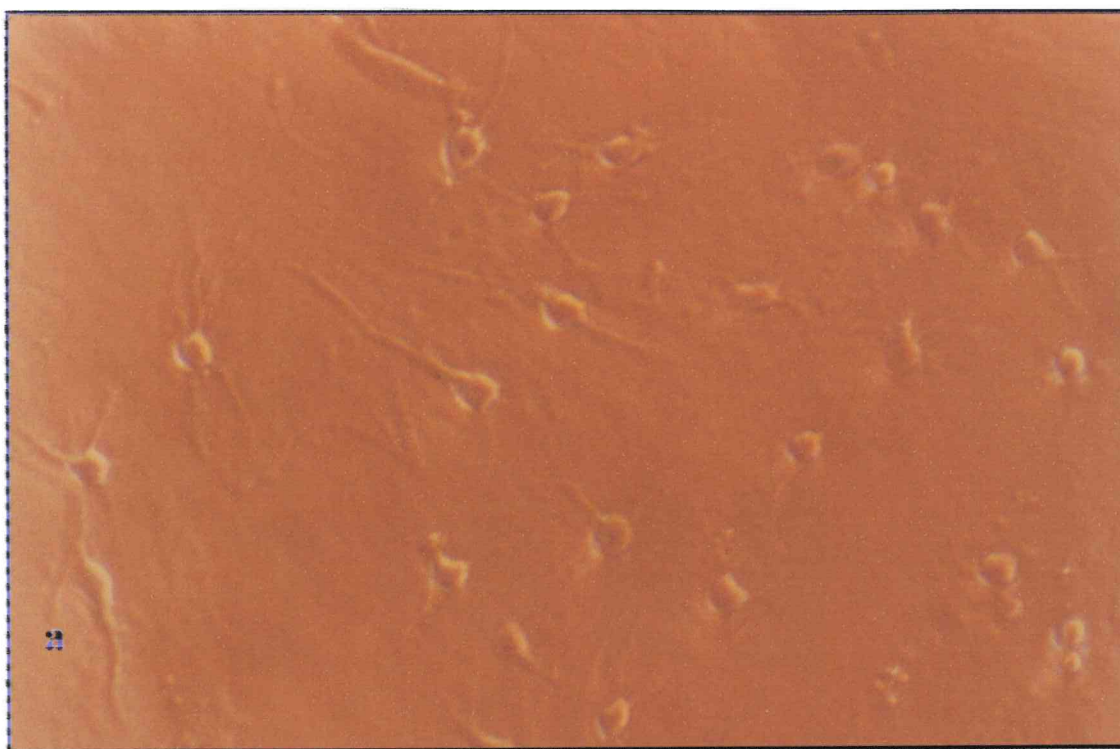
## 4.RESULTADOS

### 4.1. Efeito citotóxico da 6-OHDA sobre a viabilidade de células mesencefálicas de rato.

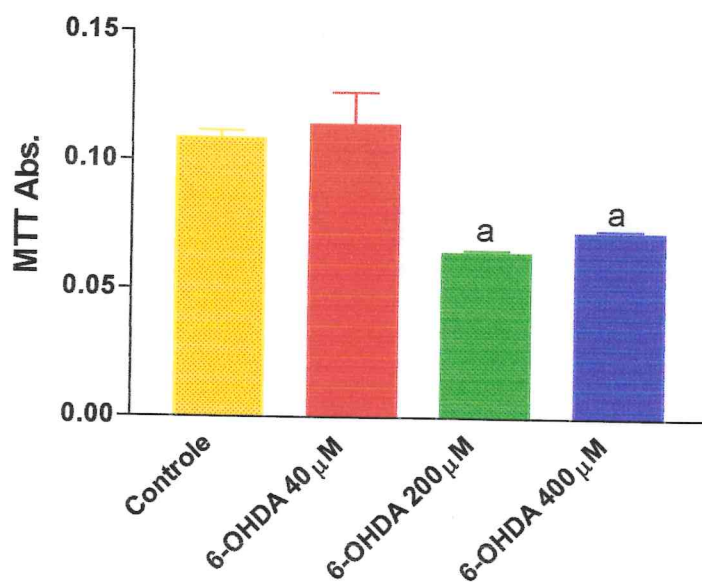
A Figura 7 mostra a cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência da 6-OHDA (200 $\mu$ M). Podemos observar uma grande redução na população de células e grande presença de fragmentos celulares.

A figura 8 mostra o efeito da 6-OHDA nas concentrações de 40, 200 e 400  $\mu$ M, equivalente a 10, 50 e 100  $\mu$ g/mL sobre a viabilidade celular. Os resultados mostram que a 6-OHDA na concentração de 40  $\mu$ M não tem efeito tóxico, a adição de 200 e 400  $\mu$ M diminuíram a viabilidade celular em 41% e 34% respectivamente, demonstrando um efeito máximo na concentração de 200  $\mu$ M (absorbância pelo MTT: controle =  $0,108 \pm 0,003$ ; 6-OHDA 40  $\mu$ M =  $0,102 \pm 0,012$ ; 6-OHDA 200  $\mu$ M =  $0,064 \pm 0,000$ ; 6-OHDA 400  $\mu$ M =  $0,071 \pm 0,010$ ).





**Figura 7-Citotoxicidade da 6-OHDA (200  $\mu$ M) em cultura de células mesencefálicas de rato. a grupo controle (40X) b grupo 6-OHDA (40X).** Como podemos observar, no grupo controle a temos a manutenção da integridade das células, integridade esta que é perdida quando estas são expostas a neurotoxina 6-OHDA como podemos observar no grupo 6-OHDA b.



**Figura 8** – Efeito da 6-OHDA sobre a viabilidade celular mesencefálicas de rato. As células foram cultivadas durante 7 dias, após este período foram cultivadas com 6-OHDA (40, 200, 400 μM) durante 24h. Após o tratamento a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. Os valores estão expressos como média ± EPM a vs controle, P < 0,05 (ANOVA e teste de Dunnett).

#### 4.2. Efeito da 6-OHDA sobre a produção de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato

A figura 9 mostra que a 6-OHDA promoveu um aumento dose dependente nas concentrações de nitrito quando comparado com controle (controle =  $4,102 \pm 0,3973 \mu\text{M}$ ; 6-OHDA  $40 \mu\text{M} = 15,460 \pm 0,3084 \mu\text{M}$ ; 6-OHDA  $200 \mu\text{M} = 18,450 \pm 0,3971 \mu\text{M}$ ; 6-OHDA  $400 \mu\text{M} = 20,85 \pm 0,6242 \mu\text{M}$ , ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

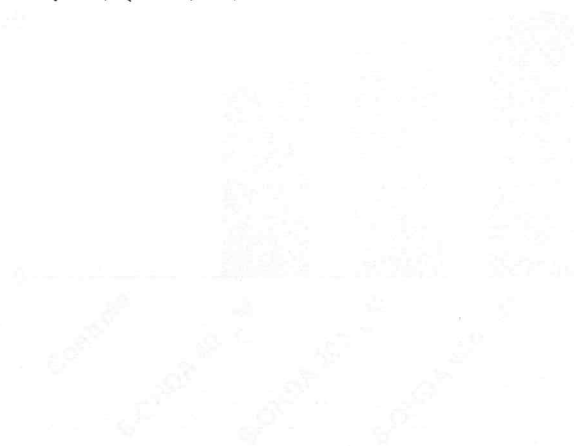
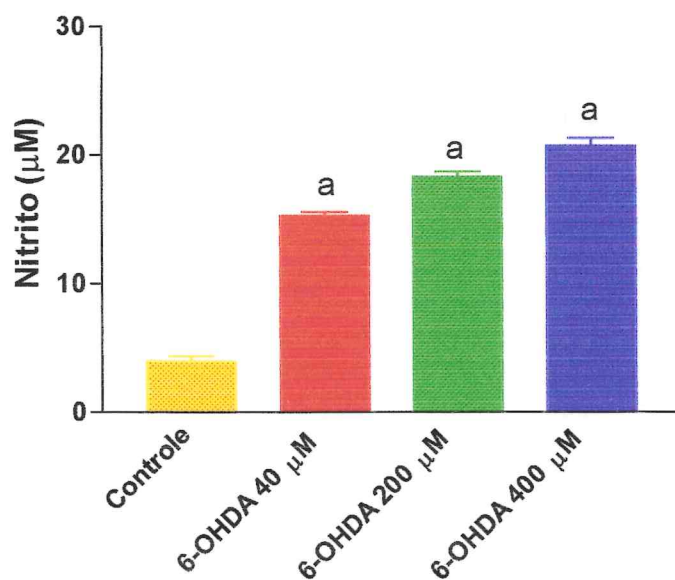


Figura 9 - Efeito da 6-OHDA sobre os níveis de nitrito em células mesencefálicas de rato. As células foram cultivadas durante 7 dias em meio de cultura e cultivadas com 6-OHDA (40, 200, 400 $\mu\text{M}$ ). Os níveis de nitrito foram detectados por espectrofotometria em 540 nm. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \* $P < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA e teste de Dunnet).

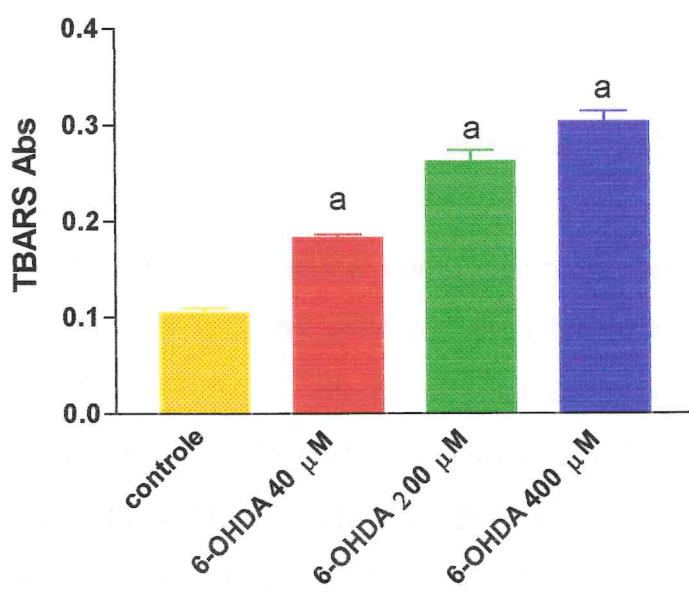


**Figura 9** – Efeito da 6-OHDA sobre os níveis de nitrito em células mesencefálicas de rato. As células foram cultivadas durante 7 dias, após este período foram cultivadas com 6-OHDA (40, 200, 400µM) durante 24h. Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados . Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM a vs controle,  $P < 0,05$  (ANOVA e teste de Dunnet).

### 4.3. Efeito da 6-OHDA sobre os níveis de TBARS em culturas de células mesencefálicas de rato.

A figura 10 mostra que a 6-OHDA promoveu um aumento dose dependente nas concentrações de TBARS em relação ao controle (TBARS: absorvância controle =  $0,1060 \pm 0,004$ ; 6-OHDA  $40 \mu\text{M} = 0,1837 \pm 0,003$ ; 6-OHDA  $200 \mu\text{M} = 0,2626 \pm 0,011$ ; 6-OHDA  $400 \mu\text{M} = 0,3039 \pm 0,117$ ) ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).



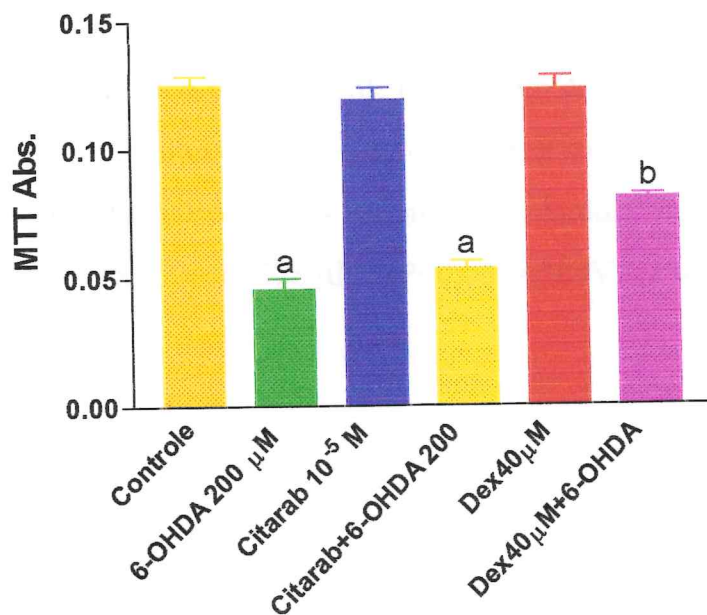


**Figura 10** - Efeito da 6-OHDA sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de rato . As células foram cultivadas durante 7 dias, após este período foram cultivadas com 6-OHDA (40, 200, 400μM) durante 24h. Após o tratamento os níveis de TBARS foram determinados . Os valores estão expressos como média ± EPM a vs controle,  $P < 0,05$  (ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.4. Efeito da citarabina e dexferoxamina sobre a viabilidade de células mesencefálicas de ratos expostas a 6-OHDA

A figura 11 mostrou que a inibição da divisão de células não neuronais, principalmente as células gliais, pela citarabina ( $10^{-5}M$ ), tanto isolada quanto em associação com a 6-OHDA, não demonstrou nenhum efeito sobre a neurotoxicidade induzida pela neurotoxina 6-OHDA em células mesencefálicas de ratos como medido pelo método do MTT (absorbância controle =  $0,1257 \pm 0,003$ ; 6-OHDA 200  $\mu M$  =  $0,0460 \pm 0,004$ ; Citarabina  $10^{-5} M$  =  $0,1203 \pm 0,004$ ; Cit + 6-OHDA 200  $\mu M$  =  $0,0540 \pm 0,002$ )( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

A dexferoxamina (40 $\mu M$ ), usada como controle positivo, quando administrada isoladamente, não promoveu nenhuma alteração na viabilidade celular. No entanto, quando associada com a 6-OHDA 200  $\mu M$ , promoveu uma citoproteção de 76%. Os resultados mostram ainda que a adição de 200  $\mu M$  da neurotoxina diminuiu em 60% a viabilidade celular (absorbância pelo MTT: controle =  $0,125 \pm 0,003$ ; 6-OHDA 200  $\mu M$  =  $0,046 \pm 0,004$ ; Dex 40  $\mu M$  =  $0,1240 \pm 0,005$ ; Dex 40 + 6-OHDA =  $0,0818 \pm 0,001$ ).



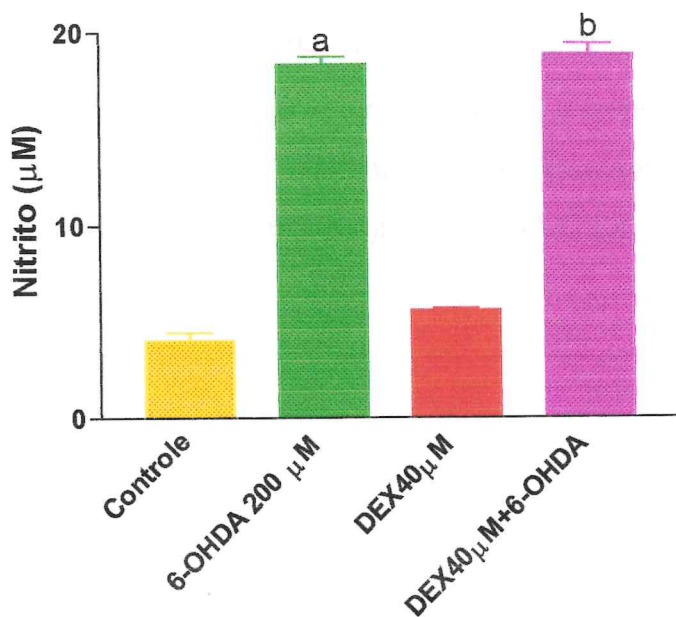
**Figura 11-** Efeito da citarabina e dexferoxamina sobre a viabilidade de células mesencefálicas de rato tratados com 6-OHDA(200 $\mu$ m). As células foram cultivadas durante 7 dias, após este período foram cultivadas com citarabina (10<sup>-5</sup>M) e dexferoxamina (40 $\mu$ M) durante 24h. Após o tratamento a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, a vs controle, b vs 6-OHDA (P< 0,05, ANOVA e teste de Dunnet).



