

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências**

Milene Borsoi

**Avaliação dos efeitos de extrato lipofílico de *Hypericum polyanthemum*
em modelo animal da Doença de Parkinson induzido por
6-hidroxidopamina**

Porto Alegre

2010

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Neurociências

Avaliação dos efeitos de extrato lipofílico de *Hypericum polyanthemum* em modelo animal da Doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina

Milene Borsoi

Orientação: Prof. Dr. Tadeu Mello e Souza
Co-orientação: Prof^a. Dr^a. Stela Maris Kuze Rates

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre
2010

Agradecimentos

Quero agradecer ao meu orientador, Prof. Tadeu, por ter aceitado orientar uma aluna que “caiu de pára-quedas” em seu laboratório. Agradeço pela ajuda, disponibilidade, atenção, confiança, honestidade e clareza de idéias ao encarar os resultados durante toda a realização deste trabalho, os quais permitiram meu crescimento durante todo o mestrado.

Agradeço a minha co-orientadora, Prof^a. Stela, pela ajuda e disponibilidade durante todo esse período, me aceitando em seu grupo de pesquisa. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos e presença constante.

Agradeço aos colegas de laboratório por toda ajuda e momentos de alegria. À Júlia, nossa “IC preferida”, pela prontidão nos experimentos. Agradeço especialmente à Beta, Cris e Cami pela presença, ajuda e apoio constantes. Sou privilegiada por trabalhar e ser amiga de pessoas como vocês, sempre alegres, disponíveis e que muito me ensinaram, tornando essa jornada mais leve e muito divertida! Vocês são ótimas!

Agradeço aos antigos colegas do “ex laboratório 35”, grupo do Dioguinho, pelo empréstimo de materiais, pela ajuda, momentos de descontração e principalmente, pela amizade. Aos colegas do laboratório 22 que nos receberam de braços abertos durante a mudança de laboratório do nosso grupo. Quero agradecer às alunas da Prof^a Stela, em especial à Desa, Eve, Ana e Fer, pela ajuda honestamente oferecida, disponibilidade para explicar “questões farmacêuticas a uma biomédica” e, principalmente, pela sincera amizade.

Agradeço principalmente a minha família pelo exemplo, por compreenderem minha ausência em muitos momentos e por me apoiarem de maneira incondicional.

À UFRGS, ao PPG Neurociências e ao Departamento de Bioquímica que possibilitaram a realização deste trabalho. Ao CNPq pela bolsa de estudo.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra (SN) e conseqüente depleção de dopamina no corpo estriado. Os tratamentos disponíveis não impedem a progressão da doença, evidenciando a importância da procura de novas terapias. Estudos anteriores demonstraram que um extrato ciclo-hexânico de *Hypericum polyanthemum* inibe a recaptação sinapotosomal de monoaminas e é capaz de alterar a ligação de GTP induzida por monoaminas em receptores em cérebro de ratos, de forma mais potente para dopamina no corpo estriado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração de um extrato ciclo-hexânico das partes aéreas de *H. polyanthemum* em modelo de DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Ratos Wistar receberam duas infusões de 6-OHDA (5,5 μ L, 3 μ g/ μ L) no feixe prosencefálico medial direito através de cirurgia estereotáxica. Foram realizados os seguintes regimes de tratamento do extrato: (regime 1) três administrações iniciadas 4 h após a lesão; (regime 2) três administrações iniciadas 24 h após a lesão; (regime 3) três administrações iniciadas 48 h após a lesão; (regime 4) três administrações iniciadas antes dos testes comportamentais, em que a última administração foi realizada 1 hora antes de cada teste. Em cada um desses regimes, as administrações (90 mg/kg, v.o.) foram realizadas em 24 h com intervalos de 6 h. Por último, foram realizadas também duas administrações diárias iniciadas 48 h após a lesão (90 mg/kg, v.o.) durante 5 dias consecutivos (regime 5). Controles receberam veículo (salina + polissorbato 80 5%). Os animais foram submetidos ao teste da fita adesiva 62 dias após a lesão e à avaliação do comportamento rotacional induzido por metilfenidato (20 mg/kg, i.p.) 10, 45 e 85 dias após a cirurgia estereotáxica. Foi realizada avaliação do conteúdo de tirosina-hidroxilase (TH) nos animais submetidos ao regime 2. Observou-se aumento no número de rotações ipsilaterais nos animais tratados com o extrato no regime 2 [ANOVA de medidas repetidas; efeito fator GRUPO $F(1,13)=6,63$; $p<0,0185$] e regime 5 [ANOVA de medidas repetidas; efeito fator GRUPO $F(1,12)=5,10$; $p<0,043$]. No teste da fita adesiva, os animais controle (teste de Wilcoxon; $p<0,004$) e tratado (teste de Wilcoxon; $p<0,045$) do regime 2 demoraram mais para perceber a fita

da pata esquerda, mas não houve diferença entre os grupos. Foi encontrada uma redução significativa do conteúdo de TH na SN dos animais tratados com o extrato pertencentes ao regime 2 (teste de Mann-Whitney, $p=0,034$). O extrato, no regime 2, aumenta a atividade rotacional induzida por MF de ratos lesionados com 6-OHDA e reduz o conteúdo de TH na SN, indicando ação neurotóxica do extrato no modelo testado.

ABSTRACT

Parkinson's Disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a loss of dopaminergic neurons of substantia nigra (SN) and consequent depletion of dopamine in the striatum. The available treatments do not prevent the disease progression, demonstrating the importance of researching new therapies. Previous studies demonstrated that the extract of *Hypericum polyanthemum* presents an antidepressant-like effect in mice that is mediated by inhibition of synaptosomal inhibits the monoamines reuptake and it's able to change the GTP binding to monoamine receptors in the rat brain, which is more pronounced for dopamine receptors in the striatum. The aim of this study was to evaluate the effect of *H. polyanthemum* cyclohexane extract administration in a PD model induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Wistar rats received two infusions of 6-OHDA (5.5 mL, 3 mg/mL) into the right medial forebrain bundle through stereotaxic surgery. We conducted the following treatments with the extract: (1) three administrations initiated 4 h after injury, (2) three administrations started 24 h after injury, (3) three administrations initiated 48 h after injury, (4) three administrations initiated before the behavioral tests, in which the last administration was performed 1 hour before each test and (5) two administration for 5 consecutive days. In each scheme, the administrations (90 mg/kg po each) were performed in 24 h with intervals of 86 h. Lastly, were performed twice daily administrations (90 mg/kg po each) for five consecutive days (5). Controls received vehicle. The assessment of rotational behavior induced by methylphenidate (MF) (20 mg / kg, ip) was performed 10, 45 and 85 days after stereotactic surgery. The animals were tested for sticky tape 62 days after infusion. The assessment of tyrosine hydroxylase (TH) content was performed in animals subjected to treatment 2. There was an increase in the number of ipsilateral rotations in animals treated with the extract in treatment 2 and treatment 5 [repeated measures ANOVA group effect, $F(1,13)=6.63$, $p<0.0185$; $F(1,12)=5.10$, $p<0.043$;, respectively]. In the sticky tape test, both groups of treatment 2 took longer to see the tape of the left paw, but did not differ from each other (Wilcoxon test, $p<0.005$). There was significant reduction in the content of TH in the SN of animals treated with

extract in the treatment 2 (Mann-Whitney testone-way ANOVA, $p=0.0034$). The treatment 2 increases the rotational behavior and reduces de content of TH in the SNpc, indicating the toxic effect of the extract in the animal PD model.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

APO -- apomorfina

CP – caudado-putâmen

DA – dopamina

DP – Doença de Parkinson

FPM – feixe prosencefálico medial

GP – globo pálido

GPe – globo pálido externo

GPi – globo pálido interno

MF – metilfenidato

NST – núcleo subtalâmico

PNE – projeções nigroestriatais

PUT – putâmen

SN – substância nigra

SNpc – parte compacta da substância nigra

TA – tálamo

TH – tirosina hidroxilase

VEIC -- veículo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuitaria envolvida na DP	1
Figura 2. Esquema mostrando a via nigroestriatal do encéfalo de rato	4
Figura 3. Teste da fita adesiva.....	5
Figura 4. <i>Hypericum polyanthemum</i>	8
Figura 5. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas 4 h após infusão de 6-OHDA	20
Figura 6. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas 24 h após infusão de 6-OHDA	21
Figura 7. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas 48 h após infusão de 6-OHDA.....	22
Figura 8. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas antes do teste.....	23
Figura 9. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 2 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas 48 h após infusão de 6-OHDA durante 5 dias consecutivos	25
Figura 10. Latência para perceber as fitas entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas 4 horas após a lesão	27
Figura 11. Latência para perceber as fitas entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas 24 horas após a lesão	28

Figura 12. Latência para perceber as fitas entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas 48 horas após a lesão	29
Figura 13. Latência para perceber as fitas entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de <i>H. polyanthemum</i> iniciadas antes do teste	30
Figura 14. Perda de TH na parte compacta da substância nigra.....	30
Figura 15. Efeito da administração do extrato de <i>H. polyanthemum</i> (270mg/kg, v.o., gavagem) sobre a inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina	31
Figura 16. Resultados obtidos relacionando os regimes de tratamento e as avaliações comportamentais e de imunistoquímica realizadas	39

ÍNDICE

RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 A Doença de Parkinson	1
1.2. Modelo Animal da DP induzido por 6-OHDA	3
1.3 Testes Comportamentais	4
1.3.1 Avaliação da atividade rotacional induzida por metilfenidato	4
1.3.2 Avaliação de déficits proprioceptivos	5
1.3.3 Inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina	6
2. GÊNERO <i>Hypericum</i>	7
3. JUSTIFICATIVA	10
4. OBJETIVOS	11
4.1 Objetivos Específicos	11
5. MATERIAL E MÉTODOS	12
5.1 Sujeitos	12
5.2 Extrato de <i>Hypericum polyanthemum</i>	12
5.3 Infusão de 6-OHDA	13
5.4 Regimes de Tratamento	14
5.5 Avaliação da atividade rotacional induzida por metilfenidato	15
5.6 Teste da Fita Adesiva	15
5.7 Imunoistoquímica para Tirosina-Hidroxilase	15
5.8 Inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina	17
5.9 Análise Estatística	17
6. RESULTADOS	19
6.1 Avaliação da atividade rotacional induzida por metilfenidato	19
6.1.1 Três administrações iniciadas 4 horas após a infusão de 6-OHDA	19
6.1.2 Três administrações iniciadas 24 horas após a infusão de 6-OHDA	20
6.1.3 Três administrações iniciadas 48 horas após a infusão de 6-OHDA	22
6.1.4 Três administrações iniciadas pré-teste	23
6.1.5 Duas administrações iniciadas 48 horas após a infusão de 6-OHDA durante cinco dias consecutivos	24

6.2 Avaliação de negligência sensório-motora através do teste da fita adesiva	25
<i>6.2.1 Três administrações iniciadas 4 h após a infusão de 6-OHDA</i>	<i>26</i>
<i>6.2.2 Três administrações iniciadas 24 h após a infusão de 6-OHDA</i>	<i>27</i>
<i>6.2.3 Três administrações iniciadas 48 h após a infusão de 6-OHDA</i>	<i>28</i>
<i>6.2.4 Três administrações iniciadas pré-teste</i>	<i>29</i>
6.3 Avaliação do conteúdo de TH	30
6.4 Avaliação da inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina	31
7. DISCUSSÃO	32
8. PERSPECTIVAS	40
9. REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que atinge cerca de 1% da população mundial acima de 55 anos e tem idade média de início de aproximadamente 60 anos, sendo que incidência aumenta com o avanço da idade (Hayes et al., 2010). A perda de células dopaminérgicas na parte compacta da substância nigra (SNpc) é uma das principais características da doença. As causas da morte dos neurônios dopaminérgicos não são bem compreendidas, mas parecem resultar da interação entre vários fatores, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, mal enovelamento protéico, excitotoxicidade do glutamato e neuroinflamação (Dauer e Przedborski, 2003; Dev et al., 2003; Fahn e Sulzer, 2004; Shen e Cookson, 2004).

