



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

IANA BANTIM FELÍCIO CALOU

EFEITOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS
DE *Myracodroun Urundeuva* Fr. All EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE
PARKINSON

AGOSTO

2013

IANA BANTIM FELÍCIO CALOU

**EFEITOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS
DE *Myracodroun Urundeuva* Fr. AII EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE
PARKINSON**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Glauce Socorro Barros Viana

AGOSTO

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

C164e

Calou, Iana Bantim Felício.

Efeitos comportamentais, neuroquímicos e imunohistoquímicos de *Myracodroun urundeuva* Fr. All em modelo experimental de doença de Parkinson / Iana Bantim Felício Calou. – 2013.
180 f. : il. Color.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Doutorado em Farmacologia, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Farmacologia.

Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana.

1. Doença de Parkinson. 2. Oxidopamina. 3. Inflamação. I. Título.

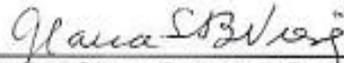
CDD 616.833

IANA BANTIM FELÍCIO CALOU

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS COMPORTAMENTAIS, NEUROQUÍMICOS E
IMUNOHISTOQUÍMICOS DA MYRACRODRUON URUNDEUVA FR. ALL. EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**

Tese submetida à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

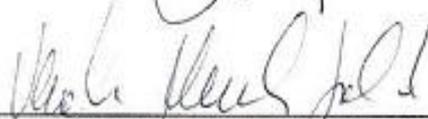
Aprovada em: 09 de agosto de 2013.



Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Universidade Federal do Ceará – UFC
(Orientadora)



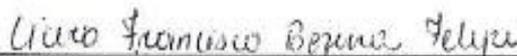
Prof. Dr. Antônio José Lapa
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP



Profa. Dra. Veralice Meireles Sales Bruin
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

*Se partires um dia rumo à Ítaca
Faz votos de que o caminho seja longo
repleto de aventuras, repleto de saber.
Nem lestrigões, nem ciclopes,
nem o colérico Posidon te intimidem!
Eles no teu caminho jamais encontrarás
Se altivo for teu pensamento
Se sutil emoção o teu corpo e o teu espírito tocar
Nem lestrigões, nem ciclopes
Nem o bravio Posidon hás de ver
Se tu mesmo não os levars dentro da alma
Se tua alma não os puser dentro de ti.
Faz votos de que o caminho seja longo.
Numerosas serão as manhãs de verão
Nas quais com que prazer, com que alegria
Tu hás de entrar pela primeira vez um porto
Para correr as lojas dos fenícios
e belas mercancias adquirir.
Madrepérolas, corais, âmbar, ébanos
E perfumes sensuais de toda espécie
Quanto houver de aromas deleitosos.
A muitas cidades do Egito peregrinas
Para aprender, para aprender dos doutos.
Tem todo o tempo Ítaca na mente.
Estás predestinado a ali chegar.
Mas, não apresses a viagem nunca.
Melhor muitos anos levars de jornada
E fundeares na ilha velha enfim.
Rico de quanto ganhaste no caminho
Sem esperar riquezas que Ítaca te desse.
Uma bela viagem deu-te Ítaca.
Sem ela não te ponhas a caminho.
Mais do que isso não lhe cumpre dar-te.
Ítaca não te iludiu
Se a achas pobre.
Tu te tornaste sábio, um homem de experiência.
E, agora, sabes o que significam Ítacas.*

Konstantinos Kaváfis (1863-1933)

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Érico e Elizabeth por terem a mim dedicado cuidados e amor e, me garantindo um lar harmonioso e o pão de cada dia, me possibilitaram sonhar e dar passos guiados por minha imaginação.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana pela orientação e, sobretudo pelo exemplo de diligência e paixão à pesquisa. Professora, muito obrigada pela dedicação, pelos cuidados e ainda, pela paciência dedicados a esta aprendiz.

À Profa. Dra. *Geanne* Matos *de* Andrade Cunha pela ajuda nos métodos histológicos e especialmente por ter sido minha maior inspiração como professora com suas aulas e didática encantadoras. Obrigada pelo exemplo!

À Profa. Gerly Anne de Castro Brito pela ajuda na realização das imunohistoquímicas.

Aos amigos Beth Nobre, Iri Sandro Lima, Cícero Felipe e Giovany Cruz pela companhia e partilha de conhecimentos, tão importantes durante a realização dos experimentos.

Aos queridos amigos Cerqueira Gil e Rafaelly Siqueira pela benevolência em me ajudar, sendo meus olhos e braços em Fortaleza durante as minhas necessárias ausências. A importância de vocês neste trabalho é inestimável.

Aos técnicos da Neurofarmacologia (UFC): Vilany, Lena e Arnaldo; da Morfologia (UFC): Socorro e Josi; da Faculdade de medicina Estácio – FMJ : Xênia Maria, Ivna e Janice. O apoio técnico foi imprescindível para a realização desta pesquisa. Minha eterna gratidão.

Aos alunos de iniciação científica da Estácio-FMJ que participaram de várias etapas deste estudo: Eudes, Debora, Mirla e Aline. Obrigada pela ajuda diária!

À família UFPI-CSHB pelo apoio: Ada Raquel, Ana Paula Peron, Artemíza Sousa, Camila Carvalho, Carmita Souza, Carol Pacheco, Julianne Viana, Luiza Xavier, Paulo Michel, Socorro Meireles e Theides Batista

Aos distintos Danilo Oliveira e Tiago Olinda que, mesmo tendo feito apenas uma passagem na minha vida, foram durante este período minha mola propulsora, minha força interior e o meu amor familiar fora do ninho. Tenho consciência de que a realização deste sonho só ocorreu com o seu auxílio. Obrigada.

À Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte (Estácio-FMJ) pela permissão para uso de suas instalações e campo de realização de toda esta pesquisa.

À FUNCAP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum sendo caracterizado pela depleção dopaminérgica na via nigroestriatal. O tratamento farmacológico da DP é meramente paliativo além de apresentar um perfil de reações adversas incapacitante. A neuroinflamação e o estresse oxidativo (EO) estão envolvidos na fisiopatologia da DP sendo alvos importantes para tratamentos por meio da neuroproteção. A *Myracrodroun urundeuva* (MU) tem uso secular e bastante difundido no nordeste brasileiro por suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes marcantes. Nesta pesquisa, avaliamos o efeito dos extratos hidralcoólicos líquido (EHAMU: 5, 10, 20 e 40mg/kg) e seco (ESMU:10 e 20 mg/kg) da MU por 15 dias, via oral, no modelo experimental de DP induzido pela injeção estriatal unilateral de 6-Hidroxiopamina. No teste do campo aberto não foi observada qualquer alteração na movimentação animal, não obstante, no teste do Rota Rod foi observado uma melhora na coordenação motora nos animais submetidos à lesão estriatal e tratados com EHAMU nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg e com ESMU nas doses de 10 e 20 mg/kg. No teste rotacional induzido por apomorfina, o EHAMU e o ESMU na dose de 20mg/kg reduziram 77,8% e 86,2%, respectivamente o número de rotações contralaterais em animais com lesão estriatal unilateral, na mesma dose os extratos líquido e seco conseguiram reverter a depleção dopaminérgica estriatal em 71,7% e 100% respectivamente indicando um ótimo efeito neuroprotetor da planta, que foi confirmado pela coloração de Nissl e pela imunohistoquímica para Tirosina hidroxilase realizadas no tecido do estriado lesionado. O efeito antioxidante da droga foi evidenciado no teste *in vitro* do DPPH onde o extrato seco na concentração de 25µg/ml teve efeito similar ao controle (vitamina E). Observamos que o efeito antioxidante dos extratos testados não está relacionado com a capacidade de sequestrar radicais superóxido pelo teste *in vitro* da superóxido dismutase. O potencial anti-inflamatório e antinociceptivo dos extratos também foram observados com clareza nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e Hargreaves, respectivamente com resultados significativos nas doses de 10 e 20mg/kg. Para verificar o mecanismo de neuroproteção do EHAMU (20 e 40mg/kg, v.o – 15 dias) também avaliamos sua ação sobre a neuroinflamação por meio de imunohistoquímica para COX-2, iNOS, TNF- α no córtex, estriado e regiões CA1, CA3 e Giro parahipocampal do hipocampo onde observamos, com exceção da região CA1, uma diminuição significativa da marcação tecidual para estes marcadores de inflamação indicando um mecanismo de neuroproteção tanto para os neurônios dopaminérgicos estriatais como para os neurônios corticais e hipocámpais envolvidos na demência apresentada pelos pacientes com a doença em estágios mais evoluídos. No tecido estriatal verificamos ainda, nos animais tratados com o EHAMU (20 e 40mg/kg, v.o – 15 dias) diminuição drástica na marcação para o fator de transcrição NF- κ B. Observamos que o EHAMU na dose de 40mg/kg diminuiu a ativação microglial por meio da diminuição acentuada da marcação para o OX-42 assim como a diminuição da astrogliose observadas pela marcação insipiente de GFAP no estriado submetido à lesão. A MU representa, portanto uma opção viável e eficiente de neuroproteção, apresentando resultados que encorajam os estudos clínicos para que uma nova estratégia terapêutica emerja não como mero paliativo, mas como uma terapia que diminua ou, pelo menos, torne mais lenta a progressão da doença.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, 6-hidroxiopamina, *Myracodroun urundeuva*, neuroinflamação.

ABSTRACT

Effect of standardized extract of *Myracrodruon urundeuva* in an animal model of Parkinson's disease.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder characterized by dopaminergic depletion in the nigrostriatal via. Pharmacological treatment of PD is merely palliative and presents a profile of disabling adverse reactions. Neuroinflammation and oxidative stress (OS) are involved in the pathophysiology of PD and are important targets for treatments through neuroprotection. The *Myracrodruon urundeuva* (MU) has secular and widespread use in Brazil's northeastern for its remarkable anti-inflammatory and antioxidants properties. In this study, we evaluated the effect of liquid hydroalcoholic extract (EHAMU: 5, 10, 20 and 40mg/kg) and dry extract (ESMU: 10 and 20 mg / kg) of MU for 15 days, orally, in the experimental model of PD induced by unilateral striatal injection of 6-hydroxydopamine. In the open field test was not observed any change in handling animal, however, the Rota Rod test was observed an improvement in motor coordination in animals subjected to estriatal injury and treated with EHAMU (10, 20 and 40 mg / kg) and ESMU (10 and 20 mg / kg). In the apomorphine-induced rotational test, EHAMU and ESMU both 20mg/kg, reduced 77.8% and 86.2%, respectively, the number of contralateral rotations in animals with unilateral striatal injury, in the same dose liquid and dry the extracts could reverse striatal dopamine depletion in 71.7% and 100% respectively indicating a great neuroprotective effect of the plant, which was confirmed by Nissl staining and by imunohistoquímica for Tyrosine hydroxylase performed in striatal tissue injury. The antioxidant effect of the drug was demonstrated in the DPPH test (*in vitro*) where the dry extract at a concentration of 25µg/ml had an effect similar to control (vitamin E). We found that the antioxidant effect of the plant extract was not related with the ability to sequester superoxide radiacals by *in vitro* assay of superoxide dismutase. The potential anti-inflammatory and antinociceptive of the extracts were also clearly observed in the models of paw edema induced by carrageenan and Hargreaves, respectively, with significant results at the doses 10 and 20mg/kg. To verify the mechanism of neuroprotection of EHAMU (20 and 40mg/kg, po - 15 days) also evaluated its effect on neuroinflammation by immunohistochemistry for COX-2, iNOS, TNF- α at the cortex, striatum and areas CA1, CA3 and parahippocampal Giro from hippocampus where noted, except for the CA1 region, a significative decrease marking tissue for these markers of inflammation indicating one mechanism of neuroprotection for both striatal dopamine neurons and for cortical and hippocampal neurons involved in dementia reported by patients with the disease in more developed stages. Striatal tissue showed even, in animals treated with EHAMU (20 and 40mg/kg, po - 15 days), drastic decrease in the markup for the transcription factor NF-kB. We note that at a dose of 40mg/kg EHAMU reduces microglial activation through the sharp decline in the markup for the OX-42 goes like as decreased astrogliosis observed by marking incipient GFAP in the striatum subjected to injury. MU therefore represents a viable and efficient neuroprotetor, encouraging clinical studies for a new therapeutic strategy, not as palliative therapy but as a tool capable of decrease or at least become slower the progression of the disease.

Key- Words: Parkinson's disease, 6-hidroxidopamine, *Myracodroun urundeuva*, neuroinflammation.

LISTA DE FIGURAS

- 01.** À esquerda, James Parkinson (1755-1824) e ao seu lado Jean- 22
Martin Charcot (1825-1893).
- 02.** À esquerda, Frederic Lewy (1985-1950) e ao seu lado Konstantin 23
Tretiakoff (1892-1958).
- 03.** Efeito da dopamina na execução do comando motor. 27
- 04.** Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Doença de Parkinson. 29
- 05.** Vias da neuroinflamação e do estresse oxidativo na patogênese da 38
doença de Parkinson.
- 06.** Planta e feijões da *Vicia faba*. 40
- 07.** Mecanismo de ação da L-DOPA 42
- 08.** *Myracrodruon urundeuva* Allemão 46
- 09.** Comparação entre as estruturas químicas da 6-Hidroxidopamina (6- 51
OHDA) e da dopamina.
- 10.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* 68
(EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos
antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de
Cruzamentos no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal
induzida por 6-OHDA.
- 11.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* 69
(EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos
antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de
Rearing no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal
induzida por 6-OHDA.
- 12.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* 70
(EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos
antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de
Grooming no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal
induzida por 6-OHDA.

- 13.** Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotóxica) sobre o Número de Cruzamentos no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 72
- 14.** Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotóxica) sobre o Número de Rearing no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 73
- 15.** Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotóxica) sobre o Número de Grooming no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 74
- 16.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotóxica) na coordenação motora (teste de Rota-Rod) de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 77
- 17.** Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU 10e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotóxica) na coordenação motora (teste de Rota-Rod) de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 78
- 18.** Comparação entre os Extratos Hidroalcoólico (EHAMU) e Seco (ESMU) de *Myracrodruon urundeuva* (10 e 20 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA) na coordenação motora de ratos (teste de Rota-Rod) com lesão estriatal induzida por 6-OHDA de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 79
- 19.** Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotóxica) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 82
- 20.** Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU10 e 20mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotóxica) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 83
- 21.** Comparação entre os extratos hidroalcoólico (EHAMU) e seco (ESMU)de *Myracrodruon urundeuva* (10 e 20 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 84

22. Efeito do extrato de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias e 1 hora após a injeção estereotóxica unilateral de 6-OHDA) nos níveis de dopamina (ng/mg de tecido) em estriado direito de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.	88
23. Efeito do extrato seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (10 e 20 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatalestereotóxica unilateral de 6-OHDA) nos níveis de dopamina (ng/mg de tecido) em estriado direito de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA.	90
24. Comparação entre os extratos hidroalcoólico (EHAMU) e seco (ESMU)de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (10 e 20 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA) sobre níveis de dopamina (ng/mg de tecido) em estriado direito de ratos.	91
25. Absorbância da solução do radical DPPH na presença do ESMU (25, 50 e 100µg/mL) e de Vitamina E (Vit E,).	93
26. Atividade da supeóxido dismutase no Extrato seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i> nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400µg/ml.	94
27. Efeito do extrato seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (ESMU 10, 20 e 40mg/kg) e indometacina (20mg/kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%) em ratos.	96
28. Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Myracrodruon urundeuva</i> (ESMU 10, 20 e 40 mg/kg) e indometacina (20 mg/kg) sobre a hiperalgesia térmica induzida por carragenina no teste de Hargreaves	97
29. Micrografia de neurônios viáveis pelo método de Nissl em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	99
30. Contagem de Células viáveis em estriado direito de ratos submetidos à injeção estereotóxica unilateral de 6-OHDA. Coloração pelo método de Nissl com Cresil violeta	100

- 31.**Fotomicrografia de imunohistoquímica para TH em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados cpor 14 dias com EHAM 102
- 32.**Contagem de imunomarcção para Tirosina Hidroxilase (TH) em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com EHAMU. 103
- 33.**Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área do giro denteado de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. 105
- 34.** Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA1 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. 106
- 35.**Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA3 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. 107
- 36.** Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 em córtex do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. 108
- 37.**Contagem de imunomarcção para COX-2 em córtex direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e 109

tratados por 14 dias com o EHAMU.

38.Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. 110

111

39.Contagem de imunomarcção para COX-2 em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.

113

40.Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área do Giro Denteado de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com EHAMU.

114

41. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área CA1 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.

115

42. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOSna área CA3 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.

116

43. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS em córtex cerebral de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.

117

44.Contagem de imunomarcção para iNOS em córtex cerebral direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.

118

45.Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOSem estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.

119

46.Contagem de imunomarcção para iNOS em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.

121

47. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α na área do giro denteado do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA	124
	122
48. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α na área CA1 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	126
49. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α na área CA3 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	123
	124
50. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α em córtex cerebral de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	
51. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	125
	126
52. Contagem de imunomarcção para TNF- α em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	
	128
53. Fotomicrografia de imunohistoquímica para NF- κ B em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	
	129
54. Contagem de imunomarcção para NF- κ B em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA.	133
55. Fotomicrografia de imunohistoquímica para OX-42 em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-	
	134

OHDA.

56. Fotomicrografia de imunohistoquímica para GFAP em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA.

57.Contagem de imunomarcção para GFAP em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA

LISTA DE TABELAS

1. Efeito do extrato Hidroalcoólico de Myracrodruon urundeuva nos níveis de dopamina e DOPAC (ng/MG de tecido) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA. 87
2. Efeito do Extrato Seco de Myracrodruon urundeuva nos níveis de dopamina e DOPAC (ng/MG de tecido) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA. 89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 DOENÇA DE PARKINSON.	21
1.1.1 Descoberta e caracterização da doença.	21
1.1.2 Gânglios da base, depleção dopaminérgica e doença de Parkinson.	24
1.2 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DA DOENÇA DE PARKINSON.	28
1.2.1 Agregados de α -sinucleína.	30
1.2.2 Estresse oxidativo e Disfunção mitocondrial.	32
1.2.3 Excitotoxicidade.	34
1.2.4 Neuroinflamação.	35
1.3 A LEVODOPATERAPIA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON.	39
1.4 <i>Myracroduon urundeuva</i> Allemão .	43
1.4.1 Aspectos botânicos e químicos.	43
1.4.2 Estresse oxidativo e Disfunção mitocondrial.	44
1.4.3 Toxicidade.	48
1.4.4 Testes clínicos.	49
1.5 Modelo experimental de Parkinson induzido por 6-OHDA .	50
2.OBJETIVOS	54
2.1 Objetivo Geral.	54
2.2 Objetivos Específicos .	54
3. METODOLOGIA	56
3.1 Animais.	56
3.2 Material botânico .	56
3.3 Preparo do Extrato Hidroalcoólico da casca do caule de <i>Myracroduon urundeuva</i> Allemão.	56
3.4 Preparo do Extrato Seco da casca do caule de <i>Myracroduon urundeuva</i> Allemão	57
3.5 Protocolo experimental	58
3.6 Modelo experimental de Parkinson induzido por 6-OHDA	59

3.7 Teste do campo aberto	59
3.8 Teste da barra giratória Rota Rod	60
3.9 Teste rotacional com Apomorfina	60
3.10 Dissecação da área cerebral (corpo estriado, córtex e hipocampo)	60
3.11 Determinação de Dopamina e DOPAC com HPLC	61
3.12 Determinação da morte neuronal (coloração de Nissl-cresil violeta)	61
3.13 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase	62
3.14 Edema de pata induzido por carragenina	63
3.15 Teste de Hiperalgisia térmica de Hargreaves	63
3.16 Avaliação da atividade antioxidante do Extrato seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i> in vitro	63
3.16.1 Método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	63
3.16.2 Método da superóxido dismutase (SOD)	64
3.17 Imunohistoquímica para TNF- α , IL-1 β , iNOS, COX-2, NF- κ B, OX-42 e GFAP	65
3.18 Análise estatística.	66
4. RESULTADOS	67
4.1 Estudos Comportamentais	67
4.1.1 Campo Aberto	67
4.1.1.1 Extrato hidroalcoólico de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	67
4.1.1.2 Extrato seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	71
4.1.2 Teste do Rota-Rod	75
4.1.3 Teste Rotacional Induzido por Apomorfina	80
4.2 Níveis estriatais de Monoaminas	85
4.2.1 Níveis dopaminérgicos	85
4.3 Atividade Antioxidante do Extrato Seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	92
4.3.1 Método do DPPH	92
4.3.2 Método da SOD/NBT	92
4.4 Atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato Seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	95

4.4.1 Extrato Seco de <i>Myracrodruon urundeuva</i>	95
4.5 Estudos Histológicos	98
4.5.1 Contagem de células viáveis por método de Nissl	98
4.5.2 Ensaio de Imunohistoquímica	101
4.5.2.1 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) em estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU 40 mg/kg, v.o, por 14 dias.	101
4.5.2.2 Imunohistoquímica para COX-2 nas áreas hipocampais Giro denteado, CA1 e CA3, no córtex e no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.	104
4.5.2.3 Imunohistoquímica para iNOS nas áreas do hipocampo Giro denteado, CA1 e CA3, no córtex e no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.	112
4.5.2.4 Imunohistoquímica para TNF- α nas áreas do hipocampo Giro denteado, CA1 e CA3, no córtex e no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.	120
4.5.2.5 Imunohistoquímica para NF- κ B no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.	127
4.5.2.6 Imunohistoquímica para OX-42 no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.	130
4.5.2.7 Imunohistoquímica para GFAP no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.	132
5. DISCUSSÃO	135
6. CONCLUSÃO	155
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

1. Introdução

1.1 Doença de Parkinson

1.1 .1 Descoberta e caracterização da doença

Coube a James Parkinson, em 1871, o mérito da descrição inicial da doença que hoje leva o seu nome. O ensaio intitulado “An Essay on the Shaking Palsy”, consta da primeira descrição mundial bem definida da DP. A enfermidade, intitulada “paralisia agitante”, foi caracterizada pela presença de movimentos tremulantes, com diminuição da força muscular, tendência para a inclinação do tronco para frente e alteração da marcha (festinação), tendo os sentidos e o intelecto não afetados. Apontou ainda que a evolução da doença era acompanhada por quedas freqüentes, obstipação, disartria, dificuldades para deglutição, sialorréia constante, incontinência urinária e finalmente anartria(PARKINSON, 1817).

Após a exímia descrição feita por Parkinson, vários trabalhos colaboraram para o melhor entendimento da patologia, dentre eles, ressalta-se a contribuição fundamental do neurologista francês Jean-Martin Charcot(**Figura 1**). Charcot definiu a presença dos chamados quatro sinais cardinais da doença, quais sejam tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular, contestando James Parkinson que citava a presença de uma fraqueza muscular no quadro da doença, e instabilidade postural. Apresentou ainda os critérios para o diagnóstico diferencial e sugeriu o primeiro tratamento para a doença(PEARCE, 1992; GOETZ, 1987; GOETZ et al.,1995; CHARCOT, 1880).Charcot discordou da descrição original de Parkinson, quanto a preservação das funções corticais superiores na doença, considerando a presença de perda de memória e enfim, uma disfunção cognitiva, fatos estes hoje bastante conhecidos(CHARCOT, 1880; BRAAK et al., 2006).



Figura 1. À esquerda, James Parkinson (1755-1824) e ao seu lado Jean-Martin Charcot (1825-1893).

Hoje, sendo apontada pelos estudos epidemiológicos como a segunda mais freqüente doença neurodegenerativa e a mais freqüente entre os distúrbios do movimento, a doença de Parkinson acomete de 1-2% da população mundial, demandando custos altíssimos e causando elevado impacto negativo na qualidade de vida dos portadores (ALVES et al., 2008). A doença de Parkinson recebe a atenção dos pesquisadores como nunca antes a fim de se desvendar por completo a etiologia e fisiopatologia e por fim, desenvolver um tratamento adequado para a patologia.

Quase cem anos foram necessários para se avançar da descoberta, descrição e definição dos sinais clínicos mais importantes até um novo patamar que forneceu um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na patologia da doença de Parkinson. Tal transição foi realizada pelo trabalho pioneiro de Frederic Lewy, que descobriu partículas microscópicas (denominadas posteriormente de corpos de Lewy, em sua homenagem) (SILVA et al., 2013) nos cérebros afetados pela doença, e pelos estudos de Konstantin Tretiakoff (**Figura 2**), que, baseado o estudo *postmortem* da substância negra forneceu a primeira evidência concreta que esta era a principal estrutura cerebral afetada pela doença de Parkinson idiopática (LEES et al., 2008). Apenas em 1997 fez-se a descoberta de que a α -sinucleína era o componente majoritário dos corpos de Lewy (SPILLANTINI et al., 1997).

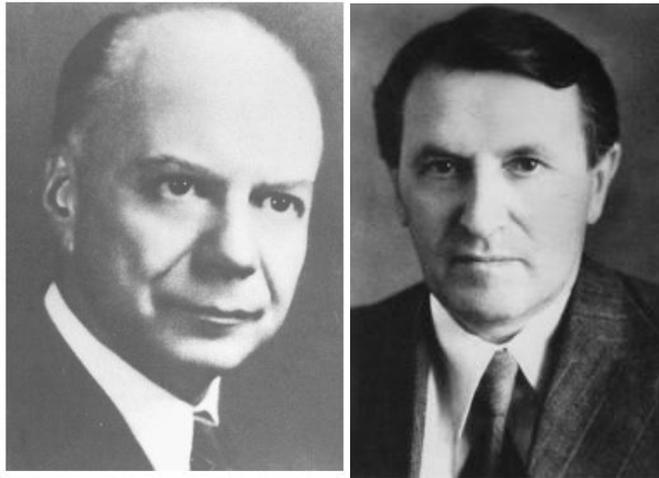


Figura 2. À esquerda, Frederic Lewy (1885-1950) e ao seu lado Konstantin Tretiakoff (1892-1958).

Os passos seguintes no entendimento das bases moleculares da Doença de Parkinson foram dados com os estudos de Carlsson e colaboradores em 1957 que mapearam a distribuição da dopamina no cérebro de mamíferos, inclusive sua concentração nos gânglios da base. Também mostraram que a L-DOPA era capaz de reverter os efeitos da depleção dopaminérgica induzidos pela reserpina. Em 1959, Sano e sua equipe fizeram esse mapeamento no cérebro humano, identificando que o neurotransmissor em questão estava mais concentrado no sistema extrapiramidal. Em 1960, Ehringer e Hornykiewicz observaram uma redução drástica (mais de 90%) na concentração de dopamina no estriado e globo pálido em cérebros de pacientes com Parkinson (GOETZ, 2011).

Meses depois, novas técnicas de histofluorescência mostraram a então desconhecida via nigroestriatal, com corpos celulares na substância negra (parte compacta) e as projeções axonais no estriado. Esta técnica possibilitou o entendimento de que a redução da dopamina estriatal não era consequência da atividade diminuída da tirosina hidroxilase, enzima que sintetiza dopamina, mas devido à perda dos neurônios dopaminérgicos da via recém-descoberta. Nesta mesma época Barbeau e colaboradores mostraram a redução do ácido homovanílico (HVA), metabólito da dopamina, na urina de pacientes com Parkinson (BARBEAU et al., 1961). Desta forma foi delineado o que ainda hoje é tida como principal característica fisiopatológica da doença e sobre a qual os tratamentos foram direcionados inicialmente (GERLACH et al., 2003).

1.1.2 Gânglios da base, depleção dopaminérgica e doença de Parkinson

O entendimento da doença de Parkinson como consequência da depleção dopaminérgica é possível quando se analisa o papel da dopamina nos circuitos motores (**Figura 3**). A movimentação voluntária, assim como a involuntária, se baseia em padrões temporo-espaciais de contrações musculares que são iniciadas e coordenadas por diferentes estruturas do Sistema Nervoso Central. O fino ajuste entre estas estruturas com as redes neuronais envolvidas no controle motor são essenciais para um comportamento motor adequado (HADDERS-ALGRA, 2003).

Os núcleos da base são um conjunto de estruturas cerebrais constituído pelo núcleo caudado, putâmen, globo pálido além dos núcleos satélites: núcleo subtalâmico e substância negra que possuem comunicação direta com os principais. Essas estruturas controlam os padrões complexos da atividade motora por meio da regulação de impulsos neuromotores (FREUND, 2002). A principal função dessas estruturas, inferida a partir de casos de pacientes com lesões nestas estruturas, é manter a prontidão dos neurônios corticais para organizar e liberar seqüência de movimentos ou programas motores em momentos adequados (IANSEK et al., 1995). A outra função importante é a de liberar e finalizar programas motores além da manutenção do movimento regulando suas variações de velocidade e amplitude. O controle motor mediado pelos NB ocorre por meio de duas vias: a direta e a indireta onde, a primeira está envolvida na iniciação e manutenção do programa motor e segunda na iniciação e/ou finalização dos movimentos (GRILLNER et al., 2005).

A via direta apresenta os neurônios estriatais GABAérgicos contendo substância P e encefalina como co-transmissores e expressão receptores dopaminérgicos tipo D1. A ativação dos neurônios estriatais pelo córtex causa inibição dos neurônios GABAérgicos do globo pálido e substância negra reticulada, os quais são responsáveis pela eferência que se projeta ao tálamo. Logo, a ativação desta via inibitória causa desinibição do tálamo que então excita o córtex através de

projeções glutamatérgicas, facilitando a movimentação (ALEXANDER & CRUTCHER, 1990).

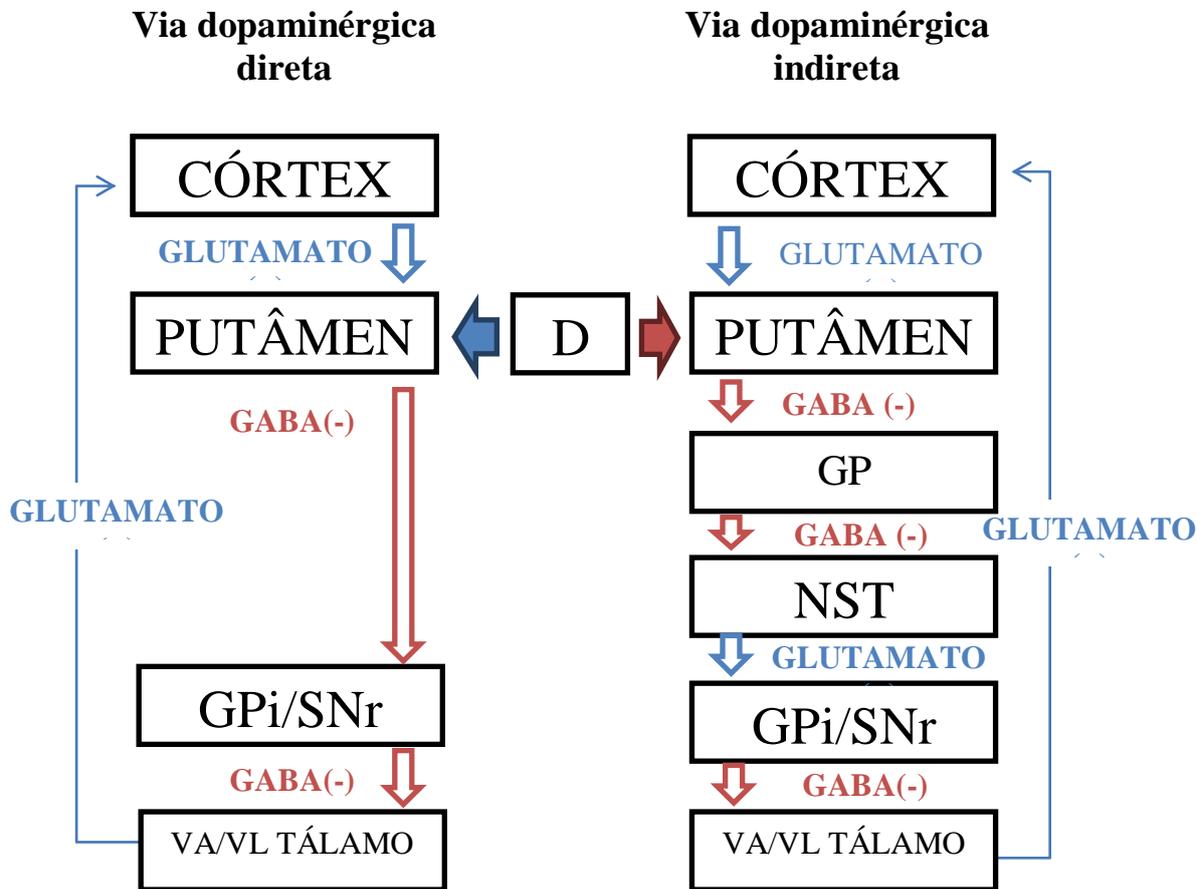
A via indireta, por sua vez, apresenta neurônios estriatais GABAérgicos contendo encefalina/neurotensina como co-transmissores e expressa receptores D2 de dopamina. Ao serem ativados, os neurônios estriatais causam inibição do globo pálido externo. Do globo pálido externo uma via GABAérgica se projeta para o núcleo subtalâmico exercendo influência inibitória, a ação dos neurônios estriatais sobre o globo pálido então provoca uma desinibição do núcleo subtalâmico que possui neurônios glutamatérgicos estimuladores da atividade inibitória do globo pálido interno sobre o tálamo, dificultando pois a estimulação cortical. As vias são, portanto antagônicas e, se assim não fosse, seria impossível a função de modulação. A via indireta, aparentemente, serve para aumentar o nível de inibição tônica no tálamo, sendo uma via mais lenta, que regula o grau de excitação cortical e modula as ações desinibitórias da via direta (GOLDMAN-RAKIC & SELEMON, 1990).

A atividade da dopamina em ambas as vias é aumentar a excitabilidade do neurônio motor, diminuindo o fluxo inibitório dos núcleos da base (**Figura 3**). A DA modula os efeitos glutamatérgicos dos impulsos corticoestriatais, exercendo dupla ação: excitando neurônios da via direta, que expressam receptores D1 e inibindo neurônios da via indireta que expressam receptores D2 (PURVES, 2005).

Na doença de Parkinson, com a perda dos neurônios dopaminérgicos e resultante depleção dopaminérgica, as duas vias, direta e indireta, tornam-se hiper-inibidas com inibição reduzida dos neurônios da via indireta e excitação diminuída dos neurônios da via direta (ONLA-OR & WINSTEIN, 2001; GRILLNER et al., 2005). O resultado final é uma ativação excessiva dos neurônios que constituem local de eferência dos NB (GPi/SNr), gerando excessiva inibição do eixo tálamo-cortical, o que é característico da doença (OBESO et al., 2000).

A depleção dopaminérgica não constitui a única característica da Doença de Parkinson, a presença de inclusões eosinofílicas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy dentro dos neurônios dopaminérgicos remanescentes, mesmo tendo

papel controverso na fisiopatologia da doença, continua como um achado neuropatológico de valor para o diagnóstico (SHULTS, 2006).



Adaptado de ALEXANDER & CRUTCHER, 1990

Figura 3. Efeito da dopamina na execução do comando motor. As áreas motoras corticais se projetam para o estriado fazendo conexões sinápticas excitatórias glutamatérgicas com os neurônios GABAérgicos espinhosos médios que dão origem a duas eferências estriatais chamadas de via direta e indireta. A via direta expressa receptores de dopamina D1 e provocam a inibição dos neurônios GABAérgicos do GPi/SNr causando a desinibição talâmica. Na via indireta os neurônios estriatais com receptores de dopamina D2, se projeta, para o GP externo, causando inibição desse núcleo e desinibição do núcleo subtalâmico que, por sua vez estimula atividade inibitória do GPi/SNr sobre o tálamo, dificultando a movimentação. Nas duas vias a dopamina atua diminuindo o efluxo inibitório dos núcleos da base sobre o tálamo: estimulando e inibindo os neurônios estriatais da via direta e indireta, respectivamente.

Outra característica neuropatológica na DP é a presença de respostas das células de glia, mais precisamente, a ativação da micróglia, possível de ser visualizada através de uma tomografia de emissão de pósitrons nas áreas cerebrais com sinais de neurodegeneração. Tal observação direcionou os estudos para a importância da neuroinflamação nos processos neurodegenerativos representando avanços importantes (OUCHI et al., 2009; PRZEDBORSK, 2010).

1.2 Aspectos fisiopatológicos da Doença de Parkinson

O mecanismo pelo qual os neurónios degeneram na DP não foi ainda totalmente compreendido, mas provavelmente envolve a oligomerização da α -sinucleína, o estresse oxidativo, a deficiência da atividade do complexo I mitocondrial, a excitotoxicidade mediada pelo glutamato, a elevação dos níveis de ferro e alterações no processamento de proteínas (OBESO et al., 2010). Ainda, com base na epidemiologia, neurogenética e estudos *pós-mortem*, a contribuição de processos neuroinflamatórios na progressão da doença, foi proposta (**Figura 4**) (HIRSCH & HUNOT, 2009).

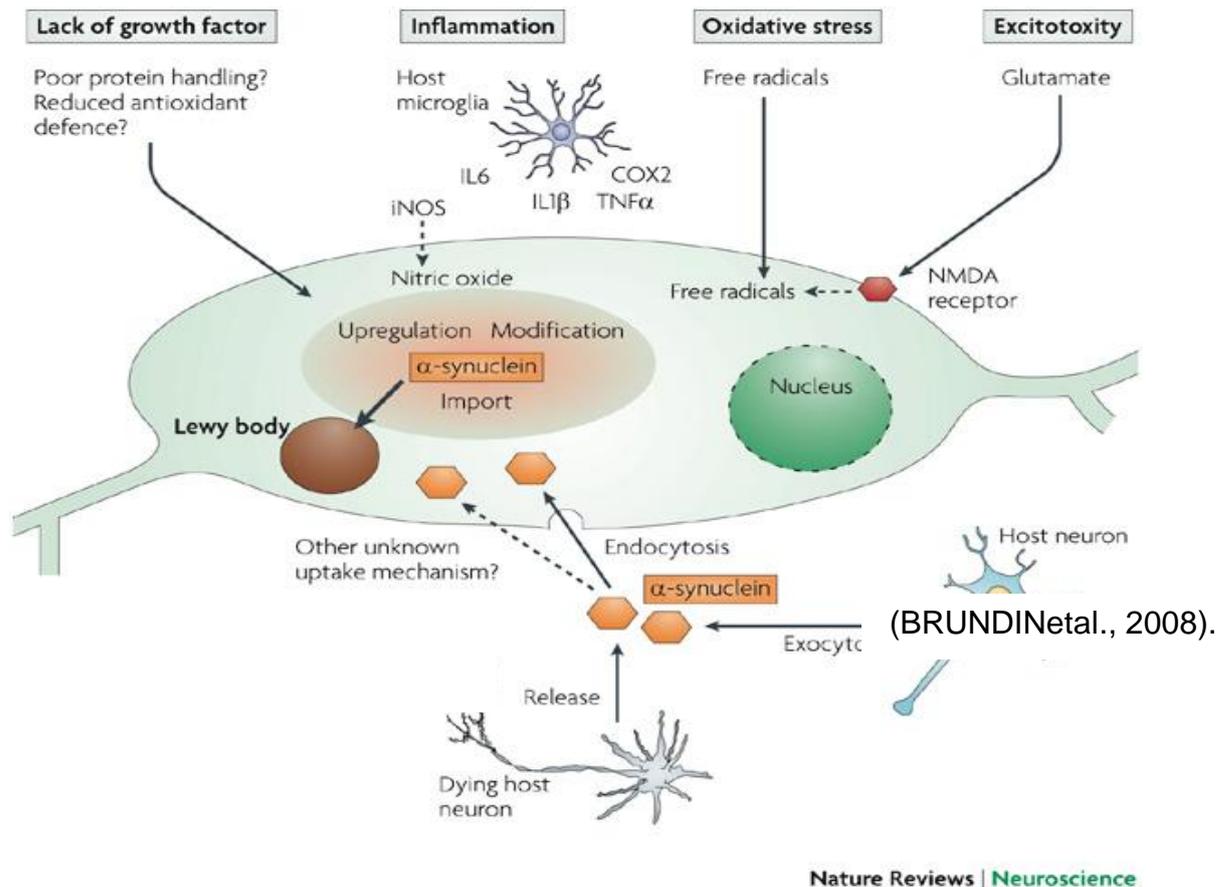


Figura 4. Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Doença de Parkinson. Fatores neurotróficos, alguns deles conhecidos por combater o estresse oxidativo e diminuir a taxa de formação de proteínas deformadas, são encontrados em menor concentração no estriado de pacientes com DP, levando a agregação de α -sinucleína má formada. Também é possível identificar um “up-regulation” de mediadores inflamatórios como TNF- α , IL-1, IL-6, iNOS e COX-2. Existem evidências consistentes e amplamente amparadas de que o estresse oxidativo está envolvido na DP, assim como a excitotoxicidade mediada pelas altas concentrações de glutamato no estriado parkinsoniano, aumentando ainda mais a produção de radicais livres e a neuroinflamação, estabelecendo assim um ciclo vicioso que se incumbe pela progressão inexorável da doença (BRUNDINetal., 2008).

1.2.1 Agregados de α -sinucleína

Além da depleção dopaminérgica, a presença de depósitos de proteínas na forma de inclusões intracelulares características (corpos de Lewy) e inclusões neuríticas que aparecem nos neurônios remanescentes, também caracterizam a DP e consistem em marcadores patognomônicos da doença (MOORE et al., 2005). A análise dessas inclusões indica que elas consistem de material filamentar ou granuloso de proteínas que se localizam nas regiões em neurodegeneração na DP, sendo classificada como uma forma neurodegenerativa de amiloidose, que consiste em um grupo de doenças resultantes do acúmulo de proteínas mutantes ou “*misfolded*” que se depositam dentro ou fora da célula como agregados insolúveis também conhecidos por placas neuríticas. Ensaios de imunorreatividade confirmam que estes depósitos se localizam nos corpos celulares e terminais pré-sinápticos e que a α -sinucleína (α -sin) é o seu componente majoritário (SPILLANTINI et al., 1997; MUNISHKINA & FINK, 2007).