#### 4.5. Efeito da dexferoxamina sobre a produção de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA

A figura 12 mostra que a dexferoxamina não promoveu alterações nas concentrações de nitrito quando comparado com controle (controle =  $4,102 \pm 0,3973 \mu\text{M}$ ; 6-OHDA =  $18,45 \pm 0,3971 \mu\text{M}$ ; dexferoxamina =  $5,622 \pm 0,1025 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet). A dexferoxamina não reverteu os níveis de nitrito produzidos pela 6-OHDA (dexferoxamina  $40 \mu\text{M} + 6\text{-OHDA} = 18,97 \pm 0,5578 \mu\text{M}$ ) ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

Figura 12 - Efeito da dexferoxamina sobre a produção de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA. Os valores foram determinados durante o período de 24 horas de cultivo em presença de 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) e dexferoxamina (100  $\mu\text{M}$ ) em cultura de células mesencefálicas de rato. Os dados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $P < 0,05$  em relação ao controle (ANOVA e teste de Dunnet).

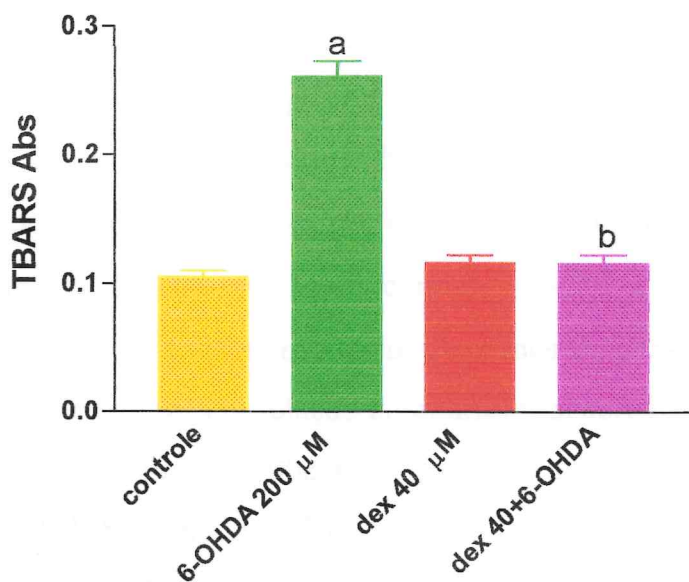


**Figura 12** – Efeito da dexferoxamina sobre os níveis de nitrito em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA. As células foram cultivadas durante 7 dias, após este período foram cultivadas com dexferoxamina (40µM) durante 24h. Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. **a** vs controle, **b** vs 6-OHDA ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.6. Efeito da dexferoxamina sobre a produção de TBARS em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA

A figura 13 mostra que a exposição das células à 6-OHDA aumentou significativamente em 103% os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: controle =  $0,108 \pm 0,004$ ; 6-OHDA =  $0,252 \pm 0,011$ ). A dexferoxamina na concentração de  $40 \mu\text{M}$  conseguiu reverter este efeito, trazendo os níveis de TBARS para próximo do controle (TBARS absorvância: Dexferoxamina =  $0,116 \pm 0,005$ ; Dexferoxamina + 6-OHDA =  $0,113 \pm 0,006$ ) ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnett).

Figura 13 - Efeito da dexferoxamina sobre a produção de TBARS em células mesencefálicas de rato. As células foram tratadas com 6-OHDA (100  $\mu\text{M}$ ) e a dexferoxamina (40  $\mu\text{M}$ ) foi adicionada 1 hora antes da exposição à 6-OHDA. Os níveis de TBARS foram medidos por espectrofotometria em 540 nm. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos realizados em triplicata. \* $P < 0,05$  em relação ao controle; # $P < 0,05$  em relação à 6-OHDA.

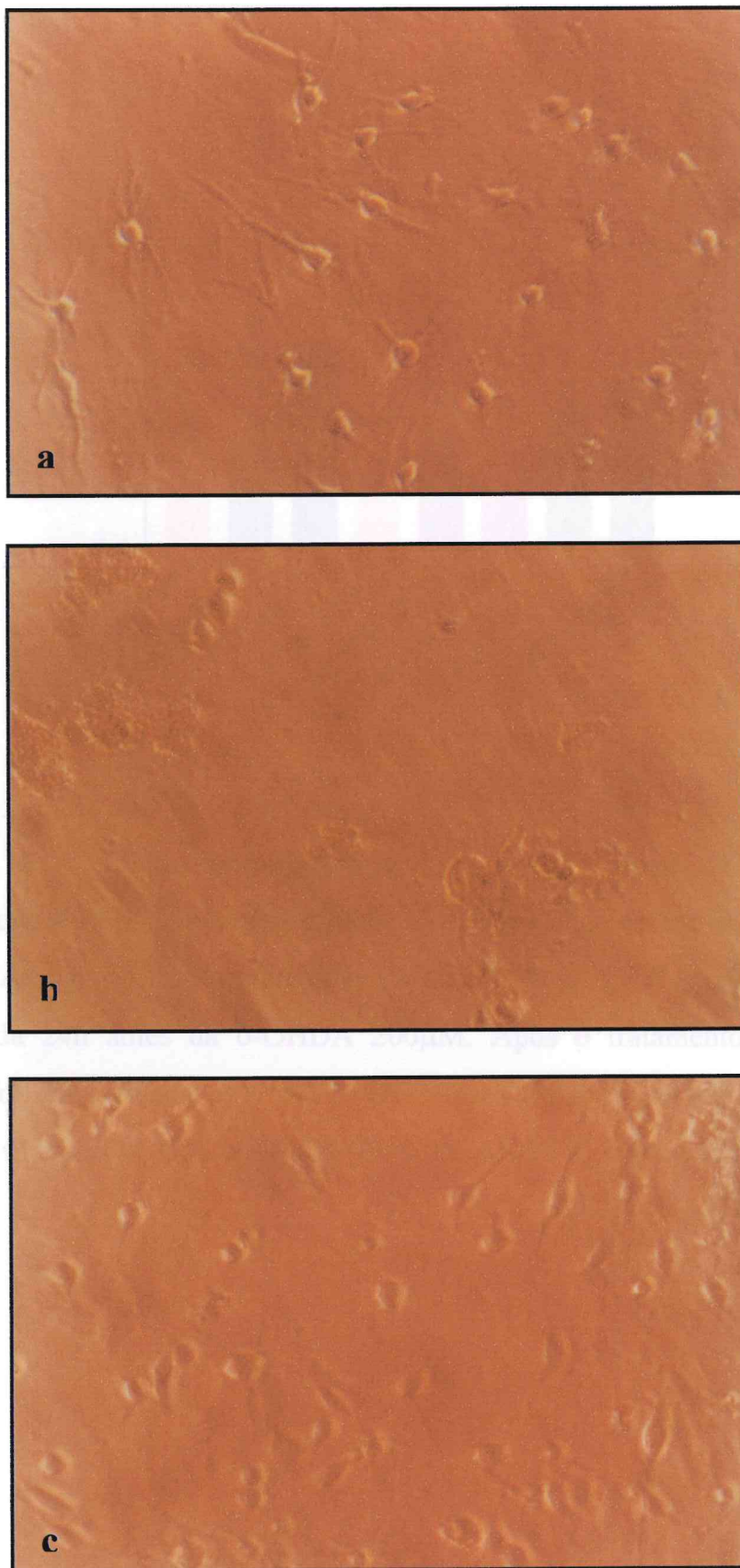


**Figura 13** - Efeito da dexferoxamina sobre os níveis de TBARS em cultura de células mesencefálicas de rato na presença ou ausência de 6-OHDA. As células foram cultivadas durante 7 dias, após este período foram cultivadas com dexferoxamina (40μM) durante 24h. Após o tratamento os níveis de TBARS foram determinados. Os valores estão expressos como média ± EPM a vs controle, b vs 6-OHDA (P< 0,05, ANOVA e teste de Dunnet).

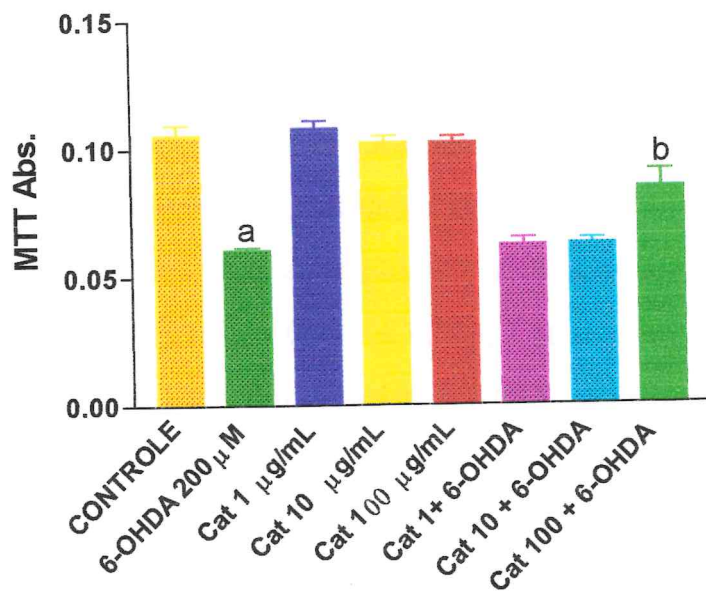
#### 4.7. Efeito neuropreventivo da fração tanino (FT) isolada da *Myracrodruon urundeuva* em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA

A Figura 14 mostra o efeito da fração tanino (FT) na cultura de células mesencefálicas de rato na presença de 6-OHDA. Podemos observar uma manutenção da integridade das células quando comparadas ao controle.

A figura 15 mostra que a FT quando adicionada 24h antes da 6-OHDA, mostra um efeito preventivo sobre a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA em células mesencefálicas de rato. Os resultados mostram que a adição de 200  $\mu\text{M}$  da neurotoxina diminuiu em 40% a viabilidade celular (absorbância pelo MTT: controle =  $0,108 \pm 0,003$ ; 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$  =  $0,065 \pm 0,000$ ). A FT isoladamente promoveu, nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , um aumento da viabilidade celular em relação ao controle (absorbância pelo MTT: Controle =  $0,108 \pm 0,003$ ; FT 1 =  $0,129 \pm 0,002$  (aumento da viabilidade em relação ao controle) (19,4%); FT 10 =  $0,138 \pm 0,005$  (27,7%); FT 100 =  $0,208 \pm 0,009$  (92%). A FT em associação com a 6-OHDA nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$  preveniu significativamente a toxicidade induzida pela OHDA (absorbância pelo MTT: 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$  =  $0,065 \pm 0,000$ ; FT 1 + 6-OHDA =  $0,077 \pm 0,001$  (aumento da viabilidade em relação a 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$ ) (18%); FT 10 + 6-OHDA =  $0,084 \pm 0,003$  (29%); FT 100 + 6-OHDA =  $0,100 \pm 0,006$  (53%)).



**Figura 14-** Efeito da fração tanino (FT) na cultura de células mesencefálicas de rato na presença de 6-OHDA. **a** grupo controle (40X) **b** grupo 6-OHDA (40X) **c** grupo FT+6-OHDA (40X).

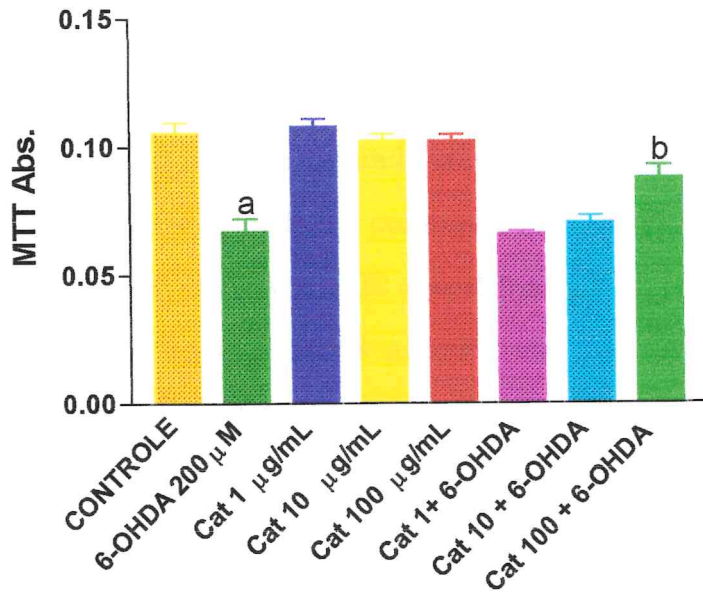


**Figura 18** – Efeito neuropreventivo da Catequina (Cat) em cultura de células mesencefálicas de rato expostos a 6-OHDA. As células foram cultivadas durante 7 dias. A Cat (1, 10, 100 $\mu$ g/mL) foi adicionada 24h antes da 6-OHDA 200 $\mu$ M. Após o tratamento a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, a vs controle, b vs 6-OHDA 50 ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.10 Efeito de neuroresgate da catequina em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA

A figura 19 mostra que a catequina quando adicionada 3h após à 6-OHDA, mostra um efeito de neuroresgate sobre a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA em células mesencefálicas de rato. Os resultados mostram que a adição de 200  $\mu\text{M}$  da neurotoxina diminuiu em 54% a viabilidade celular (absorbância pelo MTT: controle =  $0,115 \pm 0,003$ ; 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$  =  $0,065 \pm 0,000$ ). A catequina isoladamente nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , não promoveu nenhuma alteração na viabilidade celular em relação ao controle (absorbância pelo MTT: controle =  $0,115 \pm 0,003$ ; Cat 1  $\mu\text{g/ml}$  =  $0,107 \pm 0,003$ ; Cat 10  $\mu\text{g/ml}$  =  $0,101 \pm 0,002$ ; Cat 100  $\mu\text{g/ml}$  =  $0,101 \pm 0,002$ ). A catequina em associação com a 6-OHDA na concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$  reverteu significativamente a toxicidade induzida pela 6-OHDA (absorbância pelo MTT: 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$  =  $0,063 \pm 0,005$ ; Cat 1 + 6-OHDA =  $0,067 \pm 0,001$  (6%) (viabilidade em relação ao controle); Cat 10 + 6-OHDA =  $0,074 \pm 0,002$  (17%); Cat 100 + 6-OHDA =  $0,086 \pm 0,005$  (36%).