Com a morte dos neurônios da SNpc, ocorre redução nos níveis de dopamina (DA) no corpo estriado, levando ao aparecimento do quadro clínico. O corpo estriado faz parte dos núcleos da base que, juntamente com o córtex motor, é responsável pela iniciação e execução correta dos movimentos. A DA realiza a inibição e a estimulação das vias direta e indireta que interconectam essas estruturas, assim, alterações significativas de seus níveis são responsáveis pelas perturbações motoras observadas na doença (Fig. 1).

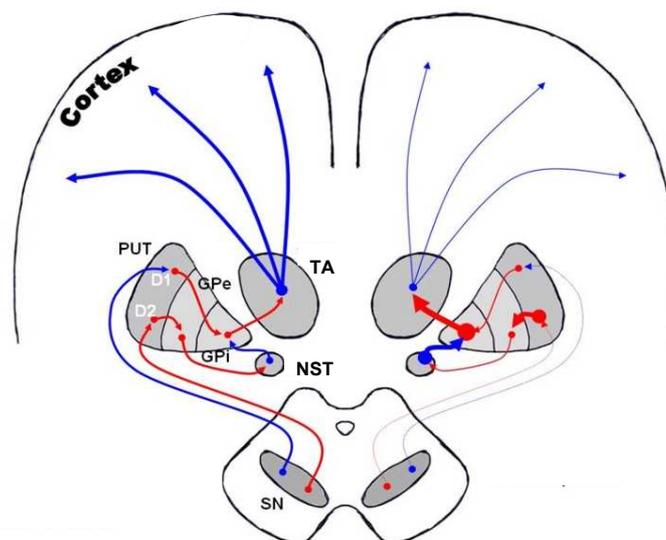


Figura 1. Circuitaria envolvida na DP. À esquerda, o circuito neural normal. À direita, o circuito alterado observado na DP. Com a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, ocorre uma

interrupção na comunicação nigroestriatal. GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; NST, núcleo subtalâmico; PUT, putâmen; SN, substância nigra; TA, tálamo. Linhas azuis representam vias excitatórias e linhas vermelhas representam vias inibitórias.

Os principais sintomas são tremores em repouso, rigidez muscular, bradicinesia, entre outros prejuízos motores. Outras alterações freqüentemente acompanham esses sintomas, como disfunção cognitiva, distúrbios do sono, depressão, entre outros, conseqüentes da perda não apenas de neurônios dopaminérgicos, mas também noradrenérgicos, serotoninérgicos, histaminérgicos, etc (Fahn e Sulzer, 2004; Carlsson et al., 2009). Além disso, déficits proprioceptivos podem ser observados nos pacientes com DP, os quais podem agravar outros sintomas motores (Vaugoyeau e Viel, 2007). Diversos estudos apontam para alterações que os pacientes apresentam na capacidade de estimar a posição de um membro antes e durante um movimento e na capacidade de agarrar objetos, atividades estas que dependem de um correto funcionamento da circuitaria responsável pelos movimentos (Desmurget et al., 1995; Teulings et al., 1997), pois acredita-se que os núcleos da base recebam entradas sensoriais e realizam a integração destes sinais para a organização da saída motora (Lewis et al., 2001).

O diagnóstico da DP é feito através da história do paciente, do exame neurológico e da resposta à terapia de reposição de DA. No entanto, os sintomas só se tornam aparentes quando ocorre aproximadamente 40% de perda neuronal na SNpc e 80% de depleção dopaminérgica no corpo estriado (Kirik et al., 1998). A observação histológica *post mortem* de tecido encefálico com presença dos Corpos de Lewy é o único diagnóstico definitivo da DP (Sulzer 2007). Os Corpos de Lewy consistem em inclusões citoplasmáticas positivas para alfa-sinucleína e ubiquitina presentes nos neurônios dopaminérgicos remanescentes na SNpc (Dauer e Przedborski, 2003).

Embora a descoberta da levodopa, um precursor da síntese de dopamina, tenha revolucionado o tratamento da DP, pacientes que fazem uso da medicação a longo prazo desenvolvem flutuações motoras acompanhadas por movimentos involuntários, chamadas discinesias, que possuem difícil controle e pioram a qualidade de vida do paciente (Dauer e Przedborski, 2003). Além da

levodopa, outros recursos terapêuticos são utilizados em associação (carbidopa, benserazida ou ainda selegilina), mas também acabam por apresentar eficácia temporária ou reduzida, além de não impedirem ou retardarem a progressão da doença (Pezzoli et al., 2004), levando à necessidade de investigação de outras possibilidades terapêuticas. A etiologia multifatorial da DP leva à possibilidade do uso de drogas com múltiplos alvos, entre os quais têm sido investigadas também a neuroproteção.

1.2 Modelo animal da DP induzido por 6-hidroxidopamina

O modelo animal de DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi inicialmente descrito por Üngerstedt em 1968, em que a infusão da toxina foi realizada bilateralmente na SN de ratos. Posteriormente, a infusão unilateral se mostrou mais útil para mimetizar a doença e se passou, então, à realização da observação dos danos provocados pela toxina comparando o lado intacto com aquele afetado pela infusão (Ungerstedt 1971).

A 6-OHDA é uma neurotoxina estruturalmente similar às catecolaminas, sendo reconhecida pelos transportadores destes neurotransmissores. Através do transportador da dopamina (DAT), a molécula de 6-OHDA entra nos neurônios dopaminérgicos desencadeando uma cascata de eventos que culmina na morte da célula, a qual é mediada, principalmente, pelo potente efeito inibitório dessa toxina sobre a cadeia respiratória mitocondrial (Deumens et al., 2002). Por não atravessar a barreira hemato-encefálica, a 6-OHDA precisa ser infundida diretamente no cérebro através de cirurgia estereotáxica em uma das seguintes estruturas-alvo: SN, corpo estriado ou feixe prosencefálico medial, mimetizando, assim, a depleção dopaminérgica observada na DP. A infusão de 6-OHDA é realizada unilateralmente, geralmente em roedores, levando a um quadro de hemiparkinsonismo caracterizado por assimetria motora. Essa assimetria motora pode ser observada através de uma série de testes comportamentais. Alguns deles serão abordados a seguir.

1.3 Testes comportamentais

1.3.1 Avaliação da atividade rotacional induzida por metilfenidato

Um dos testes mais freqüentemente utilizados em modelos animais de hemiparkinsonismo em roedores é a avaliação do comportamento rotacional induzido por droga (Herrera-Marschitz et al., 2010; Ungerstedt, 1971). A assimetria motora conseqüente à infusão unilateral de 6-OHDA resulta da depleção dopaminérgica ipsilateral à lesão (Fig. 2). Com a administração de drogas dopaminérgicas, como a anfetamina, a apomorfina, ou o metilfenidato (MF), esse desequilíbrio é acentuado, podendo ser mensurado através da avaliação do comportamento rotacional que os animais passam a apresentar de forma pronunciada (Hudson et al., 1993). De acordo com o mecanismo de ação da droga utilizada, as rotações observadas podem ser ipsi ou contralaterais ao hemisfério lesionado. Assim, drogas que estimulam receptores dopaminérgicos, como a apomorfina, produzem comportamento rotacional na direção oposta aquela do lado lesionado (contralateral), enquanto que drogas que atuam nos terminais dopaminérgicos aumentando os níveis de DA, como o MF, levam ao aparecimento de rotações em direção à lesão (ipsilaterais) (Ungerstedt, 1971; Simola et al., 2007; Torres and Dunnett, 2007).

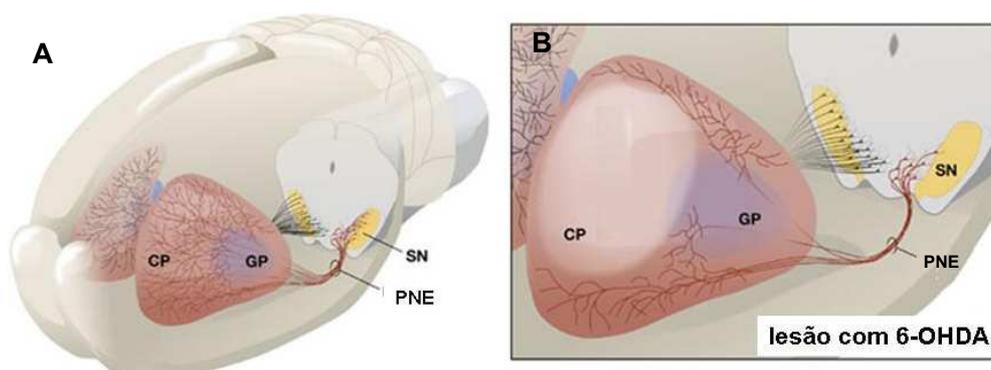


Figura 2. Esquema mostrando a via nigroestriatal do encéfalo de rato. Em A é mostrado o encéfalo de um rato não-lesionado com as projeções dos neurônios dopaminérgicos partindo da *substância nigra* em direção ao corpo estriado (ou caudado-putâmen) e globo pálido em ambos hemisférios. Em B, após lesão unilateral com 6-OHDA, ocorre significativa redução das projeções nigroestriataes e conseqüente redução dos níveis de dopamina no corpo estriado.

CP, caudado-putâmen; GP, globo pálido; PNE, projeções nigroestriatais; SN *substância nigra*. Adaptado (Kirik et al., 2004).

1.3.2 Avaliação de déficits proprioceptivos

Animais com lesão unilateral apresentam assimetria no uso das patas dianteiras para executar diferentes tarefas, a qual é evidenciada pela preferência de uso da pata ipsilateral à lesão (Schallert et al., 2000; Jeyasingham et al., 2001). Através de diferentes tarefas é possível avaliar o prejuízo na sensomotricidade de animais hemilesionados (Barneoud et al., 2000).

Uma maneira de realizar essa avaliação é através do teste da fita adesiva (Fig. 3). Nele, é colocado, na porção distal do pulso de cada uma das patas dianteiras do animal, um pedaço de fita adesiva e são medidas as latências para o animal perceber e retirar cada fita (Castaneda et al., 2005).

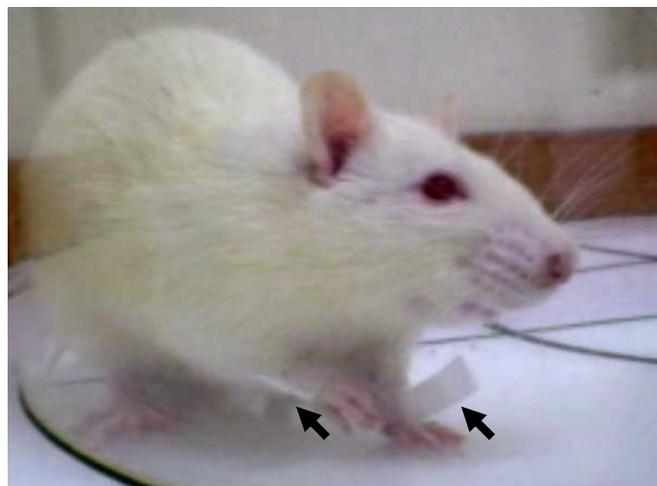


Figura 3. Teste da fita adesiva. É colocado um pedaço de fita adesiva em cada uma das patas dianteiras do animal (indicado pelas setas) e contabilizadas as latências para perceber e retirar cada uma das fitas.