Os primeiros estudos sobre o papel fisiológico da α -sin mostraram que ela interage com os terminais pré-sinápticos controlando a fusão das vesículas às membranas pré-sinápticas e, por conseguinte, a reciclagem de neurotransmissores. De forma mais direta, ela inibe a exocitose das vesículas além de evitar a reutilização das mesmas, diminuindo o conteúdo de neurotransmissores disponível para liberação na fenda sináptica (LARSEN et al., 2006), responsabilizando-se por diminuir a transmissão em períodos em que a atividade neuronal está muito elevada (SULZER, 2010).

Não obstante, esta proteína, especialmente quando sofre mutações patogênicas e são anormalmente fosforiladas, ubiquinadas e nitradas, se transformando em uma proteína “*misfolded*” (tradução direta: mal enovelada fazendo referência a estrutura terciária da proteína que foi modificada, tendo alterada a sua função fisiológica) está propensa a formar oligômeros tóxicos, conhecidos como protofibrilares, com potencial de interagir com lipídios da membrana celular provocando o seu rompimento (CONWAY et al., 2000).

As interações entre essas proteínas e as vesículas sinápticas, mitocôndrias ou as membranas lisossômicas podem promover degeneração (SILVA et al., 2013). Afora o supracitado, as proteínas com mutações patogênicas ou “misfolded”, são mais eficazes em romper as vesículas uma vez que são mais propensas a formarem poros nas membranas vesiculares fornecendo um meio para a saída das catecolaminas e contribuindo para depleção dopaminérgica (SULZER, 2010).

O grande desafio é entender como uma proteína nativa e solúvel se transforma formando estruturas poliméricas instáveis e insolúveis. A α -sin é extremamente sensível aos processos que levam a sua polimerização ou fibrilação, como os fatores ambientais a exposição a herbicidas, pesticidas e metais pesados que desempenham um importante papel na patogênese da DP (UVERSKY et al., 2002). A oxidação da dopamina igualmente mostrou capacidade de converter a α -sin em produtos insolúveis tóxicos (XU et al., 2002). Os astrócitos ativados no processo neurodegenerativo contribuem com o acúmulo desses agregados protéicos uma vez que, apresentando a proteína em altas concentrações no processo neuroinflamatório produz os exemplares tóxicos da proteína (MINAGAR et al., 2002; SEKIYAMA et al., 2012).

Já foi demonstrado que a dopamina se liga de forma covalente a α -sin resultando em um composto citotóxico. As proteínas “misfolded” se ligam com maior avidéz à dopamina estando relacionadas de forma dose-dependente a uma maior toxicidade celular que resulta em maior neurodegeneração dopaminérgica (MULLIN & SCHAPIRA, 2013).

Ainda que a mutação genética da α -sin seja rara, existem fortes evidências de que esta proteína esteja envolvida, de alguma forma, em virtualmente todos os casos de doença de Parkinson, já que ela constitui o componente majoritáriodos corpos de Lewy e dos neuritos de Lewis (SPILLANTINI et al., 1997).

1.2.2 Estresse oxidativo e Disfunção mitocondrial

Os neurônios e as células da glia contêm uma rede de mitocôndrias espalhadas ao longo dos axônios neurais com uma densidade máxima na área perinuclear. A função das células eucariontes é inteiramente dependente de um

suprimento de ATP abundante proveniente de mitocôndrias profícuas. Os neurônios são particularmente dependentes da fosforilação oxidativa devido ao seu processo dinâmico de remodelação sináptica. Defeitos mitocondriais provenientes de alterações no DNA mitocondrial, mutações de suas proteínas ou mesmo de insultos de agentes externos podem alterar o potencial de sua membrana e, se não controlados, levar à neurodegeneração (GORMAN & DOYLE, 2008; MULLIN & SCHAPIRA, 2013).

A observação, na década de 80, de que o uso do 1-metil-4-fenil-1, 2, 3,6-tetrahidropiridina (MPTP) promovia parkinsonismo, além de sugerir o envolvimento dos agentes ambientais na etiologia da doença abriu caminho para o estudo do estresse oxidativo na patogênese da DP, haja posto ser este agente um inibidor do complexo mitocondrial I e formador de radicais livres, inclusive da formação de óxido nítrico (NO) por meio do seu metabólito 1-metil,4-fenilpiridinium (MPP+) (LANGSTON et al., 1983; CLEETER et al., 1992).

O estresse oxidativo, resultado do aumento da formação ou defeitos na inativação das espécies reativas de oxigênio (EROs) citotóxicas, pode iniciar ou promover a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na doença de Parkinson (ABRAHAM et al., 2005). A citotoxicidade dos EROs se relaciona a sua habilidade de oxidar constituintes celulares, especialmente lipídios e ácidos nucleicos levando a uma deterioração da arquitetura estrutural e de sinalização celular resultando na morte neuronal tanto por necrose quanto por apoptose (EBADI & HIRAMATSU, 2000; BARNHAM et al., 2004).

Existem várias fontes de EROs na doença de Parkinson, desde as altas concentrações de ferro, naturalmente presentes na substância negra, adicionado às alterações na regulação do mineral observada em cérebros de pacientes (DEXTER et al., 1987), até o próprio sistema dopaminérgico nigroestriatal, uma vez que a dopamina, a despeito de imprescindível para o funcionamento normal dos gânglios da base, pode ser oxidada gerando espécies pró-oxidantes através da auto oxidação ou pelo catabolismo enzimático via monoaminoxidase, prostaglandina H ou tirosinase (GRAHAM, NAPPI & VASS, 2001; TSE et al., 1976).

Um importante fator contribuinte para o EO consiste na disfunção do Complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria em cérebros de humanos com DP (observação *post-mortem*) (SCHAPIRA et al. 1989, 1990). Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* da doença foram desenvolvidos com utilização de inibidores do complexo I como o MPTP, a rotenona e a 6-OHDA, que provocam uma diminuição de até 40% da atividade do complexo mitocondrial I (BETARBET et al., 2002).

O complexo I consiste em 8 grupamentos Ferro-Enxofre necessários para o transporte de elétrons. Na DP as anormalidades nas ações enzimáticas são encontradas apenas na parte compacta da substância negra (REICHMANN & JANETZKY; 2000). O estudo da atividade de enzimas que contém ferro é importante na DP devido à sobrecarga de ferro encontrada na substância negra dos pacientes (*post mortem*), particularmente de Fe^{3+} enquanto que o cérebro e a cadeia respiratória enzimática apresentam grandes quantidades da isoforma reduzida, Fe^{2+} (GRIFFITHS et al., 1999; SIAN-HÜLSMANN et al., 2011) A neuromelanina, pigmento encontrando de forma abundante na substância negra, tem capacidade de se ligar ao Fe^{3+} e outros cátions, inclusive os provenientes da oxidação da dopamina, promovendo desta forma um efeito citoprotetor (FRIEDMAN & GALAZKA-FRIEDMAN, 2001). Não obstante, a concentração deste pigmento nos pacientes com DP é inferior à metade da encontrada em indivíduos saudáveis, indicando que, de alguma forma, ela está envolvida na neurodegeneração da SN (ZECCA et al., 2002).

Os neurônios são particularmente susceptíveis aos agentes oxidantes devido a sua elevada atividade metabólica associada à relativa pequena quantidade de antioxidantes endógenos no cérebro. Em condições fisiológicas, a contínua produção de radicais livres é compensada pela potente ação de enzimas protetoras as quais seriam: superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, que representam as mais importantes enzimas antioxidantes presentes no corpo para proteção contra a toxicidade de EROs (YU, 1994). O estresse oxidativo encontrado no cérebro de pacientes com Parkinson pode ser, pois, resultado de uma redução de eficiência da atividade destes sistemas antioxidantes, tornando a SN ainda mais vulnerável ao EO, dado já ratificado por uma ampla variedade de estudos (URAKAMI et al., 1992; ABRAHAM et al., 2005; BARLOW et al., 2006).

1.2.3 Excitotoxicidade

O glutamato, aminoácido excitatório cerebral, exerce um importante papel no dano neuronal encontrado em condições patológicas. O processo de excitotoxicidade induzida pelo glutamato resulta de uma estreita interação sinérgica entre estresse oxidativo e dano mitocondrial. Embora tanto os receptores ionotrópicos quanto metabotrópicos do glutamato tenham participação do processo excitotóxico, os do tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) parecem desempenhar um papel central (LAU & TYMIANSKI, 2010).

O principal elemento patológico da excitotoxicidade do glutamato é a alteração da homeostasia do Ca^{2+} , e, a jusante, a superativação dos receptores de NMDA. A ativação destes receptores evoca uma sobrecarga de cálcio na célula que estimula a síntese de NO em quantidades tóxicas (ZÁDORÍ et al., 2012).

Além da ativação de enzimas que amplificam o dano celular, os níveis elevados de cálcio podem exceder a capacidade de sequestro de cálcio pela mitocôndria, levando a uma disfunção mitocondrial e programação de morte celular (ZÁDORÍ et al., 2012). Alterações na captação do glutamato, mediada por seus transportadores específicos também podem provocar aumento na sua concentração extracelular acompanhado, inexoravelmente, do dano excitotóxico (ICHAS & MAZAT, 1998).

1.2.4 Neuroinflamação

A neuroinflamação apresenta ações antagônicas podendo ser benéfica, uma vez que efetivamente permite remoção de detritos patogênicos e facilita a liberação de moléculas imunomoduladoras como citocinas e quimiocinas que podem fornecer suporte para as células vizinhas após um insulto tóxico, ou apresentando potencial nocivo por meio de uma resposta descontrolada que pode ser elicitada após a ativação microglial (ZECCA et al., 2003; BUTOVSKY et al., 2005; ZHANG et al., 2005, 2007; KIM et al., 2007).

Várias evidências apontam para o envolvimento do processo neuroinflamatório no desenvolvimento e progressão da Doença de Parkinson. Os fatores imunogênicos liberados pelos neurônios dopaminérgicos lesionados tem potencial para desencadear respostas imunológicas nocivas, tanto inatas quanto adaptativas, além de conseguirem amplificar o processo patológico. Estes mecanismos não apenas sugerem uma complexa comunicação entre o sistema nervoso e o sistema imunológico periférico, mas a interação entre as células imunes residentes do cérebro (isto é, as micróglia) e outras células do parênquima cerebral como as células endoteliais, os astrócitos e os próprios neurônios (HIRSCH et al., 2012).

Antígenos endógenos que normalmente não são encontrados em condições fisiológicas podem desencadear uma resposta imune adaptativa na DP. Este conceito é amparado pela presença de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ nos cérebros de pacientes com Parkinson aliado à ausência de linfócitos B e das células NK. Corroborando com estes dados, estudos experimentais com ratos intoxicados com MPTP indicam que os linfócitos T CD4⁺ contribuem para o processo neurodegenerativo através de um mecanismo envolvendo a via Fas/FasL. O antígeno envolvido nesta resposta adaptativa e na infiltração linfocitária mesmo que ainda não formalmente identificado, seriam os epítomos de α -sinucleína modificados e oxidados (BROCHARD, et al., 2009; HIRSCH et al., 2012).

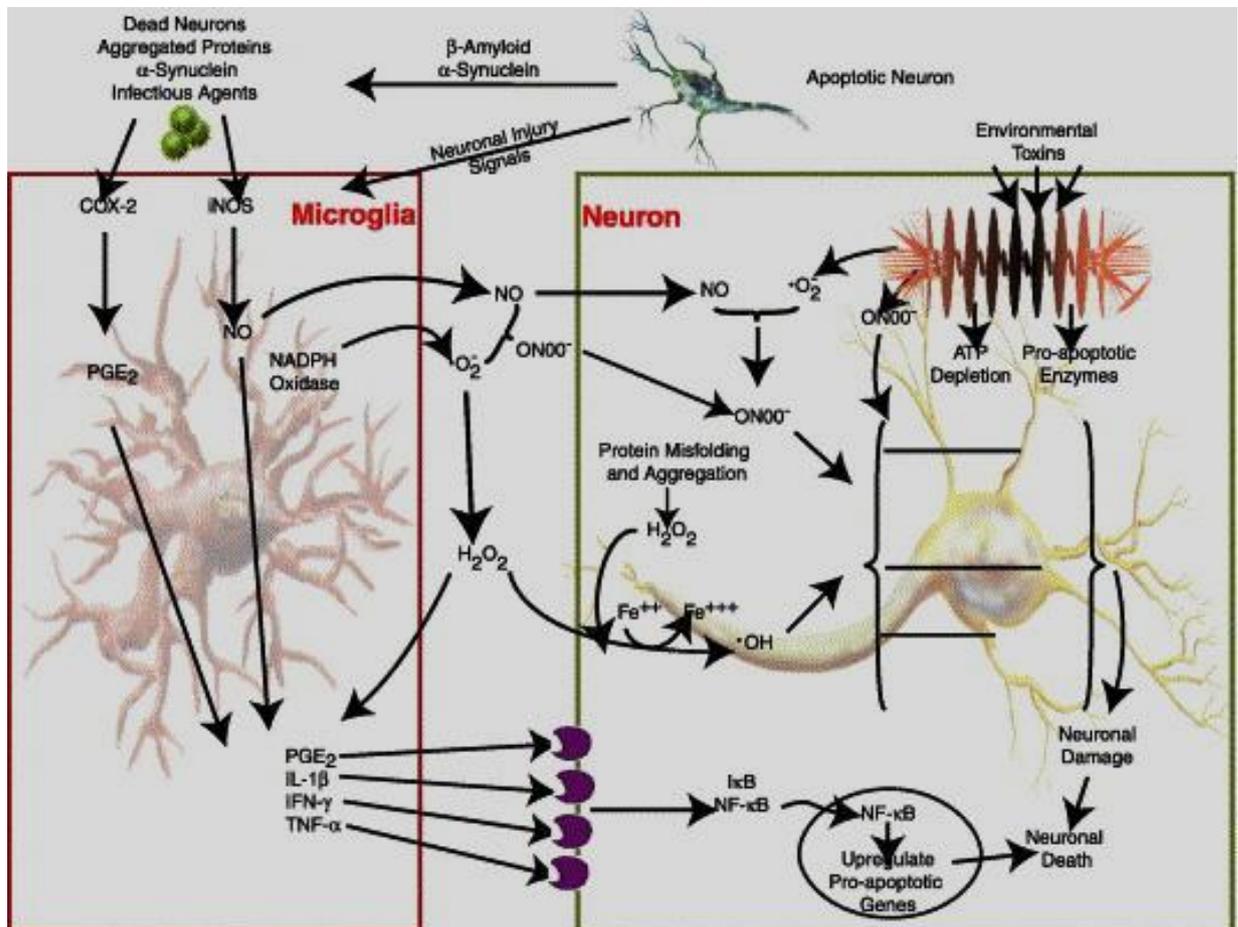
A α -sinucleína, como anteriormente explicitado, por si só, não é tóxica mas, ao induzir a ativação microglial, acaba contribuindo para uma resposta neuroinflamatória lesiva caracterizada pela liberação de EROs como radicais superóxido (ZHANG et al., 2005). A metaloproteinase-3, enzima envolvida na degradação da matriz celular, também ativa a micróglia durante a degeneração dopaminérgica (KIM et al., 2005), assim como a neuromelanina, um subproduto do catabolismo das catecolaminas, que é detectada fora dos neurônios catecolinérgicos degenerados e captada pelas micróglia sendo um potente gatilho para a ativação das mesmas e provocando um "*up-regulation*" das vias de sinalização do NF- κ B e do mitógeno p38 ativado pela proteína quinase ativada (MAPK) (BARTELS et al., 2010). Como desfecho, os neurônios em degeneração que emitem essas substâncias pró-inflamatórias, causam ativação de micróglia, criando um círculo vicioso de dano neuronal na doença de Parkinson (OUCHI et al., 2009).

O cérebro além de possuir uma situação de proteção privilegiada fornecida pela Barreira Hemato-Encefálica, ainda conta com a ação dos astrócitos e micróglia residentes que agem como uma resposta imune inata, tendo papel ativo na manutenção da homeostase do ambiente neuronal por meio da liberação de fatores neurotróficos e da fagocitose de detritos (NAPOLI & NEUMANN, 2009). Não obstante, chegou-se a conclusão de que a neuroinflamação é perigosa para os neurônios da SNpc. Vários estudos já mostraram que a micróglia ativada produz e libera em excesso vários compostos perigosos como as EROs, as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) além de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (PRZEDBORSKI, 2005; LONG-SMITH et al., 2009). Os mecanismos sugeridos de ativação da micróglia incluem a atividade dos receptores Toll-like (TLR), o NF- κ B, iNOS, COX-2 além de interleucinas (PRZEDBORSKI, 2007; LONG-SMITH et al., 2009).

Já foi observado que na SNpc saudável a concentração de micróglia é maior que nas demais partes do cérebro, e que esta população de células aumenta com a idade (BEACH et al., 2007). Além de sujeita aos efeitos deletérios do estresse oxidativo pelas altas concentrações de ferro nos neurônios dopaminérgicos a SN se torna por este motivo ainda mais sensível à neurodegeneração (JENNER et al., 1996).

As micróglia ativadas são recrutadas para SNc se fixando nos neurônios dopaminérgicos e, uma vez ativadas, se tornam fagocíticas e ingerem os neurônios degenerados (SUGAMA et al., 2003). Alguns compostos nocivos são liberados neste processo provocando eventos pró-apoptóticos (**Figura 5**) (TEISMANN et al., 2003b; OUCHI et al., 2005).

As células da glia, como os astrócitos e micróglia possuem papel central na inflamação neuronal. Quando o antígeno do Complexo Principal de Histocompatibilidade é expresso na superfície de suas membranas, as células da micróglia se tornam fagocíticas (HAYES et al., 1988), além de liberarem mediadores inflamatórios como as citocinas IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ e ativarem a iNOS, agentes profundamente envolvidos na lesão celular não apenas na área da inflamação como em todo o processo neurodegenerativo (PANEK et al., 1992; OUCHI et al., 2005).



MOSLEY et al., 2006

Figura 5. Vias da neuroinflamação e do estresse oxidativo na patogênese da doença de Parkinson. Os radicais livres podem ter origens a partir de diversas fontes, como a ativação glial, a disfunção mitocondrial e a agregação protéica. O NO e o radical superóxido, derivados da ativação da micróglia, reagem no ambiente extracelular para formar peroxinitrito, que atravessa as membranas celulares contribuindo para a peroxidação lipídica, danos ao DNA e formação de nitrotirosina na α -sinucleína. Quando as espécies reativas de oxigênio sobrepõem as defesas anti-oxidantes, o estresse oxidativo está gerado; provocando destruição de estruturas moleculares como proteínas, lipídios e DNA e que contribuem para o dano irreversível, lesão neuronal e morte.

Alguns estudos *post-mortem* mostraram que a micróglia e o complemento estavam ativados especificamente na SNpc de pacientes com DP (BANATiet al., 1998; BARTELS&LEENDERS, 2009). Os níveis de citocinas inflamatórias como IL-1b, IL-2, IL-6 e TNF- α também estavam aumentados no estriado e fluido cérebro espinhal desses pacientes. Igualmente, foi observado um aumento nas concentrações de iNOS e COX-1 e 2, amplificando a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos (NAGATSU et al., 2000; OUCHI et al., 2005). A perda de neurônios dopaminérgicos já foi relacionada com a ativação de micróglia na substância negra (McGEER et al., 1988; VILA et al., 2001; AKIYAMA & MCGEER, 1989; GAO et al., 2002; SUGAMA et al., 2003; McGeer et al., 2003) e o acúmulo de marcadores de micróglia ativada, com a severidade dos sintomas motores em pacientes com Parkinson (OUCHI et al., 2005).

Fica evidenciado que, diferente do que se pensava, as micróglia não agem apenas em resposta a um dano neuronal, estando de fato intimamente envolvidas na progressão da degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Na discussão sobre futuros tratamentos para DP, a detecção e avaliação da neuroinflamação após terapia é uma questão central, o que será possível com o auxílio de técnicas de imagem (OUCHI et al., 2009). Hong (2012) propôs uma terapia direcionada especificamente para a resposta glial sendo esta amparada por dois pilares: modulação da atividade da micróglia, tornando a neuroinflamação mais controlada e aumentando a liberação de fatores neurotróficos pelos astrócitos. Ele já observou que algumas moléculas, como o valproato e a memantina, apresentam este efeito.

1.3 A levodopa no tratamento da Doença de Parkinson

Mais de quatro décadas após a descoberta de que a dopamina era o neurotransmissor provavelmente envolvido no controle dos movimentos, o farmacologista sueco Arvid Carlsson ganhou o prêmio Nobel de Medicina/Fisiologia em 2000. Sua descoberta levou direta e rapidamente ao desenvolvimento da Levodopa (L-DOPA), um precursor da dopamina que atravessa a barreira

hematoencefálica constituindo um tratamento revolucionário para a Doença de Parkinson (BENES, 1999).

Em 1913, Marcus Guggenheim, um bioquímico da empresa Hoffmann-la Roche® em Basel, Suíça, isolou o enantiômero puro da L-DOPA do feijão da planta *Vicia faba* (**Figura6**). Guggenheim testou em si a substância que acreditava ser tóxica e foi vitimado por episódios violentos de vômitos, entendidos posteriormente com a descoberta de que a L-DOPA era convertida periféricamente em dopamina, um potente agente emético (GUGGENHEIM, 1913 apud HORNYKIEWICZ, 2010)



Figura 6. Planta e feijões da *Vicia faba*.

A L-DOPA entrou no cenário clínico no fim dos anos 60 como uma droga milagrosa, capaz de “desbloquear” ou “acordar” pacientes imobilizados por anos ou décadas vítimas da progressiva e incapacitante DP. Não obstante, com igual rapidez, seus efeitos adversos graves e debilitantes emergiram. Dentre eles as discinesias, caracterizada por movimentos involuntários, e o efeito de “liga/desliga” da droga que provoca repentinamente o “congelamento” do paciente, interrompendo suas atividades motoras (ABBOTT, 2010).

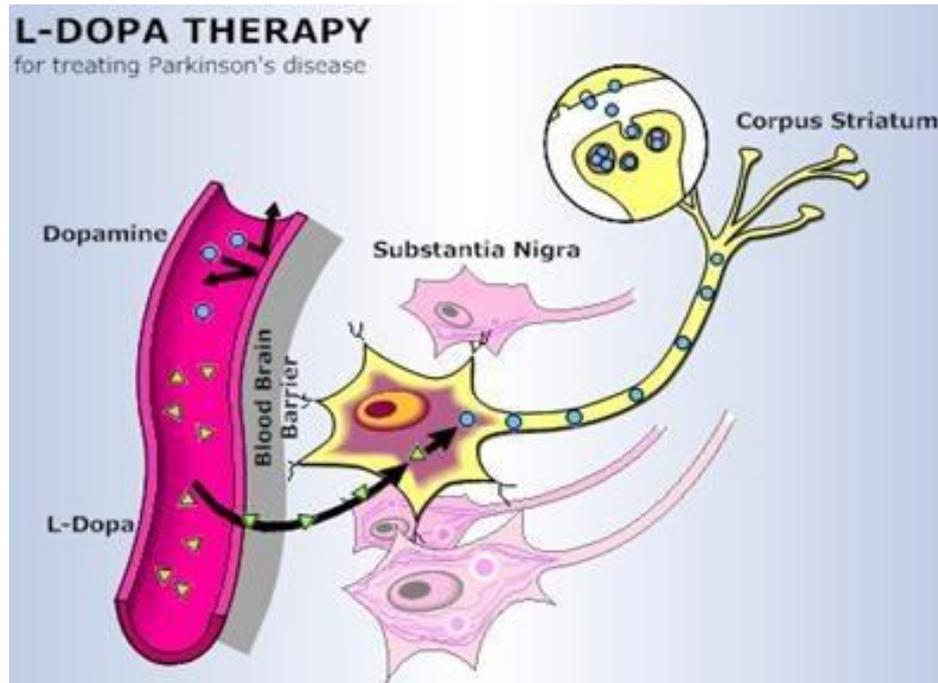
Os estudos de Carlsson (1957) mostraram que a L-DOPA revertia a catatonia de coelhos sob a ação da reserpina e em 1960 ele apresentou uma pesquisa mostrando que a dopamina atuava como um neurotransmissor e estava envolvida na patogenia da DP (CARLSSON et al., 1957 apud ABBOTT, 2010). Sua pesquisa não foi recebida com entusiasmo até que um cientista austríaco, Oleh Hornykeiwicz, decidiu observar os níveis de dopamina em cérebros de pacientes que tinham

Parkinson e encontrou que os corpos estriados dos mesmos apresentavam depleção completa de dopamina. Com dados em mãos e forças unidas, em 1961, com a ajuda do neurologista Walter Birkmayer, 20 pacientes com sintomas severos de Parkinson receberam uma injeção de L-DOPA. O resultado foi excelente, a despeito de temporário: por algumas horas a rigidez muscular deu lugar a movimentos (BIRKMAYER & HORNYKIEWICZ ; 1961 apud HORNYKIEWICZ, 2010).

Alguns anos depois, o neurologista George Cotzias, iniciou um teste clínico com a forma oral da L-DOPA; em 1968 publicou um estudo de dois anos de duração realizado com 28 pacientes e, em 1970, o FDA aprovou a droga para comercialização (COTZIAS et al, 1969).

No cérebro, a L-DOPA é tratada como se tivesse sido produzida pelo organismo. Ela penetra nos neurônios dopaminérgicos ficando brevemente armazenada antes de ser convertida em dopamina e liberada mediante a estimulação nervosa. Os terminais nervosos funcionam como um tampão, a curto prazo, das variações dos níveis sanguíneos permitindo que o efeito do fármaco se mantenha entre as doses (**Figura 7**).

Com a progressão da doença e a destruição progressiva dos terminais dopaminérgicos a capacidade de tamponamento encolhe e o efeito terapêutico da L-DOPA começa a se refletir nos níveis sanguíneos. Como isto promove as terríveis discinesias ainda não é certo, mas a teoria prevalente sustenta que, por conta da depleção dopaminérgica, os neurônios se tornam mais sensíveis à dopamina externa como forma de compensação, reagindo de forma exagerada à dopamina derivada da L-DOPA. Já o fenômeno de liga-deliga ainda não é compreendido uma vez que os períodos em que a droga não faz efeito não correspondem exatamente aos períodos em que seus níveis plasmáticos estão baixos (JAIN et al., 2012)



<http://www.parkinsonism.net/diagnose/l-dopa.htm>

Figura 7. Mecanismo de ação da L-DOPA. A L-DOPA atravessa a barreira hematoencefálica se armazenando nos neurônios dopaminérgicos que, através da ação da DOPA descarboxilase a transforma em dopamina. Dito posto, com a progressão da doença e rareamento dos neurônios dopaminérgicos, o tratamento apresenta uma diminuição de efeito adicionado a um aumento de ocorrência dos incapacitantes efeitos adversos. Para evitar a formação de dopamina periféricamente, a L-DOPA deve ser administrada com inibidores das descarboxilases periféricas.

A levodopa tem tempo de meia-vida muito curto e é rapidamente convertida em dopamina no plasma por ação da descarboxilase periférica, causando náuseas e vômitos. Este fato serviu de estímulo para a elaboração de preparações farmacêuticas de associações entre levodopa e inibidores da descarboxilase periférica, como a carbidopa, liberadas pelo FDA em 1988 (JAINet al., 2012). Mais recentemente os clínicos vêm adicionando à farmacoterapia para Parkinson inibidores das enzimas que degradam a dopamina, MAO e COMT, visando refinar a terapia com a levodopa, postergando ao máximo o seu início, aumentando o seu

tempo de meia-vida e diminuindo, o quanto pode, a sua dose (RIEDERER& LAUX, 2011).

Desde que surgiu há 40 anos, a L-DOPA persiste como esteio do tratamento da doença de Parkinson. Infelizmente, além do fato de provocar efeitos adversos incapacitantes e preditores de uma má qualidade de vida e não adesão terapêutica, a levodopa não diminui ou ao menos atrasa a progressão inexorável da doença, atuando, portanto como um mero paliativo (HORNYKIEWICZ, 2010).

1.4. *Myracrodruon urundeuva* Allemão

1.4.1 Aspectos botânicos e químicos

AMyracrodruon urundeuva Allemão, popularmente conhecida por aroeira-do-sertão, é uma árvore da família Anacardiáceae de tronco alto e copa larga formada por ramos flácidos que, quando novos, são revestidos por pêlos. A madeira tem cerne roxo-escuro, é muito dura e difícil de ser lavrada. Cresce nos sopés de serra e tabuleiros, justificando, pois, sua denominação de Aroeira do sertão (**Figura 8**). O extrato acetato de etila, preparado a partir da entrecasca triturada e previamente desengordurada com hexano, foi selecionado para fracionamento monitorado, devido ao seu melhor comportamento cromatográfico. Este procedimento resultou na separação de sete frações úteis, das quais, duas, codificadas como F(8-13) e F(18), apresentaram maior rendimento e destacada atividade anti-inflamatória (RAO *et al.*, 1989). Este trabalho de investigação e identificação de constituintes químicos ativos demonstrou que a atividade terapêutica da planta depende da presença de um complexo fitoterápico, ao invés de simplesmente um princípio ativo. Deduziu-se esta conclusão, a partir da detecção dessas frações ativas (BANDEIRA, 1993). A análise da primeira, F(8-13), com rendimento de 8,83%, permitiu concluir tratar-se de uma mistura de chalconas diméricas: as urundevinas A, B e C. A segunda, F(18), com rendimento de 31,45%, mostrou-se constituída predominantemente por taninos (BANDEIRA, 2002).

Tanto a fração enriquecida com chalconas quanto a rica em taninos demonstraram ações farmacológicas. Identificaram-se, nas folhas, os flavonóides quercetina, aromadendrinol, agastisflavona e constituintes do óleo essencial, entre outros. A presença dessas substâncias indica que a aroeira-do-sertão, além de

patrimônio ecológico, é um recurso fármaco-químico. Por outro lado, os brotos em intensa atividade metabólica poderiam produzir os mesmos constituintes ativos da entrecasca, existindo assim a possibilidade de substituir, para uso medicinal, a entrecasca pelos brotos e renovos. Não obstante, faz-se necessária a realização de estudos clínicos para avaliação da segurança e eficácia, para que essa espécie medicinal e seus constituintes bioativos possam efetivamente fazer parte do arsenal terapêutico.

1.4.2 Ações Farmacológicas

Atualmente, a aroeira-do-sertão devido ao seu secular uso pela população do nordeste e especialmente do Ceará, faz parte da Relação de Plantas Medicinais do Estado do Ceará (REPLAME). Estudos etnofarmacológicos referem o uso da casca do tronco desprovida de súber, ou seja, a entrecasca, como um remédio vegetal de uso ginecológico mais freqüente e mais antigo, em medicina popular do Nordeste do Brasil, citando seu emprego no tratamento, por via oral, de doenças do aparelho respiratório, do aparelho urinário, nas hemoptises, hemorragias uterinas e diarreias, sob a forma de infuso ou decocto, e sua excelente reputação como cicatrizante, no tratamento caseiro das sequelas pós-parto, de ferimentos na pele e na boca, usando-se as preparações caseiras, concomitantemente, por via oral e por via tópica (MATOS, 2000; VIANA et al., 1997).

O uso popular da aroeira-do sertão direcionou os pesquisadores à pesquisa visando validar o emprego da planta além da descoberta de novas ações farmacológicas. Desta forma os extratos hidroalcoólico e aquoso da entrecasca da aroeira-do-sertão foram submetidos a estudos farmacológicos, tanto pré-clínicos quanto clínicos, evidenciando o potencial terapêutico da planta nas inflamações, úlceras gástricas e dores, aliados a ausência de efeitos tóxicos e teratogênese nas doses empregadas (RAO et al., 1987; BANDEIRA, 1993; MENEZES, 1986; VIANA et al., 1997;2003).

O extrato aquoso da planta é capaz de diminuir de forma significativa as lesões ulcerativas induzidas por ácido acetilsalicílico e histamina, corroborado pelo

estudo de Menezes (1999) que também verificou ação terapêutica do extrato em um modelo de colite difusa experimental (SOUSA et al., 2007).

Em várias plantas medicinais já estudadas, a atividade antiúlcera é atribuída ao conteúdo de flavanóides uma vez que estes apresentam uma atividade antioxidante pronunciada contra os radicais peróxila. Vários polifenóis tem mostrado aumento de prostaglandina gastroprotetora (PGE_2) e muco na mucosa gástrica, mostrando efeito citoprotetor. Outros previnem a lesão da mucosa, protegendo-a contra diferentes agentes necróticos utilizados em modelos experimentais de úlcera (ALANKO et al., 1999; REPETTO & LLESUY, 2002). A aroeira-do-sertão apresenta elevada concentração de flavonóides sendo provavelmente esses compostos prováveis responsáveis pelas ações farmacológicas da planta.

Chaves (1998) estudou o efeito da planta sobre o transito gástrico e observou que na dose de 400mg/kg o extrato etanólico da casaca de *M.urundeuva* inibe a diarreia, a hipersecreção e o aumento do transito intestinal induzido por óleo de cróton. Observou também inibição da contratilidade evocada pela acetilcolina e histamina em órgão isolado (íleo) de cobaias.



Figura 8. *Myracrodruon urundeuva*Allemão.

O estudo fitoquímico da *M. urundeuva* isolou duas frações da aroeira-do-sertão: uma rica em taninos e outra rica em chalconas diméricas (VIANA et al., 1997;2003). A fração rica em taninos causou inibição da migração de neutrófilos e

leucócitos induzida por carragenina. Como o recrutamento de neutrófilos induzido pela carragenina é dependente de mediadores quimiotáticos liberados pelas células residentes (SOUZA et al., 1988), é possível que o efeito da fração tanínica se deva a inibição da liberação de quimiocinas como o LBT4 ou a IL-8. Como em outras condições, o TNF- α tem papel importante na liberação de mediadores como IL-1, prostaglandinas, PAF e bradiginina, é possível que a fração rica em taninos possa inibir a liberação de TNF- α e IL-1 além de mediadores secundários (VIANA et al., 1997).

Menezes (1986) e Viana (1995) estudaram o efeito do extrato hidroalcoólico da entrecasca da aroeira-do-sertão sobre a degradulação de mastócitos observando ação estabilizante da membrana além do efeito anti-histamínico e antibradiginina que podem estar envolvidos na mediação da atividade antiinflamatória da planta.

Também foi observado que o efeito antinociceptivo da fração tanínica da Aroeira-do-Sertão não é revertido pela naloxona, indicando que o sistema opióide não está envolvido na atividade, sugerindo uma ação periférica. No teste da formalina a ação foi melhor na segunda fase, de forma similar à aspirina, sugerindo sua provável inibição da síntese de prostaglandinas (VIANA et al, 1997).

A planta vem sendo estudada em todo o país e algumas outras ações com propósitos médicos variados já foram demonstradas, como o efeito antibacteriano do óleo essencial (MONTANARI et al., 2012); a atividade inseticida contra o *Aedes aegypti* demonstrada pelo extrato e, agora pelo m-pentadecadienil-fenol isolado das sementes da planta (SOUZA et al., 2012); atividade antiviral do extrato bruto sobre o rotavirus (CECÍLIO et al., 2012); atividade antiproliferativa e citotóxica do extrato etanólico das sementes no modelo de viabilidade celular MTT em células cancerosas humanas (FERREIRA et al., 2011) e o efeito anticariogênico apresentado pelo extrato aquoso em modelo experimental em ratos (CRIVELARO DE MENEZES et al., 2010).

Nobre-Junior e colaboradores (2009), mostraram que a fração enriquecida de chalconas reduziu a morte celular induzida pela 6-hidroxiopamina (6-HODA), além de inibir a peroxidação lipídica e prevenir a necrose, induzida por esta neurotoxina,

sugerindo que as chalconas obtidas a partir de *M. urundeuva* podem ser benéficas em doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson.

A variedade de efeitos atribuídos à planta já era de se esperar. Pertencente à caatinga, bioma caracterizado por apresentar vegetação continuamente exposta ao estresse ambiental, especialmente associado à falta de água, excesso de luminosidade e temperatura, a planta elabora respostas a estes fatores desenvolvendo mecanismos de defesa química que estão associados à produção de metabólitos secundários ou “princípios ativos”, os quais apresentam efeitos farmacológicos sendo, por isso, tão visados e estudados para a produção de novos medicamentos (Di STASI et al., 1995).

1.4.3 Toxicidade

Recentemente, um estudo de toxicidade realizado por Carlini e colaboradores (2012) revelou que o tratamento crônico, de 83 dias, não promoveu nenhuma alteração significativa nos animais tratados com o extrato da planta (13.8 mg/kg/dia), sugerindo sua segurança. Não obstante, em estudo de Bandeira (2002) ficou evidenciado que o tratamento por período prolongado com a planta apresentar toxicidade em ratas prenhes (BANDEIRA, 2002).

Os principais sinais de toxicidade produzidos pela administração intraperitoneal do extrato hidroalcoólico, em ratos (50 a 1600 mg/kg de peso), foram: ptose, piloereção e diminuição da atividade motora espontânea. Com doses acima de 1600 mg/kg de peso, por via intraperitoneal, os animais depressão, seguida de coma e morte por parada respiratória. A maioria das mortes ocorridas dentro de 48 horas. A DL₅₀ do extrato administrado por via intraperitoneal, pelo método de Miller e Tainter, foi de 2.2 g/kg de peso. Doses de até 5000 mg/kg de peso, por via oral, não mostraram qualquer alteração comportamental nos animais (VIANA *et al.*, 1995).

A toxicidade subaguda foi testada em cães, tratados durante 30 dias consecutivos com 200 mg/kg de extrato aquoso, administrado por via oral. Durante o tratamento, não houve qualquer alteração no consumo de alimentos nem no comportamento dos animais. Nenhuma reação clínica significativa ou morte ocorreu (MENEZES, 1986; RAO, VIANA, GADELHA, 1988).

A toxicidade semicrônica foi realizada em ratos tratados diariamente por via oral com 200 a 400 mg/kg de extrato, por um período de 90 dias. Todos os animais apresentaram aumento de peso, não obstante não foi observada qualquer alteração comportamental e os animais mantiveram-se saudáveis durante todo o período. As taxas de mortalidade, com as doses de 200 e 400 mg/kg, foram de 20 e 30%, respectivamente. Os resultados das autópsias não revelaram nenhuma alteração que pudesse ser correlacionada com a administração do extrato. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos, dos grupos controle e experimental, mantiveram-se dentro dos valores normais. Nenhuma lesão ou alteração foi observada nos órgãos ou na relação órgão/peso corporal dos animais, sacrificados no final do experimento (MENEZES, 1986).

1.4 .4 Testes clínicos

A segurança observada nos testes de toxicidade conduziu a planta aos testes clínicos. O Elixir (7%) da aroeira-do-sertão foi testado em 12 pacientes com úlcera gástrica nas doses de 1 e 2 g de elixir por dia durante 30 dias consecutivos. Ao final da segunda semana todos os pacientes se encontravam assintomáticos. O exame endoscópico mostrou que ao final do tratamento, 75% dos pacientes apresentaram cicatrização completa dos processos ulcerosos. Dentre os participantes apenas um relatou constipação não havendo outro efeito colateral referido (VIANA *et al.*, 1988; VIANA *et al.*, 1995).

Não foram detectadas alterações no eletrocardiograma, no hemograma, nos exames bioquímicos, nem no sumário de urina. A administração de 30 ml diários do elixir de aroeira-do-sertão, em voluntários sadios durante 28 dias, pois não apresentou efeitos tóxicos, no entanto recomenda-se que o elixir-de-aroeira do sertão seja administrado após a ingestão de alimentos (MELO *et al.*, 1998).

O creme vaginal de *Myracrodruon urundeuva* (15%) também foi testado clinicamente em um grupo de 6 pacientes com cervicite e ectopia. O creme foi administrado por via intravaginal por meio de aplicador a cada 24 horas durante 15 dias, havendo após este tratamento melhora significativa de todos os casos. Através da colposcopia de controle, observou-se que as áreas de ectopia haviam sofrido processo de repitelização significativo (VIANA, 1995).

Campos (2008) realizou um estudo do uso do creme vaginal de aroeira com 33 mulheres que receberam indicação e prescrição do uso do creme vaginal de aroeira,

sendo que 18 (54,5%) completaram todas as fases do estudo (pré-tratamento, pós-tratamento e exames clínicos em ambas as fases). Para a diagnose de cervicite, foi prescrita umabisnaga de 50 g de creme vaginal, correspondendo a 10 dias de tratamento (5 g/dia/aplicação) e, quando da diagnose de ectopia, três bisnagas de 50 g de creme vaginal, correspondetes a 30 dias de tratamento, sendo que no período menstrual o tratamento (5g/dia/aplicação) era temporariamente interrompido.

Entre as 18 mulheres constantes da amostra: onze apresentaram um processo inflamatório que, após a terapêutica, evoluiu para cura; fato este corroborado pelas observações dos potentes efeitos anti-inflamatórios por parte dos taninos e chalconas diméricas, constituintes químicos integrantes da aroeira, pela inibição da produção de NO e TNF- α , nos macrófagos, e a inibição multifatorial da PGE-2, bem como por induzir a produção da enzima citoprotetiva Heme-Oxigenase-1 (HO-1). Tais observações foram feitas por Matos (2000); Bandeira (2002); Albuquerque, Rodrigues e Viana (2004) e Sawle (2008).

A aroeira-do-sertão também apresenta efeito antibacteriano e antifúngico, como asseveram estudos de Viana (1995), Soares (2006), Nobre-Junior (2009), e o Creme Vaginal de Aroeira também demonstrou ação terapêutica neste sentido, pois, das dezoito mulheres pesquisadas, 14 apresentavam indícios de contaminação por Trichomonas, Clamídia e Candidíase (JARVIS, 2002; ANDRIS, 2006; FREITAS et al, 2006) e tiveram diminuição ou cura da contaminação.