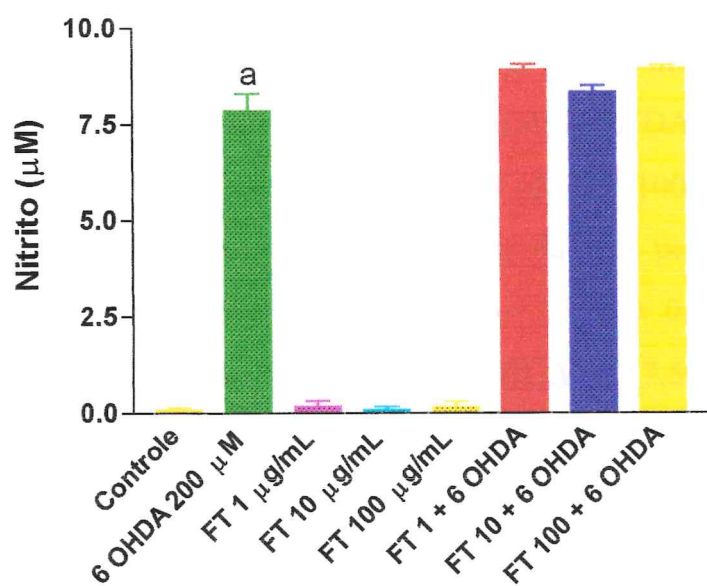




**Figura 19** – Efeito de neuroresgate da Catequina (Cat) em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA. As células foram cultivadas durante 7 dias. A Cat (1,10,100µg/ml) foi adicionada 3h após à 6-OHDA 200µM. Após o tratamento a viabilidade celular foi determinada pelo MTT. Os valores estão expressos como média ± EPM, **a** vs controle, **b** vs 6-OHDA ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.11 Efeito da fração Tanino (FT) isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (Modelo de Neuroprevenção)

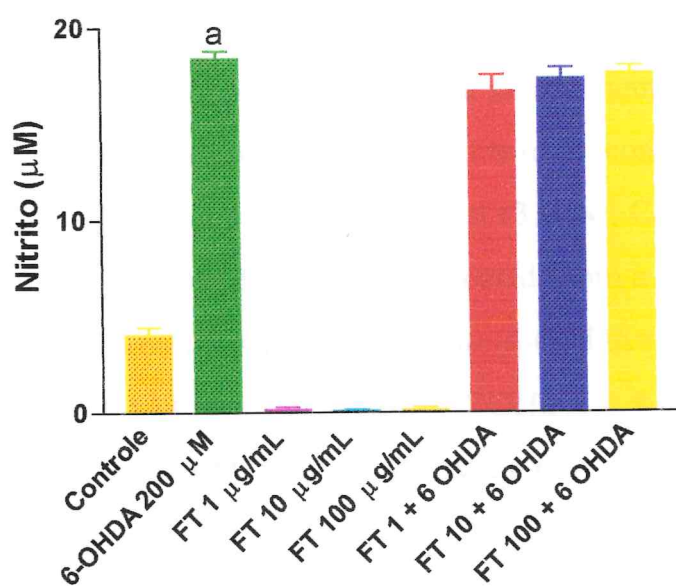
A figura 20 mostra que a FT, adicionada 24h antes da 6-OHDA (200 $\mu$ M), não alterou as concentrações de nitrito quando comparado com controle (controle =  $0,187 \pm 0,0750 \mu\text{M}$ ; 6-OHDA =  $8,420 \pm 0,452 \mu\text{M}$ ). A FT não conseguiu reverter os níveis de nitrito produzidos pela adição de 6-OHDA, (6-OHDA =  $8,420 \pm 0,452 \mu\text{M}$ ; FT 1 + 6-OHDA =  $14,62 \pm 0,466 \mu\text{M}$ ; FT 10 + 6-OHDA =  $15,45 \pm 0,248 \mu\text{M}$ ; FT 100 + 6-OHDA =  $17,59 \pm 0,404 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).



**Figura 20** – Efeito da FT isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroprevenção). As células foram cultivadas durante 7 dias. A FT (1, 10, 100 µg/ml) foi adicionada 24h antes da 6-OHDA 200 µM. Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados. Os valores estão expressos como média ± EPM, **a** vs controle ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.12 Efeito da fração Tanino (FT) isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de ratos expostas à 6-OHDA (Modelo de Neuroresgate)

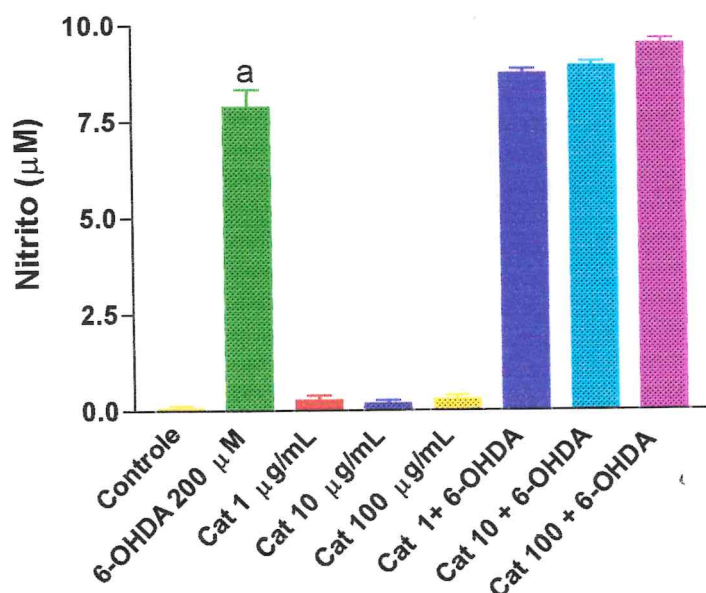
A figura 21 mostra que a FT não alterou os níveis de nitrito quando adicionada 3h após à 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$  (controle =  $3,528 \pm 0,397 \mu\text{M}$ ; 6-OHDA =  $18,00 \pm 0,397 \mu\text{M}$ ; FT 1  $\mu\text{M}$  =  $0,147 \pm 0,143 \mu\text{M}$ ; FT 10  $\mu\text{M}$  =  $0,106 \pm 0,084 \mu\text{M}$ ; FT 100  $\mu\text{M}$  =  $0,147 \pm 0,146 \mu\text{M}$ ). A FT não conseguiu reverter os níveis de nitrito produzidos pela adição de 6-OHDA (6-OHDA =  $18,00 \pm 0,397 \mu\text{M}$ ; FT 1  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $16,66 \pm 0,862 \mu\text{M}$ ; FT 10  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $16,86 \pm 0,556 \mu\text{M}$ ; FT 100  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $17,59 \pm 0,404 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).



**Figura 21** - Efeito da FT isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostas à 6-OHDA (modelo de neuroresgate). As células foram cultivadas durante 7 dias. A FT (1, 10, 100µg/ml) foi adicionada 3h após a 6-OHDA 200µM. Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, a vs controle ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.13 Efeito da Catequina sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (Modelo de Neuroprevenção)

A figura 22 mostra que a 6-OHDA (200  $\mu\text{M}$ ) levou a um aumento de 4400% na concentração de nitrito. Já a catequina não promoveu isoladamente alterações significativas nas concentrações de nitrito quando comparado com controle (controle =  $0,187 \pm 0,075 \mu\text{M}$ ; 6-OHDA =  $8,420 \pm 0,452 \mu\text{M}$ ; Cat 1  $\mu\text{M}$  =  $0,388 \pm 0,131 \mu\text{M}$ ; Cat 10  $\mu\text{M}$  =  $0,227 \pm 0,086 \mu\text{M}$ ; Cat 100  $\mu\text{M}$  =  $0,428 \pm 0,108 \mu\text{M}$ ). Quando associada com a 6-OHDA, a catequina não promoveu alteração significativa dos níveis de nitrito (6-OHDA =  $8,420 \pm 0,452 \mu\text{M}$ ; Cat 1  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $8,862 \pm 0,133 \mu\text{M}$ ; Cat 10  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $8,942 \pm 0,108 \mu\text{M}$ ; Cat 100  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $9,665 \pm 0,148 \mu\text{M}$ ,  $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

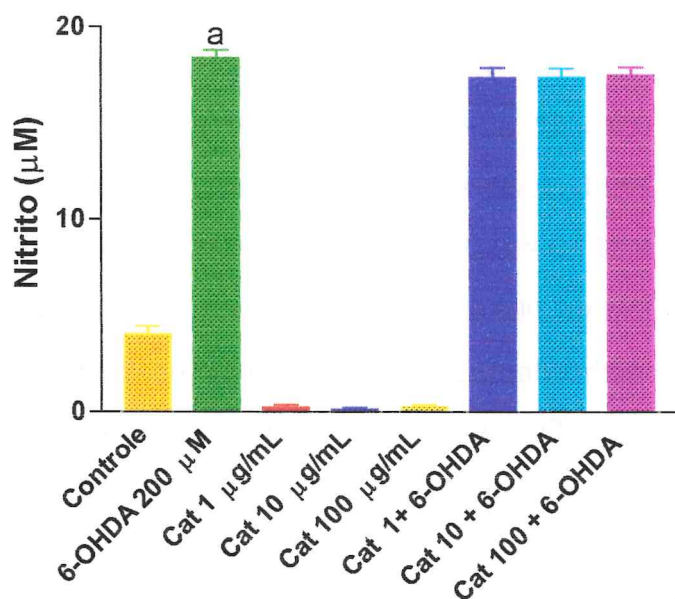


**Figura 22** – Efeito da Catequina (Cat) sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroprevenção). As células foram cultivadas durante 7 dias. A Catequina (1, 10, 100µg/ml) foi adicionada 24h antes da 6-OHDA 200µM. Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, a vs controle ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.14 Efeito da Catequina sobre a formação de nitrito em células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (Modelo de Neuroresgate)

A figura 23 mostra que a 6-OHDA (200  $\mu\text{M}$ ) levou a um aumento de 4400% na concentração de nitrito. Já a catequina não promoveu alteração na concentração de nitrito (controle =  $3,528 \pm 0,397$ ; 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$  =  $18,00 \pm 0,397$ ). A catequina em associação com a 6-OHDA, nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu\text{g/ml}$ , não promoveu nenhuma alteração nos níveis de nitrito produzidos pela 6-OHDA (6-OHDA 200  $\mu\text{M}$  =  $18,00 \pm 0,397$ ; Cat 1  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $17,38 \pm 0,545$ ; Cat 10  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $16,83 \pm 0,464$ ; Cat 1  $\mu\text{M}$  + 6-OHDA =  $17,66 \pm 0,437$ ).

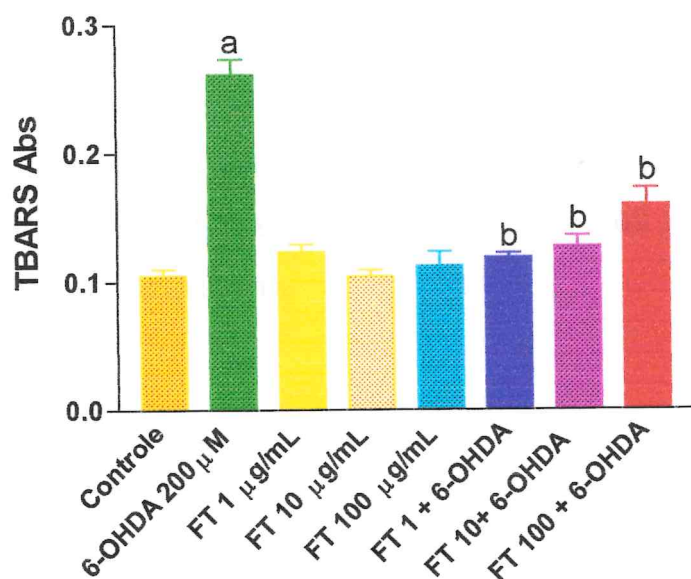




**Figura 23** - Efeito da Catequina (Cat) sobre a formação de nitrito em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA (modelo de neuroresgate). As células foram cultivadas durante 7 dias. A Catequina (1, 10, 100µg/ml) foi adicionada 3h após à da 6-OHDA 200µM. Após o tratamento os níveis de nitrito foram determinados . Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, a vs controle ( $P < 0,05$  ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.15 Efeito fração tanino (FT) isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada antes da 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo de neuroprevenção)

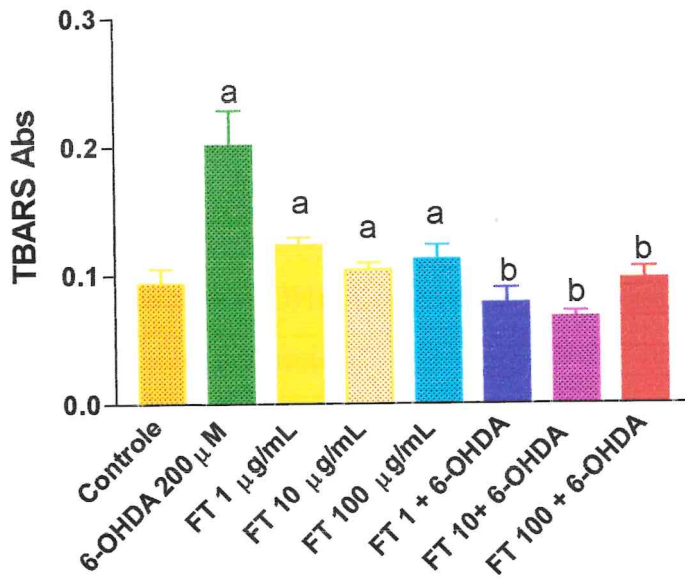
A figura 24 mostra que a exposição das células à 6-OHDA aumentou significativamente em 103% os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: controle =  $0,108 \pm 0,004$ ; 6-OHDA =  $0,252 \pm 0,011$ ). A FT isoladamente nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL não alterou os níveis de TBARS (TBARS absorvância: FT 1 =  $0,127 \pm 0,006$ ; FT 10 =  $0,108 \pm 0,004$ ; FT 100 =  $0,118 \pm 0,010$ ). No entanto, quando em associação, a FT nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL reverteu completamente os níveis de TBARS produzidos pela 6-OHDA (TBARS absorvância: FT 1 + 6-OHDA =  $0,119 \pm 0,003$  (53%) (diminuição em relação à 6-OHDA); FT 10 + 6-OHDA =  $0,136 \pm 0,008$  (46%); FT 100 + 6-OHDA =  $0,160 \pm 0,013$  (36%),  $P < 0.05$ , ANOVA e teste de Dunnet).



**Figura 24** - Efeito da FT isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de rato. As células foram cultivadas durante 7 dias. A FT (1,10,100μg/ml) foi adicionada 24h antes da 6-OHDA 200μM (modelo de neuroprevenção). Após o tratamento os níveis de TBARS foram determinados. Os valores estão expressos como média ± EPM, a vs controle, b vs 6-OHDA ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

#### 4.16 Efeito fração tanino (FT) isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada após à 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo de neuroresgate)

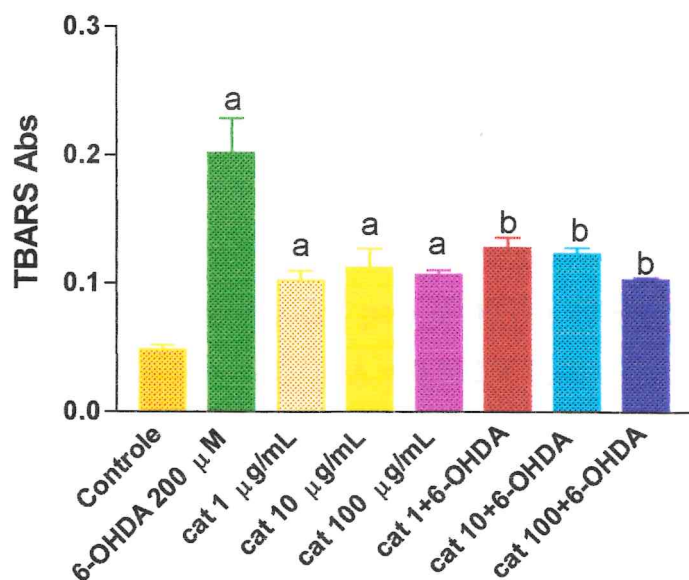
A figura 25 mostra que a exposição das células à 6-OHDA aumentou significativamente em 284% os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: controle =  $0,046 \pm 0,003$ ; 6-OHDA =  $0,177 \pm 0,027$ ). A FT isoladamente nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL alterou os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: TEF 1 =  $0,127 \pm 0,006$ ; TEF 10 =  $0,108 \pm 0,004$ ; TEF 100 =  $0,118 \pm 0,010$ ). Quando em associação, a FT nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL reverteu os níveis de TBARS produzidos pela 6-OHDA (TBARS absorvância: TEF 1 + 6-OHDA =  $0,071 \pm 0,011$ ; TEF 10 + 6-OHDA =  $0,065 \pm 0,005$ ; TEF 100 + 6-OHDA =  $0,089 \pm 0,009$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA e teste de Dunnet).



**Figura 25** – Efeito da FT isolada da *Myracrodruon urundeuva* sobre os níveis de TBARS em cultura de células mesencefálicas de ratos expostos à 6-OHDA. As células foram cultivadas durante 7 dias. A FT (1,10,100µg/ml) foi adicionada 3h após à 6-OHDA 200µM (modelo de neuroresgate). Após o tratamento os níveis de TBARS foram determinados . Os valores estão expressos como média ± EPM, a vs controle, b vs 6-OHDA (P< 0,05, ANOVA e teste de Dunnet).