1.3.3 Inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina

A inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina (APO) é um teste utilizado para predizer ação de drogas sobre receptores dopaminérgicos (antagonistas ou agonistas) *in vivo* (Protais et al., 1976). Após tratamento com APO, camundongos tendem a adotar uma posição vertical, agarrando-se e/ou escalando barras de uma gaiola, efeito esse conseqüente da ação da APO em receptores dopaminérgicos pós-sinápticos estriatais (Battisti et al., 2000).

2. GÊNERO *Hypericum*

O gênero *Hypericum* é constituído de plantas herbáceas que ocorrem em regiões temperadas, com aproximadamente 400 espécies (Robson, 1981). A caracterização química do gênero *Hypericum* levou ao isolamento de mais de 100 compostos com reconhecida atividade biológica, como flavonóides, taninos, derivados floroglucínóis (Linde et al., 1996; Butterweck et al., 1997; Viana et al., 2006).

Entre as diferentes espécies de *Hypericum*, destaca-se a espécie européia *H. perforatum*, com reconhecida atividade antidepressiva (Linde et al., 1996; Kim et al., 1999; Friede et al., 2001) e que apresentou ação neuroprotetora em diferentes condições experimentais (Genovese et al., 2006; Mohanasundari et al., 2006).

Espécies do gênero *Hypericum* têm forte tendência a acumular compostos fenólicos, como no caso da espécie *Hypericum polyanthemum* (Fig. 4), nativa do Rio Grande do Sul, que apresenta em seu extrato metanólico taninos e flavonóides (Viana et al., 2006). A partir de extrato ciclo-hexânico de *H. polyanthemum*, já foi descrita a presença do derivado floroglucinol uliginosina B (Nör et al., 2004) e dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 (Ferraz et al., 2001). A avaliação de taninos e de óleos voláteis revelou os teores de 6,7% e 0,1% a 0,5%, respectivamente (Dall'Agnoll et al., 2003; Ferraz et al., 2005a). No entanto, a hipericina, importante composto encontrado no *H. perforatum* está ausente no *H. polyanthemum*, conforme investigação fitoquímica realizada por Ferraz et al (2002). Este resultado está de acordo com a classificação quimiotaxonômica proposta por Robson (1990) onde a produção de hipericina é relacionada com a presença de glândulas negras nas folhas. As espécies brasileiras de *Hypericum* possuem apenas glândulas pálidas, as quais não produzem hipericina (Kartnig et al., 1996).

Em relação aos estudos farmacológicos, já foi mostrada ação antinociceptiva de extrato de *H. polyanthemum* nos testes de placa aquecida e de contorções induzidas por ácido acético (Viana et al., 2003). O benzopirano HP1 e o derivado floroglucinol uliginosina B, ambos isolados desse extrato, possuem atividade antinociceptiva em diferentes modelos animais. A ação de HP1 é prevenida com a administração de naloxona, um antagonista opióide

(Haas et al., 2010 *in press*), enquanto que a atividade antinociceptiva apresentada pela uliginosina B é prevenida com a administração de antagonista dopaminérgico (Stolz et al., 2009).



Figura 4. *Hypericum polyanthemum* (Cortesia: Gilsane Von Poser).

O extrato ciclo-hexânico de *H. polyanthemum* e a uliginosina B apresentaram atividade do tipo antidepressiva em ratos e camundongos, a qual é prevenida pela administração de antagonistas dopaminérgicos D1 e D2. O extrato e a uliginosina B também inibem a captação sinaptossomal de monoaminas, sendo essa inibição mais pronunciada para a DA em relação à noradrenalina e serotonina (Viana, 2007). Porém, a inibição da recaptação de monoaminas ocorre através de mecanismos diferentes dos fármacos antidepressivos disponíveis na terapêutica, visto que o extrato não se liga aos transportadores monoaminérgicos (Viana et al., 2005; Viana et al., 2006). Adicionalmente, a administração do extrato de *H. polyanthemum* é capaz de aumentar ou reduzir a ligação de [³⁵S] GTP γ S estimulada por monoaminas em cérebro de ratos, dependendo do regime de tratamento, demonstrando que o extrato altera o funcionamento da maquinaria ligada à ativação de receptores aminérgicos centrais. No entanto, o mesmo experimento realizado *in vitro* com uliginosina B, sem a presença de monoaminas no meio de incubação, mostrou que esta substância não tem ação agonista direta sobre os receptores monoaminérgicos (Viana, 2007). Ainda, tanto o extrato de *H. polyanthemum* quanto benzopiranos a partir dele isolados, inibem a atividade

da monoamina oxidase A *in vitro* a partir de homogenatos de mitocôndrias de encéfalo de rato (Gnerre et al., 2001).

O emprego de *H. polyanthemum* para o desenvolvimento de fármacos antidepressivos é objeto de depósito de pedido de patente no INPI (PI0900614-1) (Rates et al., 2009) e no *European Patent Office* (PCT/EP2010/051816) (Rates et al., 2010).

3. JUSTIFICATIVA

Como os tratamentos hoje disponíveis para a DP não impedem a progressão da doença e, com o passar do tempo, levam ao aparecimento de discinesias, quadro bastante debilitante aos pacientes, torna-se importante investigar outras possibilidades terapêuticas.

Os estudos farmacológicos realizados até o momento com *H. polyanthemum* demonstram que esta espécie é capaz de ativar a neurotransmissão dopaminérgica, tornando-o um agente potencialmente útil para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da DP. Adicionalmente, não existem dados na literatura avaliando o efeito neuroprotetor de *H. polyanthemum*. No entanto foi demonstrado que extratos de espécies de *Hypericum*, inclusive *H. polyanthemum*, protegem o cérebro de ratos do aumento de corticosterona induzido por estresse (Viana, 2007; Viana et al., 2008). Altos níveis de corticóides têm sido relacionados com neurotoxicidade (Duman et al., 1997; Salposky et al., 2000). Além disso, por analogia, dados da ação neuroprotetora de *Hypericum perforatum* corroboram a hipótese de que *H. polyanthemum* seja ativo em modelos animais de DP.

4. OBJETIVO

Avaliar o efeito pós-lesão da administração de um extrato ciclo-hexânico de *H. polyanthemum* nas alterações comportamentais e neuroquímicas causadas pela lesão induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em cérebro de ratos em um modelo animal de Doença de Parkinson.

4.1 Objetivos específicos

Verificar o efeito da administração oral (gavagem) do extrato ciclo-hexânico de *H. polyanthemum* em ratos após à infusão unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (FPM) sobre:

- 4.1.1 O comportamento rotacional induzido por metilfenidato;
- 4.1.2 A função sensório-motora, através do teste da fita adesiva;
- 4.1.3 O conteúdo de tirosina-hidroxilase, marcador de neurônios dopaminérgicos, na SNpc;

Paralelamente, verificar o efeito da administração oral (gavagem) do extrato ciclo-hexânico de *H. polyanthemum* em camundongos não-lesionados no teste de inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Sujeitos

Para avaliação do comportamento rotacional induzido por MF, do teste da fita adesiva e do conteúdo de TH na SNpc de animais lesionados com 6-OHDA, foram utilizados Ratos Wistar machos adultos (290-350g, 110 dias de idade) obtidos do Centro de Produção e Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para avaliação da inibição do comportamento de escalada induzida por apomorfina, foram utilizados camundongos Swiss CF1 machos, obtidos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde. Os animais foram mantidos em gaiolas/caixas (ratos: cinco animais por caixa; camundongos: oito animais por caixa) com acesso livre à água e ração padrão, em ciclo claro-escuro de 12 horas (período claro: 7h–19h) em ambiente com temperatura controlada (22°C). Para a realização dos testes comportamentais, os animais eram colocados na sala 30 minutos antes para ambientação permanecendo em suas caixas-moradia. Todos os animais foram manipulados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC). Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Universidade (Parecer 2007985).

5.2 Extrato de *Hypericum polyanthemum*

Hypericum polyanthemum, em floração, foi coletado em Caçapava-RS sob autorização do CGEN/IBAMA (003/2008 P 02000.001717/2008-60) e identificadas pelo Dr. Sérgio Bordignon. As exsiccatas estão depositadas no herbário ICN (Herbário do Departamento de Botânica – Instituto de Biociências – UFRGS) sob o número Bordignon et al. 1429.

Para obtenção do extrato, foram utilizadas partes aéreas (200 g) dessecadas à sombra, em temperatura ambiente, e trituradas em moinho de facas. A extração foi realizada através de maceração (3x24h) a frio com ciclohexano (planta:solvente 1:10 m/v) e posterior evaporação completa do solvente

em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a uma temperatura não superior a 55 °C. O rendimento final do extrato foi de 3% (6 g).

Os compostos majoritários presentes no extrato foram quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de acordo com Nör et al. (2004), a qual revelou a presença de compostos nas seguintes concentrações: uliginosina 11,54%, HP1 11,34%, HP2 7,88% e HP3 6,77%. O cromatógrafo utilizado foi da marca Waters com detector UV Waters 2487, bomba Waters 600 e injetor automático, coluna Nova Pack C18 acoplada à pré-coluna Nova Pack C18 60A. A fase móvel foi constituída de acetonitrila:água:TFA (ác. trifluoroacético) 95:5:0,01 (v:v:v). O tempo de corrida para a amostra foi de 20 minutos, com fluxo de 1 mL/min. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 220 nm (uliginosina B) e 270 nm (benzopiranos).

Para administração nos animais, o extrato foi suspenso em solução salina com polissorbato 80 (5%), com auxílio de ultrassom. A concentração final da suspensão foi de 90 mg/mL, para administração em ratos, e 9 mg/mL, para camundongos. A suspensão do extrato foi realizada no dia dos respectivos tratamentos.

Em todos os procedimentos realizados, o experimentador era cego para o tratamento do animal.

5.3 Infusão de 6-OHDA

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/kg) e acomodados em aparelho estereotáxico (bocal -3,3mm) para receber duas infusões de solução de 6-OHDA (16,5µg, 5,5 µL, Sigma; veículo: ácido ascórbico 0,20% em salina) no FPM direito (primeira infusão:, 2,5µL, AP -4,4 mm, LL -1,8 mm, -8,8 mm; segunda infusão: 3,0 µL, AP -4,0 mm, LL -1,6 mm, DV. -9,0 mm, ambas infusões a partir do bregma), conforme literatura (Mukhida et al., 2001) com poucas modificações. Para a realização do procedimento, foi utilizada uma agulha conectada a uma microseringa de 10µL (Hamilton, 701 N) e a toxina foi infundida com auxílio de bomba de infusão (Insight, Brasil) na

velocidade de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após o término de cada infusão, a agulha foi mantida no encéfalo por 4 minutos para permitir a difusão da droga. Após a cirurgia, os tecidos foram unidos com adesivo cianocrilato. Os animais ficaram sob observação até recobrem os sentidos e foram, então, acomodados em suas caixas-moradia.

5.4 Regimes de tratamento

Os animais foram submetidos a um dos seguintes regimes de tratamentos:

Regime 1: três administrações de 90 mg/kg cada (gavagem) iniciadas 4 horas após a cirurgia estereotáxica (n=10, grupo controle; n=10 grupo tratado);

Regime 2: três administrações de 90 mg/kg cada (gavagem) iniciadas 24 horas após a cirurgia estereotáxica (n=20, grupo controle; n=21 grupo tratado);

Regime 3: três administrações de 90 mg/kg cada (gavagem) iniciadas 48 horas após a cirurgia estereotáxica (n=6, grupo controle; n=8 grupo tratado);

Regime 4: três administrações de 90 mg/kg cada (gavagem) iniciadas antes de cada teste comportamental (n=11, grupo controle; n=12 grupo tratado). Dentre as três administrações, a última foi realizada 1 hora antes do teste comportamental.