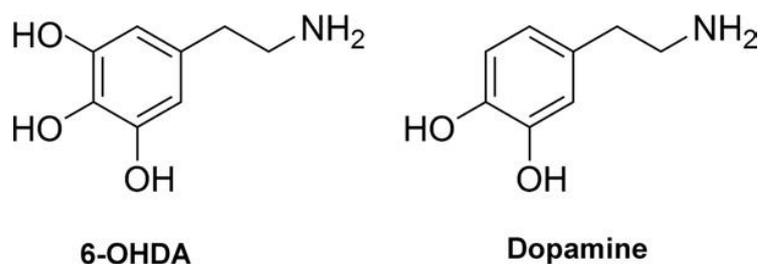
1.5 Modelo experimental de Parkinsonismo induzido por 6-OHDA

A fim de entender os mecanismos envolvidos, assim como desenvolver novas drogas e terapias para a doença de Parkinson, vários modelos experimentais validados que mimetizam da forma mais exata possível os sintomas chaves da doença e a sua evolução lenta são empregados (TERZIOGLU & GALTER, 2008). O modelo experimental de Parkinson induzido por 6-OHDA é considerado clássico e tem sido empregado por muitos anos no *screening* de novas drogas antiparkinsonianas (GALDINI et al., 2008).

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA), toxina dos neurônios catecolinérgicos, é um derivado hidroxilado da dopamina que foi pela primeira vez utilizada na deservação simpática cardíaca e, logo depois, no sistema nervoso central (UNGERSTEDT, 1968). A droga também tem sido empregada como quimioterápico

em casos de neoplasmas catecolinérgicos (SCHOR et al., 2004). Também já foi detectada no cérebro e urina de pacientes de Parkinson (ANDREW et al., 1993), uma 6-OHDA endógena formada a partir da dopamina por uma hidroxilação não enzimática na presença de Fe^{2+} e H_2O_2 , sugerindo seu envolvimento na patogênese da DP (LINERT et al., 1996).

A toxina não atravessa a barreira hematoencefálica logo, a injeção deve ser estereotáxica no estriado, no feixe medial do mesencéfalo ou na substância negra, provocando a destruição da via nigroestriatal com depleção dopaminérgica rápida e irreversível. Tal seletividade para neurônios dopaminérgicos resulta da absorção desta toxina pelos transportadores de dopamina e de noradrenalina devido à semelhança estrutural desses neurotransmissores com a neurotoxina (**Figura 9**) (BOVÉ & PERIER; 2012).



BOVÉ & PERIER; 2012

Figura 9. Comparação entre as estruturas químicas da 6-Hidroxidopamina (6-OHDA) e da dopamina.

Soluções contendo 6-OHDA devem ser protegidas da luz além de conterem ácido ascórbico para evitar a sua oxidação, por ser esta uma droga sabidamente lábil. Rotineiramente tem sido utilizado o modelo de aplicação unilateral de 6-OHDA com o lado contralateral servindo de controle. A injeção bilateral de 6-OHDA tem sido evitada devido à necessidade de cuidados mais intensos requeridos pelos animais, assim como à alta mortalidade resultante da afagia, adipsia e convulsões provocadas pelo modelo (UNGERSTEDT, 1971). Adicionalmente, a injeção estriatal unilateral possibilita a observação do comportamento rotacional induzido pela

administração de agonistas dopaminérgicos como a apomorfina, atestando assim ocorrência da lesão (CENCI et al., 2002).

O mecanismo de lesão tóxica da 6-OHDA envolve a sua auto-oxidação, resultando na formação de peróxido de hidrogênio além dos radicais superóxido e hidroxila. Estas espécies reativas de oxigênio são neurotóxicas devido ao seu forte potencial de oxidação (HEIKKILA & COHEN, 1973; COHEN & HEIKKILA, 1974; KUMAR et al., 1995, BOVE et al., 2005).

O tratamento com 6-OHDA provoca a ativação de várias quinases incluindo proteinoquinases que regula o sinal extracelular (PKE) (KULICH & CHU, 2001; HORBINSKI & CHU, 2005), da glicogênio sintase quinase-3 β e da quinase ativada por estresse (EMINEL et al., 2004). Apesar de estudos indicarem um aumento de genes relacionados tanto à morte quanto à neuroproteção, o mecanismo de transcrição pelo qual a 6-OHDA modula a decisão de morte/sobrevivência da célula continua apenas parcialmente compreendido (RYU et al., 2005; CHALOVICH et al., 2006)

A despeito da elaboração de novos e mais elaborados modelos animais para a doença de Parkinson, a injeção unilateral de 6-OHDA permanece sendo a ferramenta mais utilizada para obter uma lesão nigrostriatal controlada devido à baixa complexidade e custo do procedimento. Não obstante, a injeção estereotáxica, seja na SNpc ou no estriado, apresenta alta reprodutibilidade contrastando com outros modelos onde a variabilidade individual consiste em fonte importante de erros. Este fato representa um considerável fator de adesão ao modelo mesmo antigo como o da 6-OHDA, onde novas estratégias terapêuticas devem ser investigadas e os efeitos neuroprotetores de novas drogas, esclarecidos, sendo útil na monitorização dos efeitos de diferentes tratamentos, que podem ser preventivos ou protetores, devendo ser administrados pouco antes ou pouco depois da cirurgia, quando a perda neuronal está sendo estabelecida (BLANDINI et al., 2008; PRZEDBORSKI et al., 1995).

2. Objetivos

2.1 Geral

Investigar o efeito do extrato hidroalcoólico líquido da casca de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (EHAMU) e extrato hidroalcoólico seco da casca de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (ESMU) em um modelo animal de doença de Parkinson produzido pela injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA em ratos.

2.2 Específicos

- ❖ Verificar os efeitos dos extratos EHAMU (5,10,20 e 40mg/kg) e ESMU (10 e 20mg/kg) da casca de *Myracrodruon urundeuva* Allemão sobre:
 - A movimentação espontânea e a coordenação motora em ratos submetidos à injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA através dos testes do campo aberto e do Rota-Rod, respectivamente;
 - O comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos submetidos à injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA;
 - As alterações nos níveis de neurotransmissores envolvidos no processo neurodegenerativo da DP, através da determinação dos níveis de dopamina e de seu metabólito DOPAC na área cerebral estudada através de HPLC em ratos submetidos à injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA;
- ❖ Verificar o efeito do extrato EHAMU sobre:
 - a perda neuronal através da coloração de Nissl em ratos submetidos à injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA
 - A marcação da enzima Tirosina Hidroxilase (TH) pelo método de imunohistoquímica;
- ❖ Avaliar os efeitos anti-inflamatórios dos extratos EHAMU (10 e 20mg/kg) e ESMU (10 e 20mg/kg) da casca de *Myracrodruon urundeuva* Allemão no edema de pata induzido por carragenina e atividade sobre a hiperalgesia térmica no teste de *Hargreaves*;
- ❖ Avaliar a atividade sequestradora de radical livre do ESMU (25,50 e 100µg/ml) pelo teste do difenil-2-picrilhidrazil (DPPH);

- ❖ Avaliar a atividade do ESMU (25,50,100,200 e 400µg/ml) sobre a superóxido dismutase utilizando a metodologia do NBT (Nitroblue-tetrazólio);
- ❖ Verificar o efeito do EHAMU (20 e 40 mg/kg, v.o) sobre:
 - A neuroinflamação induzida pela 6-OHDA através de imunohistoquímica para os mediadores de inflamação TNF- α , COX-2, iNOS e fator de transcrição NF- κ B no córtex, hipocampo e estriado de ratos submetidos ao modelo experimental de doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA;
 - A atividade glial (micróglia e astrócitos) no modelo experimental de doença de Parkinson induzido pela injeção estriatal unilateral de 6-OHDA através de imunohistoquímica para OX-42 e GFAP.

3. Metodologia

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso variando entre 180-200g provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina do Juazeiro do Norte (Estácio-FMJ). Os animais foram mantidos em caixas de prolipropileno com no máximo 6 animais, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água a vontade. O protocolo experimental foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA, nº protocolo: 43/13) da UFC e os experimentos realizados de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação.

3.2 Material botânico

O extrato hidroalcoólico foi feito a partir da casca do caule da *M. urundeuva*, número da exsicata no herbário Prisco Bezerra: 14.999. O extrato hidroalcoólico na preparação líquida foi fornecido pela professora Profa. Dra. Mary Anne Medeiro Bandejas do departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará e a preparação seca do extrato fornecida pela Profa. Dra. Luzia Kaline Almeida Moreira Leal do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará.

3.3 Preparo do Extrato Hidroalcoólico da casca do caule de *Myracrodruon urundeuva* Allemão

A extração do material foi realizada de acordo com o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira II edição (1959), em processo geral B para a obtenção de extrato fluido. O líquido extrator 1 foi preparado a partir de 50 mL de glicerina bidestilada, 300 mL de álcool, 150 mL de água. O líquido extrator 2 foi preparado através da mistura de etanol e água na proporção de 2:1.

Umedeceu-se exatamente cerca de 30 g da droga pulverizada (folha e caule dos brotos) com quantidade suficiente do líquido extrator 1. Deixou-se em maceração durante 6 horas em vaso coberto. A mistura foi introduzida em um percolador. Coletou-se 80 % (24 mL) do percolado e juntou-se aos poucos, o líquido extrator 2, mantendo excesso de líquido sobre a droga. Continuou-se a percolação com o líquido extrator 2, até total esgotamento da droga vegetal. O solvente foi evaporado em banho-maria a 60°C até consistência xaroposa. O resíduo foi

dissolvido na porção posta à parte, misturou-se bem e adicionou-se quantidade suficiente do líquido extrator 2 até obtenção de 30 mL.

Foi feito o doseamento, por espectrofotometria na área visível, de taninos e fenóis totais no extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* allemão apresentando uma porcentagem absoluta de 0,93% e 1,48% EAG (equivalente de ácido gálico), respectivamente (AGUIAR, 2013).

3.4 Preparo do Extrato Seco da casca do caule de *Myracrodruon urundeuva* Allemão

Primeiramente o extrato etanólico foi produzido segundo método I descrito na Farmacopéia Brasileira 1ª edição (SILVA, 1929). Para estudo de secagem foi utilizado o equipamento modelo MSD 1.0 fabricado pela LABMAQ do Brasil, constituído de um sistema de alimentação, bico aspersor do tipo pneumático, sistema de aquecimento, câmara de secagem, ciclone, recipiente de coleta e ducto de exaustão. O adjuvante de secagem foi utilizado numa proporção de 30% em relação do percentual de resíduo seco do extrato etanólico de aroeira. O teor de fenóis totais deste extrato é de $458,7 \pm 4,5$ (0,98%) ugEAG/mg* de extrato seco.

* µg de Equivalente ao ácido gálico por mg

3.5 Protocolo experimental

Os extratos hidroalcoólico (EHAMU 5,10,20 e 40mg/kg) e seco(ESMU 10 e 20mg/kg) de *Myracrodruon urundeuva* Allemão foram utilizados por via oral sendo administrados meia hora antes e uma hora depois da injeção estereotáxica de 6-OHDA e por 14 dias seguidos após a mesma.Ver protocolo experimental no **(quadro1)**.

Quadro 1: Protocolo de tratamento experimental

GRUPOS	TRATAMENTO
1	Controle Falso operado (injeção estriatal estereotáxica de água destilada + água destilada, v.o.) – 8 animais
2	Controle (6-OHDA+ água destilada, v.o.) – 8 animais
3	EHAMU 5mg/kg (6-OHDA + EHAMU 5mg/kg v.o.) – 8 animais
4	EHAMU 10mg/kg (6-OHDA + EHAMU 10mg/kg v.o.) – 8 animais
5	EHAMU 20mg/kg (6-OHDA + EHAMU 20mg/kg v.o.) – 8 animais
6	EHAMU 40mg/kg (6-OHDA + EHAMU 40mg/kg v.o.) – 8 animais
7	ESMU 10mg/kg (6-OHDA + ESMU 10mg/kg v.o.) – 8 animais
8	ESMU 20mg/kg (6-OHDA + ESMU 20mg/kg v.o.) – 8 animais

* Os animais utilizados nos testes de avaliação da atividade anti-inflamatória (edema de pata induzido por carragenina e Hargreaves) dos extratos Hidroalcoólico e Seco de *Myracrodruon urundeuva* receberam uma aplicação única dos mesmos (10 e 20mg/kg, v.o) uma hora antes do início do experimento.

3.6 Modelo experimental de Parkinson induzido por 6-OHDA

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina (15 mg/kg) e quetamina (75mg/kg) sendo então submetidos à tricotomia da área superior da cabeça e posteriormente fixados ao aparelho estereotáxico onde receberam injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA (duas injeções de 1µl de uma solução de 6-OHDA dissolvida em salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico) na dose de 12µg/µl dentro do corpo estriado direito (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 à partir do bregma) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986), usando uma seringa de Hamilton de 5µl. A seringa era deixada no local de aplicação por 5 minutos para assegurar que o seu conteúdo fosse injetado corretamente sendo depois retirada cuidadosamente (KIM ET AL, 1998).

3.7 Teste do campo aberto

Os animais previamente submetidos à lesão estriatal de 6-OHDA e ao tratamento de 15 dias com o EHAMU ou ESMU foram, no décimo quinto dia após a cirurgia, tratados por gavagem 60 minutos antes do início do teste. Os animais foram colocados no centro do aparato que consiste em um quadrado (72cm x 72cm x 36 cm) dividido em 4 quadrantes, sendo então observados durante 5 minutos com relação aos parâmetros: número de segmentos invadidos ou número de

cruzamentos (movimentação espontânea), número de comportamento de se levantar (rearing) e número de comportamento de autolimpeza (grooming). Após o fim do teste com cada animal, o aparelho foi lavado com solução de álcool a 5% a fim de evitar possíveis influências de odor deixado pelo sujeito experimental anterior (MONTGOMERY, 1955; FRUSSA-FILHO & PALERMO NETO, 1990).

3.8 Teste da barra giratória Rota Rod

O rota-rod consiste numa barra que gira numa velocidade de 12 rpm e que permite verificar o potencial de uma substância promover incoordenação motora, seja por sedação e/ou relaxamento (ROSLAND, HUNSKAAR, HOLE, 1990). Os animais receberam o EHAMU (5, 10, 20 e 40mg/kg, v.o) ou ESMU (10 e 20 mg/kg, v.o) gavagem sendo submetidos ao teste 60 minutos após. Neste teste foi contabilizado o número de vezes que o animal caiu da barra giratória no tempo de 60 segundos (DALLMEIER & CARLINI, 1981).

3.9 Teste rotacional com Apomorfina

Os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg,s.c), 15 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Neste teste foi observado durante 60 minutos o número de rotações contralaterais que o animal realizava em volta do próprio eixo (KIM et al., 1998).

3.10 Dissecção da área cerebral (corpo estriado, córtex e hipocampo)

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA) 16 dias após a cirurgia estereotáxica de 6-OHDA. Os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com uma pinça reta de microdissecção que divulsionou o córtex delicadamente, expondo o corpo estriado que foi retirado. Após pesados, os estriados foram guardados no freezer a -20°C ou colocados em formol tamponado e posteriormente álcool a 70% para o estudo histológico. Um corte coronal no nível do hipocampo (CA1, CA3 e giro), córtex cerebral e corpo estriado também foram realizados para posterior análise histológica.

3.11 Determinação de Dopamina e DOPAC com HPLC

Os níveis cerebrais de dopamina e DOPAC foram analisados em homogenatos do estriado a 10% preparados em tampão fosfato de sódio (150mM; pH 7,4) 2 semanas após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Para a determinação da dopamina e seu metabólito DOPAC foi utilizado um equipamento de HPLC (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) com detecção amper (Shim-Pak CLC-ODS, 25cm). A fase móvel foi preparada com ácido cítrico monohidratado 150mM, octil sulfato de sódio 67mM, tetrahidrofurano 2%, acetonitrila 4%, preparados em água deionizada. O pH da fase móvel foi ajustado para 3,0 utilizando NaOH 10mM. A quantificação dos picos obtidos será realizada com o auxílio de uma curva padrão. Valores absolutos foram corrigidos quanto à recuperação das cânulas e expressões de variações com relação aos valores basais (BELLÍSSIMO et al., 2004). Foram utilizados padrões numa concentração final de 4µg/ml e a partir da altura ou área dos picos padrões as amostras foram processadas no programa *Prisma*® e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

3.12 Avaliação da perda neuronal (coloração de Nissl-cresil violeta)

O método de Nissl utiliza o cresil violeta, um corante básico utilizado para evidenciar o citoplasma de neurônios, inclusive os corpúsculos de Nissl. Com a ocorrência de lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer, dessa maneira, tal coloração serve como indicador da viabilidade neuronal, além de possibilitar a contagem de neurônios remanescentes. Após montar os slices em lâminas gelatinadas (ou silanizadas), as lâminas foram mergulhadas em: Xilol (2min) por duas vezes; álcool 100° (2 min) por duas vezes; álcool 95° (2 min) por duas vezes; álcool 70° (2 min); álcool 50° (2 min) e água destilada (2 min). A série de mergulhos citada é responsável pela hidratação da lâmina. Após isso, seguiu-se à série de mergulhos: corante cresil violeta (2 a 7 min- controlando o tempo pela cor) e água destilada (5 mergulhadas). Os próximos passos garantiram a desidratação da lâmina: Álcool 50° (5 mergulhadas), álcool 70° (5 mergulhadas), Diferenciador: 1mL de ac. acético em 100mL de álcool (1 mergulhada rápida), Álcool 70° (1 min), Álcool 96° (1 min) por duas vezes, Álcool 100° (1 min) por duas vezes, Xilol (1 min) e por fim, fez-se a imersão em xilol novamente retirando a lâmina desta solução apenas na hora do seu fechamento. As lâminas foram finalizadas com Entelan. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Leica® com câmera embutida sob aumento de 40x. As áreas analisadas foram delimitadas por 16

quadrantes e a contagem de células realizada observando sempre 3 áreas de cada área cerebral estudada com “n” mínimo de 2 animais.

3.13 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase

Os animais foram sacrificados por decapitação 16 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA e tiveram seus cérebros dissecados para retirada, por meio de um corte coronal, da área do estriado. Com a finalidade de determinarmos o percentual de células dopaminérgicas nas lâminas, foi realizada a imunohistoquímica para tirosina hidroxilase. As secções coronais foram formol tamponado e 24 horas depois colocadas em etanol 70% até o momento da parafinização das peças. As peças parafinizadas foram cortadas com um micrótomo numa espessura de 3µm. À lâmina pronta foi adicionado o anticorpo primário anti-tirosina hidroxilase (CHEMICON) (overnight) na diluição 1: 200 em solução tampão Tris 0,05 M, pH 7,2-7,6, contendo 1% de BSA (albumina de soro bovino). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS duas vezes, sendo logo em seguida adicionado o anticorpo secundário (reagente amarelo ou LINK- DAKO Cytomation) durante uma hora em câmara fria. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS e posteriormente adicionado Streptavidina peroxidase (reagente vermelho- DAKO Cytomation) por 40 minutos. As lâminas foram novamente lavadas e, em seguida, aplicada a elas uma solução de DAB preparada de acordo com o fabricante (DAKO Cytomation) durante 30 segundos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com água destilada e montadas em meio livre de xilol.

3.14 Edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (1% p/v) em salina e administrada na área subplantar da pata direita dos animais (WINTER et al., 1962). Uma hora antes da injeção de carragenina, os extratos Hidroalcoólico (EHAMU 10 e 20mg/kg) e seco (ESMU 10 e 20mg/kg), foram administrados, por via oral. Três horas após a injeção intraplantar de carragenina, a medida do edema foi feita pela diferença entre o volume deslocado da pata direita no momento 3 horas após a carragenina e o momento antes da aplicação da mesma. A indometacina (20 mg/kg, v.o.) foi usada como fármaco de referência.

3.15 Teste de Hiperalgisia térmica de Hargreaves

O teste de Hargreaves foi descrito 1988 e consiste no aquecimento, por meio de uma fonte radiante de luz infravermelha, da região central da pata da traseira de ratos. O comportamento nociceptivo é avaliado como a sensibilidade ao calor (hipernocicepção térmica), determinada pela latência de retirada da pata do raio de luz (HARGREAVES et al., 1988). Os animais receberam os extratos EHAMU ou ESMU nas doses de 10 e 20 mg/kg e uma hora depois uma injeção intraplantar de carragenina sendo uma hora após submetidos ao teste sendo submetidos a uma ambientação de 5 minutos nos compartimentos. Após este período a resposta basal de latência para retirada da pata do estímulo foi quantificada, acionando-se o infravermelho juntamente com o sistema contador de tempo, que cessa com a resposta de retirada de pata.

3.16 Avaliação da atividade antioxidante do Extrato seco de *Myracrodruon urundeuva* in vitro

3.16.1 Método do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método de sequestro do radical DPPH. O extrato utilizado foi o extrato seco (spray-dry) de *Myracrodruon urundeuva* nas concentrações de 25, 50 e 100µg/mL. As misturas reacionais foram compostas por 0,3mL da solução do ESMU (25, 50 e 100µg/mL) ou do controle positivo (vitamina E) mais 2,7mL da solução estoque de DPPH (40µg/mL). Foi aguardado um período de 30 minutos para iniciar a leitura das amostras por espectrofotometria (517nm) (SAINT-CRICQ et al., 1999). A medida que o efeito antioxidante é detectado a intensidade do espectro de absorção diminui (ADEVAILTON et al., 2009).

3.16.2 Método da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima foi determinada segundo o método de ALBINO-TEXEIRA et al. (1992), através da análise da capacidade de uma droga de inibir a redução fotoquímica do azul de nitro tetrazólio (NBT). O extrato ESMU foi adicionado a 0,5 mL de metionina (0,13 mM), 0,5 mL de EDTA (0,54 mM), 0,8 mL de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0), 0,2 mL de riboflavina (1 mM) e 0,5 mL de NBT

(0,44 mM). Os tubos contendo a solução obtida foram expostos à luz fluorescente (80 W) por 30 minutos. Extratos preparados seguindo o mesmo procedimento foram mantidos no escuro. A absorvância da solução foi medida em espectrofotômetro (= 560 nm) em ambos os tipos de extrato (iluminado e não iluminado) e a diferença entre as duas absorvâncias foi considerada para a determinação da atividade da SOD, que resultou na inibição da redução do NBT pela dismutação enzimática do ânion superóxido.

Neste método, a riboflavina reduzida fotoquimicamente gera O^{2-} , o qual reduz o NBT. Na presença de SOD esta redução é inibida. Os resultados são expressos em unidades de enzima, que é a quantidade de SOD necessária para reduzir a taxa de redução do NBT em 50%.

3.17 Imunohistoquímica para TNF- α , iNOS, COX-2, NF- κ B, OX-42 e GFAP

Foram realizadas as imunohistoquímicas para TNF- α , iNOS e COX-2 no corpo estriado e hipocampo/córtex dos animais do estudo e NF- κ B, OX-42 e GFAP apenas no corpo estriado.

As áreas cerebrais estudadas foram retiradas após dissecação cerebral e fixadas em formol tamponado a 10%. Decorridas 24 horas, os fragmentos foram retirados do formol e colocados em álcool 70% e posteriormente parafinizados. Os cortes histológicos feitos foram de 3 a 4 μ m de espessura e as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 3 horas.

Após a desparafinização do tecido, seguida de hidratação, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 (PBR). Posteriormente, foi realizada a lavagem das lâminas com tampão de lavagem (DAKO[®]) 0,01M (5 min) e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário para detecção de TNF- α (Sigma[®]), iNOS, COX-2 e NF- κ B (Santa Cruz[®]), OX-42 (Serotec[®]) e GFAP (DAKO[®]) na diluição de 1:200 em diluente DAKO[®] (diluente primário), por 60 min.

Na imunohistoquímica para COX-2, as lâminas foram lavadas três vezes em PBS 0,01M e incubadas com o anticorpo secundário marcado com biotina (Santa-Cruz[®]), na diluição de 1:200, por 30 min, à temperatura ambiente. Após a remoção

do excesso de anticorpo, foi incubado com o complexo streptavidina-biotina-peroxidase (Santa Cruz[®]) diluído em PBS, por 30 minutos.

Para investigação dos outros mediadores, as lâminas foram lavadas três vezes em tampão de lavagem e incubadas com o Flex HRP (polímero), por 30 min, à temperatura ambiente. Após a remoção do excesso de anticorpo, e a lavagem com tampão, a reação foi revelada utilizando diamina-benzina-peróxido de hidrogênio (DAKO[®]) substrato buffer, à temperatura ambiente, por 5 min, no escuro.

Para todas as imunohistoquímicas, após controle da intensidade, a reação foi interrompida pela lavagem com água corrente por 5 min. A contracoloração foi feita com hematoxilina de Mayer (Invision Flex-Dako), por 5 minutos, sendo o excesso retirado com água corrente. Finalmente, as lâminas foram submetidas à desidratação com álcool 95%, álcool absoluto, xilóis e montadas com lamínulas em Entellan (RIBEIRO et al., 2002).

Nas lâminas para imunohistoquímica de NF- κ B, a contracoloração foi realizada com Metil Green, por 10 minutos, sendo o excesso retirado com água corrente e passagens em Butanol e Xilol e montadas com lamínulas em Entellan.

Os controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, e o anticorpo primário foi substituído por diluente DAKO[®] (diluente primário).

3.18 Análise estatística

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para comparação de médias entre dois grupos será usado o teste “t” de Student e para comparação múltipla dos parâmetros será utilizada a Análise de Variância (ANOVA). O nível de significância entre os grupos será determinado pelo teste de Student Newman Keul. Em todas as análises, considerar-se-á estatisticamente significante valores $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Estudos Comportamentais

4.1.1 Campo Aberto

4.1.1.1 Extrato hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva*

O teste do campo aberto configura, entre outros, como um importante método de observação de alterações na atividade locomotora dos animais. Uma vez no aparelho, o animal é observado quanto ao número de travessias com as quatro patas os quadrantes, o número de iniciativas de comportamento de limpeza (grooming) além da quantidade de vezes em que se levanta sendo apoiado completamente pelas patas traseiras.

A **Figura 10** apresenta o efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40mg/kg, v.o) sobre o Número de Cruzamentos no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Não houve diferença estatística entre os grupos testados: 6-OHDA (18,40±0,6182), EHAMU 5mg/kg (18,60±0,8327), EHAMU 10mg/kg (19,40 ±0,2449), EHAMU 20mg/kg (18,20± 0,4422); EHAMU 40mg/kg (19,40±0,4989) e FO (19,60± 0,9452).

A **Figura 11** mostra o efeito do EHAMU (5, 10, 20 e 40mg/kg, v.o) sobre o Número de Rearing no teste do Campo Aberto. 6-OHDA (14,80±0,7118), EHAMU 5mg/kg (15,10±0,5044), EHAMU 10mg/kg (16,90±0,5467), EHAMU 20mg/kg (18,50±1,014); EHAMU 40mg/kg (17,50±0,8724) e FO (13,90± 0,7520). Apenas o grupo tratado com 20mg/kg foi diferente do grupo 6-OHDA.

A **Figura 12** apresenta o efeito do EHAMU (5, 10, 20 e 40mg/kg, v.o) sobre o Número de Grooming no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 6-OHDA (4,9 ±0,3480), EHAMU 5mg/kg (3,5 ±0,3073), EHAMU 10mg/kg (3,1±0,3786), EHAMU 20mg/kg (3,1 ±0,2769); EHAMU 40mg/kg (3,8 ±0,3590) e FO (4,4 ± 0,4000). Os grupos 5, 10 e 20mg/kg diferiram de forma significativa do grupo 6-OHDA.

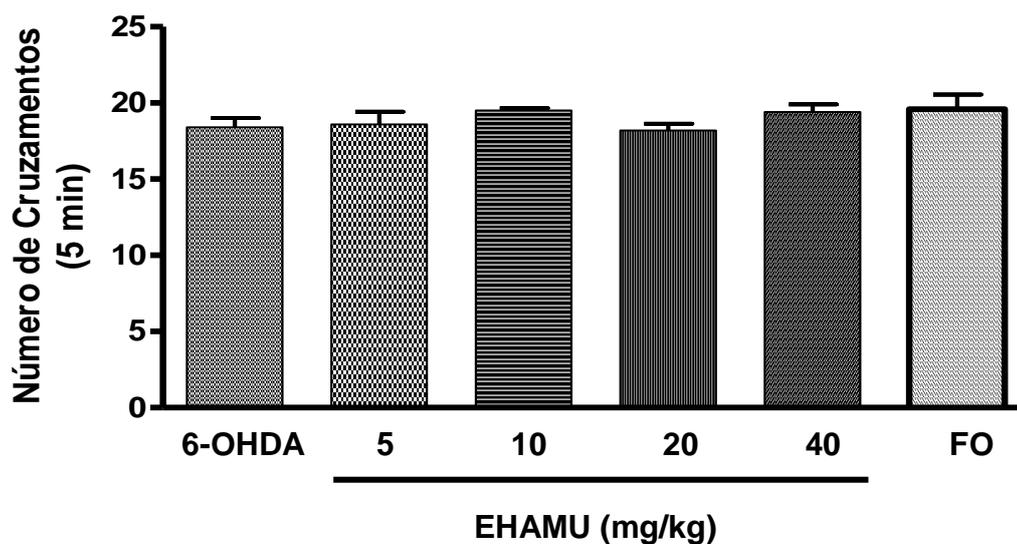


Figura 10. Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 hora após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de Cruzamentos no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 10). (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

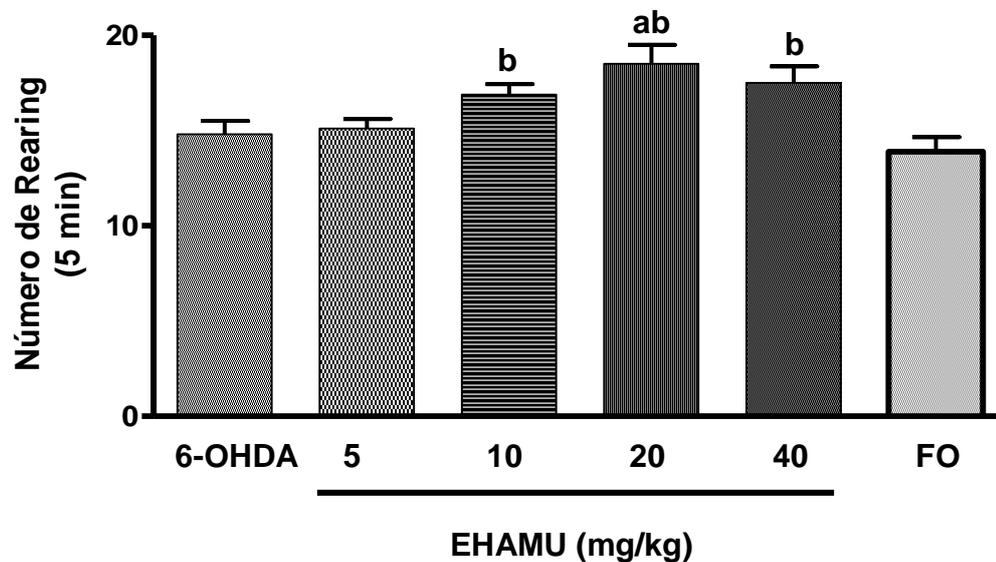


Figura 11. Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 hora após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de Rearing no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 10). ^ap < 0,05 vs 6-OHDA; ^bp<0,05 vs FO. (ANOVAe teste Student-Newman-Keul).

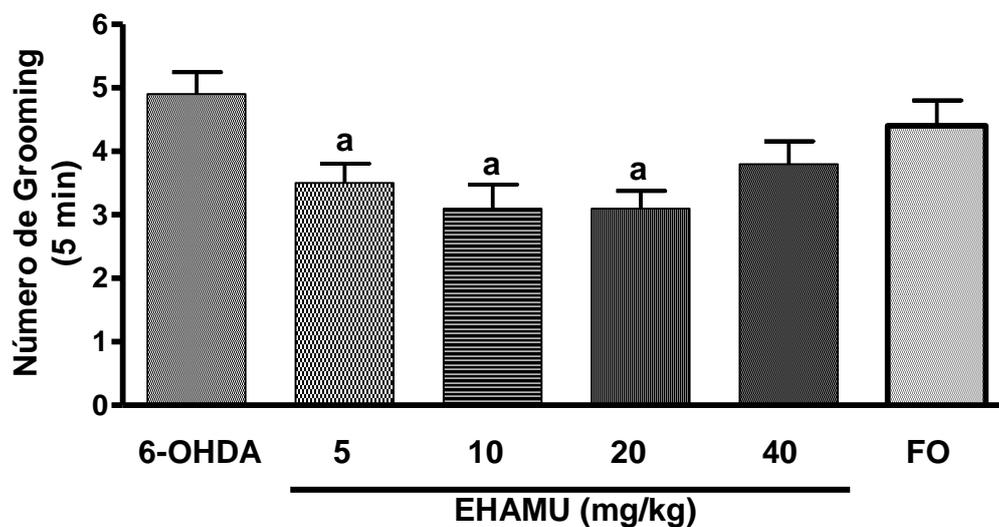


Figura 12. Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 hora após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de Grooming no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 10). ^ap < 0,05 vs 6-OHDA.(ANOVAe teste Student-Newman-Keul).

4.1.1.2 Extrato seco de *Myracrodruonurundeuva*

A **figura 13** apresenta o efeito do Extrato seco de *Myracrodruonurundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o) sobre o Número de Cruzamentos no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Não houve diferença estatística entre os grupos testados: 6-OHDA ($18,13 \pm 0,69$), ESMU 10mg/kg ($18,50 \pm 0,53$), ESMU 20mg/kg ($17,75 \pm 0,77$) e FO ($19,25 \pm 0,86$).

A **figura 14** mostra o efeito do ESMU (10 e 20mg/kg, v.o) sobre o Número de Rearing no teste do Campo Aberto. Não houve diferença estatística entre os grupos testados: 6-OHDA ($13,88 \pm 0,9$), ESMU 10mg/kg ($14,88 \pm 0,4$), ESMU 20mg/kg ($16,13 \pm 0,3$) e FO ($14,38 \pm 0,9$).

A **figura 15** apresenta o efeito do ESMU (10 e 20 mg/kg, v.o) sobre o Número de Grooming no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. 6-OHDA ($4,8 \pm 0,4$), ESMU 10mg/kg ($3,250 \pm 0,3134$), ESMU 20mg/kg ($2,875 \pm 0,2$) e FO ($4,75 \pm 0,5$). Os dois grupos tratados com ESMU diferiram do grupo 6-OHDA nos testes estatísticos.

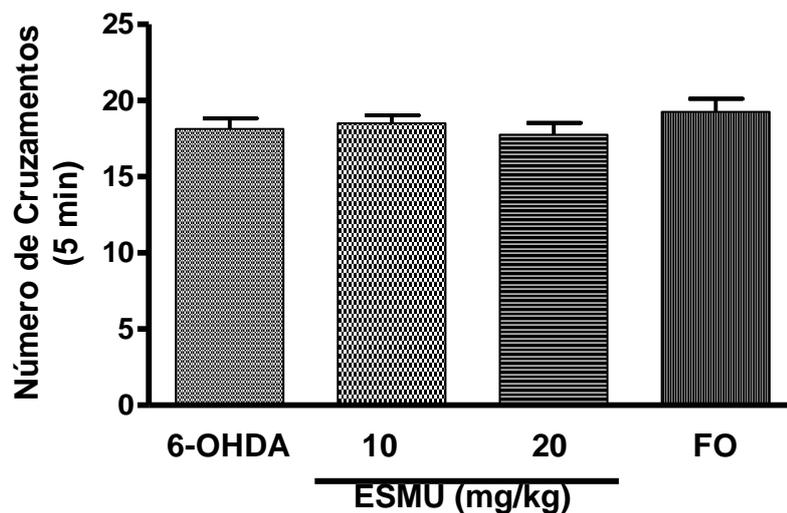


Figura 13. Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruonurundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de Cruzamentos no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 8). (ANOVAe teste Student-Newman-Keul).

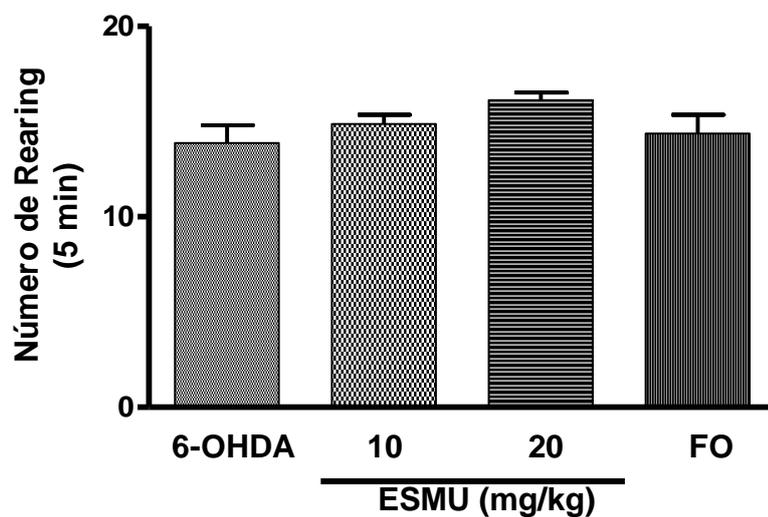


Figura 14. Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruonurundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de Rearing no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 8). (ANOVAe teste Student-Newman-Keul).

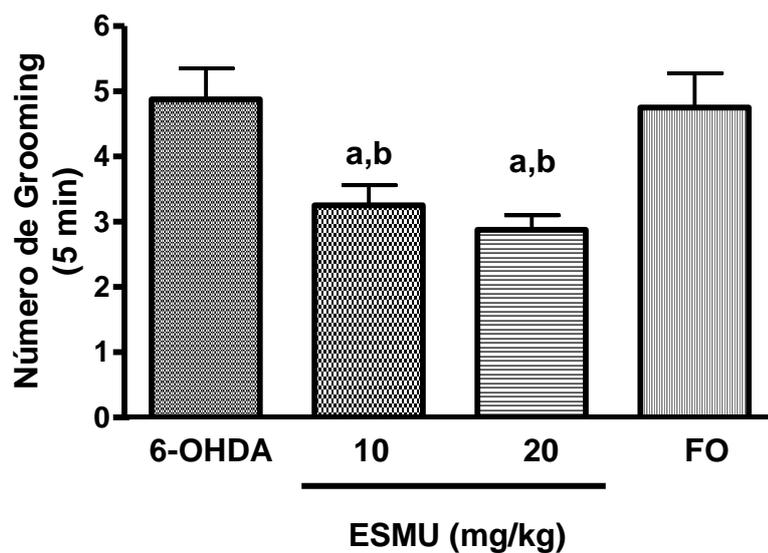


Figura 15. Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruonurundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) sobre o Número de Grooming no teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-ohda. Os animais foram observados durante cinco minutos. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 8). ^ap < 0,05 vs 6-OHDA, ^bp<0,05 vs FO.(ANOVAe teste Student-Newman-Keul).

4.1.2 Teste do Rota-Rod

O teste da barra giratória Rota-Rod mede o efeito de drogas sobre a coordenação motora, considerando preditor de incoordenação motora quanto menor seja o tempo que o animal consegue se equilibrar na barra giratória, aferindo isto pelo número de vezes que o animal cai do aparelho no período de um minuto.

A **figura 16** mostra o efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40mg/kg, v.o) sobre a coordenação motora dos animais através do número de quedas da barra giratória do Rota-Rod em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Os grupos EHAMU 20 ($0,6 \pm 0,2449$) e 40mg/kg ($0,4 \pm 0,2449$) não apresentaram diferenças entre si mas eles e o grupo EHAMU 10mg/kg ($1,6 \pm 0,2449$) são estatisticamente diferentes do Grupo 6-OHDA ($2,6 \pm 0,2429$). Os grupos EHAMU 5 ($2,4 \pm 0,2449$) e EHAMU 10mg/kg são diferentes do grupo FO ($0,4000 \pm 0,2449$) assim como entre si.

A **figura 17** mostra o efeito do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o) sobre a coordenação motora dos animais através do número de quedas da barra giratória do Rota-Rod em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. O grupo ESMU 10mg/kg ($1,600 \pm 0,2449$) e ESMU 20 mg/kg ($1,4 \pm 0,2449$) apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo 6-OHDA ($2,6 \pm 0,2449$). Considerando ainda as análises estatísticas, os grupos ESMU 10 mg/kg e ESMU 20mg/kg a despeito de não serem diferentes entre si, são diferentes do grupo FO ($0,4 \pm 0,2449$).

A **Figura 18** representa a comparação entre os efeitos dos extratos Hidroalcoólico (EHAMU) e Seco (ESMU) de *Myracrodruon urundeuva* nas doses de 10 e 20mg/kg sobre o número de quedas da barra giratória no teste do Rota-Rod no período de 1 minuto em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Na dose de 10mg/kg os extratos hidroalcoólico ($1,6 \pm 0,2449$) e seco ($1,6 \pm 0,2449$) são iguais entre si nos testes estatísticos. Não obstante, nas doses de 20mg/kg os extratos EHAMU ($0,6 \pm 0,2449$) e ESMU ($1,4 \pm 0,2449$) se mostraram diferentes.