#### **4.17 Efeito da catequina sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada antes da 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo neuroprevenção)**

A figura 26 mostra que a exposição das células à 6-OHDA aumentou significativamente em 284% os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: controle =  $0,046 \pm 0,003$ ; 6-OHDA =  $0,177 \pm 0,027$ ). A catequina nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ M alterou os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: Cat 1 =  $0,103 \pm 0,007$ ; Cat 10 =  $0,115 \pm 0,015$ ; Cat 100 =  $0,106 \pm 0,003$ ). Quando em associação, a catequina nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL reverteu os níveis de TBARS produzidos pela 6-OHDA (TBARS absorvância: Cat 1 + 6-OHDA =  $0,130 \pm 0,007$ ; Cat 10 + 6-OHDA =  $0,124 \pm 0,004$ ; Cat 100 + 6-OHDA =  $0,105 \pm 0,001$ ,  $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

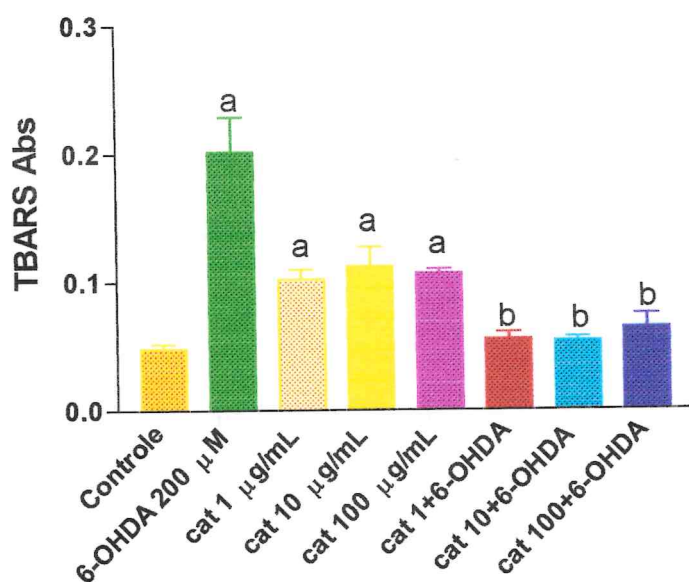


**Figura 26** - Efeito da Catequina sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de rato. As células foram cultivadas durante 7 dias. A Catequina (1,10,100 $\mu$ g/ml) foi adicionada 24h antes da 6-OHDA, 200 $\mu$ M (modelo de neuroproteção). Após o tratamento os níveis de TBARS foram determinados. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, a vs controle, b vs 6-OHDA ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnett).

#### **4.18 Efeito da catequina sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de ratos quando adicionada após à 6-OHDA 200 $\mu$ M (modelo de neuroresgate)**

A figura 27 mostra que a exposição das células à 6-OHDA aumentou significativamente em 284% os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: controle =  $0,046 \pm 0,003$ ; 6-OHDA =  $0,177 \pm 0,027$ ). A catequina nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ M alterou os níveis de TBARS em relação ao controle (TBARS absorvância: Cat 1 =  $0,103 \pm 0,007$ ; Cat 10 =  $0,115 \pm 0,015$ ; Cat 100 =  $0,106 \pm 0,003$ ). Quando em associação, a catequina nas concentrações de 1, 10 e 100  $\mu$ g/mL reverteu os níveis de TBARS produzidos pela 6-OHDA (TBARS absorvância: Cat 1 + 6-OHDA =  $0,051 \pm 0,005$ ; Cat 10 + 6-OHDA =  $0,052 \pm 0,003$ ; Cat 100 + 6-OHDA =  $0,053 \pm 0,010$ ,  $P < 0.05$ , ANOVA e teste de Dunnet).





**Figura 27** – Efeito da Catequina sobre os níveis de TBARS em células mesencefálicas de rato. As células foram cultivadas durante 7 dias. A Catequina (1,10,100µg/ml) foi adicionada 3h após à 6-OHDA 200µM (modelo de neuroresgate). Após o tratamento os níveis de TBARS foram determinados. Os valores estão expressos como média ± EPM, a vs controle, b vs 6-OHDA ( $P < 0,05$ , ANOVA e teste de Dunnet).

## 5. DISCUSSÃO

Uma superprodução desequilibrada de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode aumentar o estresse oxidativo, o qual pode induzir dano neuronal, e em última instância, conduzir para morte neuronal por apoptose ou necrose. Muitas evidências indicam que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de várias doenças neurodegenerativas. Vários estudos mostram que antioxidantes nutricionais (principalmente vitamina E e polifenóis) podem bloquear a morte neuronal *in vitro*, e podem ter propriedades terapêuticas em modelos animais de doenças neurodegenerativas incluindo a DP. Além disso, dados clínicos sugerem que antioxidantes nutricionais podem apresentar algum efeito protetor contra a DP (Di Matteo et al., 2003).

Acredita-se que os radicais livres têm uma importante participação na patogênese de várias doenças, incluindo a DP (Chun-Ching, 2003). O estudo dos radicais livres e antioxidantes na biologia está produzindo uma revolução médica que promete uma nova era para a saúde e o tratamento das doenças. Em relação às reações oxidativas, as espécies reativas de oxigênio (ROS) tem um papel importante em doenças degenerativas crônicas, incluindo câncer, doenças autoimunes, inflamatórias, cardiovasculares e neurodegenerativas (doença de Parkinson) (Aruoma et al., 2003). Influências dietéticas no estresse oxidativo tem sido investigadas como tendo um importante papel na etiologia da DP (Powers et al., 2003).

As mitocôndrias são a maior fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma disfunção mitocondrial tem sido relacionada com algumas doenças neurodegenerativas (Browne et al., 2003). Existem evidências consideráveis sugerindo que a deficiência mitocondrial e o estresse oxidativo podem ter um papel na patogênese da doença de Parkinson (DP). Esta possibilidade tem sido reforçada por estudos recentes em modelos animais, os quais mostraram que um inibidor seletivo do complexo I da cadeia transportadora de elétrons pode produzir um modelo animal que mimetiza os achados bioquímicos e histopatológicos da DP.

O estresse oxidativo pode ser um componente importante na neurodegeneração nigral dopaminérgica na DP e fenômenos semelhantes foram observado em animais tratados com 6-OHDA, sendo então utilizados como modelos de parkinsonismo. A inibição de enzimas

respiratórias pela 6-OHDA é reversível e insensível a compostos removedores de radicais livres e queladores de ferro com a exceção da dexferoxamina (Youdin et al.,1997).

Pesquisas contínuas permanecem tentando diminuir as dificuldades associadas com métodos usados na avaliação das ações de antioxidante *in vivo* (Aruoma et al., 2003). O aumento de entendimento da ligação entre radicais derivados de oxigênio e doenças, incluindo o processo biológico de envelhecimento, tem estimulado interesse geral na modulação destes eventos biológicos (Manda et al., 2003). A natureza difusa das lesões na síndrome neurodegenerativa parkinsoniana explica a ineficácia de tratamentos característicos e o interesse potencial em tratamentos com neuroprotetores, que podem lentificar ou prevenir a degeneração de neurônios em estruturas envolvidas nos processos degenerativos (Destee et al., 2003).

*In vitro* a 6-OHDA induz apoptose em células PC 12 as quais secretam dopamina e possui um transportador dopaminérgico, sendo frequentemente utilizadas em modelos de doença de Parkinson (Jeon et al., 1995).

No sistema nervoso central, as vias dopaminérgicas são a via Nigro-estriatal, envolvida com o controle motor, e a via mesolímbica e mesocortical relacionada com o comportamento, emoções e nos sistemas de recompensa e via tubero-infundibular relacionada com a liberação de hormônios de liberação hipotalâmica. Na DP, a região Nigro-estriatal esta relacionada com a diminuição de células dopaminérgicas na substância negra, no mesencéfalo. Cultura de células dessa região são utilizadas como modelo de DP para se testar drogas com ação neurotóxicas ou neuroprotetoras. No nosso trabalho utilizamos esse tipo de cultura usando a 6-OHDA como neurotoxina.

A 6-OHDA é uma inibidora do complexo mitocondrial I e IV, e pode reproduzir dano celular semelhante ao da DP (Jeon et al., 1995). Esta neurotoxina catecolaminérgica foi encontrada endogenamente em pacientes com DP (Glinka e Youdin.,1997). O mecanismo da toxicidade induzida pela 6-OHDA tem sido sumarizado em duas vias (Glinka et al., 1997; Soto-Otero et al., 2000 ; Woodgate et al.,1999; Bloum et al., 2000; Wu et al., 1996). Uma é a via de toxicidade extracelular: a 6-OHDA gera  $H_2O_2$  e outras espécies

reativas do oxigênio através de auto oxidação, gerando dano celular (Bloum et al., 2000; Wu et al., 1996; Gassen et al., 1998; Yamada et al., 1997). A outra via está relacionada com a internalização da 6-OHDA por transportadores dopaminérgicos, como p. ex. nas células PC12 (Jeon et al., 1995) e a conseqüente geração de ROS intracelular (Glinka et al., 1995) tanto por inibição do complexo I e IV da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou por desaminação enzimática da MAO.

A medida da atividade enzimática pode ser utilizada como ferramenta para se determinar a viabilidade celular. Dentre elas a medida da clivagem do sal de tetrazólium (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais formando um sal de tetrazólium o qual é um ótimo modelo para se testar viabilidade celular (Guangjun et al., 2002).

No nosso trabalho, a 6-OHDA promoveu uma diminuição na viabilidade celular em torno de 40%, demonstrando um efeito máximo na concentração de 200  $\mu$ M. Segundo a literatura, nesse tipo de cultura a percentagem de células dopaminérgicas é em torno de 1% (Nie et al., 2002). Trabalhos relatam que na presença de 6-OHDA, em concentrações de até 100  $\mu$ M, nessas culturas, os sistemas de oxiredução, representados pela glutathione, superóxido desmutase e catalase das células, conseguem proteger do dano oxidativo, no entanto, em concentrações acima 100  $\mu$ M, esses sistemas são sobrepajados e não mais existiria essa proteção, levando a morte das células (Steven et al., 1995). O fato de termos obtido um percentual de morte tão grande nos leva a pensar em uma inespecificidade da 6-OHDA nesta concentração, deixando a droga de ser seletiva para células dopaminérgicas, atingindo a outros tipos neuronais produtores de monoaminas, como a noradrenalina e a serotonina, e células não neuronais, como as células gliais. Isto está de acordo com o trabalho de Nie e cols. (2002).

Com o objetivo de avaliar a interferência das células gliais na citotoxicidade induzida pela 6-OHDA, usamos a citarabina em cultura de células neuronais a partir do sétimo dia de cultura. As células gliais são componentes da chamada neuroglia, presente no SNC. O termo neuroglia foi elaborado por Rudolph Virchow em 1859, o qual a conceituou como um tecido conectivo inativo. Técnicas recentes têm demonstrado que existem três tipos celulares na neuroglia: os astrócitos, oligodendrócitos e micróglia. Os astrócitos revestem

toda a estrutura neuronal e vascular (Miller & Szigeti, 1991). Dentre as funções normais no sistema nervoso central podemos destacar a manutenção da homeostase do potássio (redistribuição para os tecidos de baixa concentração ou para o espaço vascular) (Gardner-Medwin, 1983); o metabolismo do CO<sub>2</sub> (manutenção do pH extracelular nos limites normais) (Kimelberg & Bourke., 1982); recaptação de vários neurotransmissores, tais como glutamato e GABA (Tang & Orkand, 1986). Poucos segundos após a injúria os astrócitos podem ser observados com um aumento de volume (Kimelberg et al.,1990), após algumas horas podem-se observar, aumento na expressão da GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Lindsay, 1986; Murray et al., 1990), expressão de proteínas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC tipo I e II) (Fontana et al., 1984 ; Olsson et al.,1987; Johns et al., 1992) e finalmente, após dias se observam hipertrofia, proliferação e migração dos astrócitos (Del Rio et al.,1991; Miyake et al., 1992).

Células com a capacidade de fagocitose estão presentes no SNC e esta capacidade é prontamente ativada no local da injúria, resultando na morte celular ou processo de degeneração celular. Além disso, o dano pode atrair macrófagos do sangue. O termo “micróglia ramificada” é aplicado aos macrófagos com uma forma característica no parênquima cerebral. Estudos sugerem que estas células derivem de macrófagos derivados do sangue (Ling & Wong, 1993), assim a micróglia seria somente um componente da população de macrófagos cerebrais, com uma população de macrófagos perivasculares separados por parênquima pela lâmina basal (derivados dos monócitos do sangue), servindo como células apresentadoras de antígenos e interagindo com o sistema imune (Lassmann et al.,1993). Os macrófagos fagocitam os debris celulares que se formam, as micróglias ativadas podem liberar citocinas, tais como, interleucina-1, que podem agir nas células endoteliais aumentando a adesão destas aos macrófagos e leucócitos (Poher & Cotran, 1990). Além disso os macrófagos podem matar células normais (Giulian et al., 1993) e também lisar oligodendrócitos aparentemente por gerar radicais livres e induzir a peroxidação lipídica (Merril & Zimmerman, 1991).

Nossos resultados demonstraram que a inibição da divisão de células não neuronais, principalmente as células gliais, pela citarabina, tanto isolada quanto em associação com a 6-OHDA, não demonstrou nenhum efeito sobre a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA

em células mesencefálicas de ratos, o que era esperado, já que o tempo do experimento não ultrapassou a nove dias, tempo insuficiente para que a presença de células gliais interferisse no experimento, pois neste período não há tempo suficiente para a proliferação de células não neuronais a ponto de atingir um percentual que possa afetar significativamente nossos resultados (Michael, 1999).

A geração de ROS é considerada como um evento primário em uma variedade de condições estressantes (Noctor et al., 1998). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo, induzida pela reatividade dos radicais livres do oxigênio. O método mais empregado para determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com TBARS. É geralmente aceito que as ROS sob condições de estresse são um fator prejudicial, o qual causa peroxidação lipídica, inativação enzimática, e prejuízo oxidativo para o DNA (Blokina et al., 2000).

A 6-OHDA além de ser desaminada por monoamino oxidases com formação de água oxigenada ( $H_2O_2$ ) e espécies reativas de oxigênio (Cohen and Heikkila, 1974), também libera ferro da ferritina e promove peroxidação lipídica dependente de ferritina (Monteiro and Winterbourn, 1989) e convincentemente inibe a atividade do complexo 1 mitocondrial (Glinka and Youdim, 1995).

O  $Fe^{2+}$  ao interagir com o peróxido de hidrogênio gera, como produtos radicais hidroxila que aumentam o estresse oxidativo. Na presença de dexferoxamina, este íon estará indisponível, por estar complexado com a dexferoxamina, não ocorrerá o aumento do estresse oxidativo (Guangjun et al., 2002). Vale também destacar a influencia da outras células visto que a nossa cultura de células mesencefálicas de rato é uma cultura mista. A Inibição da respiração mitocondrial pode ser considerada como um evento primário, o qual então desencadeia a seqüência de resultados levando a processos tóxicos e morte celular. Em contraste com outros queladores, como EDTA, a dexferoxamine previne a inibição da NADH desidrogenase pela 6-OHDA e protege ratos da morte induzida por injeção intracerebral de 6-OHDA in vivo. (Bem-Shachar et al., 1991). Contudo, sua propriedade queladora de metal e seu efeito antioxidante não parece ser importante nesta neuroproteção e sim uma interação direta entre dexferoxamina e/ou a própria enzima ou 6-OHDA.