Regime 5: duas administrações diárias de 90 mg/kg cada (gavagem) iniciadas 48 após a cirurgia estereotáxica durante 5 dias consecutivos (n=7, grupo controle; n=8 grupo tratado).

Em cada regime de tratamento, as administrações foram realizadas em 24 horas, com um intervalo entre cada administração de aproximadamente 8 horas, exceto para o regime 5, em que o intervalo entre as administrações foi de 12 horas. O volume administrado foi de 1 mL/kg. Os controles receberam veículo (solução salina com polissorbatato 80 5%) 1 mL/kg.

5.5 Avaliação da atividade rotacional induzida por metilfenidato

A atividade rotacional induzida por cloridrato de metilfenidato (Ritalina®, Novartis) foi realizada 10, 45 e 85 dias após a infusão de 6-OHDA, com exceção do regime 3, onde houve apenas as duas primeiras sessões. Isto aconteceu porque os animais apresentaram importantes sinais de sofrimento por infecção e precisaram ser sacrificados. Os animais receberam uma injeção i.p. de MF (20 mg/kg) e foram imediatamente colocados em uma arena circular (80 cm de diâmetro) de parede elevadas onde foram observados por 30 minutos e registrado o número de rotações ipsilaterais à lesão. O volume injetado foi de 1mL/kg em cada animal.

5.6 Teste da fita adesiva

Para avaliar possíveis déficits proprioceptivos evidenciados pela negligência somatosensorial das patas dianteiras, foi utilizado o teste da fita adesiva (Castaneda et al., 2005; Albertsmeier et al., 2007) com poucas modificações, realizado 62 dias após a cirurgia estereotáxica. Para tal, foi colocado um pedaço de fita adesiva (Micropore®) medindo 0,5 cm x 5 cm na altura do pulso de cada pata dianteira. As latências de percepção da presença de cada fita foram computadas assim que o animal as levava até a boca, assim como as latências para a retirada da fita de cada pata. O teste foi realizado em uma arena circular (60 cm de diâmetro) de paredes transparentes e os animais foram observados durante 2 minutos.

5.7 Imunoistoquímica para Tirosina-Hidroxilase

Ao final dos procedimentos acima descritos, os animais foram anestesiados (cetamina 0,7 mL/kg e xilazina 0,6 mL/kg) e submetidos à perfusão transcardíaca com 150 mL de solução de NaCl 0,9% heparinizada, seguidos de 150 mL de solução de paraformaldeído 4%. Após decapitação, os encéfalos foram isolados e mantidos em geladeira por 12 horas mergulhados

em solução de paraformaldeído 4%. Após, para crioproteção do tecido, os encéfalos foram mantidos, ainda em geladeira, em uma solução de sacarose a 30% até submersão completa, para serem então congelados a -20°C, imersos nessa mesma solução de sacarose. Os cérebros foram então seccionados em criostato (Leica Microsystems GmbH) a -20°C para obtenção de secções coronais de 45 µm do mesencéfalo. Após a secção, foi realizada análise do conteúdo de tirosina hidroxilase nas fatias para quantificação da lesão (100 dias pós-lesão) de acordo com a literatura (Castaneda et al., 2005) com poucas modificações. As fatias foram colocadas em tampão salina fosfato (PBS) filtrado e foram lavadas cinco vezes, tendo cada lavagem a duração de 5 minutos, realizada sob leve agitação em temperatura ambiente. Após as lavagens, as fatias foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-tirosina hidroxilase 1:750 (AB 152, *Chemicon International*) à temperatura ambiente durante 18 horas. As fatias foram novamente lavadas cinco vezes com PBS filtrado e então incubadas com o anticorpo secundário (anti-coelho) fluorescente (AlexaFluor 568 A11036, *Molecular Probes, USA*) à temperatura ambiente durante 1 hora. Após, foram novamente lavadas com PBS filtrado e colocadas entre lâmina e lamínula com *Fluorsave* (Calbiochem, USA) para evitar a perda da fluorescência, para posterior observação em microscópio. As imagens foram analisadas usando o software *Scion Image for Windows* através da comparação da área positiva para TH na SN nos dois hemisférios. Para cada rato, o hemisfério contralateral à lesão foi utilizado como controle. Para estabelecer o grau de lesão, foi realizado o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Quantidade de TH no hemisfério não-lesionado}}{\text{Quantidade de TH no hemifério lesionado}} \times 100\% = \% \text{ de TH}$$

$$100\% - \% \text{ de TH} = \% \text{ de lesão}$$

Ao final de todos os experimentos, os resíduos orgânicos foram mantidos em congelador a -20°C até serem recolhidos pelo Centro de Zoonoses da Prefeitura Municipal.

5.8 Inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina

A avaliação da inibição do comportamento de escalada induzida por apomorfina foi realizada em animais não-lesionados a fim de verificar uma possível ação dopaminérgica do extrato testado, de acordo com Costall (1978) com poucas modificações.

Trinta minutos antes do teste, camundongos receberam uma administração v.o. (gavagem) do extrato (ou veículo) na dose de 270 mg/kg, sendo então colocados nas gaiolas-teste, individualmente, para ambientação. Transcorrido esse período, os animais receberam apomorfina (Sigma, 8 mg/kg, s.c.) e foram observados durante 1 minuto, a cada 5 minutos, durante 30 minutos, totalizando 6 observações. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número de patas apoiadas na gaiola, ângulo do corpo do animal ao apoiar-se na gaiola, presença ou não de estereotipia e comportamento de escalada do animal. De acordo com o comportamento observado, foi dado um escore, onde: 0 = nenhuma pata na grade sem estereotipia; 1 = nenhuma pata na grade com estereotipia; 2 = 1, 2 ou 3 patas na grade; 3 = 4 patas na grade apresentando escalada intermitente (animal inicia a escalada após o início da observação) e 4 = 4 patas na grade apresentando escalada contínua (quando o animal já está escalando a gaiola ao se iniciar a observação), totalizando um índice máximo de escalada de 24 pontos.

5.9 Análise estatística

A análise estatística, paramétrica ou não-paramétrica, foi feita de acordo com o tipo de variável, distribuição dos dados e variância entre os grupos. Foi utilizada ANOVA de medidas repetidas para avaliar os resultados obtidos nas rotações. No teste da fita adesiva, foi utilizado o teste de Wilcoxon para comparar dentro de cada grupo as latências para notar e retirar as fitas de cada pata e o teste de Mann-Whitney na comparação entre grupos. Foi utilizado o teste de Mann-Whitney na comparação do imunoconteúdo de TH entre os grupos. Para avaliação dos resultados do comportamento de escalada induzido

por apomorfina, foi utilizada ANOVA de duas vias. O valor de $p < 0,05$ foi utilizado como critério para significância estatística.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da atividade rotacional induzida por metilfenidato

Para todos os regimes de tratamento, apenas os animais que apresentaram 20 ou mais rotações em pelo menos uma das três sessões foram incluídos na análise estatística. Desta maneira, no Regime 1 foram excluídos 3 controles e 4 tratados; no Regime 2, 6 controles e 10 tratados; no Regime 3, 1 animal controle e 2 tratados; no Regime 4; 1 animal controle e nenhum tratado; e, no Regime 5, 6 controles e 7 tratados.

6.1.1 Três administrações iniciadas 4 h após a infusão de 6-OHDA (regime 1)

O resultado do comportamento rotacional dos animais submetidos ao regime de tratamento 1, em que receberam 3 administrações iniciadas 4h após a lesão estão mostrados na Figura 5. Não houve diferenças significativas entre as três sessões de rotações [ANOVA de medidas repetidas; fator SESSÃO: $F(2,22)=3,21$; $p=0,599$; dados não mostrados]. Também não foi observada diferença na análise da interação SESSÃO x GRUPO [$F(2,22)=0,36$; $p=0,701$] (Fig. 5A) e efeito fator GRUPO [$F(1,11)=0,03$; $p=0,8606$] (Fig. 5B).

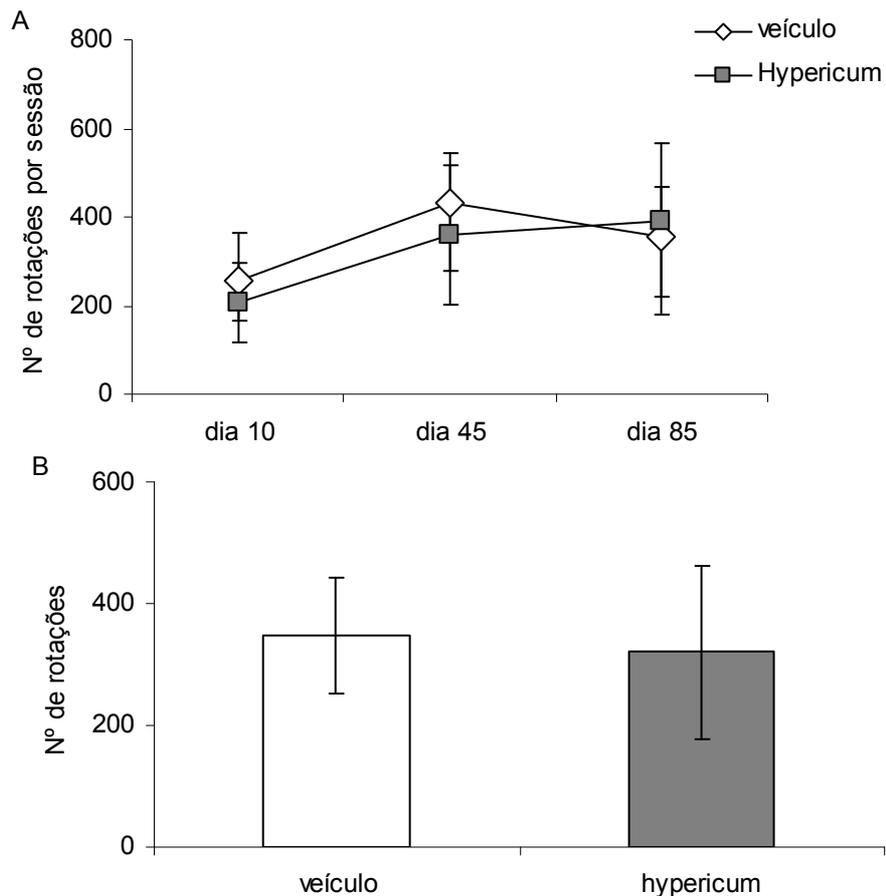


Figura 5. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas 4 horas após a cirurgia estereotáxica. O extrato foi administrado via oral (gavagem), na dose de 90 mg/kg. Foi registrado o número de rotações ipsilaterais à lesão após injeção i.p. MF 20 mg/kg (n= 7 e 6 nos grupos controle e tratado, respectivamente). Em A, os dados representam o número de rotações \pm erro padrão de cada uma das três sessões testadas em diferentes dias pós-infusão de 6-OHDA (dias 10, 45 e 85), conforme eixo horizontal; $p > 0,05$. Em B, os dados representam a média \pm erro padrão do número de rotações por sessão; $p > 0,05$, ANOVA de medidas repetidas.

6.1.2 Três administrações iniciadas 24 h após a infusão de 6-OHDA (regime 2)

A Figura 6 mostra os resultados das rotações dos animais submetidos a 3 administrações iniciadas 24h após a lesão. Aqui também não se observou diferença no número de rotações entre as sessões testadas [efeito fator SESSÃO; $F(2,46)=1,40$; $p=0,257$; dados não mostrados]. Não foi observada

interação entre os fatores GRUPO x SESSÃO [$F(2,46)=0,53$; $p=0,592$] (Fig. 6A). No entanto, ocorreu aumento significativo no número de rotações nos animais tratados com o extrato [efeito fator GRUPO: $F(1,23)=6,43$; $p=0,0185$] (Fig. 6B). Esses dados mostram que este regime de tratamento ocasionou um prejuízo permanente no comportamento de rotação.