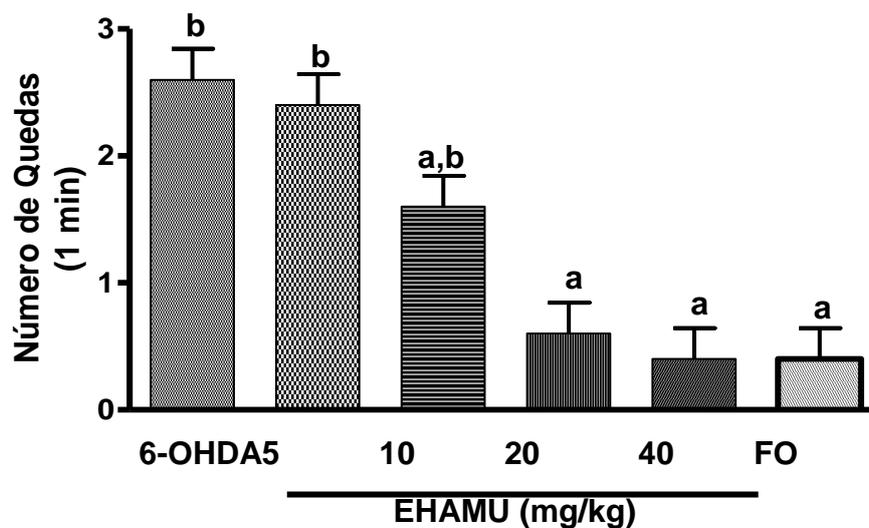


Figura 16. Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodrounurundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 hora após a cirurgia estereotáxica) na coordenação motora (teste de Rota-Rod) de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante uma hora. Os valores foram expressos como média \pm EPM ($n=5$). ^a $p<0,05$ vs Grupo 6-OHDA e ^b $p<0,05$ vs Grupo FO. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

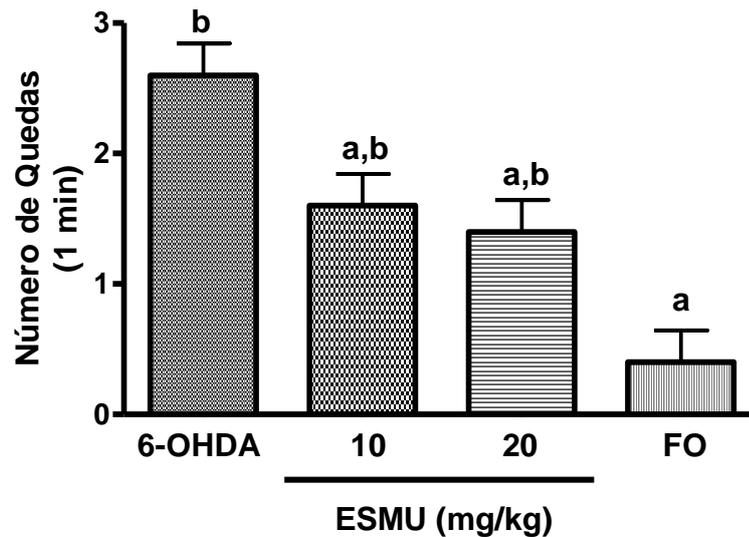


Figura 17. Efeito do Extrato Seco de *Myracrodrounurundeuva* (ESMU 10e 20 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) na coordenação motora (teste de Rota-Rod) de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-ohda. Os animais foram observados durante uma hora. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 5). ^ap<0,05vs Grupo 6-OHDA e ^bp<0,05 vs Grupo FO. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

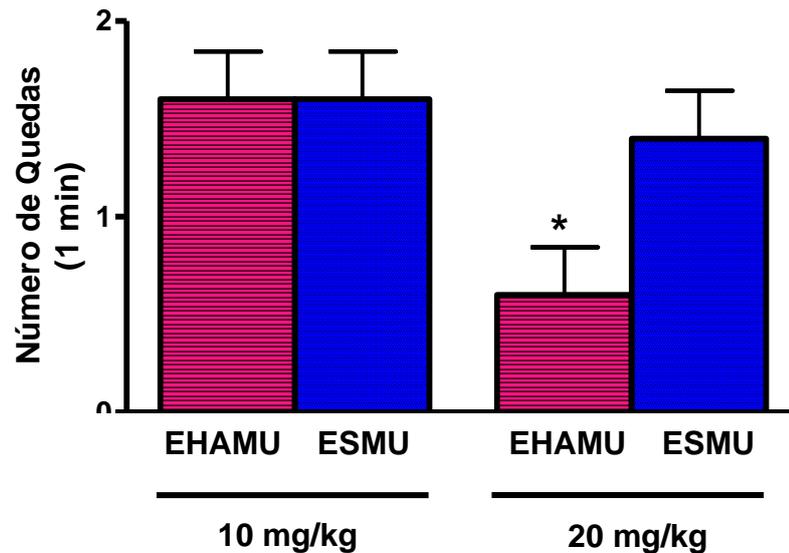


Figura 18. Comparação entre os Extratos Hidroalcoólico (EHAMU) e Seco (ESMU) de *Myracrodrounurundeuva* (10 e 20 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatalestereotóxica unilateral de 6-OHDA) na coordenação motora de ratos (teste de Rota-Rod) com lesão estriatal induzida por 6-OHDA de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Os valores foram expressos como média \pm EPM (n=5). *p<0,05 (EHAMU 20mg/kg vs ESMU 20mg/kg). (t-Test).

4.1.3 Teste Rotacional Induzido por Apomorfina

O teste rotacional induzido por apomorfina é utilizado como parâmetro para a determinação da extensão da lesão estriatal em animais submetido à injeção estriatal unilateral de 6-OHDA e se caracteriza por movimentos estereotipados de rotação na direção contralateral à lesão realizada.

A **Figura 19** mostra o efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1 mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. A administração do extrato na dose de 40 mg/kg provocou uma diminuição de 87,2% no número de rotações ($25,4 \pm 2,6$) e as doses de 20, 10 e 5 mg/kg, reduziram em 77,8% ($44,0 \pm 1,225$), 57,4% ($84,4 \pm 7,646$) e 8,8% ($180,8 \pm 7,123$) respectivamente, quando comparado ao grupo 6-OHDA ($198,4 \pm 8,183$). Houve diferença significativa entre os grupos EHAMU 20 e 40 mg/kg.

A **Figura 20** mostra o efeito do Extrato seco de *Myracrodruonurundeuva* (ESMU 10 e 20 mg/kg, v.o) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1 mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. O extrato nas doses de 10 e 20 mg/kg reduziram em 71,0% ($57,4 \pm 6,2$) e 86,3% ($27,2 \pm 1,855$), respectivamente quando comparado ao controle ($198,4 \pm 8,183$). Os grupos ESMU 20 e ESMU 10 são estaticamente diferentes.

A **Figura 21** representa a comparação entre os efeitos dos extratos hidroalcoólico e seco de *Myracrodruonurundeuva* nas doses de 10 e 20 mg/kg no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1 mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Os grupos EHAMU 20 mg/kg ($44,0 \pm 1,225$) e ESMU 20 mg/kg ($27,2 \pm 1,855$) apresentaram diferença estatística entre si, assim como ocorreu entre os grupos EHAMU ($84,4 \pm 7,646$) e ESMU ($57,40 \pm 6,218$) na dose de 10 mg/kg.

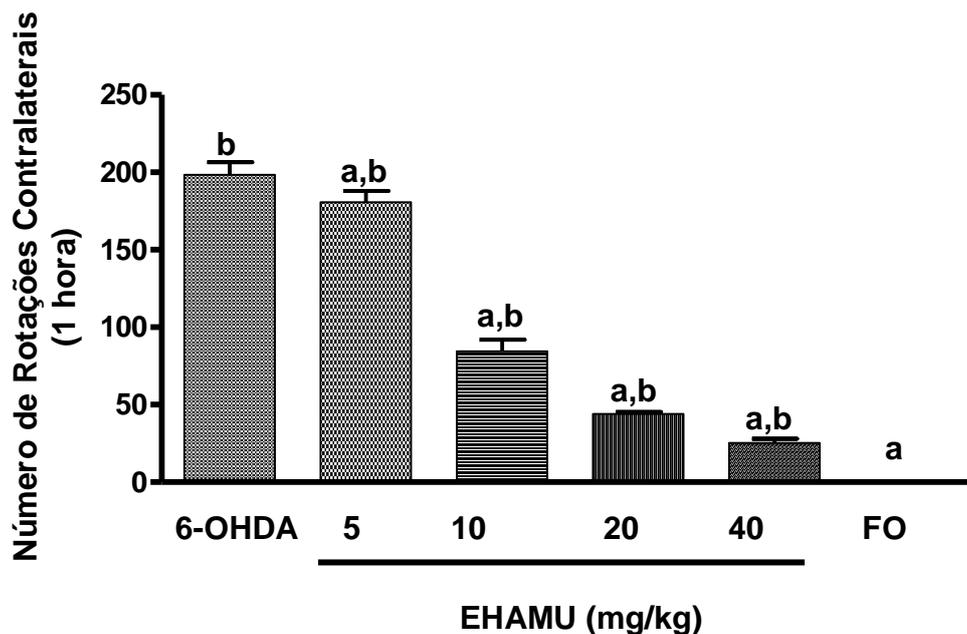


Figura 19. Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* (EHAMU 5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 hora após a cirurgia estereotáxica) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante uma hora. Os valores foram expressos com média \pm EPM (n= 5). ^ap<0,05vs Grupo 6-OHDA e ^bp<0,05 vs Grupo FO. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

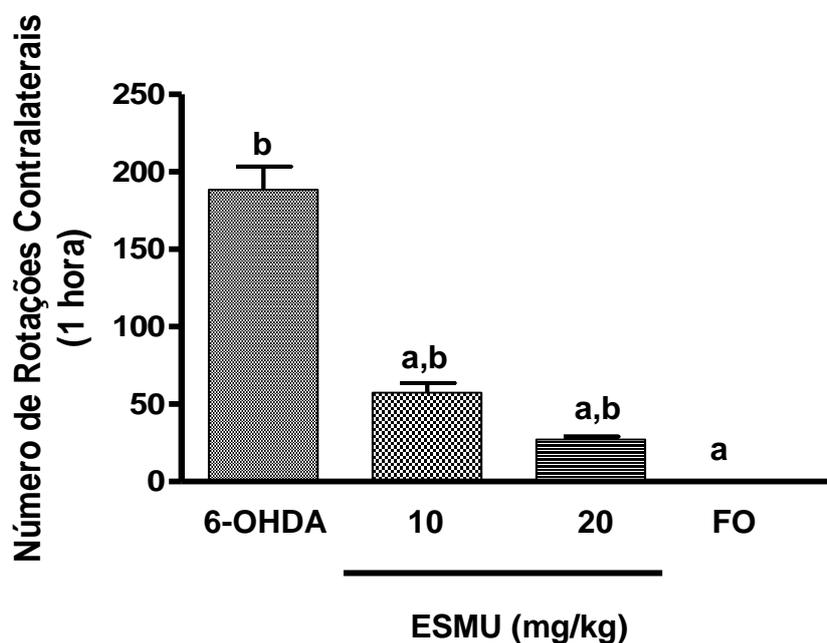


Figura 20. Efeito do ExtratoSeco de *Myracrodruonurundeuva* (ESMU10 e 20mg/kg, v.o, por 14 dias além de 30 minutos antes e 1 horas após a cirurgia estereotáxica) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Teste realizado 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os animais foram observados durante uma hora. Os valores foram expressos com média \pm EPM(n=5). ^ap<0,05vs Grupo 6-OHDA e ^bp<0,05 vs Grupo FO. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

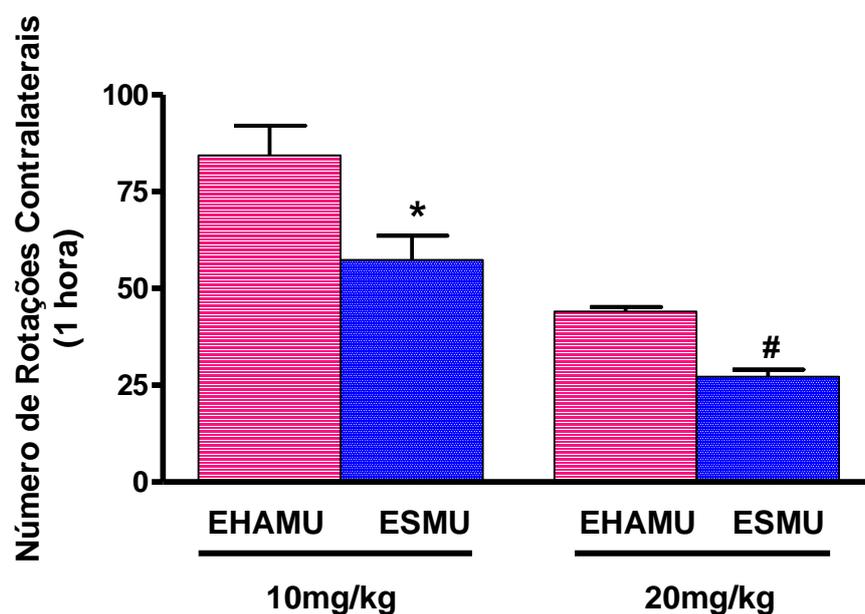


Figura 21. Comparação entre os extratos hidroalcoólico (EHAMU) e seco (ESMU) de *Myracrodruon urundeuva* (10 e 20 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatalestereotóxica unilateral de 6-OHDA) no comportamento rotacional induzido por apomorfina (1mg/kg, s.c) em ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Os valores foram expressos com média \pm EPM (n=5). *p<0,05 (EHAMU 10mg/kg vs ESMU 10mg/kg); #p<0,05 (EHAMU 20mg/kg vs ESMU 20mg/kg); (t-Test).

4.2 Níveis estriatais de Monoaminas

4.2.1 Níveis dopaminérgicos

A principal característica neuroquímica da doença de Parkinson é a depleção dopaminérgica no sistema nigroestriatal devido a degeneração neuronal local. A observação dos níveis de dopamina e de seus metabólitos na via nigroestriatal consiste em uma ferramenta importante na busca de agentes que consigam restabelecer ou aumentar a transmissão dopaminérgica com conseqüente melhora do quadro global da doença.

A **tabela 1** mostra os valores em média \pm EPM dos níveis de dopamina e DOPAC nos estriado direito e esquerdo de animais com lesão estriatal direita induzida por 6-OHDA e tratados com o Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* (5, 10, 20 e 40 mg/kg).

A injeção estereotáxica de 6-OHDA produziu uma queda de 83,21% ($447,8 \pm 79,63$ ng/mg de tecido) no conteúdo de dopamina quando comparado ao grupo FO ($2668 \pm 350,4$ ng/mg), indicando uma degeneração neuronal intensa. Os grupos tratados com o EHAMU nas doses de 5 e 10 mg/kg apresentaram uma reversão leve e estatisticamente não importante dos níveis de dopamina quando comparados ao grupo 6-OHDA, apresentando ainda uma depleção de 72,6% ($728,4 \pm 206,6$ ng/mg) e 57,6% ($1140 \pm 238,5$ ng/mg), respectivamente. Houve uma melhora estatisticamente significativa nos níveis de dopamina dos animais tratados com EHAMU nas doses de 20 e 40 mg/kg onde os níveis dopaminérgicos conseguiram atingir 71,7% ($1913 \pm 146,2$ ng/mg) e 90,9% ($2450 \pm 163,7$ ng/mg), respectivamente do nível dopaminérgico atingido pelos animais do grupo FO. Nas análises estatísticas, os grupos EHAMU 5 e EHAMU 10 não são considerados diferentes tampouco os grupos EHAMU 20 e EHAMU 40. Ver **Figura 22**.

A **Tabela 2** mostra os valores em média \pm EPM dos níveis de dopamina e DOPAC nos estriado direito e esquerdo de animais com lesão estriatal direita induzida por 6-OHDA e tratados com o Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (10 e 20 mg/kg).

A **Figura 23** apresenta o efeito do ESMU nas doses de 10 e 20mg/kg sobre os níveis estriatais de dopamina. A menor dose apresentou depleção de 62,9% ($1198 \pm 364,8$ ng/mg de tecido) do conteúdo de dopamina estriatal, não sendo estatisticamente diferente do grupo 6-OHDA. A dose de 20mg/kg conseguiu suplantiar os níveis dopaminérgicos atingidos pelo grupo falso operado apresentando uma média de $3629 \pm 464,9$ nanogramas de dopamina por miligrama de tecido. Para este parâmetro, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ESMU 10mg/kg e ESMU 20mg/kg.

A **figura 24** aponta a comparação no efeito dos extratos hidroalcoólico e seco de *Myracrodruonurundeuva* nos níveis de dopamina estriatal. Os grupos EHAMU 10mg/kg ($1131 \pm 238,5$ ng/mg de tecido) e ESMU 10mg/kg ($988,2 \pm 364,8$ ng/mg de tecido) não apresentaram diferenças significativas entre si quando analisados na estatística. O grupo ESMU 20mg/kg ($3629 \pm 464,9$) suplantou o efeito do EHAMU 20mg/kg ($1913 \pm 146,2$) em 89,7% no que diz respeito aos níveis de dopamina no estriado (em ng/mg de tecido) sendo considerados grupos diferentes pelos testes estatísticos com nível de significância de $p < 0,01$.

Tabela 1. Efeito do Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* nos níveis de Dopamina e DOPAC (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA.

Grupo Experimental	Dopamina	DOPAC
6-OHDA <i>ipsilateral</i>	447,8± 79,63 ^a	752,3 ± 201,1
6-OHDA contralateral	2027 ± 337,3	713,9 ± 16,63
EHAMU 5 <i>ipsilateral</i>	728,4 ± 206,6 ^a	1081 ± 68,51
EHAMU 5 contralateral	1971 ± 234,5	1299 ± 215,7
EHAMU 10 <i>ipsilateral</i>	1146± 185,4	990,3 ± 417,4
EHAMU 10 contralateral	1994 ± 30,67	333,8 ± 46,78
EHAMU 20 <i>ipsilateral</i>	1913 ± 146,2	2003 ± 318,6 ^{a,b}
EHAMU 20 contralateral	2072 ± 588,3 ^b	304,7 ± 46,55
EHAMU 40 <i>ipsilateral</i>	2450 ± 163,7 ^{a,b}	687,8 ± 373,1 ^a
EHAMU 40 contralateral	3921 ± 221,8	1755 ± 172,1
FO <i>ipsilateral</i>	2668 ± 350,4 ^b	1985 ± 182,4 ^b
FO contralateral	2986 ± 519,3	774,0 ± 68,83

O Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruonurundeuva* (5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o) foi administrada diariamente por 14 dias, além de 30 minutos antes e uma hora após a injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA. Duas semanas após o procedimento estereotáxico, os animais foram sacrificados por decaptação para a retirada dos corpos estriados (direitos e esquerdos). Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=4-7). Ipsilateral corresponde ao estriado retirado do lado em que houve a lesão com 6-OHDA (direito) e contralateral ao estriado do lado oposto ao da lesão (esquerdo). ^ap<0,05 vs Controle contralateral do grupo, ^bp<0,05 vs grupo 6-OHDA. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

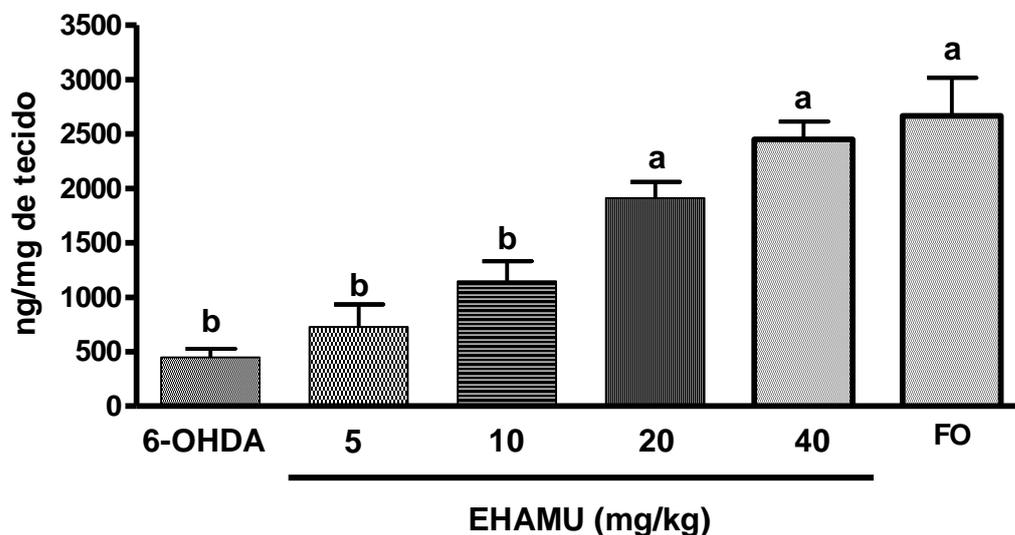


Figura 22. Efeito do extrato de *Myracrodruonurundeuva* (5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias e 1 hora após a injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA) nos níveis de dopamina (ng/mg de tecido) em estriado direito de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Os valores foram expressos com média \pm EPM (n= 5-7). ^ap<0,05 vs Grupo 6-OHDA e ^bp<0,05 vs Grupo FO. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

Tabela 2. Efeito do Extrato Seco de *Myracrodruonurundeuva* nos níveis de Dopamina e DOPAC (ng/mg de tecido) em corpo estriado de ratos lesionados com 6-OHDA.

Grupo Experimental	Dopamina	DOPAC
6-OHDA <i>ipsilateral</i>	447,8± 79,63 ^a	752,3 ± 201,1
6-OHDA <i>contralateral</i>	2027 ± 337,3	713,9 ± 16,63
ESMU 10 <i>ipsilateral</i>	1192±146,5	946 ± 266,8
ESMU 10 <i>contralateral</i>	3108 ± 548,5	2435 ± 296,5
ESMU 20 <i>ipsilateral</i>	3629± 464,9	1224 ± 256,9
ESMU 20 <i>contralateral</i>	4651 ± 678,2	1957 ± 892,2
FO <i>ipsilateral</i>	2668 ± 350,4 ^b	1985 ± 182,4 ^b
FO <i>contralateral</i>	2986 ± 519,3	774,0 ± 68,83

O Extrato Seco de *Myracrodruonurundeuva* (5, 10, 20 e 40 mg/kg, v.o) foi administrada diariamente por 14 dias, além de 30 minutos antes e uma hora após a injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA. Duas semanas após o procedimento estereotáxico, os animais foram sacrificados por decapitação para a retirada dos corpos estriados (direitos e esquerdos). Os resultados foram expressos como média ± EPM (n=4-7). Ipsilateral corresponde ao estriado retirado do lado em que houve a lesão com 6-OHDA (direito) e contralateral ao estriado do lado oposto ao da lesão (esquerdo). ^ap<0,05 vs Controle contralateral do grupo, ^bp<0,05 vs grupo 6-OHDA.(ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

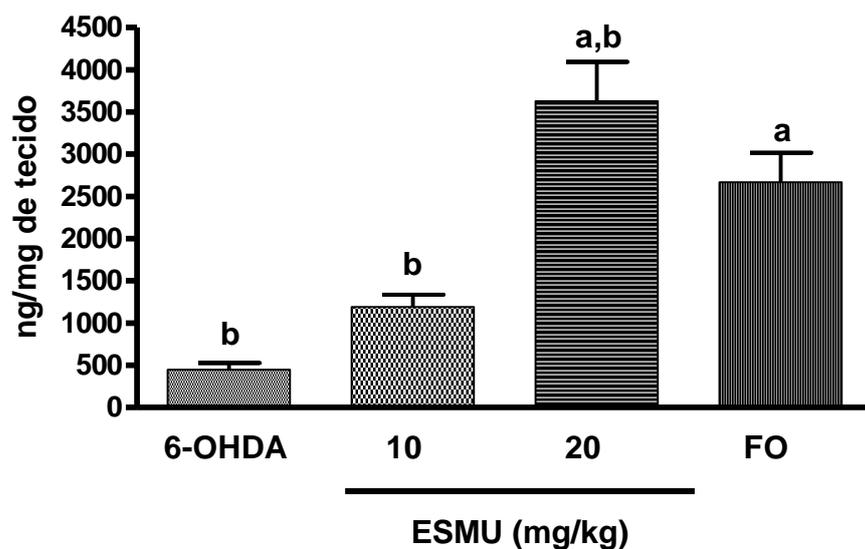


Figura 23. Efeito do extrato de *ruonurundeuva* (10 e 20 mg/kg, v.o., diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA) nos níveis de dopamina (ng/mg de tecido) em estriado direito de ratos com lesão estriatal induzida por 6-OHDA. Os valores foram expressos com média \pm EPM (n= 4-7). ^ap<0,05 vs Grupo 6-OHDA e ^bp<0,05 vs Grupo FO. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

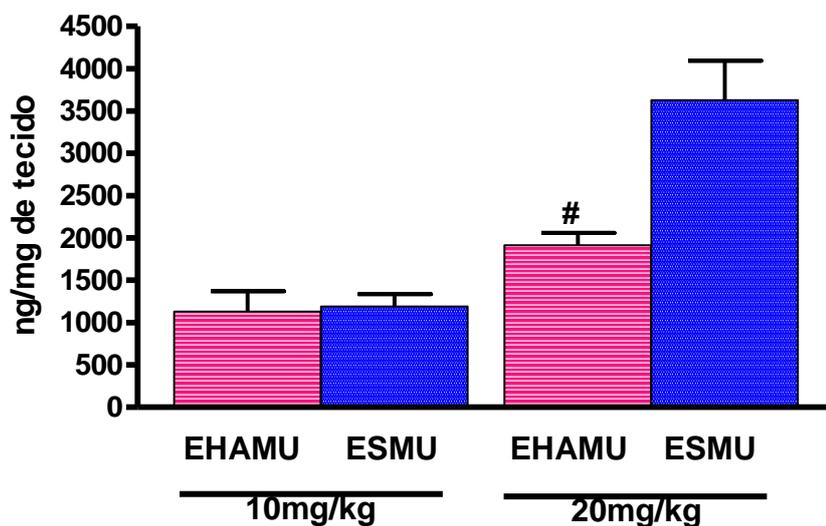


Figura 24. Comparação entre os extratos hidroalcoólico (EHAMU) e seco (ESMU) de *Myracrodruon urundeuva* (10 e 20 mg/kg, v.o, diariamente por 14 dias além de meia hora antes e 1 hora após a injeção estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA) sobre níveis de dopamina (ng/mg de tecido) em estriado direito de ratos. Os valores foram expressos com média \pm EPM (n= 4-5). [#]p<0,01 EHAMU 20mg/kg vs ESMU 20mg/kg. (t-Test).

4.3 Atividade Antioxidante do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva*

4.3.1 Método do DPPH

A **figura 26** mostra o efeito do Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* nas concentrações 25, 50 e 100 µg/mL sobre a redução da absorbância da solução de DPPH. A absorbância observada nas soluções com concentrações de 25 ($0,1346 \pm 0,003$), 50 ($0,1503 \pm 0,003702$) e 100 ($0,1435 \pm 0,002612$) µg/mL de ESMU a despeito de serem iguais entre si, diferiram do controle ($1,946 \pm 0,04$). Um controle com Vitamina E foi incluído no teste ($0,1920 \pm 0,003036$).

4.3.2 Método da SOD/NBT

A **figura 27** mostra que o Extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* nas concentrações 25($0,0160 \pm 0,0080$), 50($0,0105 \pm 0,0015$), 100($0,0200 \pm 0,0100$), 200($0,0285 \pm 0,001500$) e 400 µg/mL($0,0610 \pm 0,004000$) não apresentam efeito sobre atividade da superóxido dismutase. Um controle com Ácido Ascórbico (AA) foi incluído no teste ($0,4650 \pm 0,01800$).

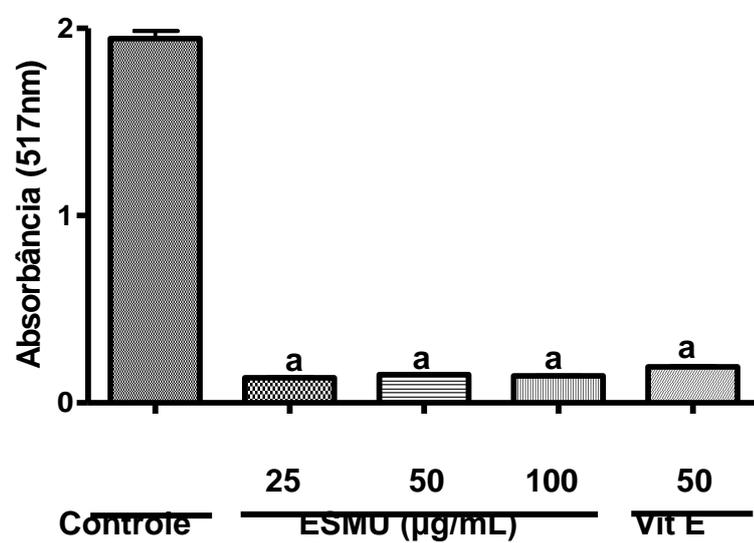


Figura 25. Absorbância da solução do radical DPPH na presença do ESMU (25, 50 e 100µg/mL) e de Vitamina E (Vit E,). Os valores foram expressos como média \pm EPM (n= 4-5). ^ap<0,05 vs controle. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

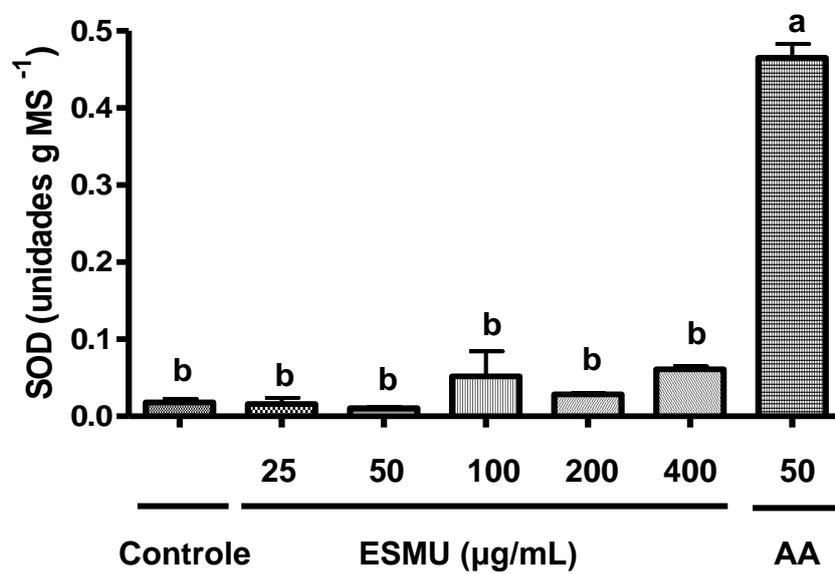


Figura 26. Atividade da supeóxido dismutase no Extrato seco de *Myracrodruon urundeuva* nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400µg/ml. Os valores foram expressos com média ± EPM (n= 6-9). ^ap<0,05 vs controle; ^bp<0,05 vs AA. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

4.4 Atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva*

A **figura 27** mostra o efeito do extrato Seco de *Myracrodruon urundeuva* (10, 20 e 40mg/kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos. O edema apresentado pelo grupo controle carragenina ($0,9511 \pm 0,076$) apresentou diferença estatística quando comparado aos dos grupos ESMU 20mg/kg ($0,5800 \pm 0,06011$) e indometacina ($0,5550 \pm 0,07205$) mas não aos dos grupos ESMU 10mg/kg ($1,140 \pm 0,1011$) e ESMU 40mg/kg ($0,8740 \pm 0,02943$). Um grupo indometacina 20mg/kg foi utilizado como controle ($0,5550 \pm 0,07$).

A **figura 28** mostra o efeito do extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* (10 e 20mg/kg) sobre a hiperalgesia induzida por carragenina no teste de Hargreaves. O tempo para retirada da pata, indicando hiperalgesia apresentado pelo grupo controle carragenina ($8,344 \pm 1,017$) apresentou diferença estatística quando comparado a todos os demais grupos: ESMU 10mg/kg ($13,29 \pm 0,6075$), ESMU 20mg/kg ($17,50 \pm 1,192$), ESMU 40 ($14,82 \pm 0,5400$) e indometacina 20mg/kg. Os grupos ESMU 10 e 40mg/kg são iguais entre si no teste estatístico ANOVA. Os grupos ESMU 20 e ESMU 40 são, e acordo com o teste estatístico, iguais entre si e ao grupo indometacina 20mg/kg.

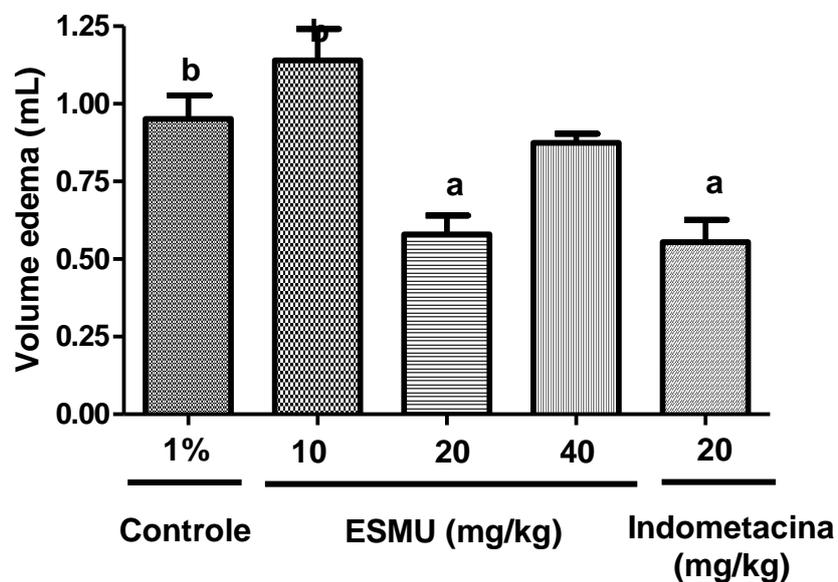


Figura27. Efeito do extrato seco de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU 10, 20 e 40mg/kg) e indometacina (20mg/kg) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%) em ratos. Os valores foram expressos com média \pm EPM (n= 9-5). ^ap<0,05 vs carragenina; ^bp< 0,05 vs indometacina. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

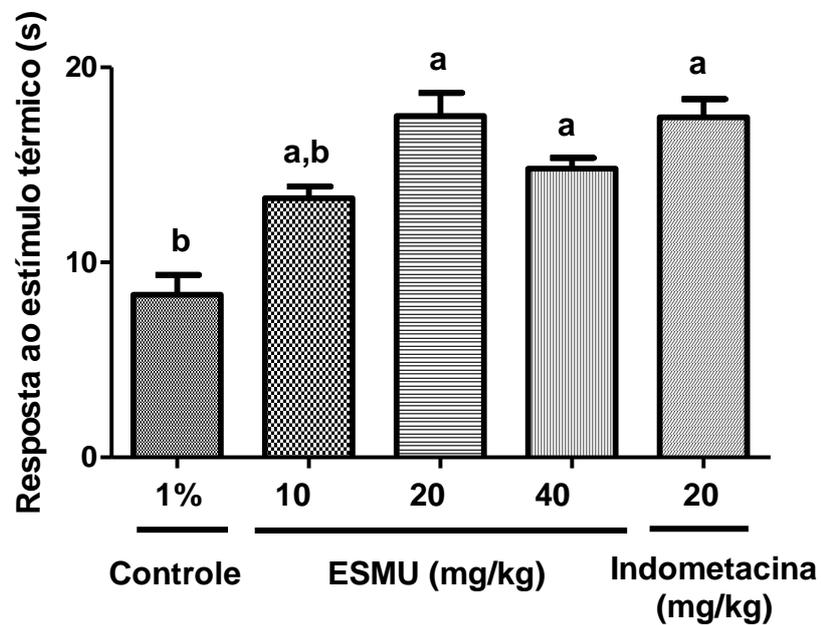


Figura 28. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* (ESMU 10, 20 e 40mg/kg) e indometacina (20mg/kg) sobre a hiperalgesia térmica induzida por carragenina no teste de Hargreaves. Os valores foram expressos com média \pm EPM (n= 9-6). ^ap<0,05 vs carragenina; ^bp< 0,05 vs indometacina. (ANOVA e teste Student-Newman-Keul).

4.5 Estudos Histológicos

4.5.1 Contagem de células viáveis por método de Nissl

O método de Nissl utiliza o cresil violeta, um corante básico utilizado para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, dentre as quais, os corpúsculos de Nissl, compostos basicamente por RNA. Esta coloração opera como indicador da viabilidade neuronal, pois, quando da ocorrência de lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer, fenômeno conhecido por cromatólise.

No grupo Falso Operado, a média de neurônios viáveis por campo foi de $174 \pm 8,390$. O grupo da 6-OHDA apresentou uma redução de 58,33% ($72,44 \pm 3,321$) no número de células viáveis enquanto que os grupos tratados com EHAMU nas doses de 20 e 40mg/kg apresentaram uma redução de apenas 34,38% ($113,3 \pm 5,053$) e 11,83% ($153,4 \pm 5,308$), respectivamente. (**Figuras 29 e 30**).

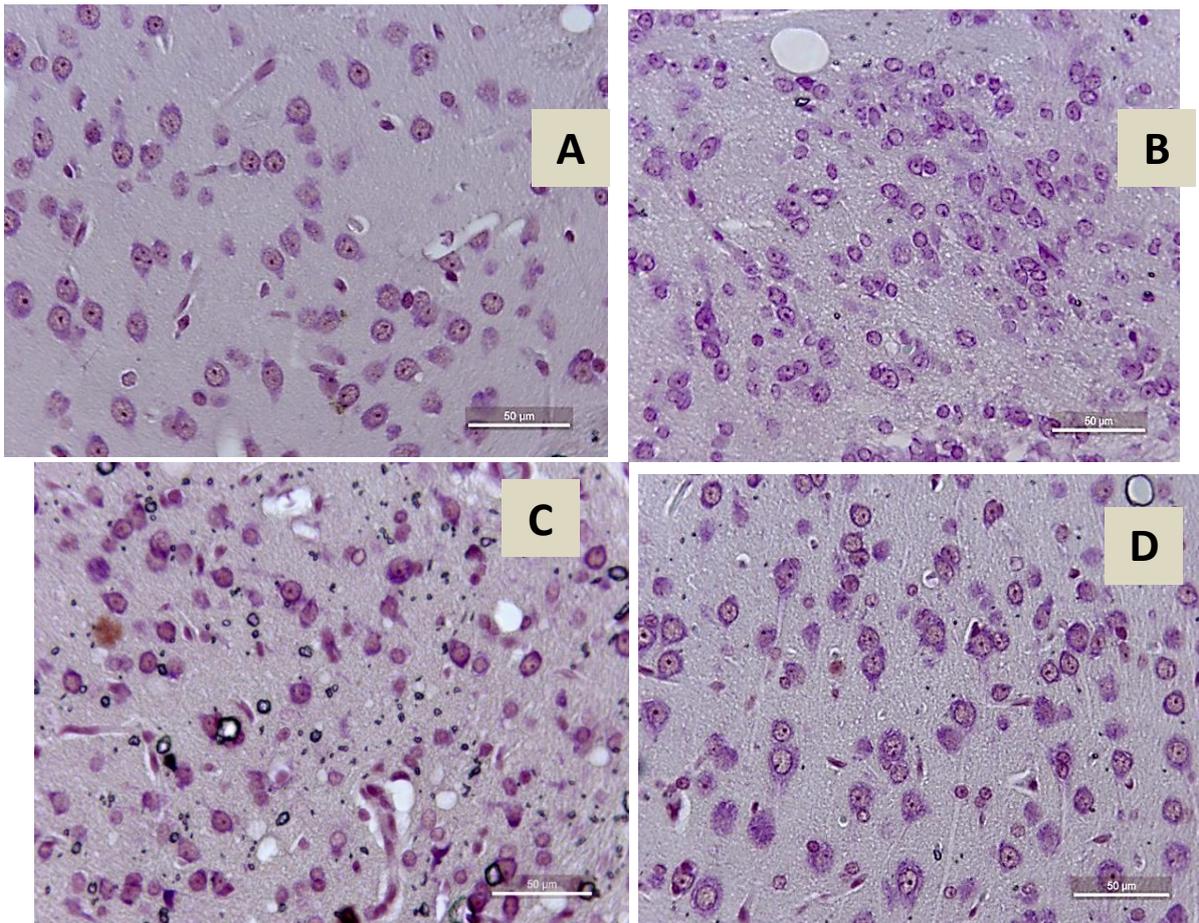


Figura 29. Micrografia de neurônios viáveis pelo método de Nissl em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

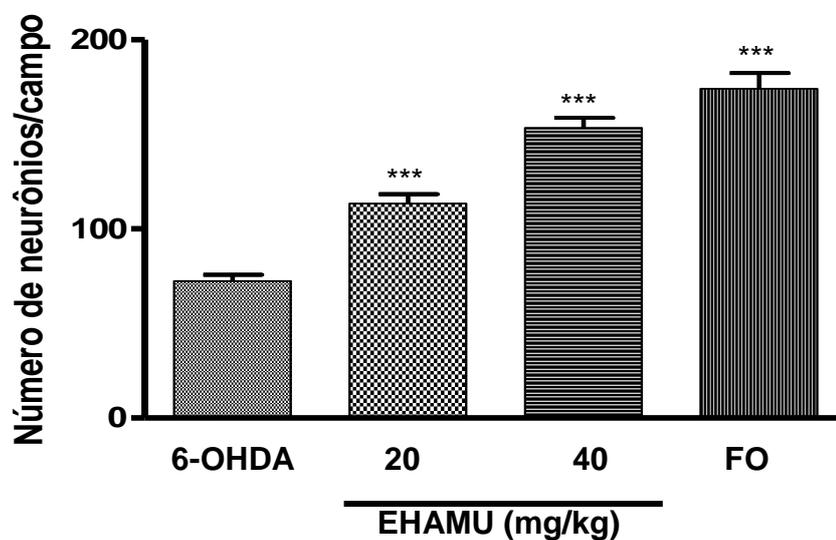


Figura 30. Contagem de Células viáveis em estriado direito de ratos submetidos à injeção estereotáxica unilateral de 6-OHDA. Coloração pelo método de Nissl com Cresil violeta. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=3) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média ± EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test).

4.5.2 Ensaio de Imunohistoquímica

4.5.2.1 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) em estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU 40 mg/kg, v.o, por 14 dias.

A imunomarcagem para TH foi observada na fotomicrografia do estriado direito dos animais (**Figura 31**) onde ficou evidente que o tratamento com EHAMU 40 mg/kg ($110,3 \pm 9,02$) aumentou de forma considerável e significativa (**Figura 32**) o número de células positivas para TH ao se comparar o grupo controle 6-OHDA ($8,5 \pm 0,99$).