Em nosso trabalho a dexferoxamina, um agente quelador de ferro, usada como controle positivo, quando associada com a 6-OHDA 200  $\mu\text{M}$ , promoveu uma citoproteção de 76%, o que está relacionado com a sua ação queladora de ferro. Alguns trabalhos relatam que queladores de ferro, como a desferoxamina, são altamente efetivos em induzir neuroproteção *in vivo* e *in vitro* (Guangjun et al., 2002). No presente estudo, a desferoxamina (40  $\mu\text{M}$ ), quando associada com a 6-OHDA, promoveu neuroproteção. Trabalhos demonstram (Glinka et al.,1996) que a dexferoxamina ativa a NADH desidrogenase até na ausência de 6-OHDA e portanto ela provavelmente atuaria diretamente sobre a enzima.

A peroxidação lipídica é um processo metabólico natural sob condições normais, e é uma das conseqüências mais investigadas da ação de ROS na estrutura e função das membranas. Tem sido experimentalmente demonstrado que o estresse oxidativo tem um papel crítico na morte celular neuronal. Enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPx) tem demonstrado eficácia terapêutica em modelos de neurodegeneração (Pong et al., 2003).

Nosso resultado demonstraram que a exposição das células à 6-OHDA aumentou de maneira dose dependente os níveis de TBARS em relação ao controle, devido ao aumento da peroxidação lipídica pela da 6-OHDA, ação essa que foi revertida pela dexferoxamina, o que pode ser explicado pela sua propriedade queladora de metal e seu efeito antioxidante ocasionadas pela sua captação de ferro, tornando-o indisponível para a reação de Fenton (Glinka et al.,1996).

O NO é um radical livre lipossolúvel formado como segundo mensageiro que ativa a guanilato ciclase. Sob condições fisiológicas o NO tem um importante papel em uma variedade de funções, incluindo sinaptogênese, plasticidade sináptica, formação da memória, fluxo sanguíneo cerebral e secreções neuroendócrinas. O NO é formado pela conversão de L-arginina para L-citrulina pela NO-sintase. São conhecidas três isoformas da NOS: A expressada constitutivamente, dependente de cálcio e encontrada em neurônios e células endoteliais; um indutível, não cálcio dependente, iNOS, encontrada em macrófagos,

astrócitos e micróglia. O NO tem sido hipotetizado como um importante mediador da morte neuronal sob condições patológicas, reagindo com sistemas biológicos como oxigênio e metais de transição (Coulston et al.,2001).

"Neuroproteção" e "neuroresgate" são termos que podem ser interpretados de várias maneiras. No contexto do nosso trabalho é provavelmente melhor defini-los em termos bioquímicos e funcionais. Neuroproteção pode ser definida como proteção das células neuronais da morte induzida por várias anormalidades bioquímicas associadas com a etiologia e a patogênese. Neuroresgate pode ser definido como o retorno de algumas ou todas as funções bioquímicas e restauração da função neuronal normal das células danificadas. (Schapira, 1999)

Neuroproteção e neuroresgate podem ter efeitos muito diferentes na função neuronal e em particular nos sintomas da DP. Isto pôde ser observados em nosso trabalho onde a FT obtida da *Miracrodruon urundeuva* e também a catequina apresentaram resultados diferentes tanto no modelo de neuroprevenção como no modele de neuroresgate. O motivo principal de termos testado estas substâncias em dois modelos foi o de primeiramente avalia-las como possíveis drogas preventivas, ou seja, o uso corriqueiro preveniria para um possível estabelecimento da DP. No segundo caso avaliariamos os efeitos dessas substâncias na tentativa de recuperar algumas atividades bioquímicas perdidas com a doença e parar este processo neurodegenerativo.

As plantas, ao longo do tempo evolutivo, assim também como os organismos animais foram dotados de distintas defesa antioxidantes, para compensar os efeitos deletérios associados a constante formação de espécies reativas do oxigênio oriundas da presença e utilização do oxigênio em seus tecidos. Dentro da fisiologia das plantas, as suas defesas antioxidantes, podem ser afetadas por inúmeros fatores estressantes, como intensa iluminação, deficiência mineral, vento, seca, oscilações de temperatura, sazonalidade, ontogenia, xenobiontes, entre outros (Grace et al., 1998; Abissi et al., 1998). O uso terapêutico de plantas parece tão antigo quanto a própria espécie humana. Entretanto o conhecimento das propriedades antioxidantes é relativamente recente, especialmente nas duas ultimas décadas observou-se um enorme crescimento da investigação científica neste



particular, envolvendo desde de o efeito de extratos brutos e frações ou de componentes isolados e/ou modificados.

A maioria dos estudos teve como ponto de partida o conhecimento geralmente baseado no costume popular, sobre algumas propriedades farmacológicas clássicas, como analgésica, antiinflamatória, antiespasmódicas, antitérmica, sendo fundamental o conhecimento das propriedades fitoquímicas neste particular (Sampietro et al., 1997).

Um grande número de estudos epidemiológicos tem enfatizado que o consumo diário de plantas e verduras previne o desenvolvimento de várias patologias, tais como cânceres e doenças cardiovasculares (Lampe, 1999). Os vegetais são fontes de fibras, cujos efeitos favoráveis sobre a digestão e metabolismo dos lipídeos e carboidratos tem sido consistentemente relatados, bem como de vários micronutrientes (vitaminas, minerais e vários antioxidantes).

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas, indubitavelmente, os flavonóides constituem o grupo mais representativo encontrados com elevada diversidade de formas (Rice-Evans et al., 1995). O termo flavonóide engloba um grupo de compostos polifenólicos complexos que apresentam um estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (C). A família dos flavonóides é composta por mais de 4000 compostos fenólicos descritos, e inclui os subgrupos flavonóis, flavanonas, antocianidinas, flavonas e flavonóis (Harborne, 1988).

Os flavonóides existem naturalmente numa grande variedade de alimentos de origem vegetal como frutas, vegetais, sementes, flores e folhas, e fazem parte integral da dieta humana (Hertog et al., 1993). Nos últimos anos um grande interesse tem sido voltado para o papel das espécies reativas de oxigênio na etiologia de várias doenças (Halliwell, 1987). As propriedades antioxidantes dos flavonóides têm, assim, atraído a atenção para a nutrição preventiva, pois eles protegem os constituintes alimentares contra o dano oxidativo, podendo também contribuir para a prevenção de importantes patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento, cânceres e outras. Existem vários relatos de que os flavonóides exibem uma grande variedade de efeitos biológicos, incluindo ação

antibacteriana, antiviral (Hanasaki et al., 1994), antiinflamatória e antialérgica (Kadasawami, 1992) e vasodilatadora (Duarte et al., 1993). Além disso eles inibem *in vitro* a peroxidação lipídica (Sugihara et al., 1999).

Frankel e cols. (1993) relatam que compostos fenólicos (incluindo flavonóides e outros polifenóis) isolados do vinho tinto inibem a oxidação da LDL *in vitro* catalisada pelo cobre. Acredita-se que as propriedades sequestradas de ERO e antioxidantes dos compostos fenólicos, presentes no vinho tinto, podem parcialmente explicar o chamado “paradoxo francês”. Esse fenômeno refere-se a baixa incidência de doenças cardiovasculares observada na população do sul da França, apesar da ingestão de uma dieta rica em gordura saturada e do tabagismo, contrastando com a alta incidência de doenças cardíacas na maioria dos países ocidentais com semelhantes hábitos de vida (Renaud, 1992; Rimm et al., 1991).

Produtos fitoquímicos isolados de variadas plantas medicinais provêm agentes valiosos que suprimem a expressão de iNOS, enzimas que são conseqüentemente úteis para a prevenção de variadas doenças. O NO produzido em grandes quantidades pela iNOS, e seus derivados, tais como peroxinitrito e dióxido de nitrogênio têm um importante papel na inflamação e possivelmente em outros processos patológicos (Barreiro et al., 2003).

Muitos polifenóis derivados de plantas exibem forte potencial antioxidante, estabelecido em diferentes modelos experimentais (Bors et al., 2002). Recentes trabalhos (Giovannelli et al., 2000) mostram que polifenóis dietéticos podem modular *in vivo* o estresse oxidativo do trato gastrointestinal de roedores, suportando a hipótese que eles podem ter tanto ação protetora como um potencial terapêutico em patologias relacionadas com estresse oxidativo. Além do que, suco de romã, rico em polifenóis, administrado em ratos com aterosclerose avançada reduziu sua ativação macrofágica do estresse oxidativo e fluxo de colesterol e assim atenuou o desenvolvimento de aterosclerose. (Kaplan et al., 2001).

Taninos ocorrem naturalmente como polifenóis em plantas, os quais estão associados com proteína e outros polímeros formando complexos estáveis. Vários grupos de hidroxilas

fenólicas localizados na superfície da molécula de tanino podem participar nas propriedades e atividades biológicas dos taninos. As diferentes atividades biológicas dos taninos são devidas à diferentes estruturas químicas. Diferentes proteínas têm diferentes afinidades por taninos, o que pode refletir funções fisiológicas. A ligação de taninos com proteínas participa na atividade antidiarreica protegendo os órgãos do ataque digestivo prejudicial. Ele também participa nos efeitos anti-hemorragicos de drogas ricas em taninos. E a inibição da autooxidação de substâncias co-existentes com os taninos é considerada como sendo devido a estruturas polifenolicas que podem produzir radicais livres estáveis (Giovannelli et al., 2000).

Taninos de *Terminalia catappa*, mostram uma grande habilidade para prevenir peroxidação lipídica e formação de superóxido, indicando uma atividade de antioxidante forte. Outros autores (Bhattacharya et al., 2002) mostraram que os taninos de frutas de *Officinalis de emblica*, exibiram atividade antioxidante in vivo e in vitro. Estes resultados demonstram o efeito antioxidante das frutas desta planta contra estresse oxidativo gerado pela isquemia de reperfusão em coração de rato, apontando para uma ação cardioprotetora. O efeito protetor dos taninos contra o estresse oxidativo neuronal e apoptose foram relatados por (Wei e cols, 2002). Estes autores sugerem que galotanino de *Pistacia weinmannifolia* pode ser usada como um efetivo antioxidante natural para a prevenção e cura de doenças neurodegenerativas associadas com a produção de peroxonitrito e espécie reativas de oxigênio.

Outras propriedades de taninos foram demonstradas por (Gyamfi e cols, 2002) por um *ellagitannin* de *Thonningia sanguinea*, o qual envolve radicais que “limpam”, a formação de anti-superóxidos e quelantes de metal. Além disso, taninos são considerados antioxidantes superiores como sua oxidação definitiva podendo conduzir para oligomerização por junções fenólicas e amplificação do número de reações locais, uma reação que não é observado com flavonoides por eles mesmos. (Bors e cols, 2002).

A FT isoladamente promoveu, na maior concentração (100 µg/ml), um aumento da viabilidade celular em relação ao controle. Este efeito pode ser justificado pela morte natural das células nas culturas primárias neuronais, com o decorrer do tempo de cultivo.

Como o tanino é um composto antioxidante, esta morte natural pode ter sido retardada pela bloqueio nas espécies reativas de oxigênio formadas durante o processo de “envelhecimento da célula”. Quando em associação com a 6-OHDA a FT nas concentrações de 1, 10 e 100 µg/ml preveniu significativamente a toxicidade induzida pela OHDA no modelo de neuroprevenção. Já no modelo de neuroresgate, somente a concentração de 100 µg/ml mostrou atividade citoprotetora mantendo a viabilidade celular a níveis próximos do controle. Estes dados sugerem que a FT apresenta uma melhor atividade neuropreventiva em relação à prevenção da DP se comparada com a doença já estabelecida. A ação dos taninos pode ser explicada em relação a sua estrutura. No anel B a eficácia da proteção é influenciada somente por grupos hidroxila no C3 e C4 (juntos eles formam uma estrutura orto-diidroxil catecol) (Bors et al., 1990).

Em relação à peroxidação lipídica, a FT conseguiu reverter o aumento dos níveis de TBARS produzidos pela 6-OHDA tanto no modelo de neuroprevenção quanto no modelo de neuroresgate, no entanto, no modelo de neuroresgate, observamos uma diminuição do efeito antioxidante com o aumento da dose, o que está de acordo com vários trabalhos que têm também demonstrado que polifenóis incluindo taninos mostram uma ação do tipo bifásica, apresentando atividade antioxidante bem como pró-oxidante de uma maneira dose dependente (Dufour et al., 2002). No presente trabalho, nós mostramos tanto um efeito oxidante, um aumento na peroxidação lipídica quando usado isoladamente e uma atividade antioxidante quando associado com a 6-OHDA. Efeitos semelhantes foram apresentados por taninos isolados de *Terminalia catappa*. (Lin et al., 2001) os quais mostraram atividade anti-hepatotóxica em baixas doses, mas com doses maiores geração de hepatotoxicidade. Estes resultados sugerem que até mesmo se estas combinações têm atividade antioxidante em doses menores, tratamentos com doses maiores vão possivelmente induzir toxicidade de células.

A estrutura catecol é sabidamente relacionada com propriedades varredoras de radicais (Bors et al., 1990; Raice-Evans et al., 1996). Acredita-se que estrutura química destas catequinas influencia sua constante de difusão em membranas celulares, dissociação e ação antioxidante. Estudos sugerem que os sítios ativos de polifenóis reativos presentes no chá verde, uma fonte de catequinas, interagem com radicais livres devido a presença de

grupamentos hidroxila no anel C (Guo et al.,1996). Grupamentos hidroxila em outras posições do anel B não tem este efeito. Também, estes grupamentos hidroxila podem estar relacionados com a atividade inibidora de lipoxigenase, visto que análogos de flavonóides (Chalconas) apresentam ação inibidora da 5-lipoxigenase quando grupamentos hidroxila estão presentes em posições comparáveis (Sogawa et al.,1993). No nosso estudo, a catequina em associação com a 6-OHDA na concentração de 100 µg/ml reverteu significativamente a toxicidade induzida pela 6- OHDA tanto no modelo de neuroprevenção como de neuroresgate. Esta ação pode ser explicada pelo fato de as catequinas atuarem reconhecidamente como agentes antioxidantes, e queladores de ferro, diminuindo assim o estresse oxidativo e a conseqüente morte celular (Sogawa et al.,1993).

Em relação a peroxidação lipídica, a catequina levou a uma diminuição da produção de TBARS, um produto de peroxidação lipídica nas células mesencefálicas expostas a 6-OHDA, o que está de acordo com o trabalho de Nie e cols. (2002) que demonstraram este efeito em cultura de células PC12. Como já explicado, a 6-OHDA causa neurotoxicidade por alterar o ciclo redox, levando a um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüente lesão oxidativa. Reforçando nossos resultados, estudos prévios demonstraram que culturas de células PC12 e neuroblastoma mostraram efeitos preventivos das catequinas contra a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA, a exposição por 24 h de culturas de células mesencefálico a 6-OHDA (200 µM) produziu proeminente morte neuronal (apoptose) como observado pelo ensaio do MTT, o qual está baseado na respiração mitocondrial (Nanjo et al., 1996).

Estes resultados podem ser explicados pelo fato de os flavonoides apresentarem ação antioxidante e queladora de metal, diminuindo assim a peroxidação lipídica e a conseqüente formação de TBARS (Bravo, 1998; Middleton et al., 2000).

O método de Griess é satisfatório para a indicar a formação de nitrito e pode ser relacionado com a produção de NO. Assim, é possível relacionar com os níveis de nitrito e nitrato nas amostras com os níveis de NO produzidos. Enquanto a produção endógena em níveis satisfatórios de NO pode ser benéfica para o organismo (Barreiro et al., 2003), sua produção excessiva foi implicada na patogenia de muitas doenças envolvendo sistema

cardiovascular, imune e sistema nervoso. O aumentado de radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO) tem sido relacionados com a progressão de doenças neurodegenerativas tais como a DP (Barreiro et al., 2003).

Contrariamente aos resultados observados com os ensaios de MTT e TBRAS, a FT e a catequina, tanto no modelo de neuroprevenção como no de neuroresgate, não mostraram efeitos na formação de nitrito, indicando que seus efeitos provavelmente não envolvem o sistema NO. Diferente do nosso trabalho, Coulston e cols (2001) demonstraram que muitos flavonóides, incluindo a quercetina levaram a uma redução na injúria no modelo de isquemia de reperfusão, por interferirem com a atividade da NO sintase indutível. Em contra partida, trabalhos anteriores mostraram inibição da produção de óxido nítrico por certos tipos de catequinas, como galocatequinas (Chan et al., 1997) mostram reduzir os níveis de nitrito.