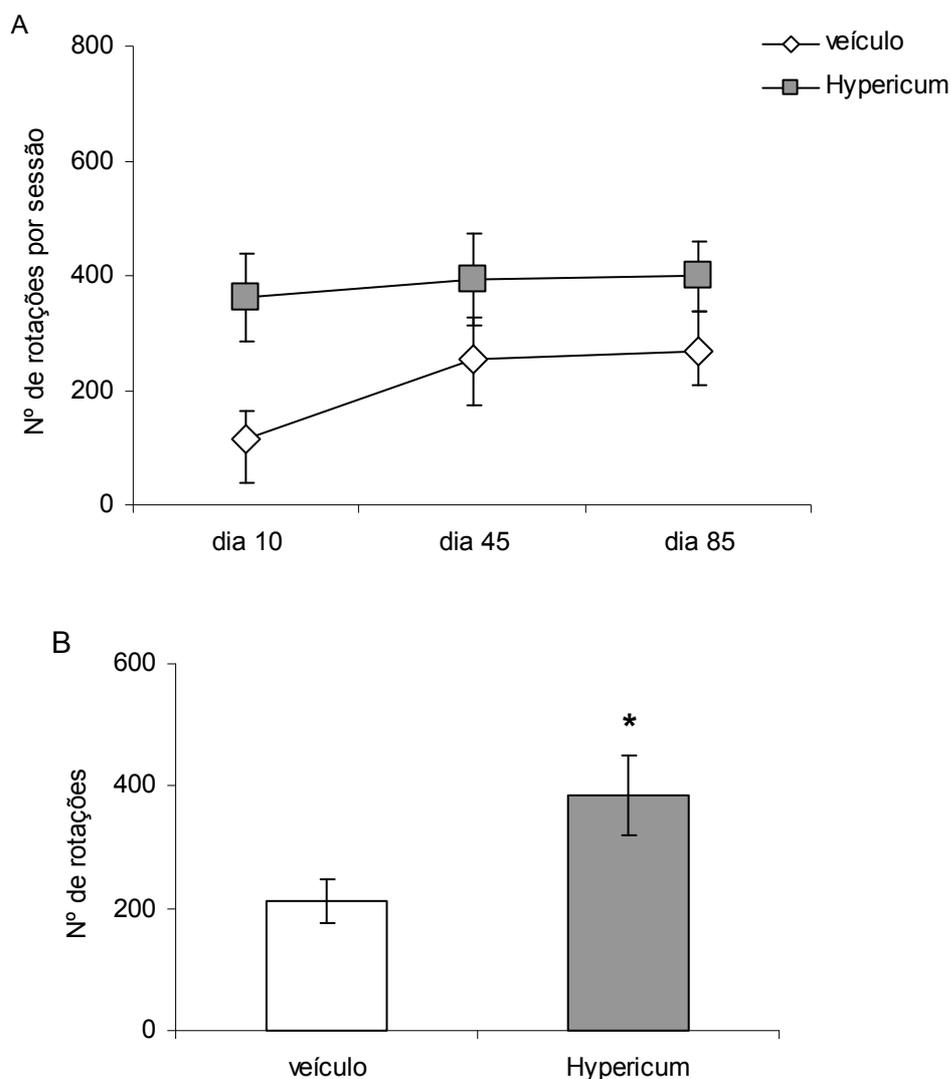


Figura 6. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas 24 horas após a cirurgia estereotáxica. O extrato foi administrado via oral (gavagem), na dose de 90 mg/kg. Foi registrado o número de rotações ipsilaterais à lesão após injeção i.p. MF 20 mg/kg ($n= 14$ e 11 nos grupos controle e tratado, respectivamente). Em A, os dados representam o número de rotações \pm erro padrão de cada uma das três sessões testadas em diferentes dias pós-infusão de 6-OHDA (dias 10, 45 e 85), conforme eixo horizontal; $p>0,05$. Em B, os dados representam a média \pm erro padrão do número de rotações por sessão; $*p<0,05$. ANOVA de medidas repetidas, fator GRUPO.

6.1.3 Três administrações iniciadas 48 h após a infusão de 6-OHDA (regime 3)

No regime de tratamento de 3 administrações iniciadas 48h após a lesão, excepcionalmente, os animais foram submetidos a duas sessões de rotações (dias 10 e 45). Novamente não foi observada diferença significativa no número de rotações entre as sessões testadas [efeito fator SESSÃO; $F(1,9)=0,44$; $p=0,524$; dados não mostrados], nem na avaliação da interação SESSÃO x GRUPO [$F(1,9)=0,42$; $p=0,534$] (Fig. 7A) e no número de rotações entre os grupos [efeito fator GRUPO; $F(1,9)=0,05$; $p=0,827$] (Fig. 7B).

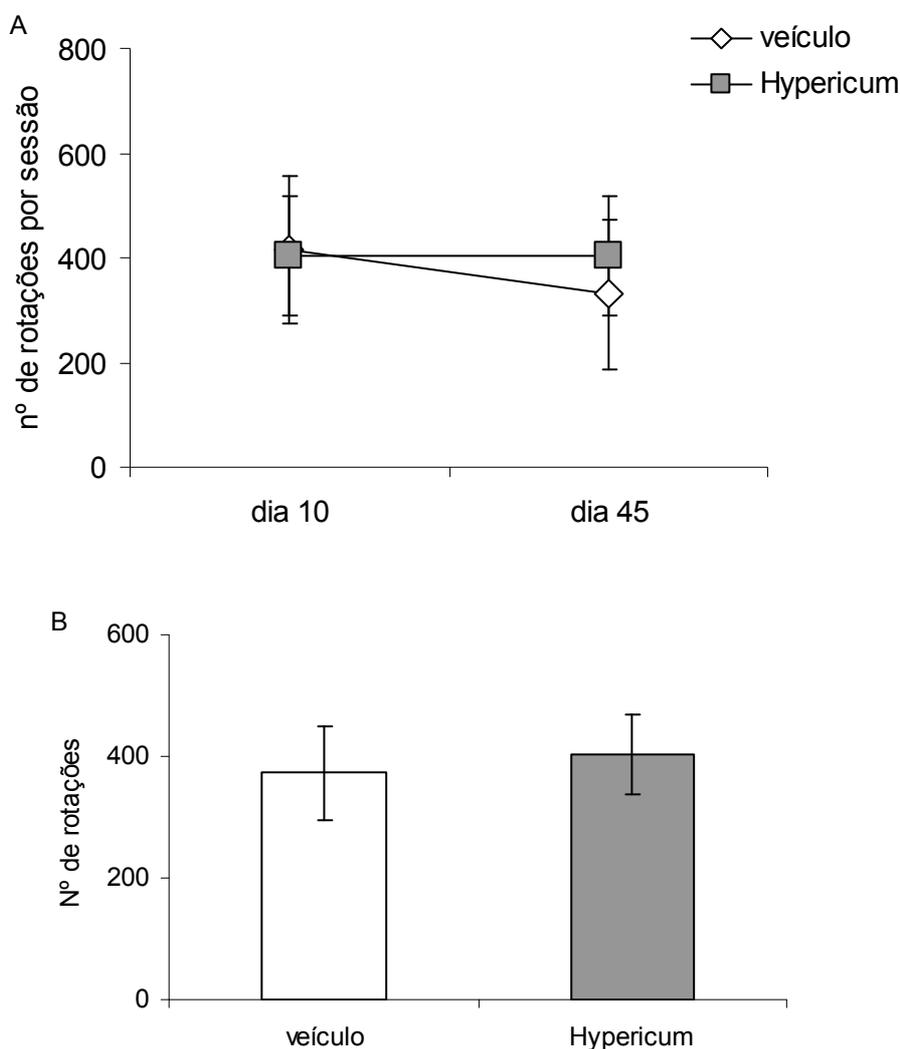


Figura 7. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas 48 horas após a cirurgia estereotóxica. O extrato foi administrado via oral (gavagem), na dose de 90 mg/kg. Foi registrado o número de rotações ipsilaterais à lesão após injeção i.p. MF 20 mg/kg ($n= 5$ e 6 nos grupos controle e tratado, respectivamente). Em A, os dados representam o número de rotações \pm erro padrão de cada uma das duas sessões testadas em diferentes dias pós-infusão de 6-OHDA (dias 10 e 45), conforme eixo

horizontal; $p > 0,05$. Em B, os dados representam a média \pm erro padrão do número de rotações por sessão; $p > 0,05$. ANOVA de medidas repetidas.

6.1.4 Três administrações pré-teste (regime 4)

Os animais que receberam o extrato antes dos testes comportamentais (regime 4, onde receberam 3 administrações do extrato iniciadas antes das rotações) não apresentaram diferença entre as sessões testadas [efeito fator SESSÃO; $F(2,22)=1,17$; $p=0,330$; dados não mostrados]. Os animais tratados também não diferiram dos controles em relação ao número de rotações [efeito fator GRUPO; $F(1,11)=0,11$; $p=0,743$] (Fig. 8A), nem em relação à interação entre os fatores SESSÃO x GRUPO [$F(2,22)=0,22$; $p=0,800$] (Fig. 8B).

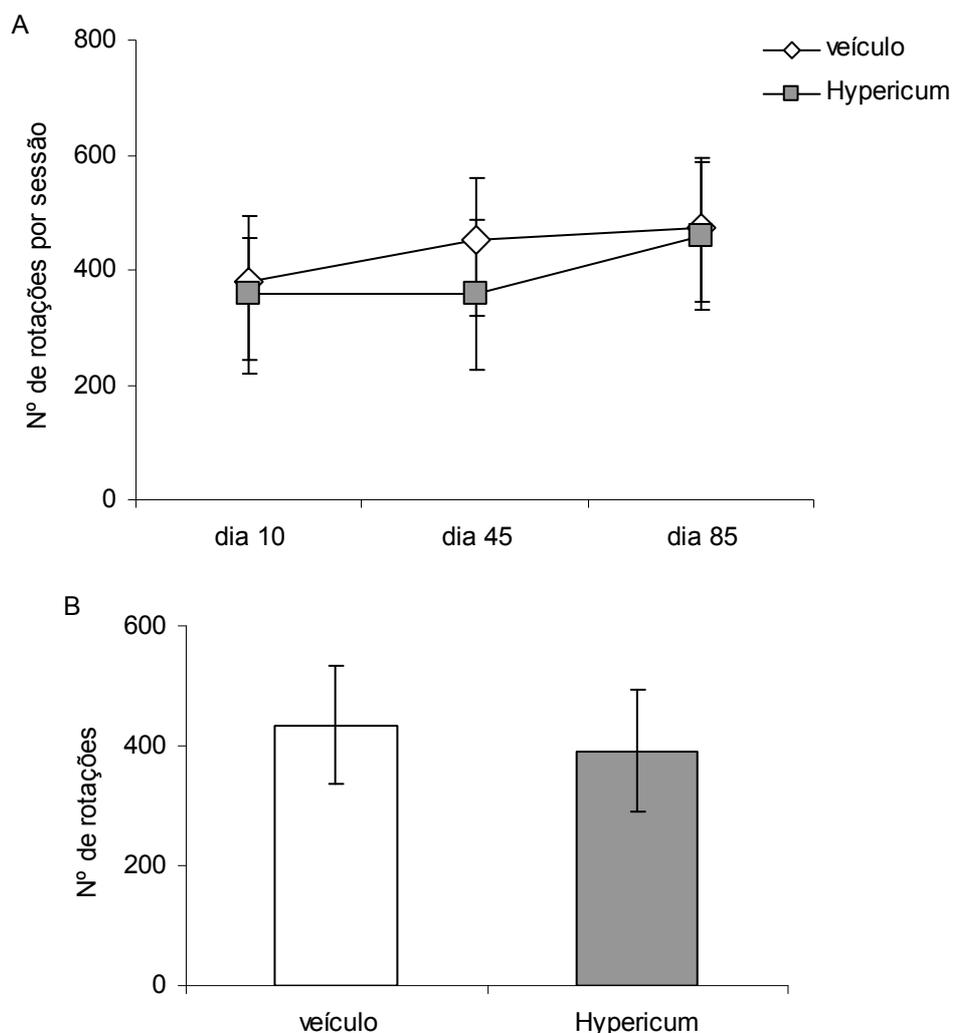


Figura 8. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas antes do teste. O extrato foi administrado via oral (gavagem), na

dose de 90 mg/kg. Foi registrado o número de rotações ipsilaterais à lesão após injeção i.p. MF 20 mg/kg (n= 6 e 7 nos grupos controle e tratado, respectivamente). Em A, os dados representam o número de rotações \pm erro padrão de cada uma das três sessões testadas em diferentes dias pós-infusão de 6-OHDA (dias 10, 45 e 85), conforme eixo horizontal; $p>0,05$. Em B, os dados representam a média \pm erro padrão do número de rotações por sessão; $p>0,05$. ANOVA de medidas repetidas.