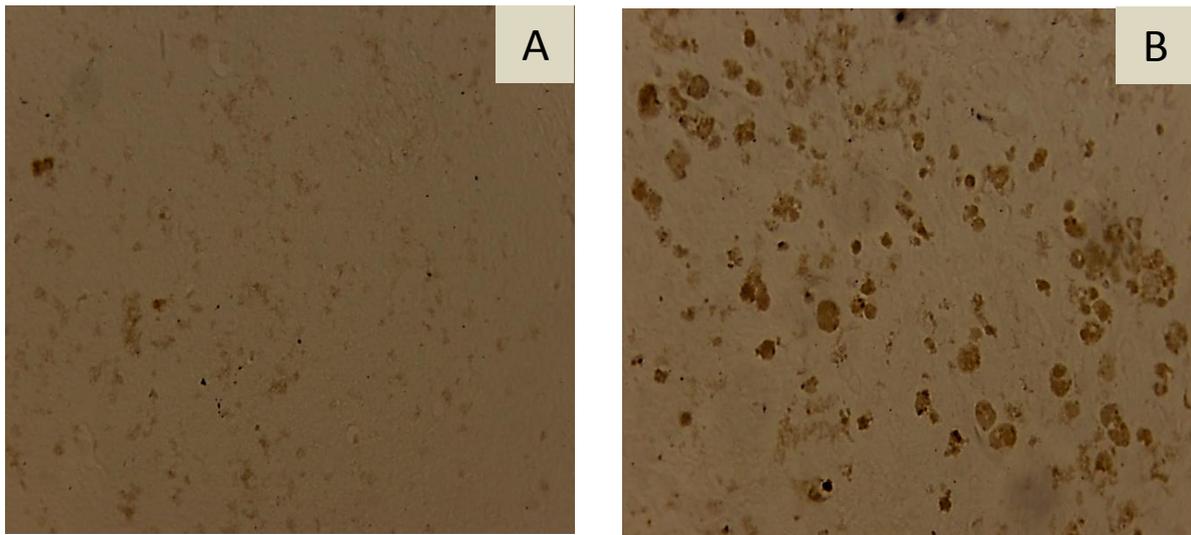


Figura 31. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TH em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com EHAMU .A: 6-OHDA; B: EHAMU (administrados meia hora antes, uma hora depois e por 14 dias após a injeção de 6-OHDA, v.o. x 40.

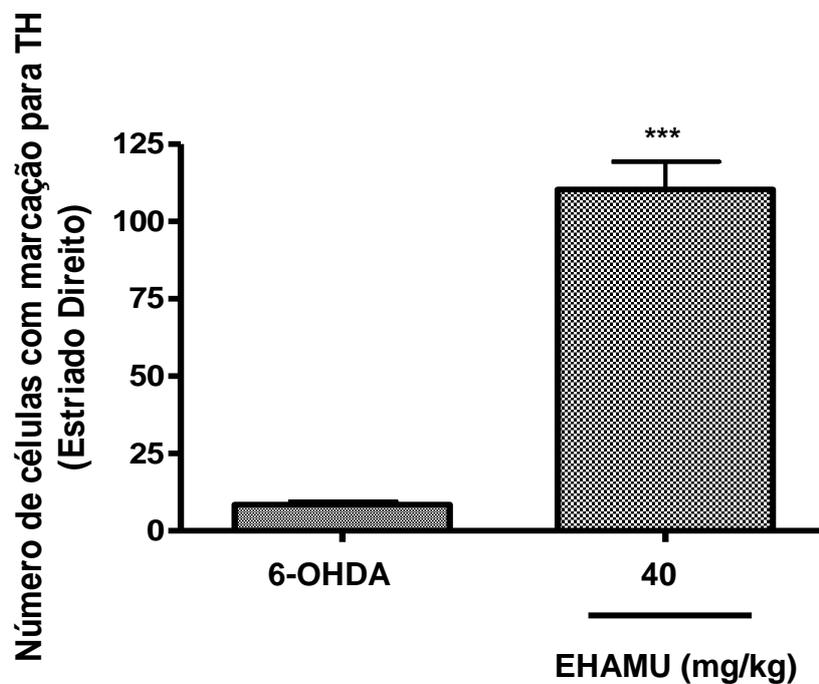


Figura 32. Contagem de imunomarcção para Tirosina Hidroxilase (TH) em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com EHAMU. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=1-2) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média \pm EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (T- Teste – não paramétrico).

4.5.2.2 Imunohistoquímica para COX-2 nas áreas hipocampais Giro denteado, CA1 e CA3, no córtex e no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias

A imunomarcção para COX-2 foi investigada por meio de fotomicrografia nas regiões do giro denteado (**Figura 33**), CA1 (**Figura 34**) e CA3 do hipocampo (**Figura 35**); córtex (**Figura 36**) e estriado (**Figura 38**).

Observou-se uma maior marcação tecidual para COX-2 nas áreas do giro denteado, CA3 e Córtex cerebral, além do estriado. Não foi observado marcação significativa na região CA1.

A **Figura 37** mostra a contagem de células marcadas com COX-2 no córtex dos animais do grupo controle 6-OHDA ($66,83 \pm 1,88$), EHAMU 20 mg/kg ($29,67 \pm 1,56$), EHAMU 40 mg/kg ($22,83 \pm 1,70$) e Falso operado ($6,50 \pm 1,47$).

A **Figura 39** mostra a contagem de células marcadas com COX-2 no estriado direito dos animais do grupo controle 6-OHDA ($256,3 \pm 9,67$), EHAMU 20 mg/kg ($80,17 \pm 2,67$), EHAMU 40 mg/kg ($81,67 \pm 3,44$) e Falso operado ($63,17 \pm 3,40$).

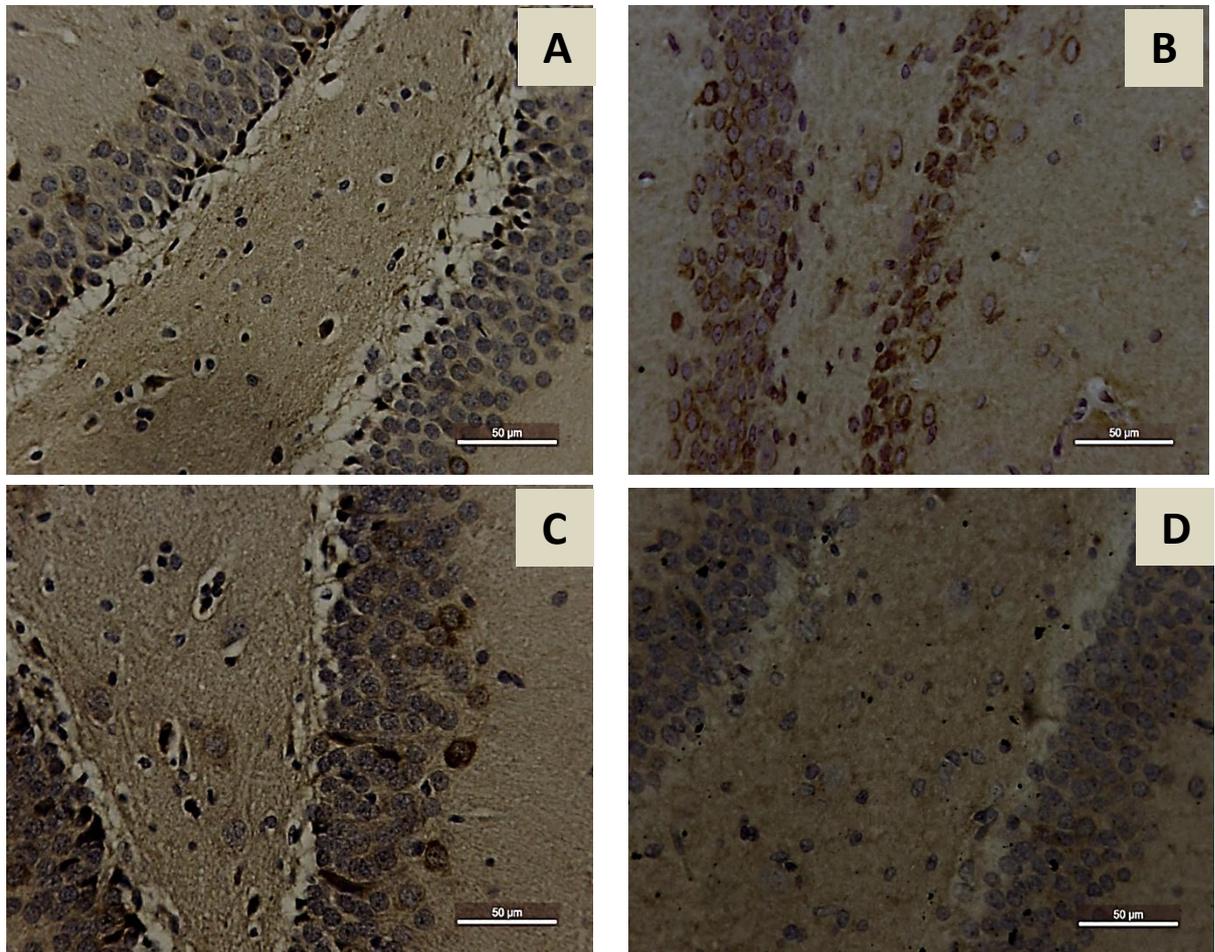


Figura 33. Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área do giro denteado de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

Imunomarcação para COX-2 na área CA1

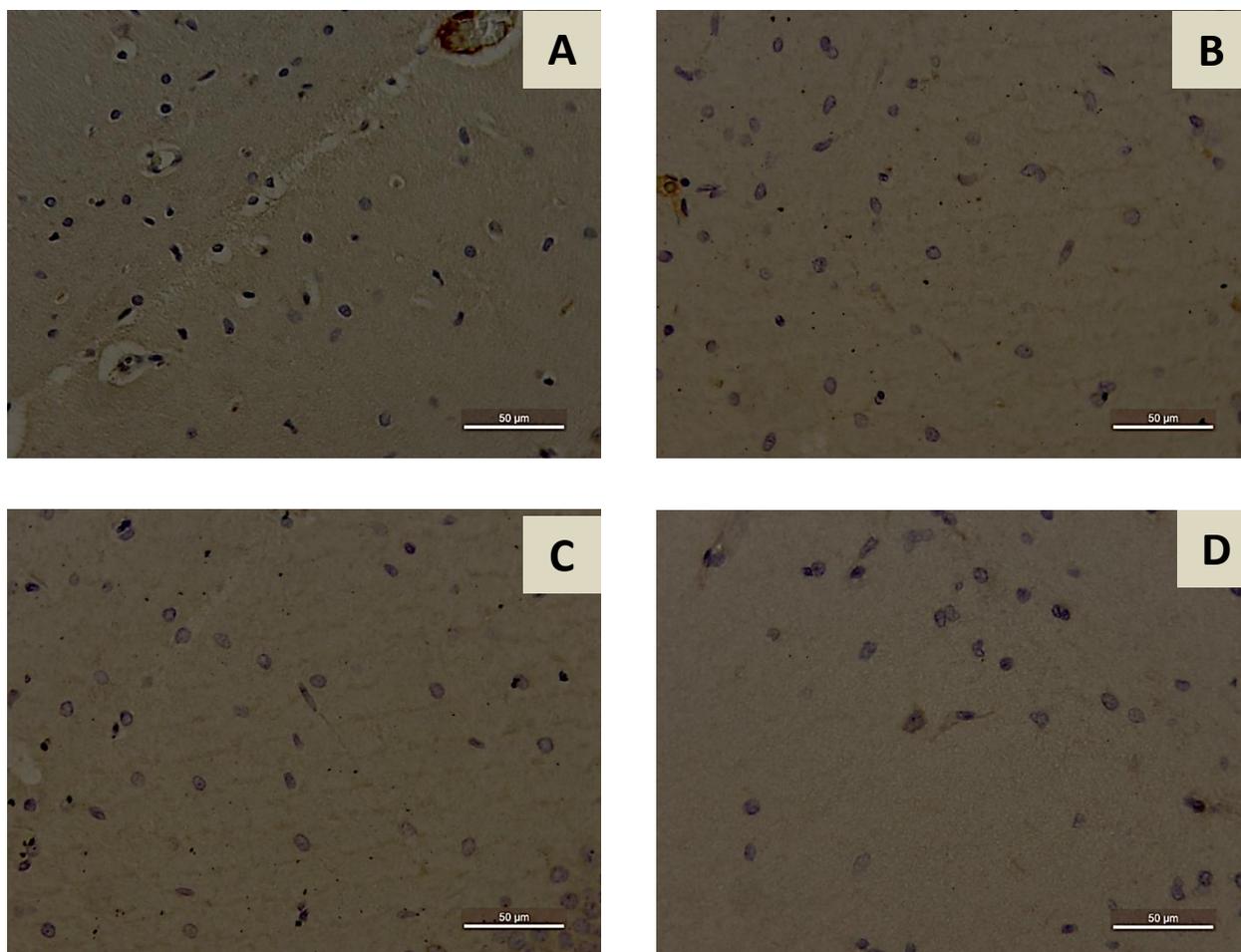


Figura 34. Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA1 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

Imunomarcação para COX-2 na área CA3

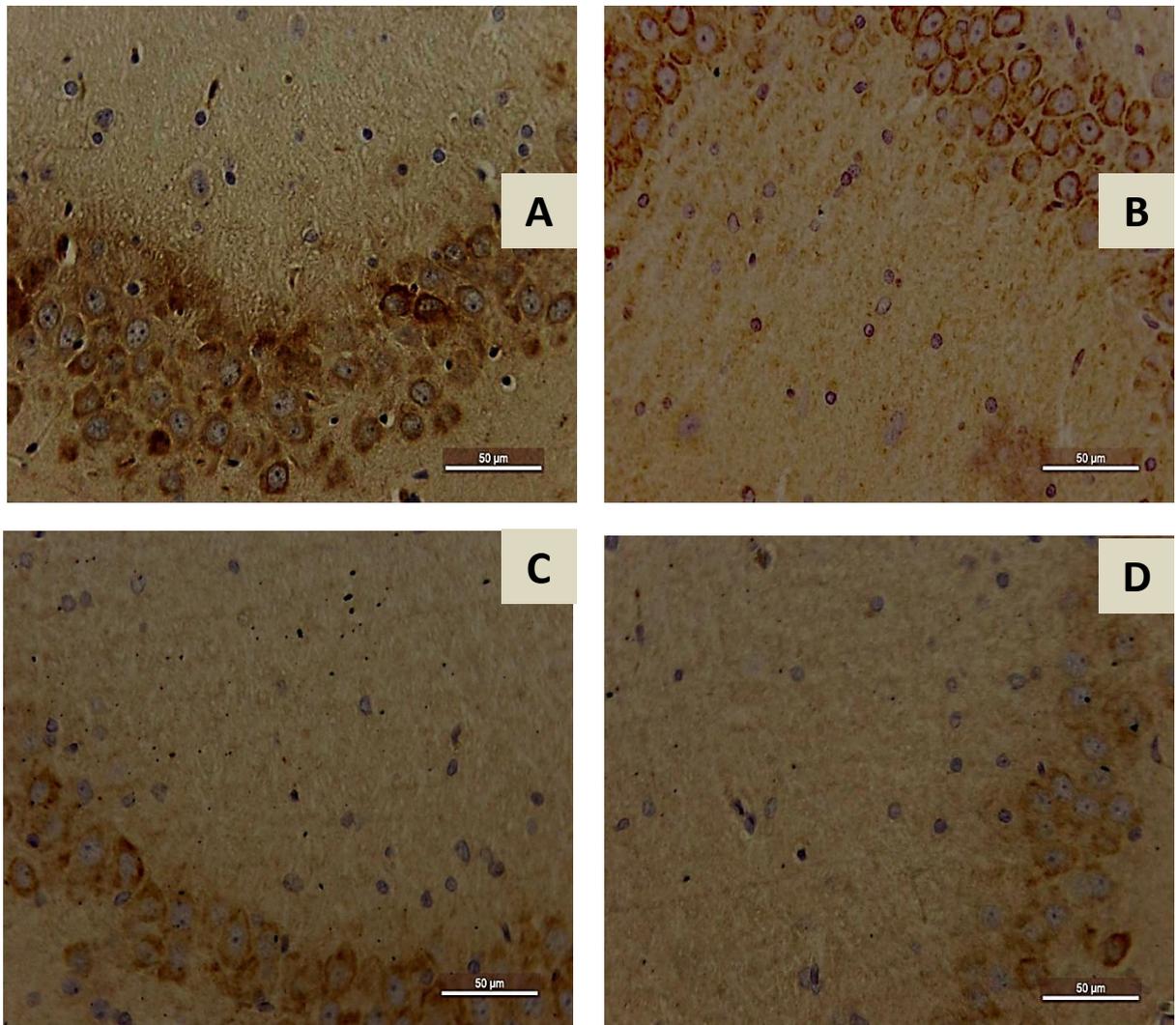


Figura 35. Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA3 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

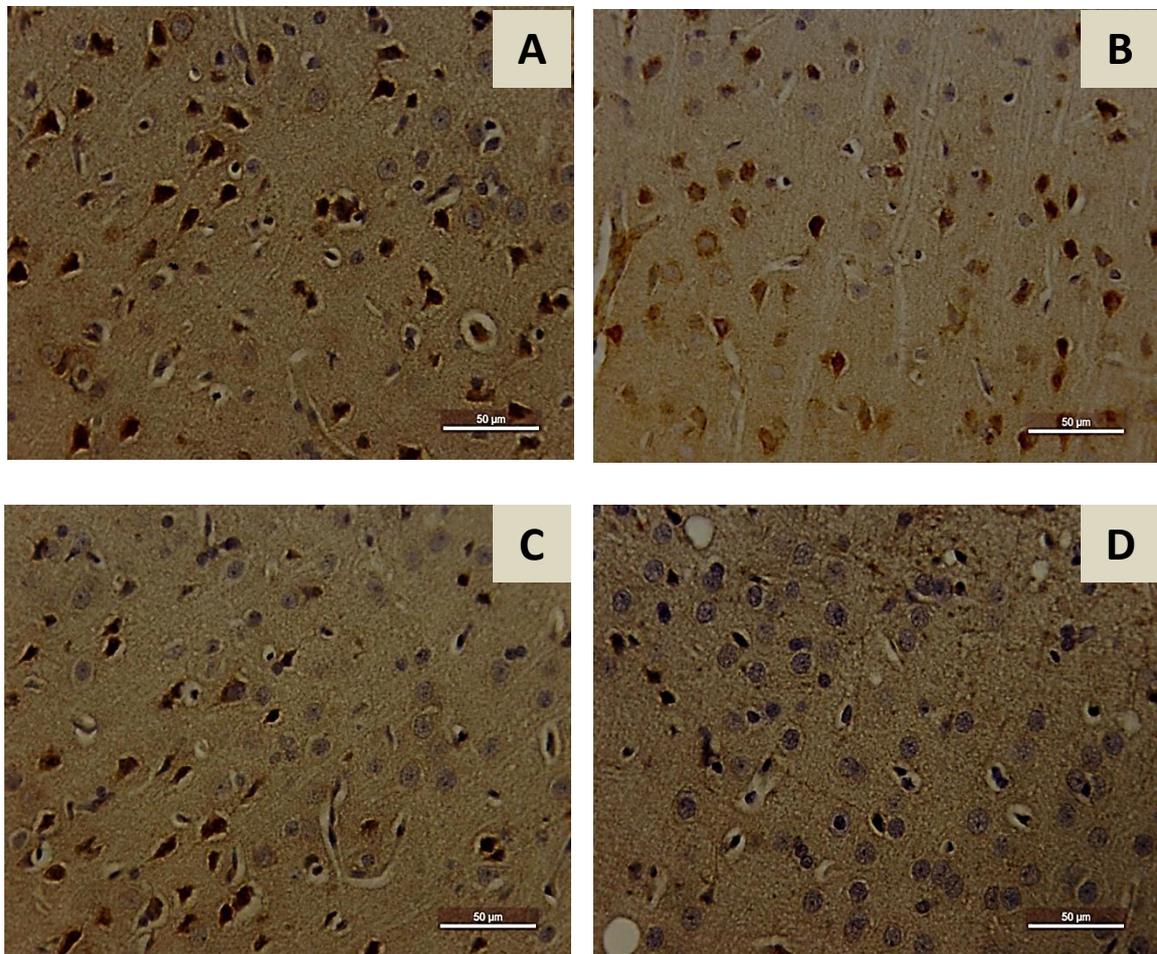


Figura 36. Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 em córtex do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

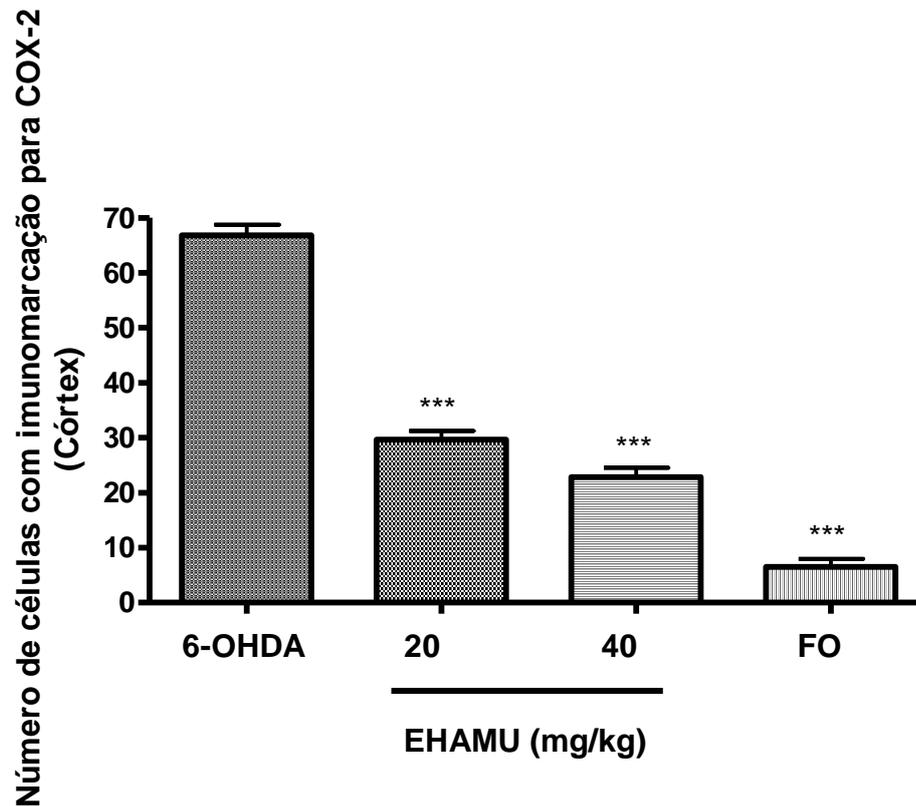


Figura 37. Contagem de imunomarcção para COX-2 em córtex direito de ratos submetidos à injeção estriatalestereotóxica unilateral de 6-OHDAe tratados por 14 dias com o EHAMU. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=2) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média \pm EPM. ***p<0,001 representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test).

Imunomarcação para COX-2 no estriado

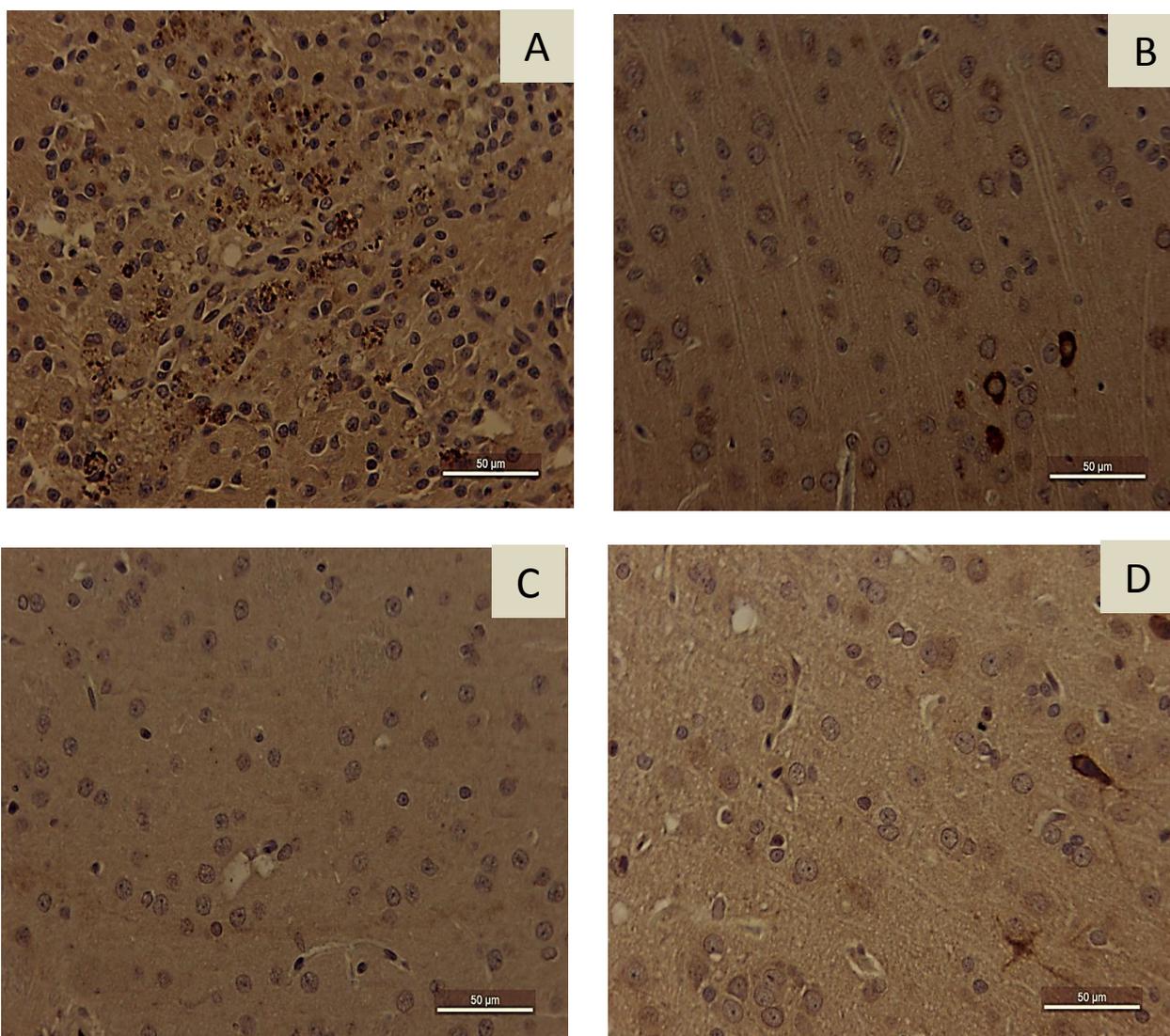


Figura 38. Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com o EHAMU. A: 6-OHDA; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

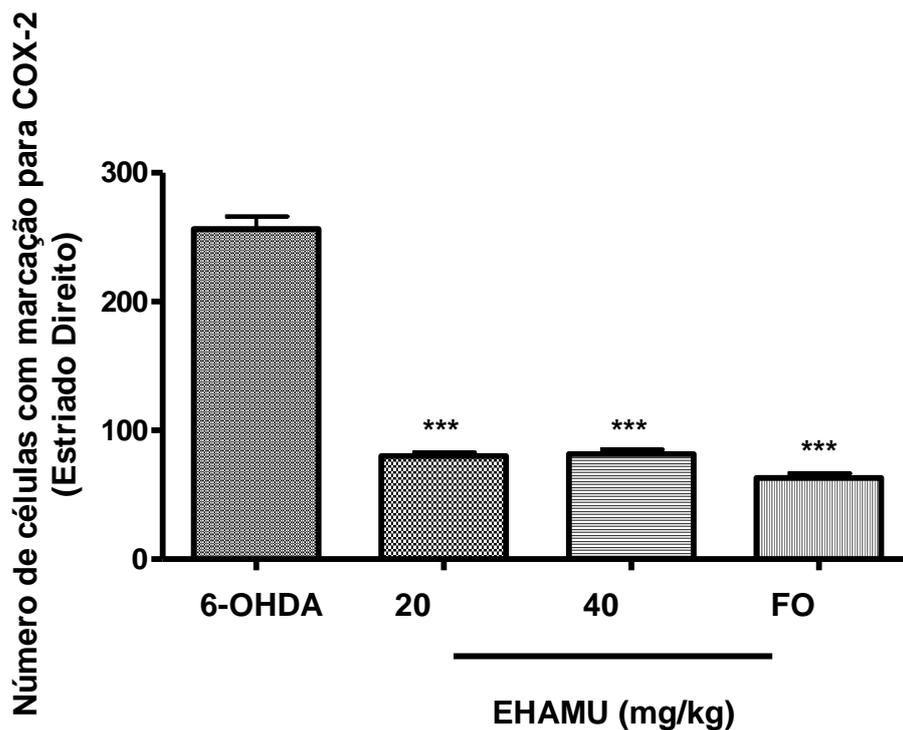


Figura 39. Contagem de imunomarcção para COX-2 em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=2) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média \pm EPM. ***p<0,001 representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test).

4.5.2.3 Imunohistoquímica para iNOS nas áreas do hipocampo Giro denteado, CA1 e CA3, no córtex e no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.

A imunomarcaçãopara iNOS foi investigada por meio de fotomicrografia nas regiões do giro denteado (**Figura 40**), CA1 (**Figura 41**) e CA3 do hipocampo (**Figura 42**); córtex (**Figura 43**)e estriado (**Figura 45**).

A **Figura 44** mostra a contagem de células marcadas com iNOS no córtex dos animais do grupo controle 6-OHDA ($78 \pm 2,88$), EHAMU 20 mg/kg ($73,17 \pm 2,12$), EHAMU 40 mg/kg ($50,67 \pm 3,04$) e Falso operado ($53,67 \pm 2,51$).

A **figura 46** mostra a contagem de células marcadas com iNOS no estriado direito dos animais do grupo controle 6-OHDA ($74,83 \pm 2,96$), EHAMU 20 mg/kg ($69,17 \pm 3,88$), EHAMU 40 mg/kg ($63,33 \pm 2,21$) e Falso operado ($29,67 \pm 1,72$).

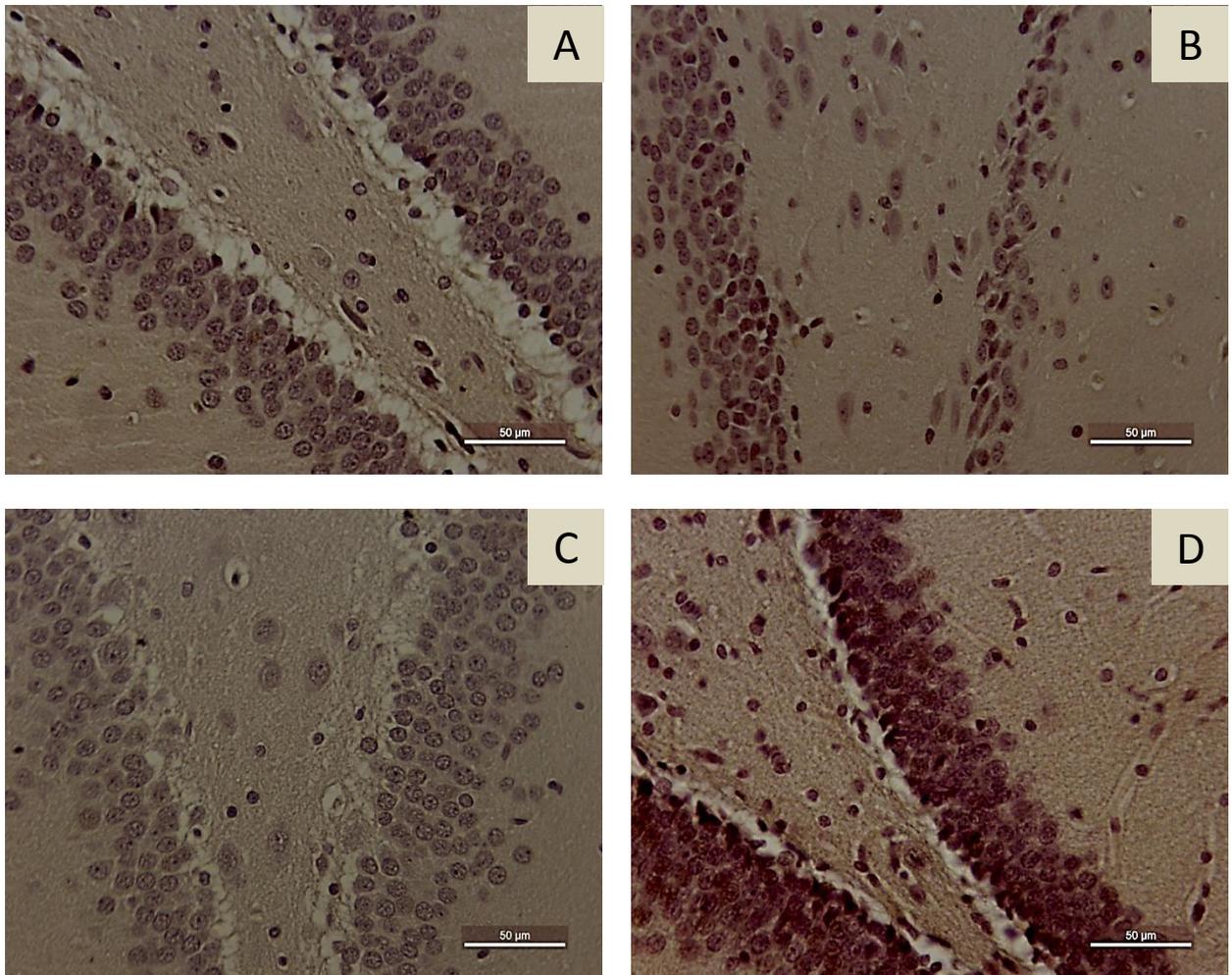


Figura 40. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área do Giro Denteado de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados por 14 dias com EHAMU. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

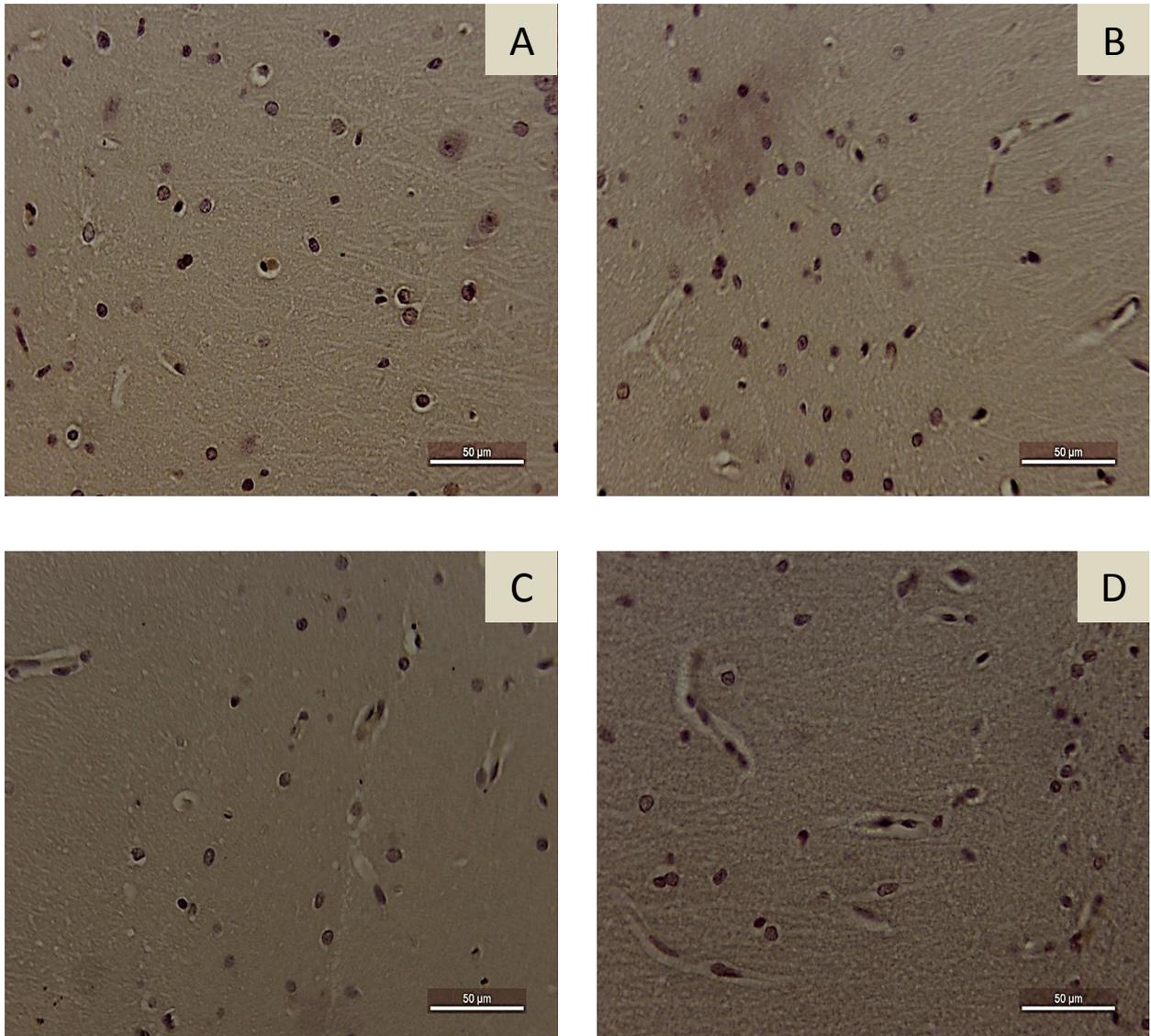


Figura 41. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área CA1 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

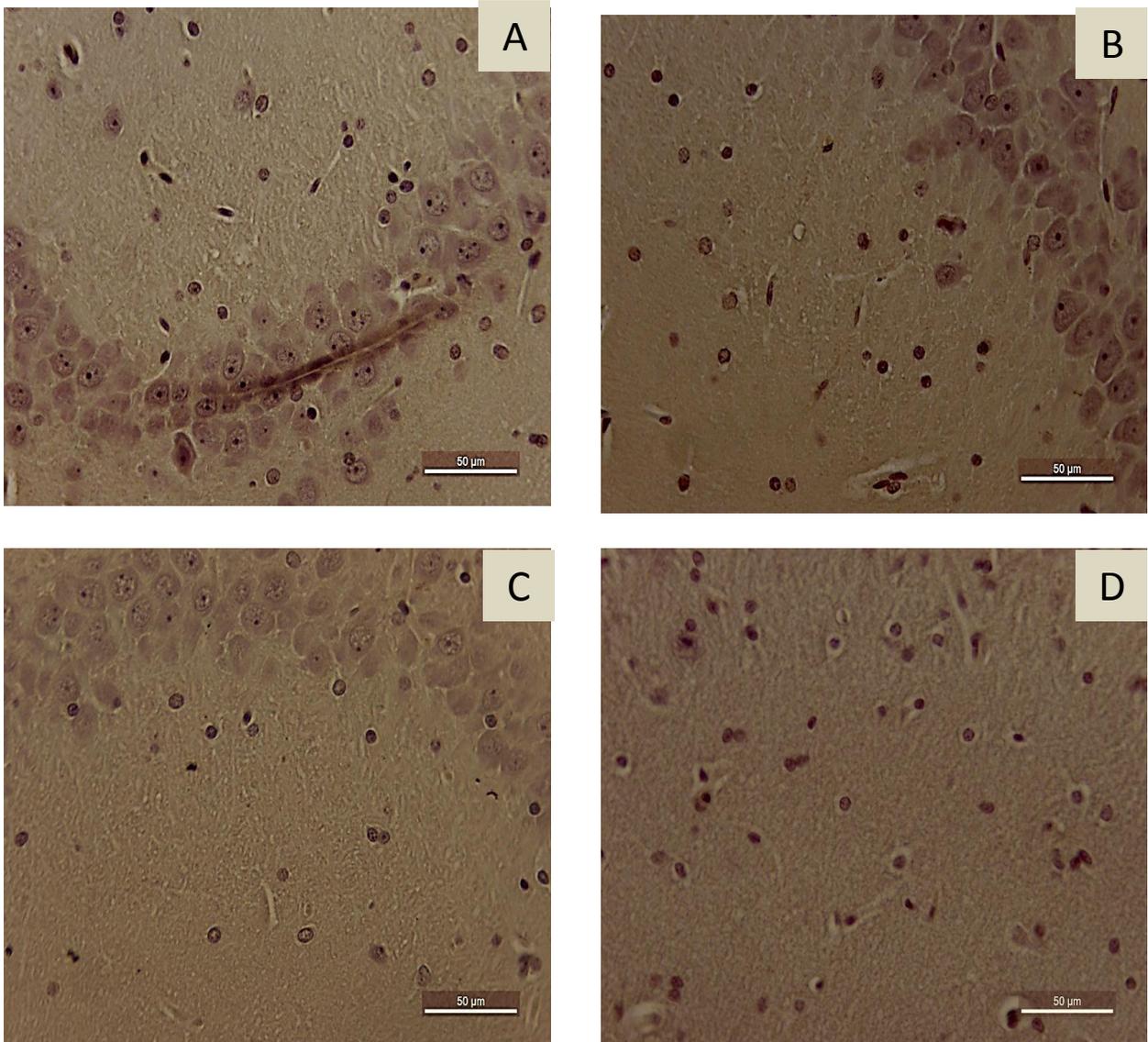


Figura 44. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOSna área CA3 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