Nenhuma estratégia de cura para DP está disponível e as terapias tradicional, tais como levodopa e deprenil, só provêem alívio característico em neurônios já afetados pela doença (Leenders, 2002), no entanto a busca por terapias alternativas continua. Um número de plantas medicinais indianas têm sido utilizadas por milhares de anos no sistema tradicional de medicamentos. Parte destas são usadas para o tratamento de doenças neurodegenerativas tais como Parkinson, Alzheimer, perda de memória, degeneração de nervos e outras desordens neuronais. Embora a etiologia das doenças neurodegenerativas permaneça enigmática, existem evidências que indicam que um metabolismo energético defeituoso, excitotoxicidade e dano oxidativo podem ser fatores críticos (Auddy et al., 2003)

Se a neuroproteção pela FT e catequina forem confirmadas em pacientes com DP, o tanino obtido da *M. urundeuva* e o chá verde com catequinas poderão ter um importante significado clínico como drogas complementares não somente para terapia da doença de Parkinson, como também para outros tipos de desordens neurodegenerativas. Devido ao fato de serem bem tolerados em humanos, e de acordo com os dados obtidos no presente trabalho, compostos obtidos de plantas medicinais surgem como fortes candidatos como agentes neuroprotetores na DP.

Em estudos futuros pretendemos determinar o percentual de células dopaminérgicas e gliais em nossa cultura de células mesencefálicas de rato através da técnica de imunohistoquímica para a tirosina hidroxilase e GFAP. Pretenderemos também avaliar a ação da FT e catequina sobre os níveis de enzimas antioxidantes como a Catalase e Superóxido desmutase (SOD) em nossa cultura de células mesencefálicas de rato e também avaliar a apoptose gerada pela presença de MPTP em células mesencefálicas através da determinação da atividade da caspase -3 e efeitos dos composto isolados da FT e catequina.

## 6. CONCLUSÕES

A 6-OHDA (200  $\mu$ M) causou morte neuronal em culturas de células mesencefálicas de rato, aumentou as concentrações de nitrito e elevou a peroxidação lipídica em culturas de células mesencefálicas de rato;

A catequina e FT isolada da *M. urundeuva* protegeram as células da neurotoxicidade gerada pela 6-OHDA;

A catequina e FT isolada da *M. urundeuva* inibiram a peroxidação lipídica e não alteraram o nitrito;

O mecanismo de ação da FT e catequina parece estar relacionado com proteção mitocondrial e atividade antioxidante, no entanto sem interferir no sistema NO.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAHI, A.L.; AGHO, M.O.; AMOS, S.; GAMANIEL, K.S.; WAMBEBE, C.: Antidiarrhoeal activity of the aqueous extract of *Terminalia avicennoides* roots. **Phytother. Res**, v.15:p 431-434, 2001.
- ABELIOVICH, A.; SCHMITZ, Y.; FARIÑAS, I.; Mice lacking  $\alpha$ -synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. **Neuron**. v. 25: p.239–252, 2000.
- ACUNA-CASTROVIEJO, D.; COTO-MONTES, A.; MONTI, M.G.; ORTIZ, G.G.; REITER, R.J. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. **Life Sci.**, v. 60, p. 23-29, 1997 .
- AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K.: Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **J Antimicrob Chemother**, v.48: p.487-491, 2001.
- ALONSO, M.E.; OTERO, E.; D'REGULES, R.; FIGUEROA, H.H. Parkinson's disease: a genetic study. **Can J Neurol Sci**. v. 13: p.248–251, 1986.
- AMOS, S.; ADZU, B.; BINDA, L.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K.: Neuropharmacological effect of the aqueous extract of *Sphaeranthus senegalensis* in mice. **J Ethnopharmacol**, v.78: p.33-37, 2001.
- ANGLADE, P.; VYAS, S.; JOVOY-AGID, F. Apoptosis and autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. **Histol Histopathol**.v. 12: p.25–31, 1997.  
**Archives of Biochemistry and Biophysics**, V. 397, p. 84–90, 2002.
- ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutat Res**. v. 20, p. 523-524, 2003.

AUDDY, B.; FERREIRA, M.; BLASINA, F.; LAFON, L.; ARREDONDO, F.; DAJAS, F.; TRIPATHI, P.C.; SEAL, T.; MUKHERJEE, B. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. **J Ethnopharmacol.** v. 84(2-3), p. 131-8, 2003.

BANDEIRA, M.A.M. *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-Sertão) Constituintes químicos da planta em desenvolvimento e adulta. Universidade Federal do Ceará. Departamento de química Orgânica e Inorgânica. p174, 2002.

BANDEIRA, M.A.M.; MATOS, F.J.A.; BRAZ-FILHO, R. New chalconoid dimmers from *Myracrodruon urundeuva*. **Natural Product Letters**, v.4(2), p.113-120, 1994.

BARBOSA, E.R.; LIMONGI, J.C.P.; CUMMINGS, J.L.: Parkinson's disease, **Psychiatr Clin North Am** v.20(4): p.769-790, 1997.

BARLOW-WALDEN, L.R.; REITER, R.J. and ABE, M. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochem. Int.**, v. 26, p. 497-510, 1995.

BARREIRO, E.; GEA, J.; COROMINAS, J.M.; HUSSAIN, S.N., Nitric oxide synthases and protein oxidation in the quadriceps femoris of COPD patients. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 2003.

BARRIENTOS, A.; MORAES, C.T. Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. **J Biol Chem** v. 274: p.16188–16197, 1999.

BEAL, M.F. Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. **Ann Neurol. Suppl** v.53, p. 39-47, 2003

BEN-SHACHAR, D.; ESHEL, G.; FINBERG, J.P.; YODIM, M.B.: The iron chelator desferrioxamine (Desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons. **J Neurochem** Apr; v.56(4):p.1441-4, 1991.

BEN-SHACHAR, D.; YODIM MB.: Intranigral iron injection induces behavioral and biochemical "parkinsonism" in rats, **J Neurochem** Dec; v.57(6):p.2133-5, 1991.

BENVENISTE, E.N. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. **Am J Physiol**; v.263: p.1–16. 1992

BEYER, C.E.; STEKETEE, J.D. and SAPHIER, D. Antioxidant properties of melatonin – an emerging mystery. **Biochemical Pharmacology**, v.56, p. 1265-1272, 1998.

BONIFATI, V.; FABRIZIO, E.; VANACORE, N.; D.E. MARI, M.; MECO, G. Familial Parkinson's disease: a clinical genetic analysis. **Can J Neurol Sci**; v.22: p.272–279. 1995

BORS, W., AND MICHEL, C.: Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. **Ann N Y Acad Sci**, v.957:p.57-69, 2002.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C.; SARAN, M., Flavonoids as anti-oxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods Enzymol.**, V. 186, p. 343-355, 1990.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v.56, p. 317-333, 1998.

BROUILLARD, R., CHEMINAT, A. Flavonoids and plant color. **Prog Clin Biol Res.** v. 280, p. 93-106, 1988.

BROWN, J.M.; YAMAMOTO, B.K. Effects of amphetamines on mitochondrial function: role of free radicals and oxidative stress. **Pharmacol Ther.** v. 99(1), p. 45-53, 2003.

BUDD, G., T.; WBESTER, K., D.; LIVINGSTON, K., B. Treatment of advanced cancer with cisplatin, actriamycin, and cyclophosphamide effect of treatment and incidence of intracranial metastases. **J. Súr. Oncol.**, v.24, n.3, p. 192-195, 1983.

BUTTERFIELD, P.G.; VALANIS, B.G.; SPENCER, P.S. Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease. **Neurology**; v.43: p.1150-1158, 1943.

CADET, J.L.; KATZ, M.; JACKSON-LEWIS, V.; FAHN, S.: Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. **Department of Pharmacology, Bruce Rappaport Faculty of Medicine, Haifa, Israel**. *Brain Res* Jan 2; v.476(1) :p.10-5, 1989.

CARRASCO, E.; WERNER P. Selective destruction of dopaminergic neurons by low concentrations of 6-OHDA and MPP(+): protection by acetylsalicylic acid aspirin. **Parkinsonism Relat Disord** v.8, p. 407-411, 2002.

CARVEY, P.M.; MCGUIRE, S.O.; LING, Z.D.; Neuroprotective effects of D3 dopamine receptor agonists. **Parkinsonism Relat Disord**. v. 7,p. 213-223, 2001

CEBALLOS, I.; LAFON, M.; JAVOY-AGID, F., E.T. A.L. Superior dismutase and Parkinson's disease. **Lancet**; v.335: p.1035-1036, 1990.

CHAN, M.M.; FONG, D.; HO, C.T.; HUANG, H.I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. **Biochem. Pharmacol** v.54, p.1281-1286, 1997.

CHAN, P.; CHENG, J.T.; TSAI, J.C.; LIEN, G.S.; CHEN, F.C.; KAO, P.F.; LIU, J.C.; HSIEH, M.H. Effect of catechin on the activity and gene expression of superoxide dismutase in cultured rat brain astrocytes. **Neurosci. Lett** v.328, p.281-284, 2002.

CHANDLER, B.V.; KEFFORD, J.F. Chemical assay of limonin, the bitter principle of oranges. **J Sci Food Agric**. V. 17(5), p.193-7, 1966.

CHEN, T.Y. and TANG, P.L. Characterization of the antioxidant effects of melatonin and related indoleamines in vitro. **J. Pineal Res.**, v. 20, p. 187-191, 1995.

CHEN, Y.; YANG, L.; LEE, T.J.: Oroxyllin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. **Biochem Pharmacol**, v.59:p.1445-1457, 2000.

CHENG, H.Y.; LIN, C.C.; LIN, T.C.: Antiherpes simplex virus type 2 activity of casuarinin from the bark of *Terminalia arjuna* Linn. **Antiviral Res**, v.55: p.447-455, 2002.

CHOI, D.W.; MAULUCCI-GEDDE, M.; KRIEGSTEIN, A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J Neurosci** v.7(2).p.357-368, 1987.

CHOI, D.W.; MAULUCCI-GEDDE, M.; KRIEGSTEIN, A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J Neurosci** Feb;v.7(2):p.357-68, 1987.

CHOI, DW.; MAULUCCI-GEDDE, M.A.; KREIGSTEIN, A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J. Neurosci** v.7, p. 357-368, 1987.

CIVELLI, O.; BUNZOW, J. R.; GRANDY, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 281-307, 1993.

CLARK, M.A. Natural Products as a Resource for New Drugs. **Pharmaceutical Research**.v. 13, n. 8, 1996.

COHEN, G.; HEIKKILA, R. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxy radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. **J. Biol. Chem** v.249, p.2447-2452, 1974.

CONN, M.P. Neuroscience in Medicine. Philadelphia: **J.B. Lippincott Company**. 1994.

CONWAY, K.A.; HARPER, J.D.; LANSBURY, P.T. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early onset Parkinson's disease. **Nature Med**; v.4: p.1318-1320, 1998.

COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; AND ROTH, R.H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, 6th ed. New York: Oxford University Press, 1991.

COSTA, A.F. *Farmacognosia*. 5.ed. Lisboa; Fundação calouste gulbenkian, v.1, 1999.

CUNHA, G.M.A.; FONTENELE, J.B.; NOBRE-JUNIOR, H.V.; SILVEIRA, E.R.; NOGUEIRA, N.A.P.; MORAES, M.O.; VIANA, G.S.B.; COSTA-LOFUTO, L.V.: Cytotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) **Kunth (sent to Phytotherapy Research)**, 2001.

DANIELS, W.M.W.; REITER, R.J. and MELCHIORRI, D. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6-phosphatase. **J. Pineal Res.**, v. 19, p. 1-09, 1995.

DE KEYSER, J. Subtypes and localization of dopamine receptors in human brain. **Neurochem. Int.**, v. 22, p 83-93, 1993.

DEL RIO, M.J.; VELEZ-PARDO, C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF-kappaB), p53, c-Jun transcription factors. **Biochem. Pharmacol** v.63, p.677-688, 2002.

DEMICHELE, G.; FILLA, A.; VOLPE, G.; ET AL. Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case control study in southern Italy. **Mov Disord**; v.11: p.17-23, 1996.

DEMIRYUREK, A.T.; CAKICI, I. and KANZIK, I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. **Parmacol. Toxicol.**, v. 82, n. 3, p. 113-117, 1998.

DEXTER, D.; CARTER, C.; AGID, F.; ET AL. A.L. Lipid peroxidation as cause of nigral death in Parkinson's disease. **Lancet**; v.2: p.639-640, 1986.

DEXTER, D.T.; CARAYON, A.; VIDAILHET, M.; E.T. A.L. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. **J Neurochem**; v.55: p.16–20,1990.

DEXTER, D.T.; WELLS, F.R.; AGID, F.; E.T. A.L. Increased nigral iron content in post-mortem parkinsonian brain. **Lancet**; v.2: p.1219–1220, 1987.

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

DRAPER, H.H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol** v.186, p.421-431, 1990.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M.: Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, **Methods Enzymol**;v.186:p.421-31, 1990.

DUFOUR, C.D.A.; SILVA, E.; POTIER, P.; QUENEAU, Y.; DANGLES, O.; GALLIC: Esters of sucrose as efficient radical scavengers in lipid peroxidation. **J Agric Food Chem**, v.50:p.3425-3430, 2002.

DUVOISIN, R.C.; GEARING, I.R.; SCHWEITZER, M.R.; YAHR, M.D. A family study of parkinsonism. In: Barbeau A, Brunette JR, eds. Progress in Neurogenetics. Amsterdam: **Excerpta Medica Foundation**,: p.492–496. 1969

EBADI, M.; GOVITRAPONG, P.; SHARMA, S.; MURALIKRISHNAN, D.; SHAVALI, S.; PELLETT, L.; SCHAFER, R.; ALBANO, C.; EKEN, J. Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of Parkinson's disease. **Biol Signals Recept** v.10, p. 224-253, 2001.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P. and O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v. 19, n. 4/5, p. 221-357, 1998.

ELEGAMI, A.A.; EL-NIMA, E.I.; TOHAMI, M.S.; MUDDATHIR, A.K.: Antimicrobial activity of some species of the family Combretaceae. *Phytother Res*, v.16:p.555-561, 2002.

ELSTNER, E.F.; HEUPEL, A.: Inhibition of nitrite formation from hydroxylammoniumchloride: a simple assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem* v.70(2): p.616-20, 1976.

EL-SUBBAGH, H.I.; ABU-ZAID, S.M.; MAHRAN, M.A.; BRADIA, F.A.; AL-OBAID, A.M.: Synthesis and biological evaluation of certain alpha, beta-unsaturated ketones and their corresponding fused pyridines as antiviral and cytotoxic agents. *J. Med Chem* v.43:p.2915-2921, 2000.

FAHN, S. AND COHEN, G. The oxidative stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.*, v. 32, p. 804-812, 1992.

FAHN, S.; COHEN, G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease. Evidence supporting it. *Ann. Neurol* v.32, p.804-812, 1992.

FARNSWORTH, N.R. Medicinal Plants In Therapy. *Bulletin of the WHO* v.63(6): p.965-81, 1985.

FERREIRA, A.L.A.; and MATSUBARA, L.S. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Brasil*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FORLONI, G.; BERTANI, H.; CALELLA, A.M.; THALER, F.; INVERNIZZI, R.  $\alpha$ -synuclein and Parkinson's disease: selective neurodegenerative effect of  $\alpha$ -synuclein fragment on dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *Ann Neurol*; v.47: p.632-640, 2000.



GASSEN, M.; GROSS, A.; YOUUDIM, M.B. Apomorphine enantiomers protect cultured pheochromocytoma (PC12) cells from oxidative stress induced by H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> and 6-hydroxydopamine. **Mov Disord**; v.13: p.661–667, 1998.

GASSER, T. Genetics of Parkinson's disease. **Ann Neurol**; 44 (suppl 1): p.53–57, 1998.

GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN, B. A.; TEW, K. D. and TAPIERO, H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of oxidants. **Biomed & Pharmacother.**, v. 53, p. 169-180, 1999.

GERLACH, M.; RIEDERER, P.: Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man, **J Neural Transm** v.103(8-9): p.987-1041, 1996.

GERLACH, M.; RIEDERER, P: Animal models of Parkinson's disease: na empirical comparison with the phenomenology of the disease in man, **J Neural Transm** v.103(8-9): p.987-1041, 1996.

GIASSON, B.I.; DUDA, J.E.; MURRA, I.V.J.; E.T. A.L. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective  $\alpha$ -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. **Science**; v.290: p.985–989, 2000.

GIASSON, B.I.; DUDA, J.E.; MURRAY, I.V.J.; E.T. A.L. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective  $\alpha$ -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. **Science**; v.290: p.985–989, 2000.

GIBB, W.R.: Neuropathology in movement disorders, **J Neurol Neurosurg Psychiatry** Jun;Suppl:p 55-67,1989

GIOVANNELLI, L.; TESTA, G.; D.E. FILIPPO, C.; CHEYNIER, V.; CLIFFORD, M.N.; DOLARA, P.: Effect of complex polyphenols and tannins from red wine on DNA oxidative damage of rat colon mucosa in vivo. **Eur J Nutr**, v.39:p.207-212, 2000.

GLINKA , Y.; YOUDIN, M.B.H.: Inhibition of mitochondrial complexes I and IV by 6-hydroxydopamine. **Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol** v.292: p.329-332, 1995.

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YOUDIM, M.B.: Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity, **J Neural Transm Suppl** v.50: p.55-66, 1997.

GLINKA, Y.; GASSEN, M.; YOUDIN, M.B.H.: Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **J Neural Transm**, v.50:p.55-66, 1997.

GLINKA, Y.; TIPTON, K.F.; YOUDIM, M.B: Nature of inhibition of mitochondrial respiratory complex I by 6-Hydroxydopamine. **J Neurochem** May; v.66(5): p.2004-10, 1996.

GLINKA, Y.Y.; YOUDIM, M.B. Inhibition of mitochondrial complexes 1 and IV by 6-hydroxydopamine. **Eur. J. Pharmacol** v.292,p. 329-332, 1995.

GOTOH, T.; AND SHIKAMA, K. Generation of the superoxide radical during the autoxidation of oxymyoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 80, p. 397-399, 1976.

GOTZ, M.D.; FREYBERG, A. AND RIEDERER, P. Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J. Neural. Transm.**, v. 29, p. 241-249, 1990.

GOWERS, W.R. A Manual of Diseases of the Nervous System. 2nd ed. Philadelphia: **Blakiston**, 1903.

GRACE, A.A. Cortical regulation of subcortical dopamine system and its possible relevance to schizophrenia. **J. Neural. Transm.**, v.91, p. 111-134, 1993.

GREEN, L.C. TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P.: Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science** 212:56-58, 1981.

GUANGJUN, N.; CHAOFANG, J.; YUANLIN, C.; SHENGRONG, S.; AND BAOLU, Z. Distinct Effects of Tea Catechins on 6-Hydroxydopamine-Induced Apoptosis in PC12 Cells

GYAMFI, M.A.; ANIYA, Y.: Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the african medicinal herb, *Thonningia sanguinea*. **Biochem Pharmacol**, v.63: p.1725-1737, 2002.

HADERLAND, R.; REITER, R.J.; POEGGELER, B.; T.A.N. D.X. The Significance of the Metabolism of the Neurohormone Melatonin: Antioxidative Protection and Formation of Bioactive Substances. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** v.17:p.347-357, 1993.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 246, p. 501-514, 1986.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J.M.C. The antioxidants of human extra cellular fluids. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 280, p. 1-8, 1990.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; HOULT, J.R. and BLACKIE, D.R. Oxidants, inflammation and antiinflammatory drugs. **FASEB J.**, v. 2, p. 2867-2873, 1988.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry** 55:481-504, 2000.

HARBORNE, J.B. Flavonoids in the environment: structure-activity relationships.

HARBORNE, J.B., Nature, distribution and function of plant flavonoids. **Prog Clin Biol Res.**, v. 213, p.15-24, 1986

HASHIMOTO, M. H.S.U. L.J., X.I.A. Y., ET AL. Oxidative stress induces amyloid-like aggregate formation of NACP-alpha-synuclein in vitro. **Neuroreport**; v.106: p.717-721, 1999.

HATTORI, N.; KITADA, T.; MATSUMINE, H.; ET AL. Molecular genetic analysis of a novel parkin gene in Japanese families with autosomal recessive juvenile parkinsonism: evidence for variable homozygous deletions in the parkin gene in affected individuals. **Ann Neurol**; v44: p.935-941, 1998.

HAYASHI, A.; GILLEN, A.C.; LOTT, J.R. Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified citrus pectin. **Altern Med Rev** v.5:p.546-552, 2000.

HE, Y., LEE, T.; LEONG, S.K.. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of dopaminergic in the rat substantia nigra. **Brain. Res** v.858, p. 163-166, 2000.

HERENCIA, F.; FERRANDIZ, M.L.; UBEDA, A.; GUILLEN, I.; DOMINGUEZ, J.N.; CHARRIS, J.E.; LOBO, G.M.; ALACARAZ, M.J. 4-dimethylamino-3',4'-dimethoxychalcone downregulates iNOS expression and exerts anti-inflammatory effects. **Free Radic Biol Med** v.30:p.43-50, 2001.

HERTOG, M.G.; FESKENS, E.J.; HOLLMAN, P.C., et al: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. **Lancet** v.342:p.1007-1011, 1993.

HIRSCH, E.C.; BRANDEL, J.P.; GALLE, P.; ET AL. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an x-ray microanalysis. **J Neurochem**; v.56: p.446-451,1991.

HIRSCH, E.C.; GRAYBIEL, A.M.; AGID, Y. Selective vulnerability of pigmented dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Acta Neurol Scand**; v.26 (suppl 1): p.19-22. 1989.

HIRSCH, E.C.; HUNOT, S.; DAMIER, P.; FAUCHEUX, B. Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration **Ann Neurol**; v.44 (suppl 1): p.115-120,1998.

HO, K.Y.; TSAI, C.C.; HUANG, J.S.; CHEN, C.P.; LIN, T.C.; LIN, C.C.: Antimicrobial activity of tannin components from *Vaccinium vitis-idaea* L. **J Pharm Pharmacol**, v.53:p.187-191, 2001.

HOPKINS, S.J.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. **Trends Neurosci**; v.18: p.83-88, 1995.

HSIEH, H.K.; TSAO, L.T.; WANG, J.P.; LIN, C.N.: Synthesis and anti-inflammatory effects of chalcones. **J Pharm Pharmacol** v.52:p.163-171, 2000.

HSU, L.J.; SAGARA, Y.; ARROYO, A.; ET AL.  $\alpha$ -synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. **Am J Pathol**; v.157: p.401-410, 2000.

ICHITANI, Y.; OKAMURA, H.; MATSUMOTO, Y.; NAGATSU, I. AND IBATA Y. Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. **Brain Research**, v. 549, p. 350-353, 1991.

JAKOBY, W.B. AND ZIEGLER, D.M. The enzymes of detoxication. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 34, p.20715-20718, 1990.

JELLINGER, K.; KIENZL, E.; RUMPELMAIR, G.; ET AL. Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. **J Neurochem**; v.59: p.1168–1171,1992.

JELLINGER, K.; LINERT, L.; KIENZL, E.; HERLINGER, E.; YODIM, M.B.: Chemical evidence for 6-hydroxydopamine to be an endogenous toxic factor in the pathogenesis of Parkinson's disease, **J Neural Transm Suppl** v.46: p.297-314, 1995.

JELLINGER, K.; PAULUS, W.; GRUNDKE-IQBAL, I.; ET AL. Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an x-ray microanalysis. **J Neural Transm**; v.2: p.327–340, 1990.

JENNER, P. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. **Acta Neurol Scand**; v.84: p.6–15,1991.

JENNER, P.; OLANOW, C.W.: Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease, **Neurology** v.47(6): p.161-170, 1996.

JONES, B.E.; BOYLAND, C.B.; FRITSCHKE, M.; JUHASZ, M.; JACKSON, C.; WIEGAND, S.J.; HYMAN, C.; LINDSAY, R.M.; ALTAR, C.A.: A continuous striatal infusion of 6-hydroxydopamine produces a terminal axotomy and delayed behavioral effects, **Brain Res** v.709(2): p.275-284, 1996.

K.O, L.; MEHTA, N.D.; FARRER, M.; ET AL. Sensitization of neuronal cells to oxidative stress with mutated human  $\alpha$ -synuclein. **J Neurochem**; v.75: p.2546–2554, 2000.

KANDA, S.; BISHOP, J.F.; EGLITIS, M.A.; YANG, Y.; MOURADIAN, M.M. Enhanced vulnerability to oxidative stress by alpha-synuclein mutations and C-terminal truncation. **Neuroscience**; v.97:p. 279–284, 2000.

KAPLAN, M.; HAYEK, T.; RAZ, A.; COLEMAN, R.; DORNFELD, L.; VAYA, J.; AVIRAM, M.: Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. **J Nutr**, v. 131:p.2082-2089, 2001.

KAPU, S.D.; NGWAI, Y.B.; KAYODE, O.; AKAH, P.A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K.: Anti-inflammatory, analgesic and anti-lymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. **J Ethnopharmacol**, v.78: p.7-13, 2001.

KEHRER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993.

KIDD, P.M. Parkinson's disease as multifactorial oxidative neurodegeneration: implications for integrative management. **Altern Med Rev** v.5, p. 502-529, 2000.

KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O.; FERREIRA, D.; KOLODZIEJ, H.: Tannins and related compounds: killing of amastigotes of *Leishmania donovani* and release of nitric oxide and tumour necrosis factor alpha in macrophages in vitro. **Z Naturforsch**, v.56: p.444-454, 2001.

KIM, Y.S.; JOO, W.S.; JIN, B.K.; CHO, Y.H.; BAIK, H.H. AND PARK, C.W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport** , v. 9, p. 2387-2390, 1998.

KISH, S.J.; MORITO, C.; HORNYKIEWICZ, O. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**; v.58: p.343-346, 1985

KITADA, T.; ASAKAWA, S.; HATTORI, N.; E.T. A.L. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature**; v.392: p.605-608, 1998.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **BMJ** v. 312:p.478-481, 1996.

- KNOLL, J. The pharmacology of (-)deprenyl **J Neural Transm Suppl**; v.22: p.75-89, 1986.
- LABANDEIRA-GARCIA, J.L.; ROZAS, G.; LOPEZ-MARTIN, E.; LISTE, I. AND GUERRA, M.J. Time course of striatal changes induced by 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway, as studied by combined evaluation of rotational behaviour and striatal Fos expression. **Exp.Brain Res.**, v. 108, p. 69-84, 1996.
- LAWRENCE, N.J.; MCGROWN, A.T.; DUCKI, S.; HADFIELD, J.A. The interactions of chalcones with tubulin. **Anticancer Drug Des** v.15:p.135-141, 2000.
- LAZZARINI, A.M.; MYERS, R.H.; ZIMMERMAN, T.R.J.R.; A clinical genetic study of Parkinson's disease: evidence for dominant transmission. **Neurology**. v. 44: p.499-506, 1994.
- LEAL, L.K.; FERREIRA, A.A.; BEZERRA, G.A.; MATOS, F.J.; VIANA, G.S. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J Ethnopharmacol** May; v.70(2): p.151-9, 2000.
- LEAL, L.K.A.M.; FERREIRA, A.A.G.; BEZERRA, G.A.; MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70(2), p.151-159, 2000.
- LEAL, L.K.A.M.; FERREIRA, F.V.; MATOS, F.J.; RIBEIRO, R.A.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive and antiedematogenic effects of hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4(3):p.221-227, 1997.
- LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E.; COTELLE, N.: Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **Free Radic Biol Med** v.29:p.900-912, 2000.



LEENDERS, K.L. Disease process and drug treatments in Parkinson's disease. **Eur. Neuropsychopharmacol** v.12, p.575-580, 2002.

LEVITES, Y.; YODIM, M.B.H.; MAOR, G.; MANDEL, S. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. **Biochem. Pharmacol** v.63, p.21-29, 2002.

LIN, C.C.; HSU, Y.F.; LIN, T.C.: Antioxidant and free radical scavenging effects of tannins of *Terminalia catappa* L. **Anticancer Res**, v. 21(1A): p.237-243, 2001.

LIN, C.C.; HSU, Y.F.; LIN, T.C.; HSU, H.Y.: Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. **Phytother Res**, v.15:p.206-212, 2001.

LIOCHEV, S.I. and FRIDOVICH, I. The role of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in the production of OH in vitro and in vivo. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 29-33, 1994.

LUCKING, C.B.; DURR, A.; BONIFATI, V.; ET AL. Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. **N Engl J Med**; v.342:p. 1560-1567, 2000.

LUCZAJ, W.; SKRZYDLEWSKA, E. The compounds resulting from lipid peroxidation mostly react with DNA showing both genotoxic and mutagenic action; among them, 4-hydroxynonenal is the most genotoxic, while MDA is the most mutagenic DNA damage caused by lipid peroxidation products. **Cell Mol Biol Lett**. V.8(2), p. 391-413, 2003.

MANDA, K.; BHATIA, A.L., Melatonin-induced reduction in age-related accumulation of oxidative damage in mice. **Biogerontology**. V.4(3), p.133-9, 2003.

MANN, V.M.; COOPER, J.M.; DANIEL, S.E.; ET AL. Complex I, iron and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. **Ann Neurol**; v.36:p. 876-881, 1994.

MARDER, K.; TANG, M.X.; MEJIA, H.; E.T. A.L. Risk of Parkinson's disease among first-degree relatives: a community-based study. **Neurology**; v.47: p.155–160, 1996

MAROTEAUX, L.; CAMPANELLI, J.T.; SCHELLER, R.H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. **J Neurosci**; v.8: p.2804–2815, 1988.

MAROTEAUX, L.; SCHELLER, R.H. The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. **Brain Res Mol Brain Res**; v.11: p.335–343, 1991.

MARTIN, W.E.; YOUNG, W.E.; ANDERSON, V.E. Parkinson's disease. A genetic study. **Brain**; v.96: p.495–506, 1973.

MARTTILA, R.J.; LORENTZ, H.; RINNE, U.K. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. **J Neurol Sci**; v.86: p.321–331, 1988.

MARTTILA, R.J.; RINNE, U.K. Arteriosclerosis, hereditary, and some previous infections in the etiology of Parkinson's disease. A case-control study. **Clin Neurol Neurosurg**; v.79: p.46–56, 1976.

MATOS, F.J.A. Plantas Mediciniais – Guia de seleção e emprego medicinal de plantas do Nordeste, **IOCE**, Fortaleza, 1989.

MATSUMINE, H.; SAITO, M.; SHIMODO-MATSUBAYASHI, S.; E.T. A.L. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile parkinsonism to chromosome 6q25.2–27. **Am J Hum Genet**; v.60: p.588–596, 1997.

Mayo, J. C., Sainz, R. M., Uria, H., Antolin, I., Esteban, M. M.,

MCCLURE, J.W., Physiology of flavonoids in plants. **Prog Clin Biol Res.** v. 213, p. 77-85, 1986.

MCGEER, P.L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B.E.; MCGEER, E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**; v.38: p.1285–1291, 1988.

MELCHIORRI, D.; REITER, R.J.; SEWERYNEK, E.; CHEN, L.D. AND NISTICO, G. Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. **FASEB J.** v.9, p. 1205-1210, 1995.

MELCHIORRI, D.; SEWERYNEK, E.; REITER, R.J. Effect of melatonin administration on ethanol-induced gastroduodenal injury in rats in vivo. **Br J. Pharmacol.**, v. 121, p. 264-269, 1997.