6.1.5 Duas administrações iniciadas 48 horas após a infusão de 6-OHDA durante cinco dias consecutivos (regime 5)

Os resultados obtidos na avaliação do comportamento rotacional com os animais que receberam 2 administrações do extrato iniciadas 48 horas após a lesão durante 5 dias consecutivos são mostrados na Figura 6. Não se observou diferença significativa no número de rotações entre as três sessões testadas [efeito fator SESSÃO; $F(2,24)=1,07$; $p=0,359$; dados não mostrados] (Fig. 9A). No entanto, houve diferença entre os grupos, onde se observou um aumento no número de rotações nos animais tratados com o extrato [efeito fator GRUPO; $F(1,12)=5,10$; $p=0,043$] (Fig. 9A). Não foi observada interação GRUPO x SESSÃO [$F(2,24)=1,13$; $p=0,339$] (Fig. 9B). Esses dados mostram que este regime de tratamento ocasionou um prejuízo permanente no comportamento de rotação.

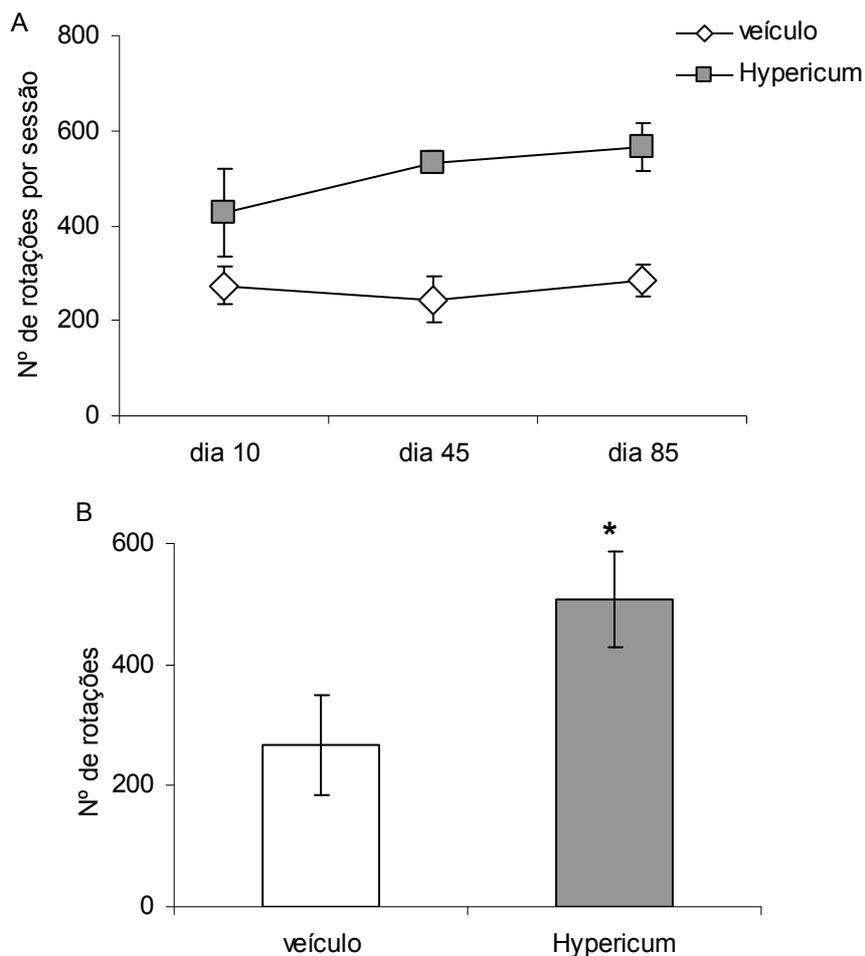


Figura 9. Comportamento rotacional dos animais submetidos a 2 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas 48 horas após a cirurgia estereotáxica durante 5 dias consecutivos. O extrato foi administrado via oral (gavagem), na dose de 90 mg/kg. Foi registrado o número de rotações ipsilaterais à lesão após injeção i.p. MF 20 mg/kg (n= 6 e 8 nos grupos controle e tratado, respectivamente). Em A, os dados representam o número de rotações \pm erro padrão de cada uma das três sessões testadas em diferentes dias pós-infusão de 6-OHDA (dias 10, 45 e 85), conforme eixo horizontal; $p > 0,05$. Em B, os dados representam a média \pm erro padrão do número de rotações por sessão; * $p < 0,05$. ANOVA de medidas repetidas, fator GRUPO.

6.2 Avaliação de negligência sensoriomotora através do teste da fita adesiva

Na análise estatística do teste de remoção de fita adesiva foram incluídos apenas os animais que apresentaram 20 ou mais rotações em pelo menos uma

das sessões após o desafio com MF. Com esse procedimento, visamos excluir ratos cuja lesão fosse pouco extensa ou leve o que, provavelmente, dificultaria a expressão do prejuízo sensório-motor nos animais.

Com exceção dos resultados obtidos com os animais que receberam 3 administrações iniciadas 24 horas após a lesão (regime 2), os demais resultados são preliminares por duas razões: número excessivo de animais que alcançaram o teto para retirar a fita e/ou tamanho amostral insuficiente.

Não são mostrados os resultados referentes ao parâmetro tempo para RETIRAR a fita, pois a maior parte deles atingiu o teto estabelecido, não retirando nenhuma das fitas.

Os animais submetidos ao regime 5 (duas administrações diárias durante cinco dias consecutivos iniciadas 48 horas após a lesão) não foram submetidos ao teste da fita adesiva, o que passa a ser uma perspectiva de continuidade desse trabalho.

6.2.1 Três administrações iniciadas 4 h após a infusão de 6-OHDA (regime 1)

A Figura 10 mostra os resultados do teste da fita adesiva obtidos com os animais submetidos ao regime de tratamento de 3 administrações iniciadas 4 horas após a infusão de 6-OHDA. O teste de Wilcoxon, que avaliou as latências para notar as fitas direita e esquerda dentro de cada grupo, não revelou diferença significativa entre os controles (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR, $p=0,593$) nem entre os tratados (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR, $p=0,345$).

Ao analisar o parâmetro RETIRAR, também não foi mostrada diferença significativa na comparação do tempo para retirar cada uma das fitas (teste de Wilcoxon, parâmetro RETIRAR; entre controles, $p=0,317$; entre tratados, $p=0,715$) (dados não mostrados).

Na análise entre os grupos, o teste de Mann-Whitney não apontou diferença nas latências para notar (notar direita, $p=0,115$; notar esquerda, $p=0,534$; Fig. 10) ou retirar as fitas (retirar direita, $p=0,190$; retirar esquerda, $p=0,295$; dados não mostrados).

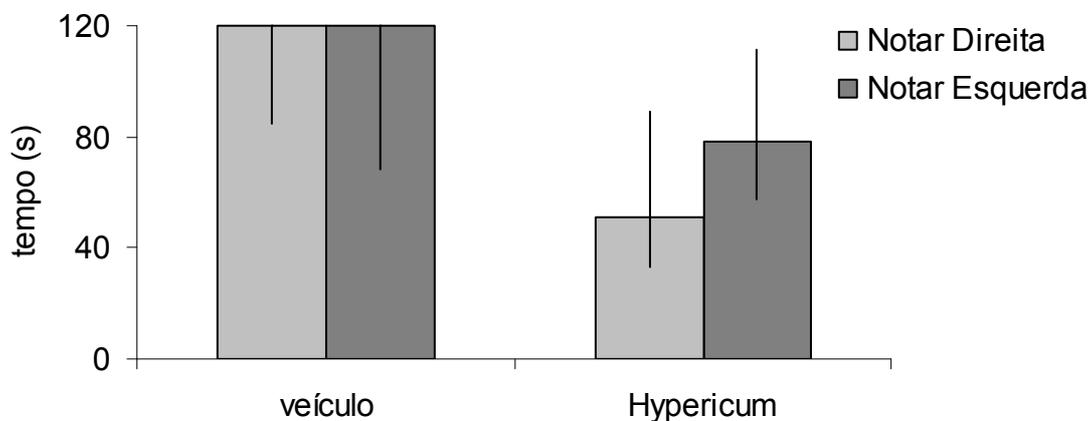


Figura 10. Latência para perceber as fitas, dentro de cada grupo, entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas 4 horas após a infusão de 6-OHDA. O extrato foi administrado via oral (gavagem) na dose de 90 mg/kg cada. Grupo controle, n=7; grupo tratado, n=6. Os dados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil. Teste de Wilcoxon e de Mann-Whitney, $p > 0,05$.

6.2.2 Três administrações iniciadas 24 h após a infusão de 6-OHDA (regime 2)

As latências para perceber as fitas dos animais que receberam três administrações iniciadas 24 h após a infusão de 6-OHDA são mostradas na Figura 11. Foi observada diferença significativa no parâmetro NOTAR dentro do grupo controle (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR; $p=0,028$) e dentro do grupo tratado com o extrato (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR; $p=0,012$), indicando que em ambos os grupos há assimetria na função sensório-motora. Já a análise do parâmetro RETIRAR não revelou diferença significativa (teste de Wilcoxon, parâmetro RETIRAR; entre controles, $p=0,144$; entre tratados, $p=1,000$) (dados não mostrados).

Apesar da diferença apontada na análise dentro de cada grupo, na comparação entre os grupos, o teste de Mann-Whitney não revelou diferença significativa nas latências para notar (notar direita, $p=0,115$; notar esquerda, $p=0,534$; Fig. 11) ou retirar as fitas (retirar direita, $p=0,190$; retirar esquerda, $p=0,295$; dados não mostrados).