Imunomarcção para iNOSno córtex cerebral

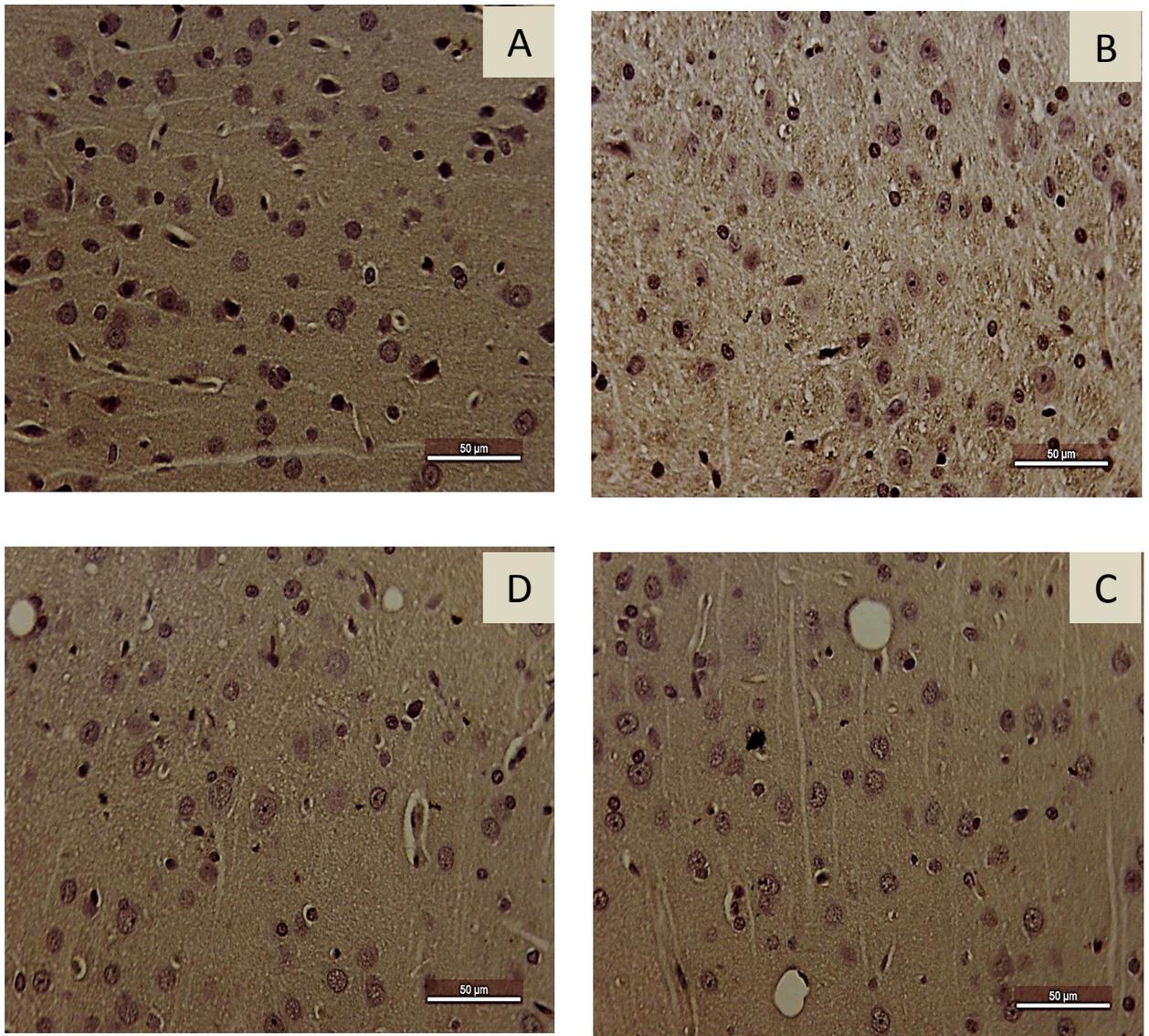


Figura 45. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOSem córtex cerebral de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

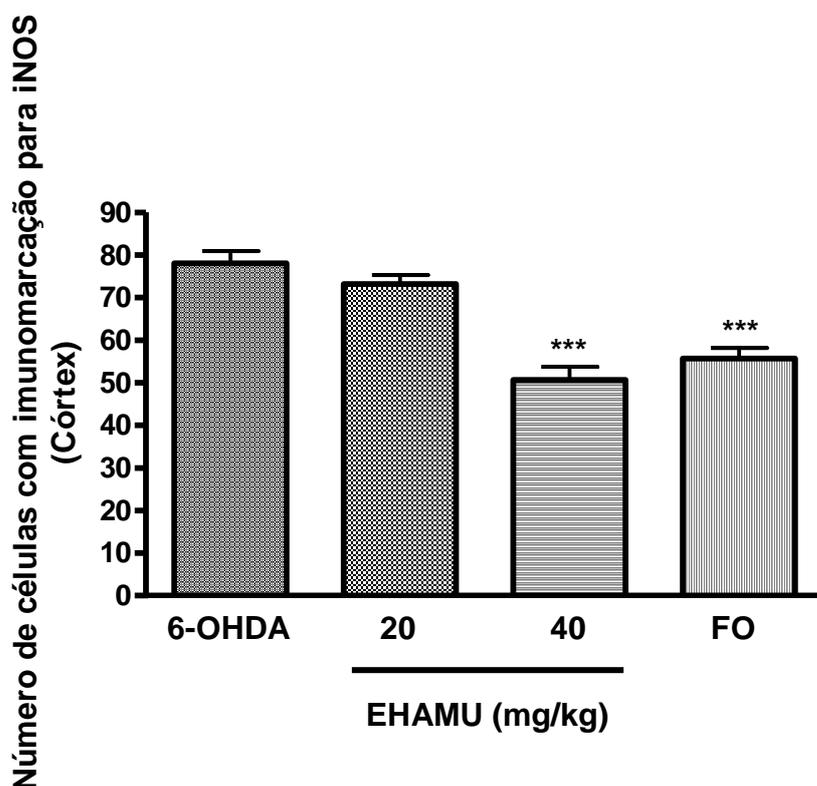


Figura 44. Contagem de imunomarcção para iNOS em c3rtex cerebral direito de ratos submetidos à injeção estriataletereot3xica unilateral de 6-OHDA. Contagem realizada em 3 campos 3pticos de cada animal (n=2) sob aumento de 40x. Os valores s3o expressos como a m3dia \pm EPM. * $p < 0,001$ representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test).**

Imunomarcação para iNOSno estriado direito

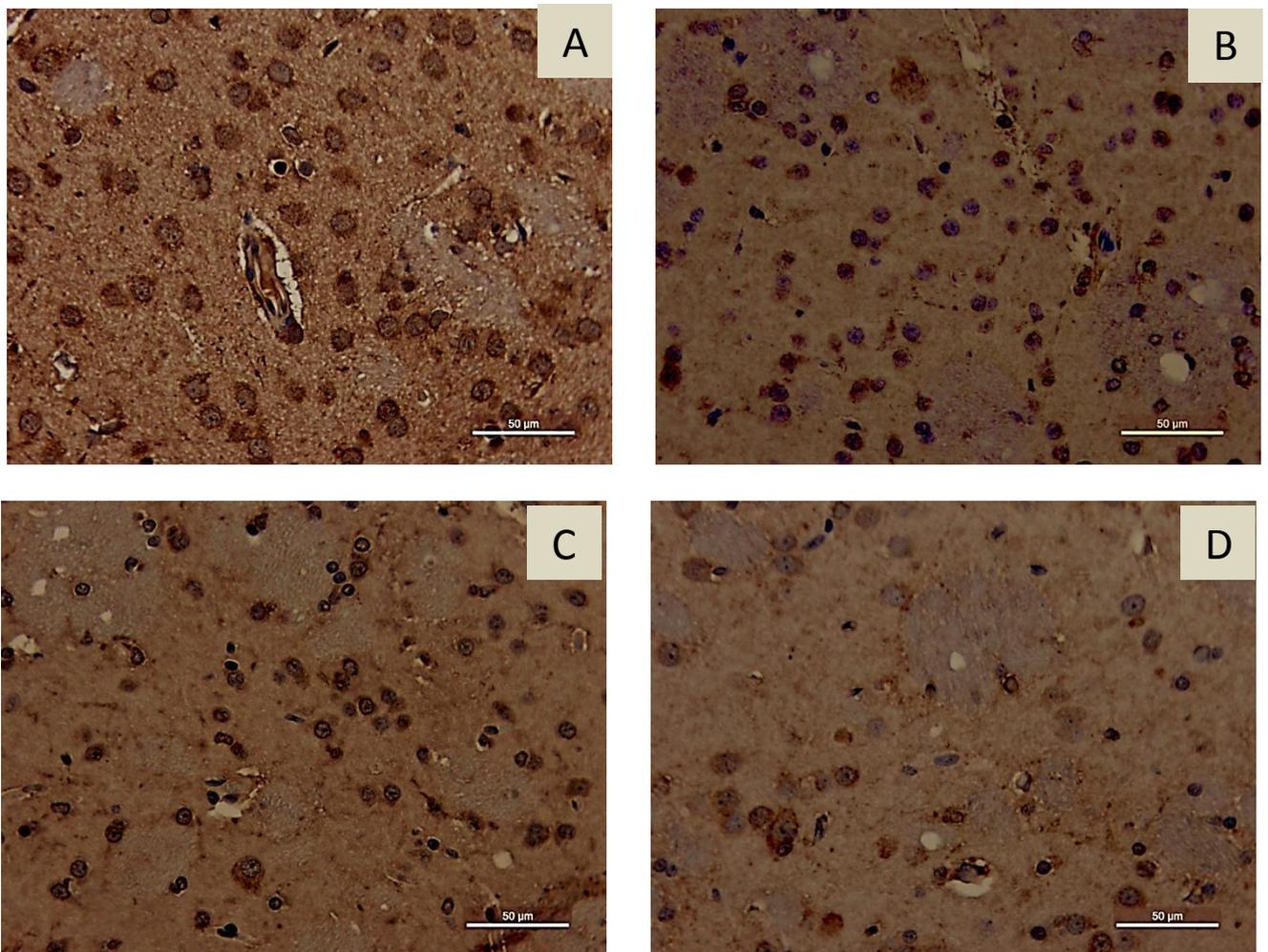


Figura 45. Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). x 40.

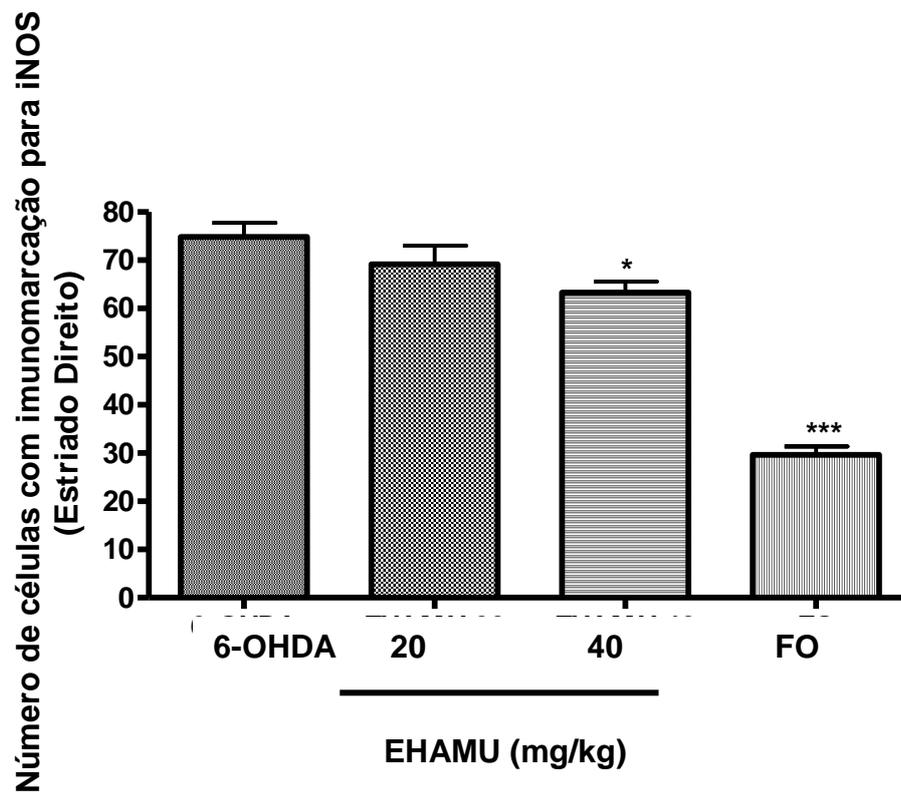


Figura 46. Contagem de imunomarcção para iNOS em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=2) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test).

4.5.2.4 Imunohistoquímica para TNF- α nas áreas do hipocampo Giro denteado, CA1 e CA3, no córtex e no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.

A imunomarcção para **TNF- α** foi investigada por meio de fotomicrografia nas regiões do giro denteado (**Figura 47**), CA1 (**Figura 48**) e CA3 do hipocampo (**Figura 49**); córtex (**Figura 50**) e estriado (**Figura 51**).

A **figura 52** mostra a contagem de células marcadas com TNF- α no estriado direito dos animais do grupo controle 6-OHDA ($245 \pm 9,85$), EHAMU 20 mg/kg ($83,50 \pm 3,79$), EHAMU 40 mg/kg ($96,17 \pm 4,45$) e Falso operado ($27,17 \pm 1,92$).

Imunomarcção para TNF- α no Giro Denteado

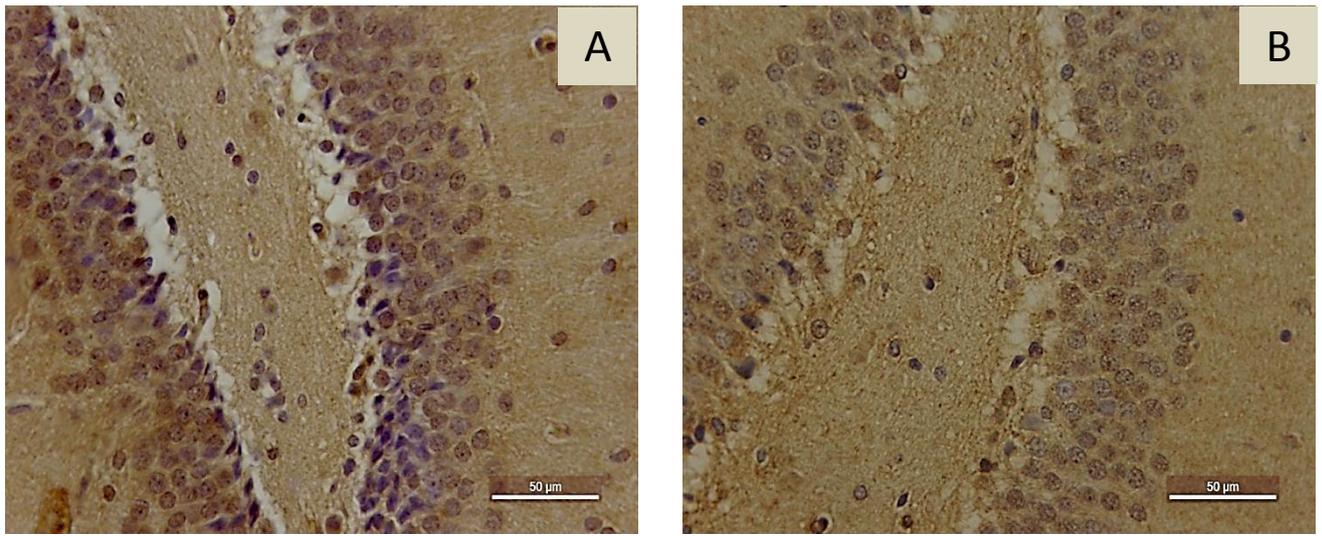


Figura 47. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α no giro denteado do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA; B: EHAMU 40 (administrado meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA, v.o). x 40.

Imunomarcção para TNF- α na área CA1 do hipocampo

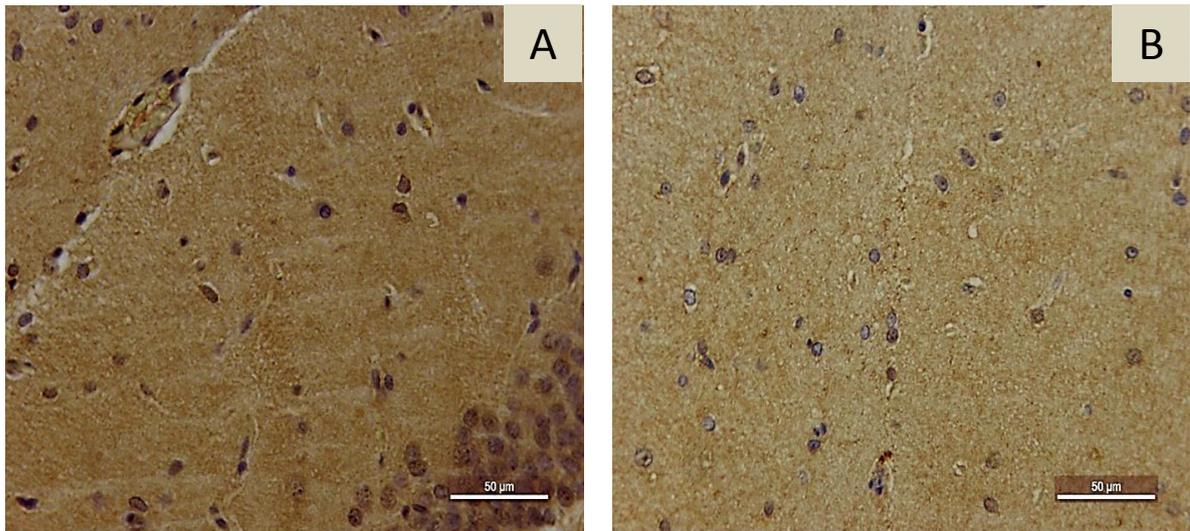


Figura 48. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α área CA1 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA; B: EHAMU 40 (administrado meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA, v.o). x 40

Imunomarcação para TNF- α na área CA3 do hipocampo

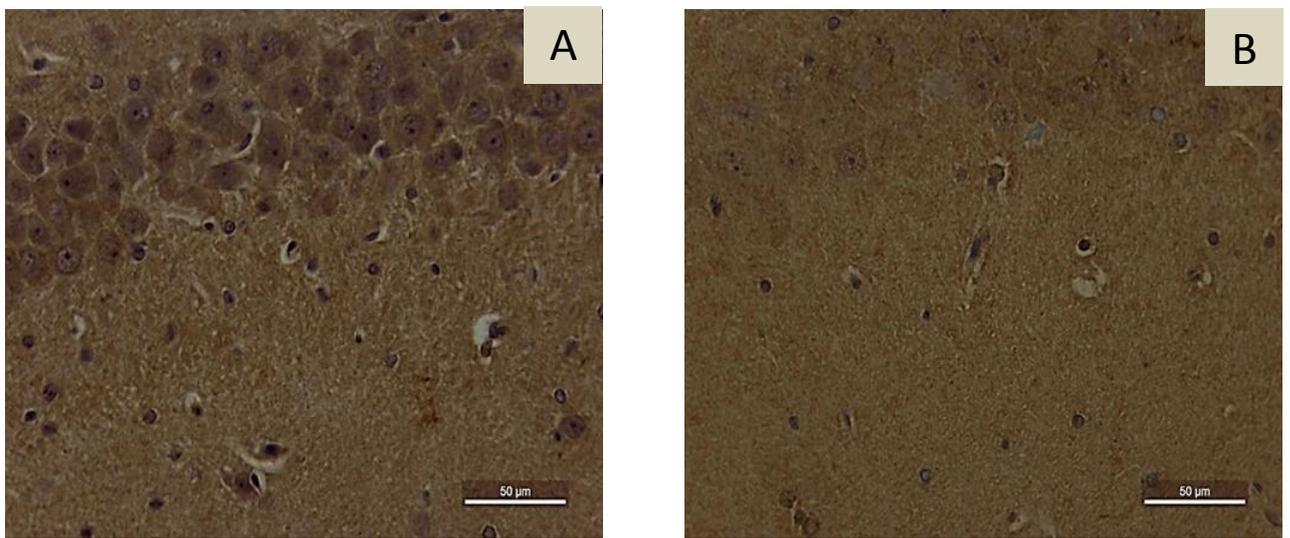


Figura 49. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α na área CA3 do hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA; B: EHAMU 40 (administrado meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA, v.o). x 40.

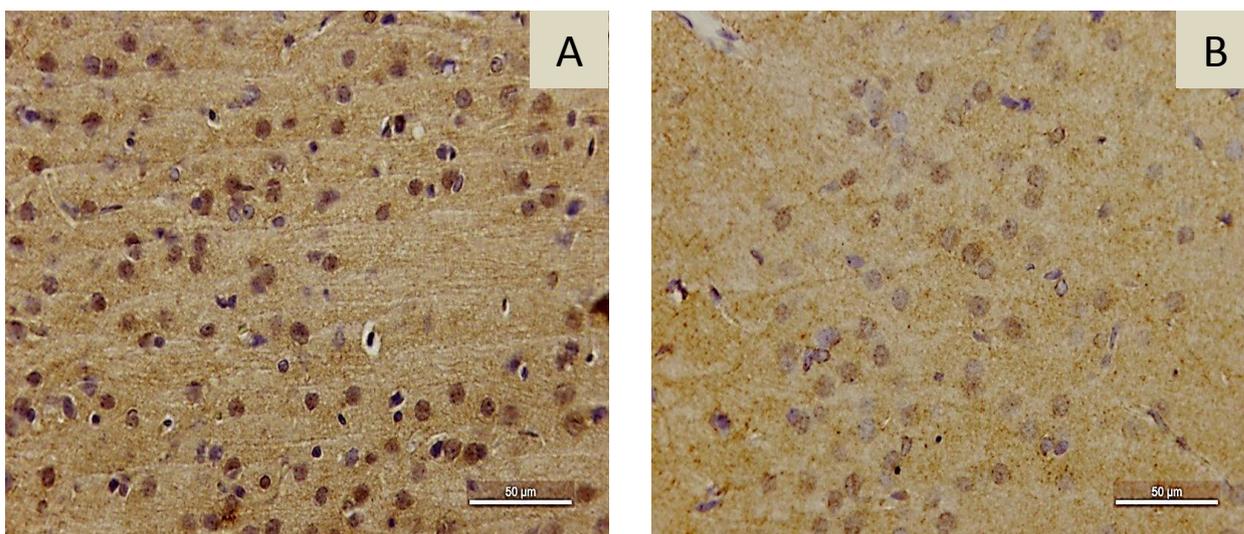


Figura 50. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α em córtex cerebral de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA; B: EHAMU 40 (administrado meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA, v.o). x 40.

Imunomarcção para TNF- α no Estriado

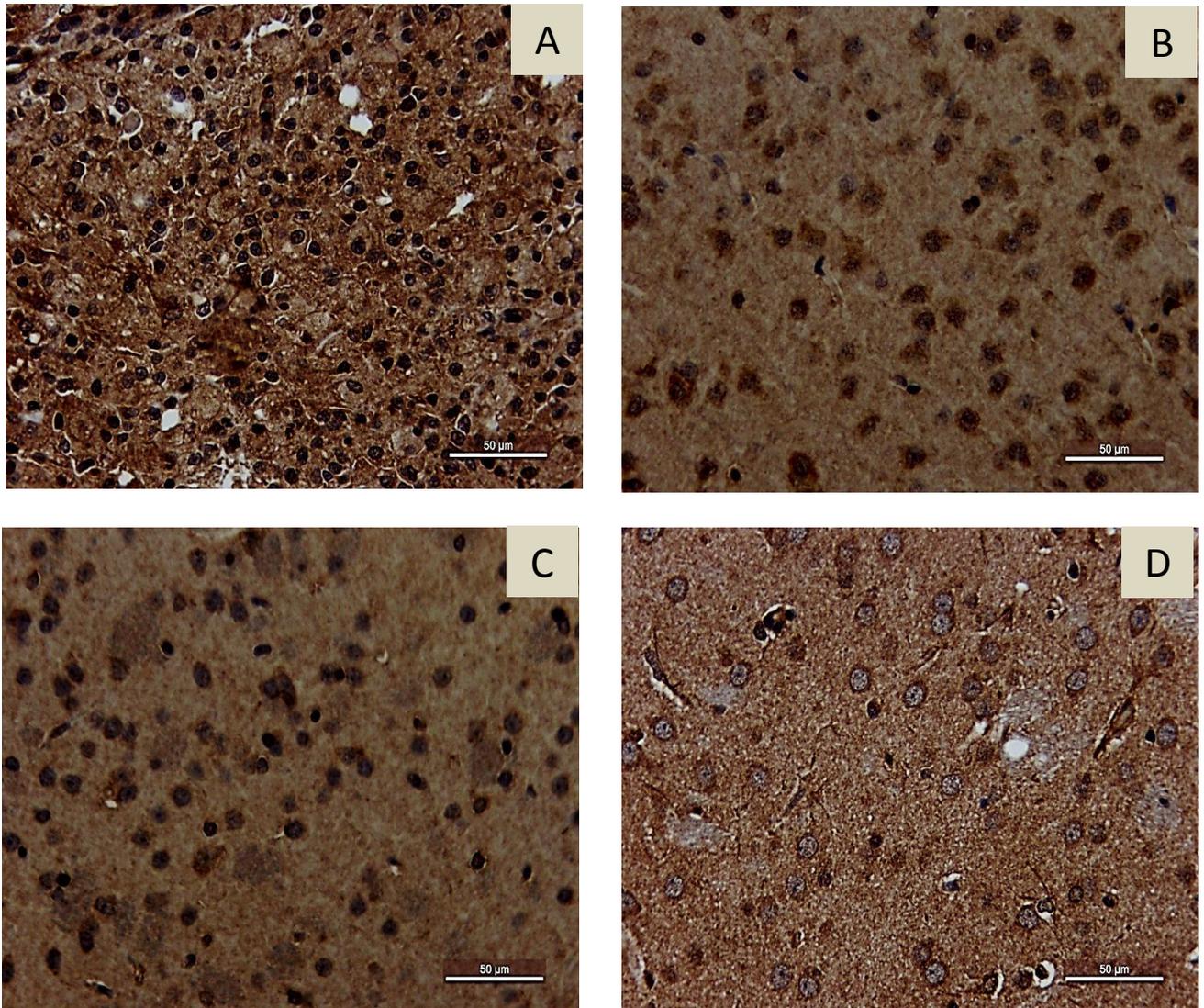


Figura 51. Fotomicrografia de imunohistoquímica para TNF- α em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia horas antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). X 40.

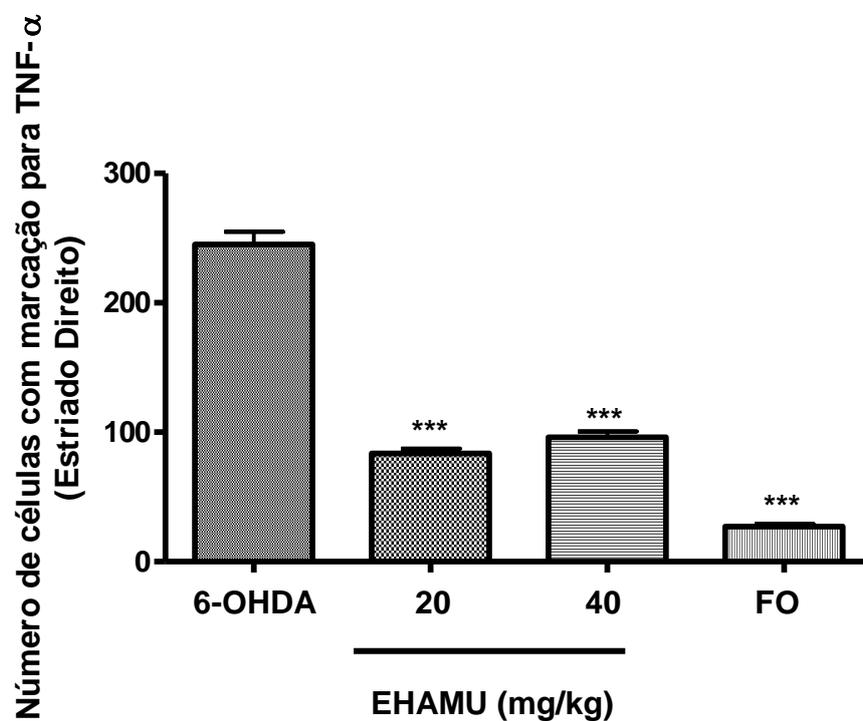


Figura 52. Contagem de imunomarcção para TNF- α em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatal estereotóxica unilateral de 6-OHDA. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=2) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média \pm EPM. ***p<0,001 representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test). X 40.

4.5.2.5 Imunohistoquímica para NF-κB no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.

A imunomarcagem para NF-κB foi investigada por meio de fotomicrografia no estriado dos animais (**Figura 53**).

A **figura 54** mostra a contagem de células marcadas com NF-κB no estriado direito dos animais do grupo controle 6-OHDA ($245 \pm 9,85$), EHAMU 20 mg/kg ($83,50 \pm 3,79$), EHAMU 40 mg/kg ($96,17 \pm 4,45$) e Falso operado ($27,17 \pm 1,92$). Evidenciando portanto a ação do EHAMU em inibir o fator de transcrição.

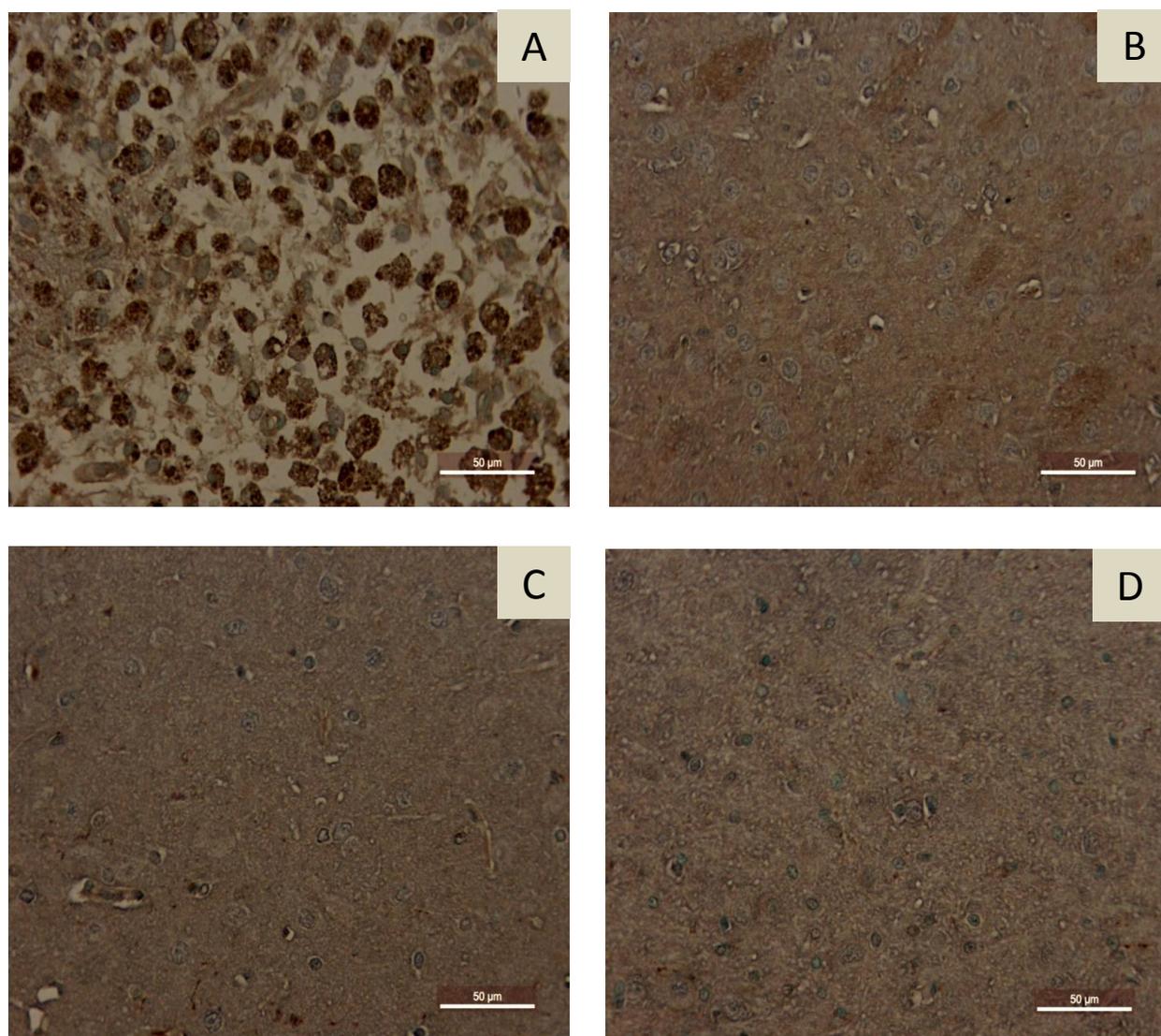


Figura 53. Fotomicrografia de imunohistoquímica para NF-κB em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). X 40.

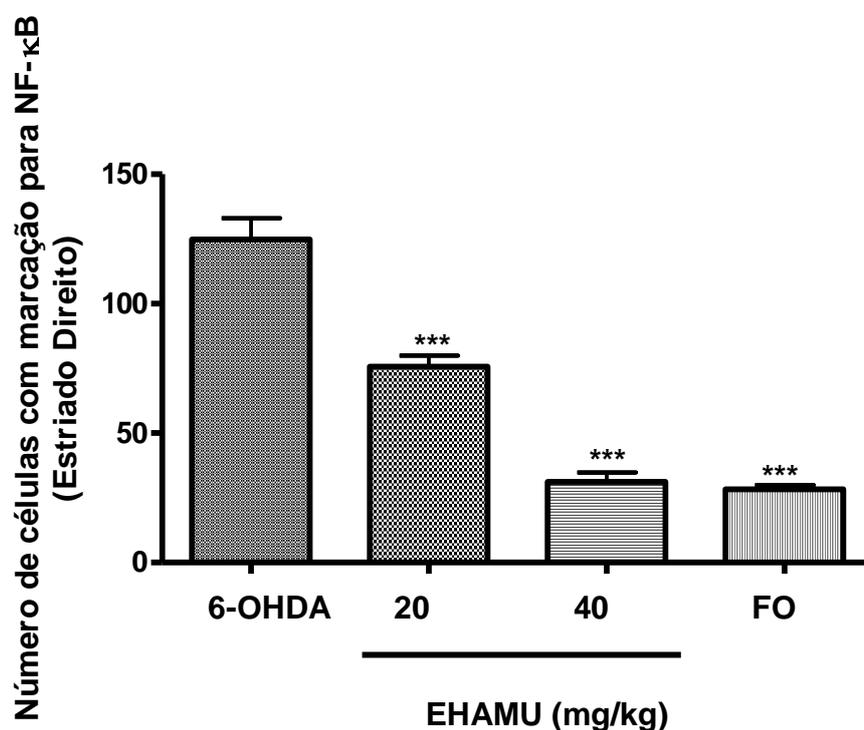


Figura 54. Contagem de imunomarcção para NF-κB em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriatalesterotóxica unilateral de 6-OHDA. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=2) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média ± EPM. ***p<0,001 representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test). X 40.

4.5.2.6 Imunohistoquímica para OX-42 no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotóxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.

A imunomarcção para OX-42 foi investigada por meio de fotomicrografia no estriado dos animais (**Figura 55**). Foi observada uma drástica diminuição da marcação para OX-42 nos animais tratados com o EHAMU.

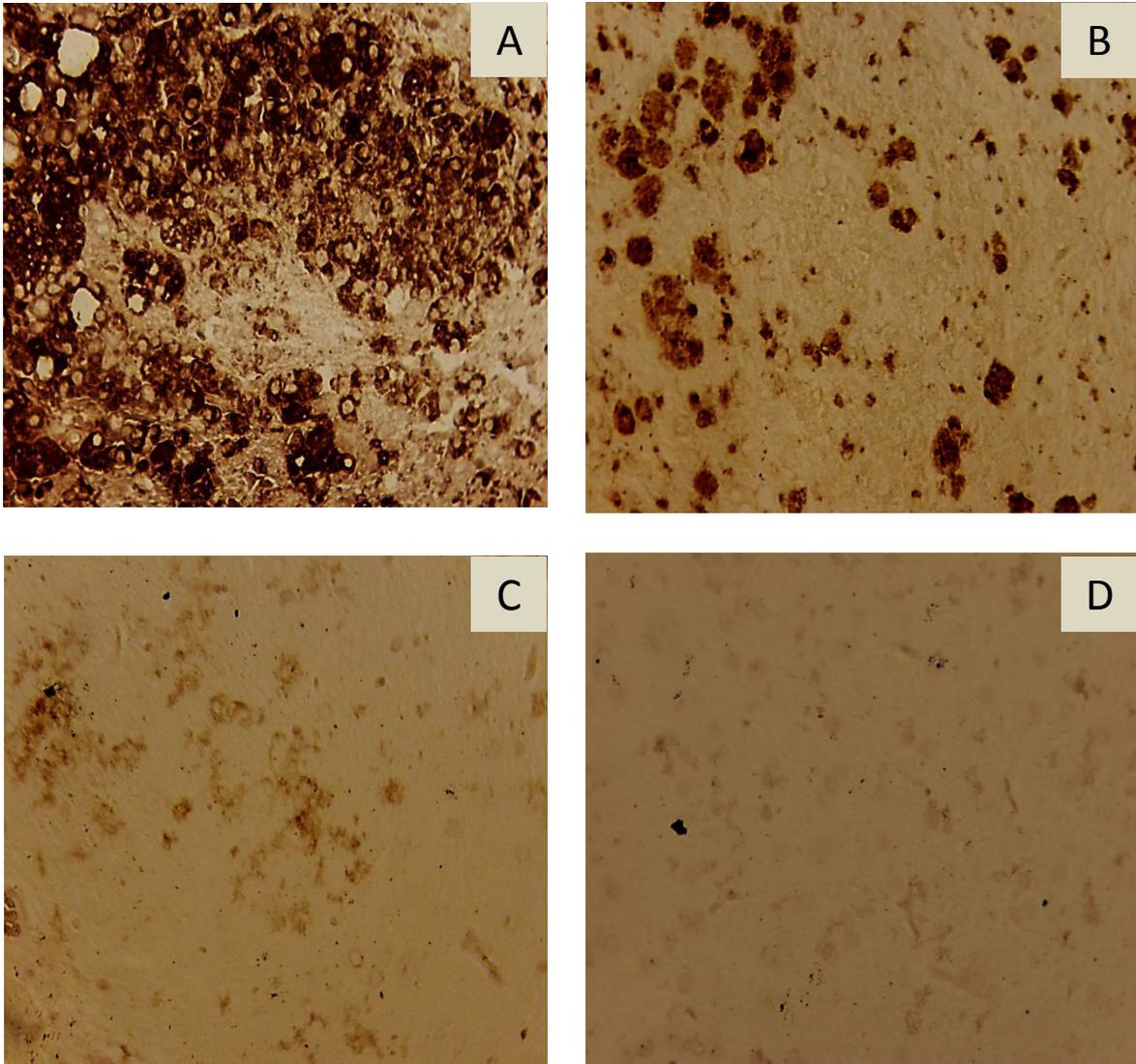


Figura 55. Fotomicrografia de imunohistoquímica para OX-42 em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). X 40.

4.5.2.7 Imunohistoquímica para GFAP no estriado direito de ratos submetidos à lesão estereotáxica unilateral de 6-OHDA e tratados com o EHAMU, v.o, por 14 dias.

A imunomarcção para GFAP foi investigada por meio de fotomicrografia no estriado dos animais (**Figura 56**). E a contagem das células marcadas foi realizada nos grupos: 6-OHDA ($67,67 \pm 4,33$); HEAMU 20 ($44,33 \pm 3,48$); EHAMU 40 ($28,33 \pm 3,38$) e FO ($11,67 \pm 0,88$) (**Figura 57**). Evidenciando que o EHAMU também é capaz de inibir a astrocitose observada no modelo de Parkinson induzido por 6-OHDA.

Imunomarcção para GFAP no Estriado direito

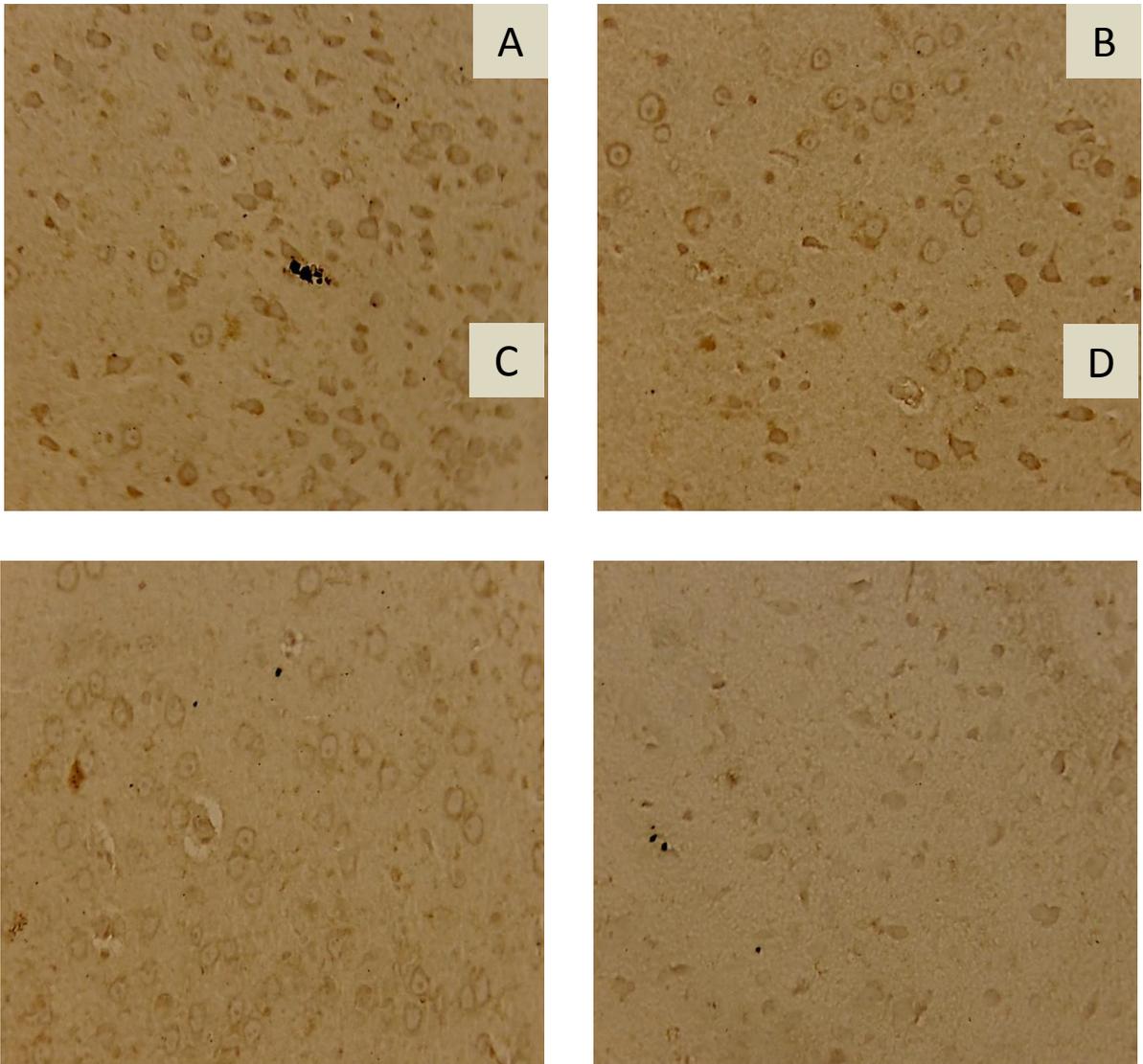


Figura 58. Fotomicrografia de imunohistoquímica para GFAP em estriado direito de ratos submetidos à lesão estriatal estereotáxica unilateral de 6-OHDA. A: 6-OHDA ; B: EHAMU 20; C: EHAMU 40 (B e C meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA); D: Falso Operado (água destilada meia hora antes, uma hora depois e por 15 dias após a injeção de 6-OHDA). X 40.