MENESES, A.M.S.; RAO, V.S.N.; FONTELES, M.C. Antiinflammatory activity of *Astronium urundeuva* Engl.: possible mechanisms involved. **Brasilian Jornal Med. Bio. Re.**, v.18:p.217-224, 1985.

MENEZES A.M.S., "Atividade antiinflamatória e antiulcerogênica de *Astronium urundeuva* Engl.", **Academic Dissertation**, Federal University of Ceara, Faculty of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Fortaleza, Brazil, 1986.

MENEZES, A.M.S. Atividade antiinflamatória e antiulcerogênica de *Astronium urundeuva* Engl. Fortaleza,. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Ceará**.p. 146 1986.

MICHAEL, J.Z.; FLOYD, E.B.; STORY, C.L.; JAMES, L.R.; LARRY, R.S. Fundamental Neuroscience. 1ª edição. **Academic Press**, p.53-61, 1999.

MIDDLETON, E.JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Farmacol. Rev** v.52, p.673-751, 2000.

MIRANDA, C.L.; STEVENS, J.F.; IVANOV, V.; MCCALL, M.; FREI, B.; DEINZER, M.L.; BUHLER, D.R. Antioxidant AND prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavonones in vitro. **J Agric Food Chem** v.48:p.3976-3884, 2000.

MISRA, H.P. AND FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during autoxidation of hemoglobin. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 1, p. 188-192, 1972a.

MISRA, H.P. AND FRIDOVICH, I. The role of anion superoxide in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972b.

MONTEIRO, H.P.; WINTERBOURN, C.C. 6-Hydroxydopamine releases iron from ferritin and promotes ferritin-dependent lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol** v.38, p.4177-4182, 1989

MOREL, I.; LESCOAT, G.; CÔGREL, P.; SERGENT, O.; PASDELOUP, N.; BRISSOT, P.; CILLARD, P.; CILLARD, J. Antioxidant, and iron chelatin activities of the flavonoidscatechin, quercetin, and diosmetin on iron loaded rat hepatocyte cultures. **Biochem. Pharmacol** v.45, p.13-19, 1999.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** v.65, p.55-63, 1983.

MULLEN, W.; MCGINN, J.; LEAN, M.E.; MACLEAN, M.R.; GARDNER, P.; DUTHIE, G.G.; YOKOTA, T.; CROZIER, A.: Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. **J Agric Food Chem**, v.50:p.5191-5196, 2002.

MULLER, D.P. AND GROSS-SAMPSON, M.A. Neurochemical, neurophysiological and neuropathological studies in vitamin E deficiency. **Crit. Rev. Neurobiol.**, v. 5, p. 239-247, 1990.

MUN OZ-PATIN O, A. M., AND LABANDEIRA-GARCIA, J. L. **J. Neurochem.** v. 74, p.1605–1612, 2000.

NAKAGAWA, K.; MIYAZAWA, T. Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. **J. Nutri. Sci. Vitaminol** v.43, p.679-684, 1997.

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T.: Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food Chem Toxicol**, v.40:p.1745-1750, 2002.

NANJO, F.; GOTO, K.; SETO, R.; SUZUKI, M.; SAKAI, M.; HARA, Y. Scavenging effects of tea catechins, and their derivatives on 1,1-dephenyl-2-picrylhydrazil radical. **Free Rad. Biol & Med** v.21, p.895-902, 1996.

NIE, G.; JIN, C.; CAO, Y.; SHEN, S.; ZHAO, B. Distinct effects of tea catechins on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells. **Arch. Biochem. Biophys** v.397, p. 84-90, 2002.

NOCTOR, G.; FOYER, C.H.: Simultaneous measurement of foliar glutathione, gamma-glutamylcysteine and amino acids by high-performance liquid chromatography: comparison with two other assay methods for glutathione, **Anal Biochem** Nov 1; v.264(1):p.98-110, 1998.

OGAWA, N.; TANAKA, K.; ASANUMA, M.; Bromocriptine protects mice against 6-hydroxydopamine and scavenges hydroxyl free radical in vitro. **Brain Res**; v.657: p. 207–213, 1994.

OKOLI, C.O., AKAH PA.: A pilot evaluation of the anti-inflammatory activity of *Culcasia scandens*, a traditional antirheumatic agent. **J Altern Complement Med**, v.6: p.423-427, 2000.

OLANOW, C.W. Oxidation reactions in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 40, p. 32-37, 1990.

OLEH, H.M.D.: Biochemical aspects of Parkinson's disease, **Neurology** v.51(2):p.002-009, 1998.

OLOW, A.; FREESTONE, C.; LEWIS, R.; E.T. A.L. The effect of pergolide and MDL 72974 on rat brain CuZn superoxide dismutase. **Neurosci Lett**;v.164: p.41-43. 1993.

PAPPOLLA, M.; SAS, M. AND BICK, R.J. Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the Alzheimer's amyloid peptide. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 1683-1690, 1997.

PASTORE, A.; FEDERICI, G.; BERTINI, E.; PIEMONTE, F. GSH depletion is linked to a number of disease states including cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chim Acta**. v. 333(1-2), p. 19-39, 2003.

PAYAMI, H.; LARSEN, K.; BERNARD, S.; NUTT, J. Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients. **Ann Neurol**; v.36: p.659-661, 1994.

PERRY, T.L.; GODIN, D.V.; HANSEN, S. PARKINSON'S DISEASE: a disorder due to nigral glutathione deficiency. **Neurosci Lett**; 33: 305-310, 1982.

PONG, K., Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. **Expert Opin Biol Ther**. V. 3(1), p. 127-39, 2003.

POWERS, K.M.; SMITH-WELLER, T.; FRANKLIN, G.M.; LONGSTRETH, W.T. JR.; SWANSON, P.D.; CHECKOWAY, H. **Neurology**. V. 10;60(11), p. 1761-1766, 2003.

**Prog Clin Biol Res**. v.280: p.17-27 1988b

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; FERREIRA, M. JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D. AND TOGASAKI, D.M. Dose-dependent lesions of dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, v. 67, p. 631-647, 1995.

REITER, R.J. Cyoprotective properties of melatonin: presumed association with oxidative damage and aging. **Nutrition**, v. 14, p. 691-696, 1998.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; CABRERA, J. and DARPA, D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 467, p. 379-387, 1999.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; CABRERA, J. and DARPA, D. Melatonin and tryptophan derivatives as free radical scavengers and antioxidants. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 467, p. 379-387, 1999.

REITER, R.J.; TANG, L.; GARCIA, J.J. AND MUNOZ-HOYOS, A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sciences**, v. 60, p. 2255-2271, 1997.

RICE-EVANS, C.A. AND PACKER, L., Flavonoids in Health and Disease. **Marcel Dekker, Inc.**, New York. (1998)

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radic. Biol. Med.** 1996, v. 20, p. 933-956.

RIEDERER, P.; SOFIC, E.; RAUSCH, W.D.; ET AL. Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brains. **J Neurochem**; 52: 515-520, 1989.

SACHS, C.; JONSSON, G.: Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. **Biochem Pharmacol** Jan 1; v.24(1): p.1-8,1975.

SAGGU, H.; COOKSEY, J.; DEXTER, D. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in Parkinson's substantia nigra. **J Neurochem**; 53: 692–697, 1989.

SANCHEZ-RAMOS, J.; ÖVERVIK, E.; AMES, B.N. A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2 $\alpha$ -deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinson's disease brain. **Neurodegeneration**; v.3: p.197–204.1994.

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

SCHAPIRA, A.H.V. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. **Biochim Biophys Acta**; 1410: 159–170, 1999.

SCHAPIRA, A.H.V. Science, medicine, and the future: Parkinson's disease. **BMJ**; v.318: p. 311–314, 1999.

SCOTT, M.D.; LUBIN, B.H.; ZUO, L. and KUYPERS, F.A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: prominent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v.118, p. 7-16, 1991.

SELWAY, J.W., Antiviral activity of flavones and flavans, **Prog Clin Biol Res.** v. 213, p. 521-36, 1986.

SEMCHUK, K.M.; LOVE, E.J.; LEE, R.G. Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. **Neurology**; 43: p. 1173–1180, 1993.

SETHY, V.H.; WU, U.; OUSTUEEN, J.A.; ET AL. Neuroprotective effects of the dopamine agonists pramipexole and bromocriptine in 3-acetylpyridine-treated rats. **Brain Res** 18: 181–186, 1997;



SEWERYNEK, E.; MELCHIORRI, D.; ORTIZ, G.G.; POEGGELER, B. AND REITER, R.J. Melatonin reduces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. **J. Pineal Res.**, v.19, p. 51-56, 1995.

SEWERYNEK, E.; REITER, R.J. and MELCHIORRI, D. Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. **Hepato-Gastroenterology.**, v. 43, p. 898-905, 1996.

SHERMAN, M.Y.; GOLDBERG, A.L. Cellular defences against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative disease. **Neuron**; 29: 15–32, 2001.

SHIMURA, H.; HATTORI, N.; KUBO, S. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. **Nature Genet**; 25: 302–305, 2000.

SIAN, J.; DEXTER, D.T.; LEES, A.J.; ET AL. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. **Ann Neurol**; 36: 348–355, 1994.

SILVA, O.; FERREIRA, E.; VAZ-PATO, M.; CANICA, M.; GOMES, E.T. In vitro anti-*Neisseria gonorrhoeae* activity of *Terminalia macroptera* leaves. **FEMS Microbiol Lett**, v. 211: p.203-206, 2002.

SKAPER, S.D.; FLOREANI, M.; CECCON, M.; FACCI, L. AND GIUSTI, P. Exitotoxicity, oxidative stress and the neuroprotective potential of melatonin. In: **NY Acad. Sci.**, p.107-118, 1999.

SKOUMALOVA, A.; ROFINA, J.; SCHWIPPELOVA, Z.; GRUYS, E.; WILHELM, J. The role of free radicals in canine counterpart of senile dementia of the Alzheimer type. **Exp Gerontol.** v. 38(6), p. 711-9, 2003.

SMITH, R.; LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P., Free radicals and ailing proteins--the culprits behind Parkinson disease? **Destee A. Rev Neurol (Paris)**. v. 10;100(15), p. 1324-6, p. 1329-30, 2003.

SOFIC, E.; PAULUS, W.; JELLINGER, K.; RIEDERER, P.; YODIM, M.B.H. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta in parkinsonian brains. **J Neurochem**; v.56: p.978-982, 1991.

SOGAWA, S.; NIHRO, Y.; UEDA, H.; IZUMI, A.; MIKI, T., MATSUMOTO, H., SATOH, T. 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. **J. Med. Chem.** V. 36, p. 3904-3909; 1993.

SPILLANTINI, M.G.; SCHMIDT, M.L.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q.; JAKES, R.; GOEDERT, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**; 388: 839-840, 1997.

STEVEN, M,V.; DOUGLAS, E.P.D.; AND STEPHEN, E.B. Localization of damage induced by reactive oxygen species in cultured cells. **Free radical biology & medicine** , v. 18 (2), p. 141-151, 1995

SUSIN, S.A.; LORENZO, H.K.; ZAMZAMI, N. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. **Nature**; 397: 441-446, 1999.

SUSIN, S.A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. **Biochim Biophys Acta** 1366: p. 151-156, 1998.

TAMAS, L. H.; SABRINA, D.; CSABA, L.; LUIS, M. G.; MICHAEL, A. C.; MARYA, S.; JOHN, D. E.; PETER, S.; ROBERT, H. R.; EDWIN, H. D.; RUSSEL, T. M.; COLIN, J. B.; EUGENE, R. Coenzyme Q Induces Nigral Mitochondrial Uncoupling and Prevents Dopamine Cell Loss in a Primate Model of Parkinson's Disease. **Endocrinology** v. 140(7), p. 2757-2760, 2003.

TANAKA, Y.; ENGELENDER, S.; IGARASHI, S. Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis. **Hum Mol Genet**; 10: 919–926, 2001.

TANNER, C.M.; GOLDMAN, S.M.: Epidemiology of Parkinson's disease, **Neurol Clin** 14(2): 317-335, 1996.

TIMBERLAKE, C.F., HENRY, B.S. Plant pigments as natural food colours. **Endeavour**. v. 10(1), p.31-6, 1986.

TOLWANI, R.J.; JAKOWEC, M.W.; PETZINGER, G.M.; GREEN, S.; WAGGIE, K.: Experimental models of Parkinson's disease: insights from many models, **Lab Anim Sci** 49(4): 363-371, 1999.

TURRENS, J.F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A.L. Ubisemiquinone is the donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 237, p. 408-414, 1985.

UBEDA, A.; MONTESINOS. C.; PAYA, M.; E.T. A.L. Iron-reducing and free-radical-scavenging properties of apomorphine and some related benzyloquinolines. **Free Radic Biol Med**; v.15: p.159–167, 1993.

UEDA, K.; FUKUSHIMA, H.; MASLIAH, E.; E.T. A.L. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. **Proc Natl Acad Sci USA**; v.90: p.11281–11286,1993.

VIANA G.S.B.; MATOS F.J.A.; BANDEIRA M.A.M.; RAO V.S.N., “Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) Estudo Botânico, Farmacognóstico, Químico e Farmacológico,” **2nd. ed., Edições UFC**, Fortaleza, , p. 160, 1995.

VIANA, G.S.B.; MATOS, F.J.A.; BANDEIRA, M.A.M.; R.A.O., V.S.N.: Aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) **Estudo Botânico, Farmacognóstico, Químico e Farmacológico. 2a. ed. EUFC**, Fortaleza, p.160., 1995.

VIANA, G.S.B.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; MOURA, L.C.; BANDEIRA, M.A.M.; MATOS, F.J.A.; RIBEIRO, R.A. Analgesic and antiinflammatory effects of the tannin fraction from the bark of *Myracrodruon urundeuva* Fr. Al. **Phytotherapy Research**, v.11:p.118-122, 1997.

VIEREGGE, P.; GLAESE, A.; U.L.M. G.; KOMPFF, D. Familial Parkinson's disease. **Mov Disord**; v.7 :p. 23–32, 1992.

VIEREGGE, P.; HEBERLEIN, I. Increased risk of Parkinson's disease in relatives of patients . **Ann Neurol**; v. 37: p.685, 1995.

WALKINSHAW, G.; WATERS, C.M., Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. **Neuroscience** v.63, p. 975-987. 1994.

WEI, T.; SUN, H.; ZHAO, X.; HOU, J.; HOU, A.; ZHAO, Q.; XIN, W.: Scavenging of reactive oxygen species and prevention of oxidative neuronal cell damage by a novel gallotannin, pistafolia A. **Life Sci**, v.70: p.1889-1899, 2002.

WELTON, A.F., HURLEY, J., WILL, P. Flavonoids and arachidonic acid metabolism. **Prog Clin Biol Res.** v.280, p. 301-12, 1988

YAMAMOTO, H.A.; TANG, H.W. Melatonin attenuates L-cysteine-induced seizures and lipid peroxidation in the brain of rats. **J. Pineal Res.**, v. 21, p. 108-117, 1996.

YING, W.; SEVIGNY, M.B.; CHEN, Y.; SWANSON, R.A. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates oxidative and excitotoxic neuronal death. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.98: p.12227-12232, 2001.

YOUNG, R. Update on Parkinson's disease, **Am Fam Physician** v.59(8), 1999.

ZAMZAMI, N.; HIRSCH, T.; DALLAPORTA, B.; PETIT, P.X.; KROEMER, G. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. **J Bioenerg Biomembr** v.29: p.185–193 1997.

ZHANG, Y.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis** v.7, p.240-250, 2000.

ZHOU, W.B.; HURLBERT, M.S.; SCHAACK, K.; PRASAD, K.N.; FREED, C.R. Overexpression of human alpha-synuclein causes dopamine neuron death in rat primary culture and immortalized mesencephalon-derived cells. **Brain Res**; 866: 33–43, 2000.

ZOU, L.; XU, J.; JANKOWIC, J.; HE, Y.; APPEL, S.H.; LE, W. Pramipexole inhibits lipid peroxidation and reduces injury in the substantia nigra induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice. **Neurosci Lett** .v. 281:p 167–170, 2000.