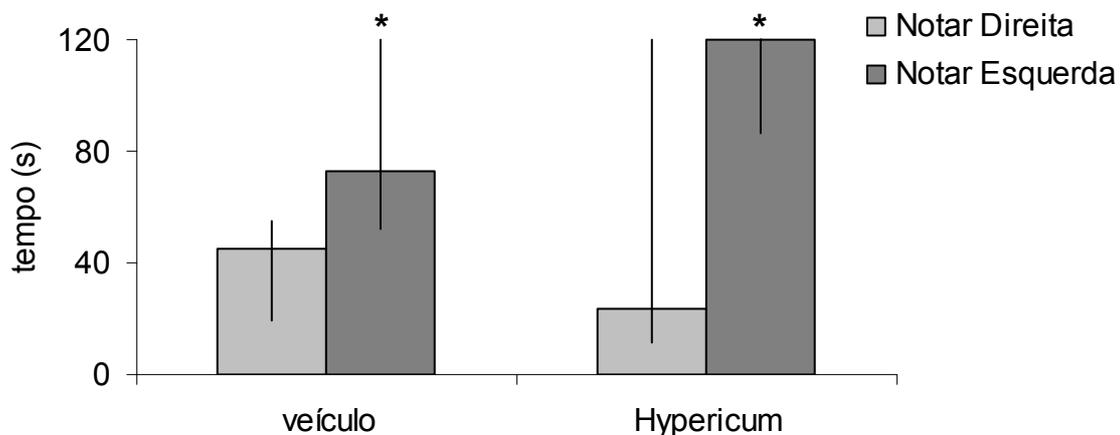


Figura 11. Latência para perceber as fitas, dentro de cada grupo, entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthum* iniciadas 24 horas após a infusão de 6-OHDA. O extrato foi administrado via oral (gavagem) na dose de 90 mg/kg cada. Grupo controle, n=14; grupo tratado, n=11. Os dados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil. * $p < 0,05$ no teste de Wilcoxon (diferenças entre as latências no mesmo grupo); Teste de Mann-Whitney, $p > 0,05$.

6.2.3 Três administrações iniciadas 48 h após a infusão de 6-OHDA (regime 3)

Entre os animais submetidos ao regime 3, em que receberam três administrações do extrato iniciadas 48 h após a infusão de 6-OHDA, a análise do parâmetro NOTAR não revelou diferença significativa dentro do grupo controle (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR, $p = 0,588$) nem dentro do grupo tratado (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR, $p = 0,248$) (Fig. 12).

A análise do parâmetro RETIRAR também não revelou diferença significativa na avaliação do tempo que os animais levaram para retirar as fitas (teste de Wilcoxon, parâmetro RETIRAR; entre controles, $p = 0,180$; entre tratados, $p = 1,000$) (dados não mostrados).

Novamente, na comparação entre os grupos, o teste de Mann-Whitney não apontou diferença na latência para notar (notar direita, $p = 0,849$; notar esquerda, $p = 0,371$; Fig. 12) ou retirar as fitas (retirar direita, $p = 0,830$; retirar esquerda, $p = 0,166$; dados não mostrados).

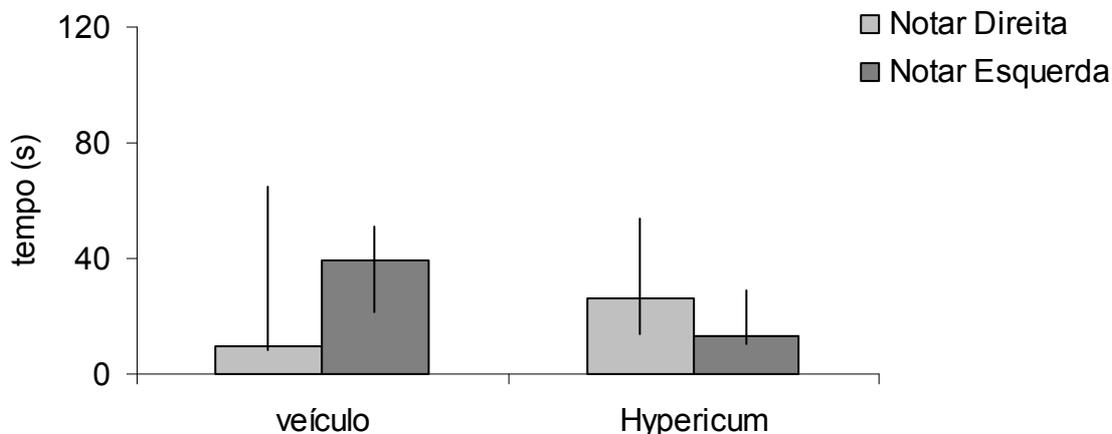


Figura 12. Latência para perceber as fitas, dentro de cada grupo, entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas 48 horas após a infusão de 6-OHDA. O extrato foi administrado via oral (gavagem) na dose de 90 mg/kg cada. Grupo controle, n=5; grupo tratado, n=6. Os dados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil. Teste de Wilcoxon e de Mann-Whitney, $p > 0,05$.

6.2.4 Três administrações iniciadas pré-teste (regime 4)

A Figura 13 mostra os resultados do teste da fita adesiva dos animais que receberam três administrações do extrato iniciadas pré-teste.

Na análise do parâmetro NOTAR, não foi observada diferença significativa no tempo dos animais para notar as fitas dentro de cada grupo tanto entre os controles (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR, $p=1,000$) quanto entre os tratados (teste de Wilcoxon; parâmetro NOTAR, $p=0,066$).

Também não se observou diferença significativa ao se analisar o parâmetro RETIRAR (teste de Wilcoxon, parâmetro RETIRAR; entre controles, $p=0,655$; entre tratados, $p=0,180$; dados não mostrados).

O teste de Mann-Whitney não apontou diferença entre os grupos nas latências para notar (notar direita, $p=0,277$; notar esquerda, $p=0,222$; Fig. 13) ou retirar as fitas (retirar direita, $p=0,629$; retirar esquerda, $p=0,112$; dados não mostrados).

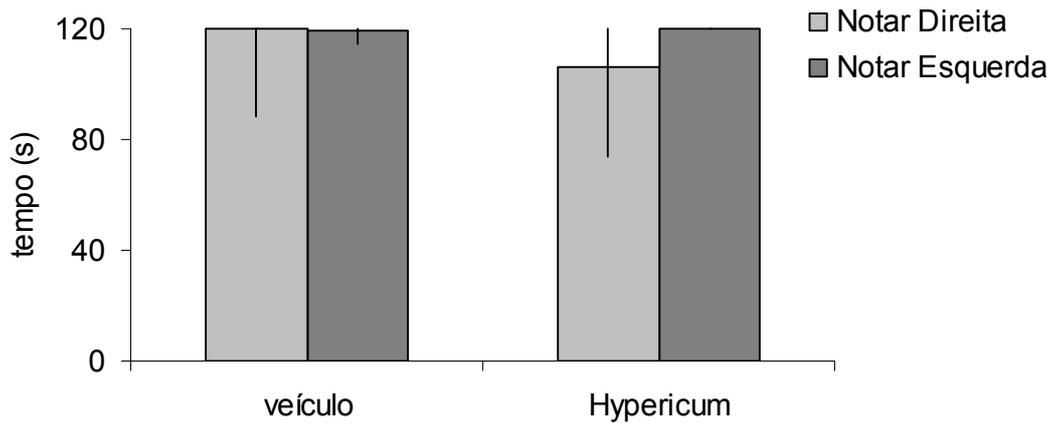


Figura 13. Latência para perceber as fitas, dentro de cada grupo, entre os animais submetidos a 3 administrações do extrato de *H. polyanthemum* iniciadas pré-teste. O extrato foi administrado via oral (gavagem) na dose de 90 mg/kg cada. Grupo controle, n=6; grupo tratado, n=7. Os dados estão expressos em mediana \pm intervalo interquartil. Teste de Wilcoxon e de Mann-Whitney, $p > 0,05$.

6.3 Avaliação do conteúdo de TH

A avaliação do conteúdo de TH na SN foi realizada apenas nos animais que receberam o extrato em 3 administrações iniciadas 24 horas após a lesão com 6-OHDA (regime 2); posteriormente, será realizada nos demais grupos. Foi encontrada uma redução significativa ($p = 0,034$; Teste de Mann-Whitney) no conteúdo de TH nos animais tratados com o extrato (n=5) em relação ao controle (n=6). A variância do grupo tratado com o extrato foi irrelevante, pois todas as fatias mostraram quase total ausência de TH (Fig. 14).

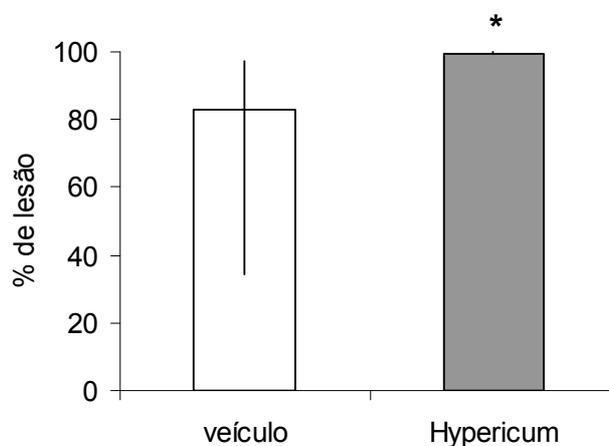


Figura 14. Perda de TH na parte compacta da substância nigra. Os dados representam mediana \pm intervalo interquartil. * $p < 0,05$ (Teste de Mann-Whitney).

6.4 Avaliação da inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina

A Figura 15 mostra os resultados obtidos no teste de inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina. Como esperado, foi observado efeito fator APO [$F(1,34)=46,63$, $p<0,001$; ANOVA de duas vias] indicando que ela induziu comportamento de escalada. Entretanto, não foram observados efeito significativo do extrato [efeito fator HYP: ($F(1,34)=0,56$, $p=0,458$; ANOVA de duas vias] nem a interação entre o extrato e APO [efeito fator interação HYP x APO: $F(1,34)=0,51$, $p=0,521$; ANOVA de duas vias], mostrando que o extrato *per se* não promove comportamento de escalada nem é capaz de bloquear a escalada induzida pela apomorfina.

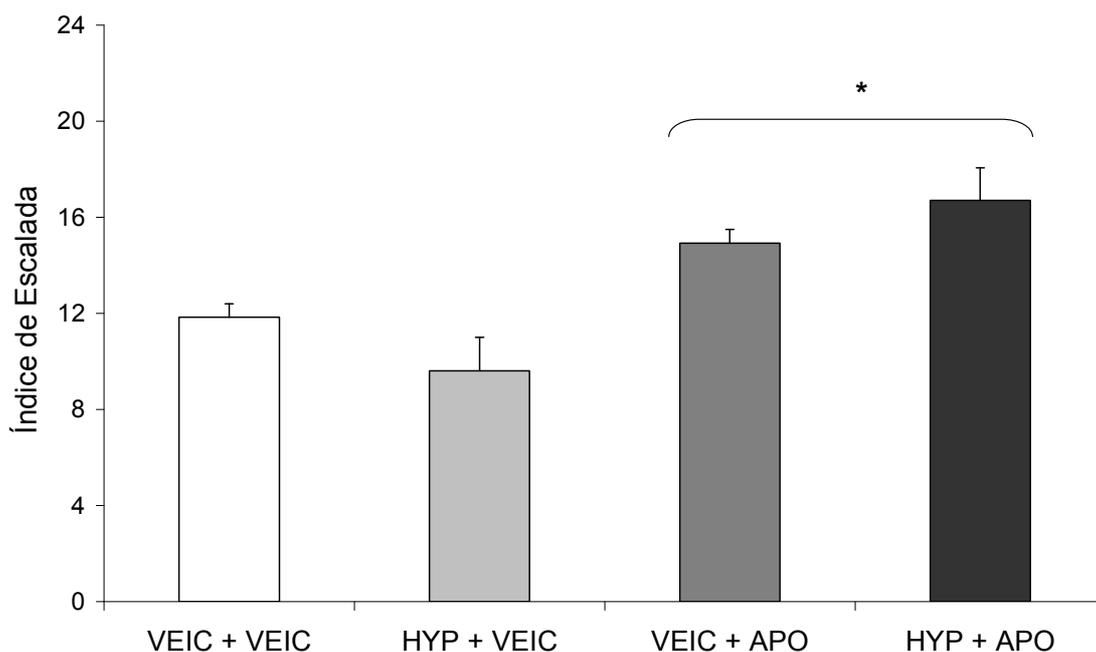


Figura 15. Efeito da administração do extrato de *H. polyanthemum* (270 mg/kg, v.o., gavagem) sobre a inibição do comportamento de escalada induzido por apomorfina. Os dados representam média \pm erro padrão do índice de escalada. * $p<0,001$ (ANOVA de duas vias).