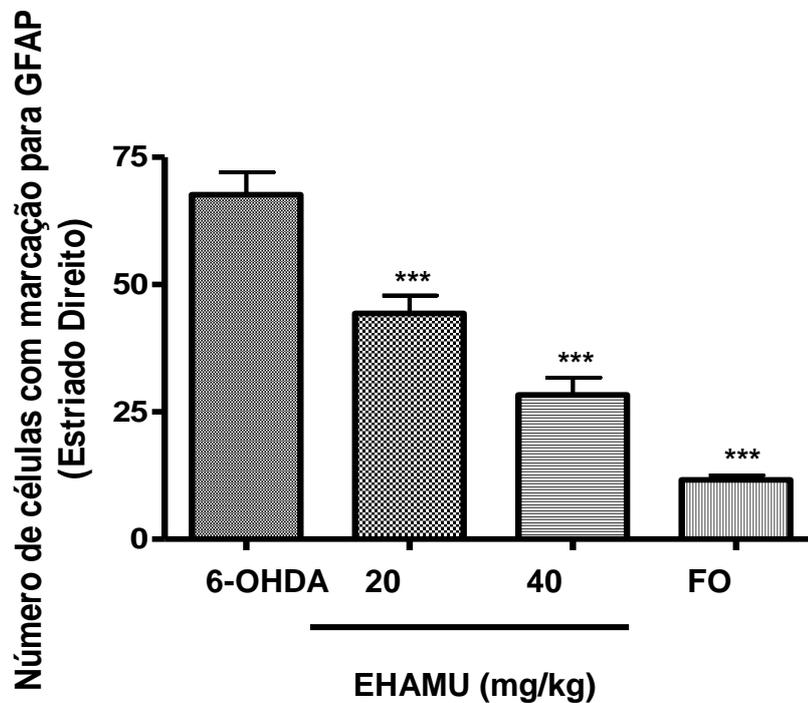


Figura 59. Contagem de imunomarcção para GFAP em estriado direito de ratos submetidos à injeção estriataletereotóxica unilateral de 6-OHDA. Contagem realizada em 3 campos ópticos de cada animal (n=1-2) sob aumento de 40x. Os valores são expressos como a média \pm EPM. *** $p < 0,001$ representa diferença significativa comparada ao grupo 6-OHDA. (ANOVA – Newman – Keuls test).

5. Discussão

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo. Sendo relacionada com a idade e contextualizando o envelhecimento populacional que está ocorrendo na sociedade, sua incidência está destinada a crescer acarretando no aumento do impacto social e dos custos demandados por ela, o que justifica a necessidade premente do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para esta patologia que venham, senão curar pelo menos, coibir a sua progressão (BLANDINI, 2010).

Na DP, a perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos na *pars compacta* da substância negra (SNpc) funciona como gatilho para complexas modificações no circuito dos gânglios da base que subjazem os sintomas motores típicos da doença como tremor, rigidez muscular, instabilidade postural e bradicinesia. Porquanto não existe um único fator causador para a doença, é sugerido um número reduzido de mecanismos que convergem para tentar explicar a sua origem como: o acúmulo de ferro (BROOM et al., 2011), o estresse oxidativo, defeitos mitocondriais, empacotamento defeituoso de proteínas e neuroinflamação. Muitas, se não todas, informações provêm de estudos conduzidos nas últimas quatro décadas mediante o uso de modelos experimentais, o que tem progressivamente identificado os mecanismos etiopatogênicos múltiplos e a fisiopatologia envolvida na Doença de Parkinson (BLANDINI et al., 2008).

A injeção intraestriatal de 6-OHDA incita danos aos terminais dopaminérgicos seguidos por perda progressiva e prolongada dos neurônios da SNpc por um mecanismo de morte anterógrado (*dying back*). O nível de dano celular provocado pela injeção estriatal é menos marcante quando comparada à lesão provocada pela injeção da toxina diretamente na substância negra, ficando limitada à 50-70% de perda do núcleo (BLANDINI et al., 2008). Esta neurotoxina medeia suas ações através do potente dano oxidativo consequente da inibição da atividade das enzimas do complexo respiratório mitocondrial e, em parte, pela ativação da micróglia com consequente neuroinflamação (WHITTON, 1997). Por outro lado parâmetros como força muscular, equilíbrio e coordenação motora dependem da interação de vários neurotransmissores em regiões diferentes do cérebro como o

córtex motor, o estriado, o tronco cerebral e o cerebelo e podem ser avaliados pelo teste do Rota-rod (WICHMANN & DELONG, 2002).

No presente trabalho avaliamos de modo comparativo os efeitos comportamentais e neuroquímicos de duas preparações obtidas de *Myracrodruon urundeuva* (aroeira-do-sertão) em modelo experimental de DP. Os nossos resultados mostraram que a administração intraestriatal de 6-OHDA reduziu de forma mais marcante a coordenação motora do que a atividade motora (avaliada pelo campo aberto) dos animais. Porquanto a dopamina é essencial para a coordenação do movimento motor, a diminuição dos níveis deste neurotransmissor acarreta na falha desse sistema (KUMAR et al., 2012). A deterioração do desempenho dos animais submetidos à lesão estriatal também pode ser consequência da degeneração cortical que ocorre, dentre outras causas, pelo processo de neuroinflamação instalado, como evidenciado em alguns estudos (SEKIYAMA et al., 2012).

O tratamento com EHAMU e ESMU nas doses respectivas de 40 e 20 mg/kg, v.o., por 14 dias melhorou o desempenho motor dos animais no teste do rota-rod, sugerindo o seu efeito neuroprotetor. É possível que o tratamento com estas preparações se deva à preservação pelo menos parcial, dos níveis de dopamina na via nigroestriatal, por vias que provavelmente diminuem o dano oxidativo e a cascata inflamatória não permitindo uma degeneração dopaminérgica mais intensa nos animais lesionados com 6-OHDA e tratados com EHAMU ou ESMU, em relação àqueles apenas lesionados. No teste do campo aberto apenas o número de grooming apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo 6-OHDA, mostrando uma diminuição no número deste comportamento estereotipado o que pode ser identificado como alguma atividade sedativa da planta.

A despeito de a bradicinesia ser um dos sinais cardinais da doença, o teste do campo aberto utilizado em animais que sofreram indução experimental da DP nem sempre apresenta efeitos sobre a movimentação animal como observado no trabalho realizado por Barbiero e colaboradores (2010), o que indica que este teste, por mais que nos dê uma boa ideia de como está a atividade motora do animal, não

tenha uma aplicação tão direta nestes modelos, como tem o teste de comportamento rotacional provocado por agonistas dopaminérgicos como é o caso da apomorfina.

Classicamente, ratos submetidos à lesão na via dopaminérgica nigroestriatal apresentam estereotipia motora e comportamento rotacional em resposta a administração sistêmica de um agonista dopaminérgico (MEREDITH & KANG, 2006). O teste rotacional induzido por apomorfina continua sendo a referência inicial para determinação da magnitude da perda dos neurônios dopaminérgicos. O desequilíbrio no conteúdo de dopamina entre os lados esquerdo e direito do cérebro causa a assimetria rotacional observada, onde o animal apresenta rotações oriundas do lado cerebral de maior atividade devido a presença de um maior número de neurônios dopaminérgicos viáveis (UNGERSTEDT, 1971). No presente estudo, os animais submetidos à cirurgia estereotáxica intraestriatal de 6-OHDA apresentaram rotações contralaterais estereotipadas, o que validou o experimento. Os tratamentos tanto com EHAMU quanto com ESMU diminuíram o número de rotações de forma dose dependente como observado na estatística, o que denota um possível efeito neuroprotetor da planta provavelmente mediado pela preservação dos níveis de dopamina no corpo estriado, comprovado pelos resultados dos níveis estriatais de monoaminas realizados pelo HPLC.

A associação entre a depleção dopaminérgica na via nigroestriatal e a doença de Parkinson já é bem estabelecida (KELLEY et al., 2012) logo, diminuições nas concentrações de dopamina (DA) e DOPAC no estriado dos animais já eram esperadas e, de fato, foram observadas neste estudo. Corroborando com estes achados, a tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante da síntese de dopamina sendo expressa principalmente nos neurônios dopaminérgicos, também teve sua presença drasticamente diminuída pela 6-OHDA como observado no corpo estriado dos animais através da análise imunohistoquímica. Estes resultados estão de acordo com estudos que utilizam o mesmo modelo e que apontam uma perda considerável de neurônios dopaminérgicos observada através da diminuição acentuada da marcação de imunohistoquímica para TH (JANG et al., 2012). Estes achados

refletem o dano aos terminais neuronais estriatais ou mesmo à morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc.

Os extratos testados elevaram os níveis de dopamina e de DOPAC, assim como aumentaram a marcação para TH no estriado, mostrando uma maior integridade dos neurônios e, portanto uma atividade neuroprotetora, o que ainda foi endossado pela coloração com cresil violeta no estriado dos animais que mostrou uma maior população neuronal viável naqueles animais tratados com o EHAMU. Este era o efeito esperado tendo em vista todo o embasamento teórico sobre os mecanismos fisiopatológicos da doença assim como ações da planta sobre estes mecanismos que precedeu a realização desta pesquisa, no entanto o entendimento dos mecanismos por meio dos quais esta proteção ocorre é imprescindível para o entendimento da doença e para a escolha dos alvos terapêuticos.

Vários fatores podem levar a morte neuronal, não obstante, um estudo recente mostrou que o bloqueio da iNOS reverte tanto a diminuição de marcação para TH como a depleção dopaminérgica induzida pela injeção estriatal de 6-OHDA (LIU et al., 2012). A inibição da iNOS observada neste estudo pode desta forma ser um dos fatores responsáveis pela neuroproteção observada em animais que receberam o Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva*.

Devido ao envolvimento de neuroinflamação no processo fisiopatológico da DP o interesse pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) tem aumentado, sendo a eles creditado algum efeito neuroprotetor. Assim muitos estudos epidemiológicos indicam que a utilização prolongada de AINEs está associada a um risco menor de DP por mecanismos dependentes e independentes da inibição da COX (MOORE et al., 2010). Nesta direção, o ácido salicílico (AS) tem sido proposto como agente neuroprotetor em estudos que utilizam o MPTP como modelo experimental de DP. A ação do AS é atribuída a sua capacidade de sequestrar radicais livres, podendo atuar desta maneira de modo profilático em um tratamento de longa duração (ESPOSITO et al., 2007). Outros estudos com o AS, agora a longo prazo, e no modelo de Parkinson induzido por rotenona, mostraram que a droga também atenua os níveis de mediadores inflamatórios como a COX-2 e iNOS além

de suprimir os níveis do fator de transcrição NK-kB e de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (THAKUR & NEHRU, 2012). Os efeitos neuroprotetores são, portanto devido a suas propriedades antiinflamatórias e antioxidantes.

Vale ressaltar que, mesmo os AINEs apresentando efeitos sobre a progressão da doença, sendo, portanto uma ferramenta de intervenção neuroprotetora, a utilização a longo prazo destes agentes não é viável. Este fato é devido aos já conhecidos e danosos efeitos colaterais dessas drogas, sobretudo, no trato gastrointestinal sendo portanto necessária a contínua busca por agentes que causem menos efeitos adversos. Considerando esta questão, avaliamos o potencial da *Myracrodruon urundeuva* como agente anti-inflamatório além do seu efeito analgésico, usando o teste de edema de pata induzido por carragenina e o teste de Hargreaves.

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado extraído a partir de algas marinhas e que tem sido vastamente utilizado em testes animais para a indução de inflamação sendo muito útil no “screening” de novas drogas antiinflamatórias (SHRIVASTAVA et al. 2012). Tem sido proposto que os principais mediadores envolvidos neste edema sejam a histamina, a serotonina, as cininas e prostaglandinas sendo os dois primeiros responsáveis pelo edema inicial e os dois últimos pela fase tardia (Di ROSA et al. ,1971), que também está relacionada com a infiltração de neutrófilos e à liberação de radicais livres por estas células (DAWSON et al., 1991; PESKAR et al, 1991).

Observamos, através da mensuração, que a injeção intraplantar de carragenina provocou extravasamento de plasma e inflamação caracterizado pelo aumento de líquido no tecido conjuntivo da pata do animal. A fase tardia do edema, observada neste estudo, foi inibida pelos extratos hidroalcoólico e seco da planta de forma significativa, principalmente na dose de 20mg/kg. Esta fase classicamente responde bem aos anti-inflamatórios não esteroidais, pontuando a participação da cicloxigenase-2 neste modelo e nos fornecendo indicativos de que os extratos de *Myracrodroun urundeuva* também possam apresentar este efeito inibidor de COX e iNOS. Observamos ainda estes mesmo animais no aparelho de Hargreaves e os

extratos foram capazes de diminuir a hiperalgesia induzida pela carragenina aumentando o limiar de resposta ao estímulo térmico. O efeito de hiperalgesia pode ser, embora não unicamente, responsabilidade da liberação central e periférica de prostaglandinas em resposta a lesão tecidual (ORTIZ et al., 2007), endossando assim o provável envolvimento da inibição da COX-2 pelos extratos testados, o que explica sua ação antiinflamatória e analgésica.

O extrato hidroalcoólico da casca de aroeira apresentou efeito anti-inflamatório significativo em estudos anteriores em modelos de inflamação crônica e aguda (MENESES, 1986). Uma fração importante do extrato desta planta é a enriquecida de chalconas, que são flavonóides e que assim como os outros de sua classe, possuem de forma bem descrita na literatura, potencial antioxidante e antiinflamatório, principalmente devido à inibição da COX (ZUANAZZI, 1999). Algumas chalconas já tiveram comprovadas suas ações sobre a inibição da migração de neutrófilos e a liberação de eicosanoides e TNF- α em modelos utilizando o zymozan e a carragenina (HERENCIA et al., 2001). O estudo com a fração de chalconas diméricas isoladas a partir do extrato de acetato de etila da MU realizado em nosso laboratório mostrou que nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg esta fração aumentou a latência ao estímulo térmico no teste da placa quente por efeitos analgésicos periféricos e centrais (VIANA et al., 2003).

Os efeitos analgésico e anti-inflamatório apresentado pelos flavonoides são compartilhados com outra fração importante presente nos extratos de MU, que é a fração rica em taninos (AHMADIANI et al., 2000). A fração tanínica também foi estudada pelo nosso laboratório nos testes da formalina e do edema de pata induzido por carragenina apresentando efeitos farmacológicos significativos provavelmente devido ao seu efeito antioxidante.

Os taninos são produzidos pelas plantas com a finalidade de proteção, sendo eficientes em capturar espécies reativas de oxigênio. O estudo mostrou que, diferentemente da fração rica em chalconas, a fração tanínica apresenta ação analgésica apenas na segunda fase do teste da formalina, assim como ocorre com a aspirina, indicando, pois uma possível inibição da COX (SOUZA et al., 2007).

O extrato etanólico também apresentou efeito anti-inflamatório pronunciado no edema de pata induzido por carragenina, em um modelo de peritonite e na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (UNITED STATES, 2012; VIANA et al., 1997). Não obstante, este mesmo extrato em estudo recente interferiu com o processo de cicatrização de feridas, prolongando desta forma o processo inflamatório por mecanismos que podem envolver os receptores nucleares de glicocorticóides (MACHADO et al., 2012).

É apropriado atentar para o possível destaque de algum composto presente no extrato hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* quando este é administrado em doses maiores, uma vez que observamos uma diminuição inesperada da atividade farmacológica com o aumento de dose, indicando que teríamos uma atividade máxima com a dose de 20mg/kg. Apesar de não usual na farmacologia, este efeito foi igualmente observado em trabalhos anteriores que utilizaram a fração tanínica do extrato de acetato de etila da MU indicando que uma curva em sino poderia aparecer em doses maiores como observado no teste da formalina e no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina (SOUZA et al., 2007).

A compilação de todos estes dados valida o uso centenário desta planta pela população como agente anti-inflamatório, principalmente para inflamações do trato geniturinário (VIANA et al., 2003), por mecanismos que envolvem, entre outros, a inibição da COX-2, da migração de neutrófilos além de sua atividade antioxidante. Não seria ainda ousado afirmar que, por ter ação gastroprotetora já comprovada (SOUZA et al., 2007), o extrato hidroalcoólico da MU seria uma opção mais segura e eficaz que os próprios AINEs para utilização crônica na neuroinflamação envolvida na fisiopatologia da DP.

A observação de tais ações nos guiou à realização de testes *in vitro* que avaliassem a ação antioxidante do extrato seco estudado, considerando que o processo inflamatório leva ao estresse oxidativo que, por sua vez, amplifica a resposta inflamatória. Um trabalho prévio do nosso laboratório (NOBRE-JUNIOR et al., 2009) em um modelo de doença de Parkinson *in vitro*, induzida pela exposição a 6-OHDA de cultura de células mesencefálicas de rato, já havia apontado um ótimo

efeito neuroprotetor de uma fração rica em chalconas da aroeira-do-sertão via efeito antioxidante, particularmente através da diminuição a peroxidação lipídica e da formação de oxido nítrico, indicando que esta fração seria benéfica em caso de processos neurodegenerativos como a DP.

O teste do DPPH mostrou, de forma evidente, que o extrato hidroalcoólico seco da Aroeira-do-Sertão apresenta a capacidade de sequestrar radicais livres em concentrações muito baixas. Este método é fácil e preciso para avaliar o potencial antioxidante de extratos *in vitro* sendo o sequestro do radical DPPH atribuído à habilidade destes compostos de doar hidrogênio. O extrato etanólico da aroeira-do-sertão também já foi testado neste método com resultados igualmente satisfatórios (FRANÇA et al., 2012).

A realização do método da superóxido dismutase/NBT foi uma tentativa de identificarmos uma via específica de atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de MU, não obstante, não identificamos nenhuma ação do mesmo sobre esta enzima indicando que provavelmente sua atividade antioxidante não está relacionada ao sequestro de radicais superóxido. De toda forma, constatado o efeito antioxidante no teste do DPPH, a busca pelos mecanismos antioxidantes específicos se faz importante tendo em vista que o estresse oxidativo está intimamente relacionado com doenças neurodegenerativas como a DP, sendo um alvo importante para a ação de novos fármacos.

Todas as atividades e indícios supracitados nos direcionaram a averiguar como os extratos utilizados melhoravam o desempenho dos animais submetidos à lesão estriatal induzida por 6-OHDA no comportamento rotacional induzido por apomorfina assim como de que forma geravam o aumento considerável de dopamina no estriado destes animais levando em consideração os possíveis mecanismos antiinflamatórios da droga.

O modelo de doença de Parkinson induzido pela injeção intraestriatal de 6-OHDA é bastante utilizado para desvendar a patogênese da doença e testar drogas neuroprotetoras (HUetal., 2011), diferente do modelo que utiliza a injeção da

neurotoxina no mesencéfalo, que é mais apropriado para estudar as consequências da morte neuronal dopaminérgica e testar estratégias terapêuticas para os sintomas motores (GHOSH et al., 2010; RYLANDER et al., 2010). Desta forma, realizamos vários imunoensaaios nos tecidos cerebrais dos animais submetidos à injeção intraestriatal de 6-OHDA para avaliarmos a importância da neuroinflamação neste modelo e a capacidade do extrato testado (EHAMU) em reverter os sinais da doença atenuando o processo de morte neuronal.

A neuroinflamação é um fenômeno que visa à proteção do SNC contra danos físicos e agentes infecciosos, sendo, pois na maioria das vezes, benéfica, agindo a favor da restauração da homeostasia. Não obstante, a sugestão de que o processo neuroinflamatório contínuo contribui para uma cascata de eventos que resultam na morte neuronal esta sendo cada vez mais amparada pelas pesquisas (SPENCER et al., 2012).

Vários mediadores estão envolvidos no processo neurodegenerativo da Doença de Parkinson, entre eles o TNF- α , que promove inflamação e apoptose ao se ligar aos seus receptores TNFR1 nos neurônios dopaminérgicos (QIAN et al., 2010) por ativação dos fatores de transcrição NF- κ B (ARCH & THOMPSON, 1998). Nesse sentido, o trabalho realizado por Boka e colaboradores (1994) observou que o líquido cérebro-espinhal e o cérebro *post-mortem* de pacientes com doença de Parkinson, apresentavam elevadas concentrações de TNF- α .

Corroborando com estes achados, neste estudo mostramos que a administração estriatal de 6-OHDA nos animais causou um aumento significativo de TNF- α tanto no hipocampo quanto no corpo estriado ao passo que o EHAMU promoveu uma diminuição significativa na marcação tecidual deste mediador sugerindo a capacidade desta droga de inibir a cascata de neuroinflamação citada acima que culmina com a neurodegeneração dopaminérgica. É sabido que o TNF- α pode causar fosforilação e degradação do fator inibidor I κ B (LITTEL JOHN et al., 2010), resultando na ativação da cascata de sinalização mediada pelo NF- κ B.

Nos animais tratados com o EHAMU observamos a inibição desta cascata de amplificação que envolve TNF- α e NF- κ B através da diminuição significativa da

marcação deste fator de transcrição no corpo estriado dos animais tratados com o extrato hidroalcoólico da *Myracrodruon urundeuva*.

A ativação do NF- κ B pode regular positivamente as citocinas inflamatórias, que em baixas concentrações promovem a produção de fatores neurotróficos como o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF). Não obstante, os níveis de BDNF estarem mais elevados em condições patológicas como a PD, desempenham um papel central no processo inflamatório controlando a expressão de genes que codificam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, enzimas induzíveis e fatores de crescimento, todos com importância crítica no processo inflamatório observado na neurodegeneração (NAM, 2006; LITTELJOHN et al., 2010).

Estes achados têm estimulado sobremaneira as pesquisas na área da Farmacologia e a busca por compostos de origem natural ou sintética que apresentem o potencial de inibir o NF- κ B, o que significaria uma via de neuroproteção e uma nova estratégia se não para a cura, mas para tornar mais lento o processo de morte neuronal (FOLMER et al., 2008; SPILSBURY et al., 2012).

A amplificação da resposta inflamatória não se limita a poucos mediadores e fatores de transcrição, algumas enzimas induzidas no processo são ativadas gerando produtos que irão então acelerar a neurodegeneração. Tanto o TNF- α (CHEN & TANSEY, 2011) quanto o NF- κ B (HARTLAGE-RUBSAMEN et al., 1999), este último via ativação de micróglia, estimulam a produção de óxido nítrico (NO) via ativação da iNOS, o que aumenta o estresse oxidativo, exercendo efeitos prejudiciais sobre as proteínas e o DNA celular (HALD & LOTHARIUS, 2005).

Até o momento, três isoformas de NOS já foram identificadas: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a forma induzível (iNOS). De forma bastante peculiar, não é detectada a isoforma nNOS nos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (TIEU et al., 2003). A neurodegeneração tem sido relacionada com a superexpressão de iNOS na SNpc tanto em estudos *post-mortem* como em modelos animais de DP (IRAVANI et al., 2002). Em circunstâncias patológicas, a produção de NO é mediada pela ativação da iNOS, que não está presente em cérebros saudáveis (CONTI et al., 2007). Uma vez induzida, a iNOS produz níveis altos e

sustentados de NO que leva a neurotoxicidade via produção de radicais livres (peroxinitrito) (LI et al., 2012).

O tratamento com o EHAMU mostrou que este extrato também foi efetivo na inibição da iNOS no estriado dos animais submetidos a injeção intraestriatal de 6-OHDA quebrando também neste ponto a cascata amplificadora da neuroinflamação.

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), que como *M. urundeuva*, pertence também a família Anacardiaceae tem seus frutos e sementes utilizados pela população no tratamento de distúrbios inflamatórios, assim como a Aroeira-do-Sertão e um estudo recente com o extrato metanólico da casca do caule desta plantademonstrou sua atividade neuroprotetora por meio do bloqueio do NF- κ B na micróglia, diminuindo a expressão de iNOS e COX-2 (OLAJIDE et al., 2013). Esta semelhança provavelmente tem origem em compostos comuns à família Anacardiaceae como é o caso dos taninos e flavonoides, detentores destas ações farmacológicas.

Um bom exemplo que ilustra essa capacidade comum a compostos de uma mesma classe seria a silimarina, flavonoide polifenólico derivada da *Silybum marianum*. Demonstrou-se que a silimarina apresenta efeito antiinflamatório associado à inibição da indução do NF- κ B provocado pelo TNF- α , regulando desta forma a expressão de vários genes envolvidos no processo inflamatório (MANNA et al., 1999). Um estudo recente mostrou que a silimarina inibe a ativação da micróglia induzida pelo LPS além da produção de fatores neurotóxicos como o TNF- α , ânions superóxidos e NO derivado da iNOS, com consequente diminuição da neurodegeneração dopaminérgica em ratos (WANG et al., 2002).

O estudo realizado por Broom e colaboradores (2011) mostrou que a administração de inibidores seletivos da iNOS por sete dias após a lesão com 6-OHDA produz uma resposta neuroprotetora com farmacocinética representada por uma curva “*bell-shape*”. Corroborando com estes achados, Li e colaboradores (2012) provou que o aumento nos níveis de iNOS ocorre em paralelo, sendo diretamente proporcional, à neurotoxicidade provocada pela 6-hidroxidopamina. A diminuição da imunomarcagem para iNOS observada nos animais tratados com o extrato fluido de aroeira é portanto um importante mecanismo de neuroproteção neste modelo por amenizar a neurotoxicidade por mecanismos antioxidantes e antiinflamatórios.

Neste estudo, observamos também uma diminuição drástica na marcação de COX-2 no estriado dos animais submetidos ao modelo experimental de DP e tratados com o EHAMU. A COX-2 é a enzima limitante de transformação do ácido araquidônico em prostaglandina H_2 (PGH₂), que estimula a produção de radicais livres e desempenha um papel muito importante na patogênese de vários distúrbios neurodegenerativos (SUI et al., 2009; BORRE et al., 2012).

No cérebro normal a COX-2 é constitutivamente expressa em neurônios do hipocampo e do córtex (SASAKI et al., 2004), e está envolvida na plasticidade sináptica e aquisição de memória (COWLEY et al., 2008). Curiosamente, a expressão de COX-2, (HOOZEMANS et al., 2004; IMBIMBO, 2009) é particularmente aumentada em neurônios durante as fases iniciais de processos neurodegenerativos. Classicamente, a ativação de ciclooxigenase e produção de prostaglandinas são consideradas patológicas, promovendo, direta ou indiretamente, lesão neuronal (SUI et al., 2009).

Hald e Lotharius (2005) mostraram que a COX-2 está presente em níveis drasticamente aumentados no cérebro de pacientes com Parkinson. Esta enzima atua como catalisadora da oxidação da dopamina para dopamina-quinona na presença de H_2O_2 *in vitro* o que contribui para a agregação de α -sinucleína (HASTINGS, 1995; SUI et al., 2009). Além disso, a COX-2 medeia a potencialização dos efeitos citotóxicos não apenas por meio da ROS (ROGERS & KOVELOWSKI, 2003), mas também através do estímulo à liberação de glutamato com consequente aumento da excitotoxicidade mediada pelo receptor de NMDA (SANZGIRI & ARAQUE, 1999) e da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias que causam a ativação microglial (LITTELJOHN et al., 2010).

Neste sentido, vários estudos têm sugerido e comprovado que o processo de neurodegeneração na substância negra pode não ser puramente neuronal, tendo também o envolvimento das células da glia, componente da imunidade no cérebro (HALD & LOTHARIUS, 2005). Observamos que os animais submetidos à lesão estriatal apresentaram intensa ativação microglial, que foi revertida naqueles tratados com o extrato fluido de aroeira.

As micróglia são macrófagos que residem no cérebro e respondem a vários tipos de insultos como ao NO, ao TNF- α e à IL-1 β passando de sua forma de repouso para a ativada (HELKAMAA et al., 2007). A substância negra é extremamente susceptível à citotoxicidade mediada pela microglia ativada uma vez que esta região tem menores quantidades de defesas antioxidantes naturais e níveis mais elevados de radicais livres, devido à presença de ferro e ao próprio metabolismo da dopamina. Além disso, esta é a região do cérebro em que a proporção relativa entre as células gliais e as células neuronais é a maior (KIM et al., 2000).

A lesão nigroestriatal estabelecida após a administração estriatal de 6-OHDA está associada a uma resposta inflamatória marcante que se expressa através da ativação de micróglia. Sabe-se que esta célula exerce um importante papel na imunovigilância cerebral e reage prontamente a vários tipos de insulto. A detecção da marcação imunohistoquímica positiva para OX-42, que indica ativação de microglia, é intensa em animais submetidos à injeção estereotáxica de 6-OHDA (RODRIGUES et al., 2001). De fato, a ativação de microglia é detectada no estriado ainda na primeira semana após a administração da 6-OHDA persistindo por até 3 semanas, precedendo, inclusive, a perda neuronal propriamente dita (ARMENTERO et al., 2006). Nossos dados foram inteiramente de acordo com estes estudos tendo o grupo controle 6-OHDA apresentado intensa marcação para micróglia ativada.

Os animais tratados com o Extrato Hidroalcoólico de *Myracrodruon urundeuva* praticamente não apresentaram marcação para OX-42, demonstrando uma atividade excelente em inibir a ativação microglial. Curiosamente, tem sido demonstrado que a ativação de microglia precede a perda neuronal nos modelos que utilizam a injeção estriatal de 6-OHDA, indicando esta ativação como agente causador e não como uma consequência, provavelmente contribuindo para a fase tardia da neurodegeneração (HARMS et al., 2011; BOVÉ & PERIER, 2012). Neste sentido, foi mostrado que a administração de fractalquina, um supressor da ativação microglial, se mostrou eficaz contra a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA (PABON et al., 2011) indicando que agentes que consigam inibir esta ativação, como é o caso do EHAMU, constituem ótimas ferramentas de proteção para os neurônios dopaminérgicos.

Esses achados são rememorativos àqueles relatados na doença humana onde a inflamação emerge como uma chave importante no mecanismo neurobiológico do processo neurodegenerativo (HIRSCH et al., 2005) provocando ativação de micróglia com consequente produção de citocinas, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), a ativação do complemento (CHEN&TANSEY, 2011) além da estimulação da óxido nítrico sintase induzível, da COX-2, da NADPH oxidase e da mieloperoxidase aumentando ainda mais a produção de ROS (WITTE et al., 2010).

As micróglia ativadas apresentam uma alta expressão de iNOS assim como geram níveis altos e sustentados de NO na SN, exacerbando a perda neuronal (TIEU et al., 2003). Estudos sugerem que a ativação de micróglia é regulada pelo NO produzido pela iNOS, mostrando haver mecanismos de *feedback* que resultam em uma cascata amplificadora de estresse oxidativo e neuroinflamação com consequente morte neuronal (LI et al., 2012). Algumas pesquisas mostraram que a morte neuronal induzida por 6-OHDA é dependente do aumento das espécies reativas de oxigênio provenientes da superexpressão de iNOS provocada pela micróglia ativada e que a administração de antioxidantes previne tanto o aumento do estresse oxidativo quanto a morte neuronal (HOLTZ et al., 2006).

Vale também ressaltar que astrócitos reativos são observados de forma ubíqua em várias doenças neurodegenerativas. Estas células apresentam múltiplas funções de proteção como a recaptação e degradação de glutamato. Isto diminui o potencial excitotóxico deste aminoácido e contribui para manutenção da integridade da barreira hematoencefálica e, no início do processo neurodegenerativo, são inclusive capazes de proteger os neurônios contra a morte neuronal. Apesar de possuir uma função neuroprotetora, com o acúmulo de α -sinucleína, os astrócitos se tornam ativados e passam a apresentar e mesmo produzir α -sinucleína amplificando a cascata composta pelo estresse oxidativo, neuroinflamação e morte neuronal (MINAGAR et al., 2002; SEKIYAMA et al., 2012).

A astrogliose é caracterizada pelo aumento do GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) e contribui para o declínio da função neuronal sendo a representação de uma resposta genérica dos astrócitos às lesões no sistema nervoso central (MINAGAR et al., 2002). Estudos *in vitro* mostraram que os astrócitos respondem a uma grande variedade de estímulos como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas não

deixando dúvidas ao afirmarem que os astrócitos funcionariam como o sensor no microambiente do SNC (TACCONI et al., 1998). Nossos resultados mostraram um aumento considerável do GFAP no estriado dos animais submetidos à lesão striatal por 6-OHDA, indicando uma ativação de astrócito que amplia o processo neurodegenerativo. Este aumento de GFAP foi consideravelmente diminuído nos animais tratados com o EHAMU mostrando que, ainda por este mecanismo, este extrato é capaz de prover neuroproteção.

Estudos de mapeamento cerebral realizado por meio da observação do consumo de glicose cerebral em animais submetidos à lesão estriatal unilateral de 6-OHDA, mostraram que existe uma correlação entre os níveis de atividade funcional das regiões tanto corticais, quanto subcorticais (hipocampo, núcleos da base e substância negra) o que correlaciona com o prejuízo funcional observado no teste rotacional induzido por apomorfina (JANG et al., 2012). Este dado foi levado em consideração e por isso realizamos testes histológicos para marcação por imunohistoquímica dos mediadores iNOS, COX-2 e TNF- α no hipocampo e córtex dos animais lesionados não tratados e após tratamento com uma das drogas estudadas.

Além da disfunção motora, a demência aparece em 25-30% dos pacientes com doença de Parkinson. A excitotoxicidade está muito relacionada a este sintoma e receptores de glutamato mGluR estão presentes em locais como o hipocampo, o córtex, o estriado e os núcleos da base, particularmente no núcleo subtalâmico (NST) aumentando a toxicidade na região e conseqüentemente, a morte neuronal. Estes receptores têm sido propostos como novos e bons alvos na terapia da DP (HSIEH et al., 2012).

As deficiências da memória e de reconhecimento espacial, sintomas cardinais da demência na DP, podem resultar da disfunção do hipocampo, área do cérebro envolvida na memória espacial, no reconhecimento visual, na memória de reconhecimento (BROADBENT et al., 2004) e na memória de curto prazo associando um objeto e sua localização (PIEKEMA et al., 2006). Particularmente,

a área CA1 do hipocampo é responsável pela memória temporal e de trabalho e pelo reconhecimento do arranjo espacial dos objetos (HUNSAKER et al., 2006).

Alguns modelos experimentais de DP já comprovaram que há perda neuronal tanto na SNpc quanto no hipocampo, mais particularmente na região CA1, paralelamente à ativação de micróglia. Estudos anteriores mostraram que a lesão do sistema nigroestriatal dopaminérgico evocada pela 6-OHDA provoca uma “up-regulation” dos receptores glutamatérgicos mGluR5 em diferentes partes do cérebro como hipocampo, córtex e estriado (PELLEGRINO et al., 2007; ZHU et al., 2007), provocando aumento de morte neuronal por, entre outros fatores, excitotoxicidade.

Ainda que esperássemos outro resultado, não observamos no modelo de Parkinson induzido pela injeção estriatal unilateral de 6-OHDA, alterações na memória ou cognição dos animais nos testes de esquiwa passiva e do labirinto aquático (dados não mostrados), em oposição a alguns trabalhos que apontam deficiência cognitiva de animais lesionados (De LEONIBUS et al., 2009). É provável que esta ausência de alterações cognitivas deva à integridade do lado contralateral à lesão e sua possível capacidade de compensar a perda neuronal sofrida no lado lesionado o que não há de ocorrer em modelos que promovem uma depleção dopaminérgica mais intensa como o MPTP ou injeção bilateral de 6-OHDA, impossibilitando a compensação e, portanto, apresentando alterações cognitivas mais pronunciadas.

Há muito se sabe que o processo de excitotoxicidade induzida pelo glutamato apresenta estreita e sinérgica interação com o estresse oxidativo e dano mitocondrial (NOVELLI et al., 1988). Concentrações excessivas de glutamato extracelular agindo sobre os receptores glutamatérgicos das micróglia ativadas contribuem para o estabelecimento da neuroinflamação (POCOCK et al., 2007). Adicionando o fato de que um dos principais mecanismos efetores da ativação da micróglia é a produção excessiva de NO, contemplamos então o envolvimento da mitocôndria disfuncional que, em casos de excitotoxicidade, apresenta sua capacidade de sequestro e tamponamento de íons Ca^{2+} insuficiente com posterior aumento do processo inflamatório e propagação da morte neuronal (ZÁDORI et al., 2012).

A despeito da ausência de alteração na cognição e memória, observamos um processo inflamatório intenso na região hipocampal (áreas CA1, CA3 e giro), mostrando que o processo neurodegenerativo, ainda que incipiente nestas regiões já estava instalado. O uso do EHAMU diminuiu a marcação de mediadores de neuroinflamação como o TNF- α , iNOS e COX-2 mostrando seu potencial neuroprotetor também nas regiões responsável pelo processo de demência interrompendo a cascata de eventos iniciada pela toxicidade glutamatérgica e finalizada com a morte neuronal, o que beneficiaria os pacientes que fizessem uso desta planta também quanto à gravidade dos sintomas não motores.

Também observamos intensa marcação dos mediadores inflamatórios no córtex dos animais submetidos à lesão estriatal com 6-OHDA. Esta região, no processo de neurodegeneração que ocorre na doença de Parkinson está muito relacionada ao acúmulo de α -sinucleína, que, por sua vez, está intimamente envolvida com o estresse oxidativo e neuroinflamação local (CAVINESS&AARSLAND,2011). Observamos uma drástica diminuição dos mediadores de inflamação na região cortical dos cérebros dos animais tratados com o EHAMU quando comparados aos animais controle (6-OHDA). Este dado vem a contribuir com a hipótese de que, além do benefício direto sob o sistema nigroestriatal com consequente preservação dopaminérgica e alívio dos sintomas motores, a *Myracrodruon urundeuva* possivelmente é capaz de inibir o processo de morte neuronal nas demais regiões do cérebro que compõem o complexo mosaico que culmina na morte neuronal dos processos neurodegenerativos sendo capaz inclusive de coibir a demência não raramente encontrada nos estágios finais da doença.

Ainda que a estratégia terapêutica ideal na terapêutica de Parkinson fosse a eliminação dos fatores causais da doença, há uma grande necessidade de inovar as possibilidades de tratamento com agentes de neuroproteção com capacidade ampla de atenuar as alterações relacionadas à fisiopatologia da doença, servindo inclusive para os demais processos neurodegenerativos, que compartilham os mesmos mecanismos fisiopatológicos. Neste aspecto a *Myracrodruon urundeuva* emerge de um cenário natural como uma espécie medicinal que poderá trazer uma nova possibilidade e esperança para o tratamento da doença de Parkinson com mecanismos de ações diversos que podem inibir a progressão do processo

neurodegenerativo de vários pontos, estabelecendo uma relação sinérgica de efeitos que culminam com a proteção neuronal.

O extrato fluido Hidroalcoólico e seco de *Myracrodruon urundeuva* apresentou efeito neuroprotetor no modelo experimental de Parkinson induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA por mecanismos que envolvem a inibição do processo inflamatório neuronal, sua atividade antioxidante e provavel diminuição da ação tóxica do glutamato com consequente ativação da cascata que leva a morte neuronal.

6. Conclusão

Com base nos resultados deste estudo, sugerimos que a *Myracrodruon urundeuva* Allemão apresenta um potencial efeito neuroprotetor, aliviando as alterações comportamentais, bioquímicas e celulares associadas à administração de 6-OHDA. A atenuação dessas alterações pelo extrato hidroalcoólico da Aroeira-do-Sertão confirma o seu potencial terapêutico, por meio de suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e provável restauração da atividade mitocondrial e inibição da excitotoxicidade mediada pelo glutamato com preservação dos neurônios da via nigroestriatal assim como daqueles envolvidos nos processos não motores da doença.

O presente trabalho demonstra pela 1ª. vez os efeitos neuroprotetores da *M. urundeuva* em modelo experimental de DP. Sabe-se que esta planta medicinal é rica em chalconas, fato este já comprovado em trabalhos anteriores. As chalconas são flavonóides de cadeia aberta que apresentam um grande número de atividades biológicas e algumas destas como é o caso da atividade anti-inflamatória, já comprovadas por nós com preparações de *M. urundeuva*.

É importante salientar que alguns compostos com propriedades farmacológicas importantes foram desenvolvidos tendo como base o esqueleto das chalconas. Além disso, ensaios clínicos mostraram que estes compostos apresentam uma razoável biodisponibilidade, ausência de efeitos tóxicos significativos e foram bem tolerados, tornando esses compostos matéria prima importante para o desenvolvimento de novos fármacos (BATOVSKA & TODOROVA, 2010; SAHU ET AL., 2012). É possível que as ações observadas neste estudo sejam consequência do elevado teor de chalconas presente no extrato hidroalcoólico da planta.

Trabalho recente (KIM et al., 2011) mostrou que derivados de chalconas protegem contra a injúria neuronal induzida por peptídeo Beta-amilóide, in vitro. Verificou-se também que esses derivados reduziram os déficits de aprendizagem e memória de camundongos injetados com peptídeo beta-amilóide (fração 1-42). Estes

resultados mostram que chalconas, como aquelas presentes em *M. urundeuva*, podem ser candidatos promissores e nova estratégia terapêutica para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP.

Os dados experimentais emergentes a partir desta pesquisa pré-clínica são estimulantes e justificam facilmente a continuação da investigação da MU e possivelmente de suas frações ativas visando o desenvolvimento de um novo fármaco. Esta pesquisa pré-clínica deve servir de farol para o posterior encaminhamento da droga ao teste clínico, ajudando com a escolha da dosagem a ser utilizada em humanos que possa prever realmente a resposta clínica esperada.

Ainda que a estratégia terapêutica ideal para a terapêutica da doença Parkinson fosse a eliminação dos fatores causais da doença, há uma grande necessidade de inovar as possibilidades de tratamento com agentes de proteção capazes de atuar de forma ampla atenuando as alterações relacionadas à fisiopatologia da doença, servindo inclusive para os demais processos neurodegenerativos, que compartilham os mesmos mecanismos fisiopatológicos. Neste ínterim, a *Myracrodruon urundeuva* emerge de um cenário infrutífero trazendo uma nova possibilidade e esperança para o tratamento da doença de Parkinson com mecanismos de ações diversos que podem inibir a progressão do processo neurodegenerativo de vários pontos, estabelecendo uma relação sinérgica de efeitos que culminam com a proteção neuronal.

7. Referências Bibliográficas

- ABBOTT, A. Levodopa: the story so far. **Nature.**, Aug 26;466(7310):S6-7, 2010.
- ABRAHAM, S.; et al. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. **Indian J Med Res.**, 121, pp 111-115, 2005.
- AGUIAR, W.R **Desenvolvimento de Técnicas Farmacêuticas para a obtenção da Droga Vegetal a partir dos Brotos e Renovos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-Sertão).** Dissertação de mestrado. Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2013.

AHMADIANI, A.; et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract. **J Ethnopharmacol.**, 72, pp. 287–292, 2000.

AKIYAMA, H.; MCGEER, P.L. Microglial response to 6-hydroxydopamine-induced substantia nigra lesions. **Brain Res.**, 489:247–253, 1989.

ALBINO-TEIXEIRA, A., AZEVEDO, I.; MARTEL, F.; OSSWALD, W. Superoxide dismutase partially prevents sympathetic denervation by 6-hydroxydopamine. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, Jul;344(1):36-40, 1991.

ALBUQUERQUE, R. J. M.; RODRIGUES, L. V.; VIANA, G. S. B. Análise clínica e morfológica da conjuntivite alérgica induzida por ovalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cir. Bras.** v .19, n. 1, p. 43-48, 2004.

ALEXANDER, G.E; CRUTCHER, M.D. Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. **Trends Neurosci.**, 13:266-271, 1990.

ALVES, G., et al. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neurol.**, 255 [Suppl 5]:18–32, 2008.

ANDRIS, D.A.; KUNTE, J.B.; BEAN, C.A.; HOLLAND, C.B.; ISEN, J.A.; JOHNSON, N.B. **Semiologia: bases para a prática assistencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 424p.

ARCH, R.H.; THOMPSON, C.B. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappa. **B. Mol. Cell Biol.**, 18, pp. 558–565, 1998.

ARMENTERO, M.T.; et al. Peripheral inflammation and neuroprotection: systemic pretreatment with complete Freund's adjuvant reduces 6-hydroxydopamine toxicity in a rodent model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.**, 24: 492-505, 2006.

BANATI, R.B.; DANIEL, S.E.; BLUNT, S.B. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. **Mov Disord. Mar.**, 13(2):221-7, 1998.

BANDEIRA, M.A.M. **Contribuição ao conhecimento químico de Plantas do Nordeste, *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (= *Astronium urundeuva* Engl.) aroeira-do-sertão**. 204 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1993.

- BANDEIRA, M.A. M. **Myracrodruon urundeuva Allemão (aroeira-do-sertão): Constituintes químicos ativos da planta em desenvolvimento e adulta.** 322f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.
- BANTI, R.B.; DANIEL, S.E.; BLUNT, S.B. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. **MovDisord**; 13:221–7, 1998.
- BANDEIRA, M.A.M. Myracodrounurundeiva Allemão (aroeira-do-sertão): constituintes químicos ativos da planta em desenvolvimento e adulta. Tese de doutorado. Fortaleza, **Universidade Federal do ceará**, 180p, 2002.
- BARBEAU, A.; et al. Excretion of dopamine in diseases of basal ganglia. **Science.**, 133: 1706–1707, 1961.
- BARBIERO, J.K.; **SANTIAGO**, R.M.; LIMA, M.M.; ARIZA, D.; MORAIS, L.H.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A. Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res.**, 1;216(1):186-92, 2011.
- BARLOW, C.A.; et al. **Am J Respir. Cell MolBiol**; 34:7–14, 2006.
- BARNHAM, K.J.; MASTERS, C.L.; BUSH, A.I. **Nat Rev Drug Discov.**, 3:205–214, 2004.
- BARTELS, A.L.; LEENDERS, K.L. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. **Cortex.** Sep;45(8):915-21, 2009.
- BARTELS, A.L.; WILLEMSSEN, A.T.; DOORDUIN, J.; DE VRIES, E.F.; DIERCKX, R.A.; LEENDERS, K.L.[11C]-PK11195 PET: quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? **Parkinsonism Relat Disord.**, Jan;16(1):57-9, 2010.
- BLANDINI, F.; et al. Transplantation of undifferentiated human mesenchymal stem cells protects against 6-hydroxydopamine neurotoxicity in the rat. **Cell Transplant.**, 19:203–217, 2010.
- BLANDINI, F. An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Funct Neurol.**, Apr-Jun; 25(2):65-71, 2010.
- BLANDINI, M.T.; ARMENTERO, E.; MARTIGNONI. The 6-hydroxydopamine model: news from past. **Parkinsonism Relat.Disord.**, v.14, pp. S124–S129, 2008.

BEACH, T.G.; SUE, L.I.; WALKER, D.G.; LUE, L.F.; CONNOR, D.J.; CAVINESS, J.N.; SABBAGH, M.N.; ADLER, C.H. Marked microglial reaction in normal aging human substantia nigra: correlation with extraneuronal neuromelanin pigment deposits. **Acta Neuropathol.**, Oct;114(4):419-24,2007.

BENES, H.; KURELLA, B.; KUMMER, J.; KAZENWADEL, J.; SELZER, R.; KOHNEN, R. Rapid onset of action of levodopa in restless legs syndrome: a double-blind, randomized, multicenter, crossover trial. **Sleep.**, Dec 15;22(8):1073-81, 1999.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; GREENAMYRE, J.T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays.**, Apr;24(4):308-18, 2002.

BORRE, Y.; et al. Celecoxib delays cognitive decline in an animal model of neurodegeneration. **Research report.**, v. 234, Issue 2, p. 285–291, 2012.

BROADBEN, N.J.; SQUIRE, L.R.; CLARK, R.E. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. **Proc Natl Acad.**, Oct 5;101(40):14515-20, **Sci USA. 2004.**

BROOM, L.; et al. Neuroprotection by the selective iNOS inhibitor GW274150 in a model of Parkinson disease. **Free Radic. Biol. Med.**, 50 (5), pp. 633–640, 2011.

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx.**, Jul;2(3):484-94,2005.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Review Neurotoxin-Based Models Of Parkinson's Disease. **Neuroscience.**, 211 51–76, 2012.

BRAAK, H.; et al. Nigral and extranigral pathology in Parkinson's disease. **J Neural TransmSuppl.**, 46:15–31, 1995.

BRENDAN, J.; KELLEY, A.; ANDREW P. D.; PETER, C. Dopamine Agonists and Pathologic Behaviors. Hindawi Publishing Corporation. **Parkinson's Disease.** v. 2012, 2012.

BROCHARD, V.; COMBADIÈRE, B.; PRIGENT, A.; LAOUAR, Y.; PERRIN, A.; BERAY-BERTHAT, V.; BONDUELLE, O.; ALVAREZ-FISCHER, D.; CALLEBERT, J.; LAUNAY, JM.; DUYCKAERTS, C.; FLAVELL, R.A.; HIRSCH, E.C.; HUNOT, S.

Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **J Clin Invest.**, Jan;119 (1):182-92, **2009**.

BRUNDIN, P., et al. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. **Nature Reviews Neuroscience.**, 9, 741-745, 2008.

BUTOVSKY, O.; ZIV, Y.; SCHWARTZ, A.; LANDA, G.; TALPALAR, A.E.; PLUCHINO, S.; MARTINO, G.; SCHWARTZ, M. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. **Mol Cell Neurosci.**, Jan;31(1):149-60, 2006.

CAMPOS, A. C. S. **Estudo do Creme Vaginal de Aroeira-do-Sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) em pacientes atendidas no ambulatório de ginecologia em uma Unidade Básica de Saúde em Fortaleza.** 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; TABACH, R. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). **Phytother Res.** doi: 10.1002/ptr.4767. [Epub ahead of print]. jul.2012.

CARLSSON, A.; LUNDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature.**, 180:1200, 1957.

CAVINESS, J.N.; AARSLAND, D. Developing predictive biomarkers for dementia of Parkinson's disease. **Expert Rev Neurother.**, Dec; 11(12):1661-3, 2011.

CENCI, M.A.; CAMPBELL, K.; WICTORIN, K.; BJÖRKLUND, A. Striatal c-fos Induction by Cocaine or Apomorphine Occurs Preferentially in Output Neurons Projecting to the Substantia Nigra in the Rat. **Eur J Neurosci.**,4(4):376-380, 1992.

CHALOVICH, E.M.; ZHU, J.H.; CALTAGARONE, J.; BOWSER, R.; CHU, C.T. Functional repression of cAMP response element in 6-hydroxydopamine-treated neuronal cells. **J Biol Chem.** Jun 30;281(26):17870-81, 2006.

CHARCOT, J.M. De la paralysie agitante. Cinquième leçon. In Charcot JM. Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière. Adrien Delahaye et E. Lecrosnier Éditeurs, Paris, 1880.

CHEN, X.; TANSEY, M.G. The role of neuroinflammation in Parkinson's disease. A. Minagar (Ed.), **Neuroinflammation.**, vol. 18 Elsevier, Oxford, pp. 401–420, 2011.

CLEETER, M.W.; COOPER, J.M.; SCHAPIRA, A.H. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. **J Neurochem.**, 58:786–789, 1992.

COHEN, G.; HEIKKILA, R.E. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. **J Biol Chem.**, Apr 25;249(8):2447-52,1974.

CONTI, A.; MISCUSI, M.; CARDALI, S.; GERMANÒ, A.; SUZUKI, H.; CUZZOCREA, S.; TOMASELLO, F. Nitric oxide in the injured spinal cord: synthases cross-talk, oxidative stress and inflammation. **Brain Res Rev.** Apr;54(1):205-18, 2007.

COTZIAS, G.C.; PAPAVALIOU, P.S.; GELLENE R. L-dopa in parkinson's syndrome. **N Engl J Med.**, Jul 31;281(5):272,1969.

COWLEY, T.R.; FAHEY, B.; O'MARA, S.M. COX-2, but not COX-1, activity is necessary for the induction of perforant path long-term potentiation and spatial learning in vivo. **European Journal of Neuroscience.**, 27, pp. 2999–3008, 2008.

CONWAY, K.A.; et al. Jr. Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. **Biochemistry.**, 39:2552–2563, 2000.

CRICQ, G. N.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **J Agric Food Chem.**, v. 47, n. 2, p. 425-31, 1999.

CRUTCHER, M.D.; ALEXANDER, G.E. Movement-related neuronal activity selectively coding either direction or muscle pattern in three motor areas of the monkey. **Neurophysiol.**, Jul;64(1):151-63, 1990.

DAWSON, J., et al. A comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. **Int J Tissue React.**, 13: 171–185, 1991.

DALLMEIER, K.; CARLINI, E.A. Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues. *Pharmacology.*;22(2):113-27, 1981.

DE LEONIBUS, E.; MANAGÒ, F.; GIORDANI, F.; PETROSINO, F.; LOPEZ, S.; OLIVERIO, A.; AMALRIC, M.; MELE, A. Metabotropic glutamate receptors 5 blockade reverses spatial memory deficits in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology.*, Feb; 34(3):729-38, 2009.

DEXTER, D.T.; WELLS, F.R.; AGID, F.; AGID, Y.; LEES, A.J.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet.*, Nov 21;2(8569):1219-20,1987.

Di ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol.*,104:15–29, 1971.

EMINEL, S.; KLETTNER, A.; ROEMER, L.; HERDEGEN, T.; WAETZIG, V. JNK2 translocates to the mitochondria and mediates cytochrome c release in PC12 cells in response to 6-hydroxydopamine. *J Biol Chem.*, Dec 31;279(53):55385-92,200

ESPOSITO, E.; et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol.*, 205 (2), pp. 295–312, 2007.

EBADI, M.; HIRAMATSU, M. Glutathione and metallothionein in oxidative stress of Parkinson's disease. In: Poli G, Cadenas E and Packer L, editors. **Free radicals in brain pathophysiology**. Marcel Dekker p. 427-65; New York, 2000.

FATTMAN, C.L.; CHU, C.T.; KULICH, S.M.; ENGHILD, J.J.; OURY, T.D. Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. *Free Radic Biol Med.*, Nov 15;31(10):1198-207, 2001.

FOLMER, F.; et al. Marine natural products as targeted modulators of the transcription factor NF-kB. *Biochemical Pharmacology.*, 75,603–617, 2008.

FRANÇA, T.E.L.; et al. Atividade antioxidante pelo método DPPH de extrato vegetal da casca da aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). ISBN 978-85-62830-10-5., **VII CONNEPI**, 2012.

FREITAS, F.; MENKE, C.H.; RIVOIRE, W.A.; PASSOS, E.P. **Rotinas em Ginecologia**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed; 2006, 584p.

FRIEDMAN, A.; GALAZKA-FRIEDMAN, J. The current state of free radicals in Parkinson's disease. Nigral iron as a trigger of oxidative stress. **Advances in neurology**, 86:137-42, 2001.

FRUSSA-FILHO, R.; PALERMO-NETO, J. Effects of single and long-term administration of sulpiride on open-field and stereotyped behavior of rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 23(5):463-72, 1990.

GAO, H.M.; LIU, B.; HONG, J.S. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **J Neurosci**, 23 (15), pp. 6181–6187, 2003.

GAO, H.M.; JIANG, J.; WILSON, B. Microglial activation mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. **J Neurochem**, 81:1285–1297, 2002.

GERLACH, M.; FOLEY, P.; RIEDERER, P. The relevance of preclinical studies for the treatment of Parkinson's disease. **J Neurol**, 250 [Suppl 1]: I/31–I/34, 2003.

GHOSH, B.; et al. Discovery of 4-(4-(2-(5-Hydroxy-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-yl)(propyl)amino)ethyl) piperazin-1-yl) quinolin-8-ol and its analogues as highly potent dopamine D2/D3 agonists and as iron chelator: in vivo activity indicates potential application in symptomatic and neuroprotective therapy for Parkinson's disease. **J Med Chem**, 53:2114–2125, 2010.

GOETZ, C.G. Charcot: the clinician: the tuesday lessons. **Raven Press**, 123-140, New York, 1987.

GOETZ, C.G.; BONDUELLE, M.; GELFAND, T. Charcot: constructing neurology. **Oxford Univ Press**, 113-120, New York, 1995.

GOLDMAN-RAKIC, P.S., SELEMON, L.D. New frontiers in basal ganglia research. **Trends Neurosci**, 13: 241-244, 1990.

GORMAN, A.M.; DOYLE, K.M. Considerations and recent advances in neuroscience. **Biochem Soc Trans**, Feb;37(Pt 1):299-302, 2009.

GRIFFITHS, P. D.; et al. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease: An *in vitro* study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. **Brain**, 122(4): 667-673, 1999.

GRILLNER, S.; HELLGREN, J.; MÉNARD, A.; SAITOH, K.; WIKSTRÖM MA. Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. **Trends Neurosci.**, Jul;28(7):364-7, 2005.

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

HARGREAVES, K.; DUBNER, R.; BROWN, F.; FLORES, C.; JORIS J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain.**, Jan;32(1):77-88, 1988.

HARMS, A.S.; et al. Delayed dominant-negative TNF gene therapy halts progressive loss of nigral dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. **Mol Ther.**, 19:46-52, 2011.

HARTLAGE-RÜBSAMEN, M.; LEMKE, R.; SCHLIEBS, R. Interleukin-1 β , inducible nitric oxide synthase, and nuclear factor- κ B are induced in morphologically distinct microglia after rat hippocampal lipopolysaccharide/interferon- γ injection. **J Neurosci Res.**, 57 (3), pp. 388-39, 1999.

HASTINGS, T.G. Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. **J Neurochem.**, 64, pp. 919-924, 1995.

HAYES, G.M.; WOODROOFE, M.N.; CUZNER, M.L. Characterisation of microglia isolated from adult human and rat brain. **J Neuroimmunol.**, 19:177-89, 1988.

IANSEK, R.; BRADSHAW, J.; PHILLIPS, J.; MORRIS, M.E.; CUNNINGTON, R. Review article: the functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. **Brain.** 1995 Dec;118 (Pt 6):1613-7.

IMBIMBO, B.P. An update on the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. **Expert Opinion on Investigational Drugs.**, 18 (8), pp. 1147-1168, 2009.

HELKAMAA, T.; et al. Increased catechol-O-methyltransferase activity and protein expression in OX-42-positive cells in the substantia nigra after lipopolysaccharide microinfusion. **Neurochemistry International.**, v. 51, Is. 6-7, p. 412-423, 2007.

HEIKKILA, R.E.; COHEN, G. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. **Science.**, Aug 3;181(4098):456-7, 1973.

HERENCIA, F.; et al. 4-Dimethylamino-3', 4'- dimethoxychalcone downregulates iNOS expression and exerts anti-inflammatory effects. **Free Radic Biol Med.**, 30, pp. 43-50, 2001.

HIRSCH, E.C.; HUNOT, S.; HARTMANN, A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, 11(Suppl. 1):S9-15, 2005.

HIRSCH, E.C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** Jan;18 Suppl 1:S210-2, 2012.

HOLTZ, W.A.; TURETZKY, J.M.; JONG, Y.J.; O'MALLEY, K.L. Oxidative stress-triggered unfolded protein response is upstream of intrinsic cell death evoked by parkinsonian mimetics. **J Neurochem.**, Oct;99(1):54-69, 2006.

HONG, J.; KIM, B.K.; LIM, H.; LEE, S.; LEE, S.J. Identification and characterization of triamcinolone acetonide, a microglial-activation inhibitor. **Immunopharmacol Immunotoxicol.**, Dec;34(6):912-8, 2012.

HOOZEMANS, J.J.; et al. Neuronal COX-2 expression and phosphorylation of pRb precede p38 MAPK activation and neurofibrillary changes in AD temporal cortex. **Neurobiology of Disease.**, 15 (3), pp. 492–499, 2004.

HORBINSKI, C.; CHU, C.T. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. **Free Radic Biol Med.**, Jan 1;38(1):2-11, 2005.

HORNYKIEWICZ, O. A brief history of levodopa. **J Neurol.** Nov; 257(Suppl 2):S249-52, 2010.

HSIEH, M.H.; HO, S.C.; YEH, K.Y.; PAWLAK, C.R.; CHANG, H.M.; HO, Y.J.; LAI, T.J.; WU, F.Y. Blockade of metabotropic glutamate receptors inhibits cognition and neurodegeneration in an MPTP-induced Parkinson's disease rat model. **Pharmacol Biochem Behav.**, Jul;102(1):64-71, 2012.

HU, X.; et al. Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade. **J Neurosci.**, 31:247–261, 2011.

IANSEK, R.; BRADSHAW, J.; PHILLIPS, J.; MORRIS, M.E.; CUNNINGTON, R. Review article: the functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in Parkinson's disease. **Brain.** Dec;118 (Pt 6):1613-7, 1995.

ICHAS, F.; MAZAT, J.P. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low - to high-conductance state. **BiochimBiophysActa.**, 1366:33–50, 1998.

IRAVANI, M.M.; KASHEFI, K.; MANDER, P.; ROSE, S.; JENNER, P.; Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. **Neuroscience.**; v. 110(1):49-58, 2002.

JAIN, L.; BENKO, R.; SAFRANEK, S. Clinical inquiry. Which drugs work best for early Parkinson's disease? **J Fam Pract.**, Feb;61(2):106-8, 2012.

JANG, D.P. Functional neuroimaging of the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters.**, v. olume 513 (2), p.187–192, 2012.

JARVIS, C. **Exame físico e avaliação em saúde.** 3 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2003. 900p.

JENNER, P.; OLANOW, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology.**, Dec;47(6 Suppl 3):S161-70, 1996.

KELLEY, B.J.; DUKER, A.P.; CHIU, P. Dopamine agonists and pathologic behaviors. **Parkinsons Dis.**2012:603631, 2012.

KIM, Y.S.; JOO, W.S.; JIN, B.K.; CHO, Y.H.; BAIK, H.H.; PARK, C.W. Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport.**, Jul 13;9(10):2387-90,1998.

KIM, W.G.; et al. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain, role of microglia. **J Neurosci.**, 20, pp. 6309–6316, 2000.

KIM, S.T.; CHOI, J.H.; KIM, D.; HWANG, O. Increases in TH immunoreactivity, neuromelanin and degeneration in the substantia nigra of middle aged mice. **Neurosci Lett.**, Apr 3;396(3):263-8, 2006.

KUMAR, R.; AGARWAL, A.K.; SETH, P.K. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. **J Neurochem.**, Apr;64(4):1703-7,1995.

KUMAR, A.; et al. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms. **Brain Res.**, Vol. 1471, Pages 13–22, 2012.

LANGSTON, J.W.; et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science.**, 219:979–980, 1983.

LARSEN, K.E.; SCHMITZ, Y.; TROYER, M.; et al. Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis. **J Neurosci.**, 26:11915–11922, 2006.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch.**, Jul;460(2):525-42,2010.

LEES, A. J.; et al. The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. **MovDisord.**, 23(6):777–783, 2008.

LINERT, W.;HERLINGER, E.; JAMESON, R.F.; KIENZL, E.; JELLINGER, K.; YODIM, M.B. Dopamine, 6-hydroxydopamine, iron, and dioxygen--their mutual interactions and possible implication in the development of Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta.**, Aug 23;1316(3):160-8, 1996.

LITTELJOHN, D.; et al. Inflammatory mechanisms of neurodegeneration in toxin-based models of Parkinson's disease. **Parkinsons Dis.**, 2011, p. 71351, 2010.

LONG-SMITH, C.M.; SULLIVAN, A.M.; NOLAN, Y.M. The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, Nov;89(3):277-87, 2009.

MACHADO A.C.; et al. Evaluation of tissue reaction to Aroeira (*Myracrodruonurundeuva*) extracts: a histologic and edemogenic study. **Journal of Applied Oral Science.** vol:20 fasc:4 pág:414 – 8, 2012.

MANNA, S.K. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF-kappa B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. **J. Immunol.**, 163, 6800–6809, 1999.

MARIO, I.; et al. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruonurundeuva* Allemão. **Phytomedicine** 10: 189–195, 2003.

MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais.** 2ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000, 344p.

MCGEER, P.L.; et al. Presence of reactive microglia in monkey substantianigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. **Ann Neurol.**, 54:599–604, 2003.

MCGEER, P.L.; et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantianigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology.**, 38:1285–1291, 1988.

MELO, G. S.; PIMENTEL, M. L. L.; VIANA, G. S. B.; Moraes, M. °; BEZERRA, F. A. F.; MORAES, M. E. A. Toxicologia Clínica e Laboratorial do Elixir de Aroeira-do-Sertão, *Myracrodruon urundeuva* Allemão. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 15., 1998, Águas de Lindóia, Brasil. Anais, Águas de Lindóia, 1998.

MELLO, M. J. R. **Atividade anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiana do extrato aquoso de aroeira-do-sertão a 20% (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) aplicado em fraturas expostas induzidas em mandíbula de coelho**. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas), Departamento de Cirurgia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2007.

MENEZES, A. M. S., RAO, V. S. N., FONTELES, M. C. Anti-inflammatory activity of *Astronium urundeuva* possible mechanisms involved. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.18, p. 7224, 1985.

MENEZES, A.M.S; RAO, V. S. N.; VIANA, G.S.B.; GADELHA, M.G.T. Anti-ulcerogenic activity of *Astronium urundeuva*. **Fitoterapia**. V. 57, p.253-256, 1986.

MENEZES, A. M. S. **Atividade antiinflamatória e antiulcerogênica de *Astronium urundeuva* Engl**. 160f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce. 1986.

MENEZES, A.M.S., RAO, V.S.N. Effect of *Astronium urundeuva* (aroeira) on gastrointestinal transit in mice. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** V.21, p.531-533, 1988.

MEREDITH, G.E.; SONSALLA, P.K.; CHESSELET, M.F. Animal models of Parkinson's disease progression. **ActaNeuropathol.**, 115 (4) (2008), pp. 385–398.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp. Neurol.**, 175, pp. 303–317, 2002.

MEREDITH, G.E.; KANG, U.J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord.**, 21:1595e606, 2006.

MIZUNO, Y. Where do we stand in the treatment of Parkinson's disease? **J Neurol.**, 254 [Suppl 5]:13–18, 2007.

MINAGAR, A.; et al. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. **J Neurol Sci.**, 15;202(1-2):13-23, 2002.

MOHANAKUMAR, K.P.; MURALIKRISHNAN, D.; THOMAS, B. Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. **Brain Res.**, 864 (2), pp. 281–290, 2000.

MOORE, A.H.; et al. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Alzheimer's disease and Parkinson's disease, reconsidering the role of neuroinflammation. **Pharmaceuticals.**, 3 (6), pp. 1812–1841, 2010.

MOORE, D.J.; et al. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. **Annu Rev Neurosci.**, 28:57, 2005.

MOSLEY, R.L.; BENNER, E.J.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, M.D.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, H.E. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clin Neurosci Res.**, Dec 6;6(5):261-281, 2006

MULLIN, S.; SCHAPIRA, A. α -Synuclein and Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. **MolNeurobiol.**, 47:587–597, 2013.

MUNISHKINA, L.A.; FINK, A.L. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. **BiochimBiophysActa.**, 1768(8):1862– 1885, 2007.

NAGATSU, T. Cytokines in Parkinson's disease. **J Neural TransmSuppl.**, 58:143–51, 2000.

NAM, N.H. Naturally occurring NF-kappa B inhibitors. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry.**, 6, 945–951, 2006.

NAPPI, A.J.; VASS, E. The effects of nitric oxide on the oxidations of l-dopa and dopamine mediated by tyrosinase and peroxidase. **J Biol Chem.**, Apr 6; 276(14):11214-22, 2001.

NAPOLI, I.; KIERDORF, K.; NEUMANN, H. Microglial precursors derived from mouse embryonic stem cells. **Glia.**, Nov 15;57(15):1660-71, 2009.

NOBRE-JUNIOR, H.V.; et al. Neuroprotective effects of chalcones from *Myracrodruon urundeuva* on 6-Hydroxydopamine-Induced cytotoxicity in rat mesencephalic cells. **Res. Neurochem.**, 34:1066-75., 2009.

NOVELLI, A.; et al. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. **Brain Res.**, 451:205–12, 1988.

OBESO, J.A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M.C.; RODRÍGUEZ, M.; LANCIEGO, J.L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C.W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, Oct;23(10 Suppl):S8-19,2000.

OLAJIDE, O.A.; ADEROGBA, M.A.; FIEBICH, B.L.; Mechanisms of anti-inflammatory property of *Anacardium occidentale* stem bark: inhibition of NF- κ B and MAPK signalling in the microglia. **J Ethnopharmacol.**, Jan; 9;145(1):42-9, 2013.

OLUMAYOKUN, A.; et al. Mechanisms of anti-inflammatory property of *Anacardium occidentale* stem bark: Inhibition of NF- κ B and MAPK signaling in the microglia. **Journal of Ethnopharmacology.**, 145, 42–49, 2013.

ONLA-OR, S.; WINSTEIN, C.J. Function of the 'direct' and 'indirect' pathways of the basal ganglia motor loop: evidence from reciprocal aiming movements in Parkinson's disease. **Brain Res Cogn Brain Res.** Jan;10(3):329-32, 2001.

ORTIZ, M.I.; PONCE-MONTER, H.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, E.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; MACÍAS, A.; RANGEL-FLORES, E.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G. Evaluation of the interaction between acetaminophen and opioids on the hargreaves model of thermal hyperalgesia. **Pharmacol Biochem Behav.**, Nov;88(1):47-54, 2007.

OUCHI, Y.; YOSHIKAWA, E.; SEKINE, Y.; FUTATSUBASHI, M.; KANNO, T.; OGUSU, T.; TORIZUKA, T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. **Ann Neurol.**, Feb;57(2):168-75, 2005.

OUCHI, Y.Y.; et al. Neuroinflammation in the living brain of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders.**, 15S3, S200–S204, 2009.

PABON, M.M.; et al. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. **J Neuroinflammation.**, 8:9, 2011.

PANEK, R.B.; et al. Tumor necrosis factor alpha response elements in the HLA-DRA promoter: identification of a tumor necrosis factor alpha-induced DNA-protein complex in astrocytes. **Proc Natl Acad Sci USA.**, 59:11518–22, 1992.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. **Whittingham & Rowland**. London, 1817.

PEARCE, J.M.S. Parkinson's disease and its management. **Oxford Univ Press**. Oxford, 1992.

PELLEGRINO, D.; CICCETTI, F.; WANG, X.; ZHU, A.; YU, M.; SAINT-PIERRE, M.; BROWNELL, A.L. Modulation of dopaminergic and glutamatergic brain function: PET studies on parkinsonian rats. **J Nucl Med.**, Jul; 48(7):1147-53, 2007.

PESKAR, B.M.; et al. Release of 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid and cysteinylleukotrienes in carragenin-induced inflammation: effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Agents Actions.*;1: 240–246, 1991.

PIEKEMA, C.; KESSELS, R.P.; MARS, R.B.; PETERSSON, K.M.; FERNÁNDEZ, G. The right hippocampus participates in short-term memory maintenance of object-location associations. **Neuroimage.**, Oct; 15;33(1):374-82, 2006.

POCOCK, J.M.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neurosci.**, 30:527–35, 2007.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, Jun;11 Suppl 1:S3-7, 2005.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; FERREIRA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; DONALDSON, D.; TOGASAKI, D.M. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience.**, Aug;67(3):631-47, 1995.

PURVES, D. *Neurosciences*. **ARTMED**, 2th edition. Rio de Janeiro, 2005.

QIAN, L.; FLOOD, P.M.; HONG, J.S. Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. **J Neural Transm.**, 117, pp. 971–979, 2010.

RAO, V.S.N., VIANA, G.S.B.,BANDEIRA, M.A.M., MATOS, F.J.A. Anti-inflammatory activity of *Astronium urundeuva* Engl.: chemical fractionation study. **Simpósio Brasil – China de Química e Farmacologia de Produtos Naturais**, Rio de Janeiro, 1989.

REICHMANN, H.; JANETZKY, B. Mitochondrial dysfunction--a pathogenetic factor in Parkinson's disease. **J Neurol.**, Apr;247 Suppl 2:II63-8, **2000**.

RIEDERER, P., et al. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neurochem.**, 118(6):939-57, 2011.

RODRIGUES, R.W.; GOMIDE, V.C.; CHADI, G. Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-hydroxydopamine. **Int J Neurosci.**, 109 :91e126, 2001.

ROGERS, J.; KOVELOWSKI, C.J. Inflammatory mechanism in Parkinson's disease. P.L., Neuroinflammation: mechanisms and management (2nd ed.), **Humana Press**, Totowa, NJ, Wood (Ed.), pp. 391–403, 2003.

ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacol Toxicol.**, May;66(5):382-6, 1990.

RYLANDER, D.; et al. A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys. **Neurobiol Dis.**, 39:352–361, 2010.

RYU, E.J.; ANGELASTRO, J.M.; GREENE, L.A. Analysis of gene expression changes in a cellular model of Parkinson disease. **Neurobiol Dis.**, Feb;18(1):54-74, 2005.

SAIRAM, K., et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. **Brain Res.**, 966, pp. 245–252, 2003.

SANZGIRI, R.P.; ARAQUE, A.; HAYDON, P.G. Prostaglandin E(2) stimulates glutamate receptor-dependent astrocyte neuromodulation in cultured hippocampal cells. **Journal of Neurobiology.**, 41 (2), pp. 221–229, 1999.

SASAKI, T.; KITAGAWA, K.; YAMAGATA, K.; TAKEMIYA, T.; TANAKA, S.; OMURA-MATSUOKA, E.; SUGIURA, S.; MATSUMOTO, M.; HORI, M.; Amelioration of

hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in cyclooxygenase-2-deficient mice. **J Cereb Blood Flow Metab.**, Jan; 24(1):107-13, 2004.

SAWLE, P.; MOULTON, B.E.; JARZYKOWSKA, M.; GREEN, C.J.; FORESTI, R.; MOTTERLINI, R. Structure-activity relationships of Methoxychalcones as inducers of heme-oxygenase-1. **Chemical Research in Toxicology**. United Kingdom, v. 21, n. 7, p. 1484-94. July, 2008.

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.**, Jun 3;1(8649):1269,1989.

SCHOR, N.F.; KAGAN, V.E.; LIANG, Y.; YAN, C.H.; TYURINA, Y.; TYURIN, V.; NYLANDER, K.D. Exploiting oxidative stress and signaling in chemotherapy of resistant neoplasms. **Biochemistry (Mosc)**. Jan;69(1):38-44,2004.

SHRIVASTAVA, P.; SINGH, P.; TEWARI, A.K. Synthesis of pyrazole-based 1,5-diaryl compounds as potent anti-inflammatory agents. **Medicinal chemistry research.**, vol:21 iss:9 pg:2465-2475, 2012.

SEKIYAMA, K.; SUGAMA, S.; FUJITA, M.; SEKIGAWA, A.; TAKAMATSU, Y.; WARAGAI, M.; TAKENOUCI, T.; HASHIMOTO, M. Neuroinflammation in Parkinson's Disease and Related Disorders: A Lesson from Genetically Manipulated Mouse Models of α -Synucleinopathies. **Parkinsons Dis.**, 2012:271732., 2012.

SHULTS, C.W. Lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci**;103: 1661–1668, USA 2006.

SIAN-HÜLSMANN, J.; et al. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neurochem.**, 118(6):939-57, 2011.

SILVA, B. A.; et al. Uversky Targeting the Chameleon: a Focused Look at α -Synuclein and Its Roles in Neurodegeneration. **Mol Neurobiol.**, 47:446–459, 2013.

SOARES, D.G. de S.; OLIVEIRA, C.B.; LEAL, C. DRUMOND, M.R.S.; PADILHA, W.W.N. Susceptibilidade in vitro de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. **Revista Odonto Ciência – PUCRS**, Porto Alegre, v.21, n 53, p 233-237, jul/set 2006.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, E. D.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.;

CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355. 2007.

SOUZA, S. M. C., et al. Antiinflammatory and Antiulcer Properties of Tannins from *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae) in Rodents. **Phytother. Res.**, v.21, 220–225, 2007.

SOUZA, T. M., CUNHA, A. P., FARIAS DF, MACHADO LK, MORAIS SM, RICARDO NM, CARVALHO AF. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* of m-pentadecadienyl-phenol isolated from *Myracrodruon urundeuva* seeds. **Pest Manag Sci**. 2012.

SPENCER, J.P.; et al. Neuroinflammation: modulation by flavonoids and mechanisms of action. **Molecular Aspects of Medicine.**, v. 3, 383–397, 2012.

SPILLANTINI, M.G.; et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature** ., 388: 839–840, 1997.

SPILSBURY, A.; VAUZOUR, D.; SPENCER, JP.; RATTRAY, M. Regulation of NF- κ B activity in astrocytes: effects of flavonoids at dietary-relevant concentrations. **Biochem Biophys Res Commun.**, Feb; 17;418(3):578-83, 2012.

SUI, Y.I.; et al. Horne Meloxicam reduces lipopolysaccharide induced Degeneration of dopaminergic neurons in the rat substantianigra pars compacta. **Neuroscience Letters.**, v. 460, Issue 2, Pages 121–125, 2009.

SUGAMA, S.; CHO, B.P.; DEGIORGIO, L.A.; SHIMIZU, Y.; KIM, S.S.; KIM, Y.S.; SHIN, D.H.; VOLPE, B.T.; REIS, D.J.; CHO, S; JOH, T.H. Temporal and sequential analysis of microglia in the substantia nigra following medial forebrain bundle axotomy in rat. **Neuroscience.**, 116(4):925-33,2003.

SUGAMA, S., et al. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) - induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. **Brain Res.**, 964:288–294, 2003.

SULZER, D. Clues to How Alpha-Synuclein Damages Neurons in Parkinson's Disease. **Movement Disorders.**,v. 25, Suppl. 1, pp. S27–S31, 2010.

TACCONI, M.T. Neuronal death: is there a role for astrocytes? **Neurochem Res.**, May;23(5):759-65, 1998.

THAKUR, P.; NEHRU, B. Anti-inflammatory properties rather than anti-oxidant capability is the major mechanism of neuroprotection by sodium salicylate in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, Feb 12;231:420-31,2013.

TEISMANN, P.; TIEU, K.; CHOI, D.K.; WU, D.C.; NAINI, A.; HUNOT, S.; VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, Apr 29;100(9):5473-8, 2003.

TERZIOGLU, M.; GALTER, D. Parkinson's disease: genetic versus toxin-induced rodent models. **FEBS J.** Apr;275(7):1384-91,2008.

TIEU, K.; ISCHIROPOULOS, H.; PRZEDBORSKI, S. Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. **IUBMB Life.**, Jun;55(6):329-35, 2003.

TSE, D.C.; MCCREERY, R.L.; ADAMS, R.N. Potential oxidative pathways of brain catecholamines. **Med Chem.**, 6 Jan;19(1):37-40, 197.

TYMIANSKI, M.; LAU, A. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch.**, 460:525–42, 2010.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol. Scand., Suppl.**, 367, pp. 69–93, 1971.

UNITED STATES. **United States Departments of Agriculture.** Natural Resources Conserve Service. http://plant_materials.nrcs.usda.gov. 2012.

URAKAMI, K.; et al. Decreased superoxide dismutase activity in erythrocyte in Parkinson's disease. **Jpn J Psychiatry Neurol.**, v. 46 : 933-6, 1992.

UVERSKY, V.N.; et al. Synergistic effects of pesticides and metals on the fibrillation of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. **Neurotoxicology.**, 23(4–5):527–536, 2002.

VIANA, G. S. B.; CORREIA, R. A; RAO, V. S. ; MATOS, F. J. A; BANDEIRA, M. A M. Estudos Clínicos Preliminares sobre *Astronium urundeuva* na úlcera péptica. **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, São Paulo, 1988.

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. 2ed. Fortaleza: **EUFC**, 160p., 1995.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRA, M. A. M.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine** (Stuttgart), Inglaterra, v. 10, p. 189-195. 2003.

VIANA, G. S. B.; BANDEIRAS, M.A.M.; MOURA, L.C.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; MATOS, F.J.A.; RIBEIRO, R.A. Analgesic and Antiinflammatory Effects of the Tannin Fraction from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. **Phytotherapy Research**. V.11,(2), pages 118–122.,1997.

VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; GUEGAN, C.The role of glial cells in Parkinson's disease.**Curr Opin Neurol.**, 14: 483–489, 2001.

WANG, M.J. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. **Eur. J. Neurosci.**, v. 16, 2103–2112, 2002.

WHITTON, P.S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. **Br. J. Pharmacol.**, 150, pp. 963–976, 1997.

WICHMANN T.; et al. Neurocircuitry of Parkinson's disease. Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress.**American College of Neuropsychopharmacology.**, pp. 1761–1779, 2002.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med.**, Dec;111:544-7, 1962.

WITTE, M.E.; et al. Mitochondrial dysfunction, a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? **Mitochondrion.**, v. 10 (5), pp. 411–418, 2010.

XU, J.; et al. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. **Nat Med.**, 8:600–606, 2002.

YU, B.P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev.**, 74 : 139-62, 1994.

ZÁDORI, D.; et al. Mitochondrial disturbances, excitotoxicity, neuroinflammation and kynurenines: Novel therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. **Journal of the Neurological Sciences.**, 322, 187–191, 2012.

ZECCA, L.; et al. The absolute concentration of nigralneuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. **FEBS Lett.**, 16;510(3):216-20, 2002.

ZECCA, L.; ZUCCA, FA.; WILMS, H.; SULZER, D. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. **Trends Neurosci.**, Nov;26(11):578-80, 2003

ZHANG, W.; et al. Aggregated alphasynuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. **FASEB J.**, 19:533–42, 2005.

ZHU, A.; WANG, X.; YU, M.; WANG, J.Q.; BROWNELL, A.L. Evaluation of four pyridine analogs to characterize 6-OHDA-induced modulation of mGluR5 function in rat brain using microPET studies. **J Cereb Blood Flow Metab.**, Sep; 27(9):1623-31, 2007.

ZUANAZZI, A.S.; et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** UFRGS, pp. 489–516, 1999.