7. DISCUSSÃO

Através deste trabalho buscou-se avaliar os efeitos da administração do extrato ciclo-hexânico de *H. polyanthemum* em modelo animal da doença de Parkinson induzido por 6-OHDA. Para isso, foram realizadas avaliações dos animais através do comportamento rotacional induzido por MF, do teste da fita adesiva e de imunistoquímica para TH em fatias da SNpc. Os resultados encontrados indicam que, dependendo do protocolo de administração, o extrato piora a assimetria motora dos animais por aumentar a lesão induzida por 6-OHDA.

No comportamento rotacional induzido por MF, os animais que receberam 3 administrações do extrato iniciadas 24 horas após a lesão apresentaram aumento no número de rotações ipsilaterais em comparação ao respectivo grupo controle (Fig. 6B). Como a administração de MF leva ao aumento da concentração de DA no hemisfério não-lesionado, pode-se inferir que referido protocolo de administração aumenta o grau de assimetria dopaminérgica nos animais lesionados, o que possivelmente ocorreu devido ao aumento do grau da lesão, conforme detectado por nossa análise de imunistoquímica. Com isto, podemos inferir que o efeito do extrato é duradouro, pois causa maior neurodegeneração e porque tal efeito não se extinguiu ao longo de 85 dias, data da última sessão de MF (Fig. 6A). Além disso, a indução do efeito pelo extrato segue uma janela temporal, já que a administração realizada em outros períodos pós-lesão (4 e 48 horas) não alterou o desempenho dos animais nas tarefas realizadas, o que ainda é reforçado pelo fato de que sua administração pré-teste não teve efeito no teste de rotações induzidas por MF (Fig. 8B) e no teste da fita adesiva (Fig. 13). O aumento do número de rotações induzidas por MF foi também observado nos animais submetidos a um diferente regime de tratamento, em que receberam o extrato duas vezes, iniciando 48 horas após a lesão, durante cinco dias consecutivos (Fig. 9B). Nesse protocolo, o efeito do extrato também foi duradouro, pois a atividade rotacional aumentada dos animais continuou sendo observada 85 dias após a administração do extrato (Fig. 9A). No entanto, até o momento, a análise do conteúdo de TH não foi realizada. Portanto, não podemos afirmar que esse resultado seja decorrente de um aumento da lesão provocada pelo extrato. A assimetria da atividade

dopaminérgica mostrada aqui se deve provavelmente à interação do tempo pós-lesão em que foi feita a administração do extrato e a duração do tratamento (5 dias consecutivos), já que o tratamento agudo (em 24 horas) iniciado no mesmo período pós-lesão, não levou a alterações comportamentais (Fig. 7). Adicionalmente, a possibilidade de que o extrato estivesse potencializando a ação do MF foi descartada, visto que os animais tratados antes das tarefas comportamentais (regime 4) não apresentaram aumento no número de rotações.

Viana et al. (2006) demonstraram que a administração do extrato ciclohexânico de *H. polyanthemum* é capaz de alterar *ex vivo* a ligação do [³⁵S]GTPγS a receptores monoaminérgicos em encéfalo de rato. No trabalho citado, a administração do extrato realizada três vezes em 24 horas aumentou o grau de ativação da proteína G após a ocupação pelo agonista (DA), enquanto que o tratamento realizado duas vezes diárias, durante 5 dias consecutivos, diminuiu essa ativação, ambos resultados observados no corpo estriado. Com base nesses resultados, esperávamos encontrar uma melhora na atividade dopaminérgica do hemisfério lesionado nos animais submetidos ao primeiro regime de tratamento citado, o que diminuiria o número de rotações no desafio com MF. Já o aumento das rotações estava sendo esperado no segundo tratamento, de duas administrações durante 5 dias consecutivos iniciando 48 horas após a cirurgia. Entretanto, em ambos os protocolos observamos aumento no número de rotações, o que sugere que não há uma relação entre o número de rotações e o nível de ativação da proteína G induzida pela dopamina em receptores dopaminérgicos do corpo estriado.

Vale ressaltar que o ensaio de ligação [³⁵S]GTPγS utilizado no trabalho citado não é capaz de distinguir o tipo de receptor dopaminérgico envolvido. Diferentes receptores estão envolvidos na patofisiologia da doença de Parkinson e podem sofrer alterações de maneira não-homogênea entre seus subtipos, tanto nos pacientes portadores da doença quanto em animais submetidos a diferentes protocolos de lesão (Herrera-Marschitz et al., 2010). Além disso, deve ser levado em consideração o fato de que a avaliação da ativação da proteína G foi realizada em animais não lesionados, pois a lesão com 6-OHDA induz importantes alterações pós-sinápticas nos receptores dopaminérgicos, como aumento da expressão e da sensibilidade (Simola et al.,

2007). Por último, destacamos que o extrato pode afetar outros sistemas neurotransmissores, como o noradrenérgico e serotoninérgico (Viana, 2007).

De posse dos resultados obtidos com os animais que receberam 3 administrações do extrato 24 h após a lesão, os quais apresentaram aumento no número de rotações, logo uma provável piora na atividade dopaminérgica, resolvemos verificar a potencialidade do extrato em inibir o comportamento de escalada induzido por apomorfina. Esse teste prediz atividade antagonista de receptores dopaminérgicos quando uma substância testada é capaz de inibir a escalada induzida por apomorfina, mas também pode indicar uma ação agonista, quando a substância é capaz de potencializar o efeito da apomorfina ou quando testada isoladamente, sem administração de apomorfina, é capaz de provocar o comportamento de escalada nos animais. No entanto, a ausência de atividade de uma substância nesse teste não descarta a possibilidade dela possuir ação dopaminérgica, uma vez que ela pode induzir ao aumento na liberação de dopamina, modular a ativação de proteínas acopladas aos receptores, etc. Para realização do teste, foram utilizados camundongos, diferentemente dos demais experimentos, onde foram utilizados ratos. Eles receberam uma única administração do extrato na dose correspondente àquela utilizada nos animais que apresentaram aumento das rotações (270 mg/kg). No entanto, o extrato não bloqueou o comportamento de escalada quando administrado junto com a APO e, quando administrado sozinho, não induziu o comportamento de escalada (Fig. 15). Esses resultados são uma evidência contrária à possibilidade de que o aumento da atividade dopaminérgica observada nas rotações tenha sido desencadeada por uma ação agonista do extrato, o que está em acordo com os dados de Viana (2007) que demonstram que, na ausência de dopa mina, a uliginosina B não foi capaz de estimular a ligação de [³⁵S]GTP γ S.

No teste da fita adesiva, não foram detectadas diferenças entre os grupos em todos os regimes de tratamento. Entretanto, no regime 2, os animais de ambos os grupos que receberam três administrações do extrato 24 horas após a lesão apresentaram uma latência maior para perceber a presença da fita na pata esquerda (Fig. 11). Uma demora maior para perceber a fita na pata contralateral à lesão já era esperada nos animais controles, pois com a infusão de 6-OHDA no hemisfério direito, o lado esquerdo do corpo, contralateral à

lesão, passa a apresentar déficits sensório-motores (Jeyasingham et al., 2001). Diversos trabalhos já demonstraram que lesões unilaterais no FPM, SN ou corpo estriado, levam à assimetria do uso das patas dianteiras, fazendo com que o animal apresente preferência de uso da pata ipsilateral para realizar diferentes tarefas (Whishaw et al., 1992; Barneoud et al., 2000; Jeyasingham et al., 2001; Park et al., 2008). A demora dos animais tratados em perceber a fita da pata esquerda corrobora a idéia de que o extrato aumente a assimetria no conteúdo dopaminérgico estriatal. No entanto, não foi observada diferença no parâmetro retirar (dados não mostrados) ou na comparação entre os grupos controle e tratado.

Nos demais regimes de tratamento, os animais controle não apresentaram assimetria no uso das patas. Whisham et al. (1992) relataram que lesões muito extensas são capazes de afetar a sensomotricidade de ambas as patas, impedindo que diferenças entre elas sejam observadas. Isso ocorre provavelmente devido a mudanças no funcionamento da alça motora, pois a depleção de DA no corpo estriado leva a alterações nos diferentes tipos neuronais aí presentes, comprometendo o funcionamento da circuitaria responsável pelo movimento, o que inclui vias córtico-estriatais, afetando a maneira com que o SNC recebe e interpreta aferências proprioceptivas periféricas (Graybiel, 2000; Jacobs et al., 2006). Somam-se a isso os resultados obtidos por Boecker et al. (1999), através de técnicas de neuroimagem, que encontraram alterações no processamento sensorial em estruturas corticais e subcorticais de pacientes com DP. Lembramos ainda que não existe uma correlação linear entre a extensão da lesão e o desempenho dos animais em tarefas comportamentais (Hudson et al., 1993). Ainda, alguns aspectos do protocolo escolhido também podem ter afetado as respostas observadas. Por exemplo, o tempo de observação pode não ter sido suficiente, embora normalmente a fita seja percebida bem antes, nos primeiros 20 segundos, conforme trabalhos anteriores que, entretanto, utilizaram o teto de 180 segundos (Albertsmeier et al., 2007). Outra explicação pode estar relacionada ao menor poder estatístico de testes não-paramétricos se comparados aos paramétricos. Além disso, para economia de animais, os mesmos ratos foram utilizados tanto para o teste com MF como com a fita adesiva, o que eventualmente poderia comprometer o comportamento no teste

da fita. Até o momento, não há descrição dos efeitos de drogas dopaminérgicas em animais hemilesionados submetidos a tarefas que avaliam déficits sensório-motores. Adicionalmente, dados na literatura apresentam resultados controversos a respeito dos efeitos de drogas dopaminérgicas sobre déficits proprioceptivos observados em paciente com DP. Alguns resultados sugerem uma ação benéfica de terapias de reposição de DA (Rickards et al., 1997; Almeida et al., 2005), enquanto outros relatam que o tratamento não traz benefícios nem prejuízos no processamento proprioceptivo e/ou performance sensório-motora (Maschke et al., 2006; Konczak et al., 2007).

Os animais que receberam o extrato duas vezes ao dia, iniciando 48 horas após a lesão, durante 5 dias consecutivos, não foram submetidos ao teste da fita adesiva, conforme explicado anteriormente (item 5.5, página 13), o que passa a ser uma perspectiva desse trabalho. O desempenho dos animais submetidos aos demais regimes testados, 3 administrações iniciadas 4, 48 horas e antes dos testes comportamentais, também não foi significativo no teste da fita adesiva. O fato de os animais-controle desses regimes de tratamento não apresentarem assimetria na percepção ou retirada da fita das patas não é surpresa, pois alguns autores apontam para as dificuldades de se avaliar déficits proprioceptivos experimentalmente. Em humanos, alguns fatores, como por exemplo, o paciente ter conhecimento da avaliação a qual está sendo submetido, pode fazê-lo com que preste mais atenção durante determinada tarefa, mascarando, assim, os resultados, que certamente diferem das alterações observadas no cotidiano (Maschke et al., 2006). Em animais, a dificuldade aumenta, pois fatores como o local da lesão, tarefas utilizadas (Jeyasingham et al., 2001), realização ou não de treino para a tarefa antes da lesão (Grabwoski et al., 1993) tornam a avaliação mais complexa.

De acordo com nossos resultados, é provável que o extrato de *H. polyanthemum* tenha interferido em alguma etapa inicial da degeneração induzida pela 6-OHDA. O padrão de morte neuronal no modelo de DP induzido por 6-OHDA apresenta diferentes características de acordo com o sítio de infusão da toxina. Quando injetada no FPM, como em nosso trabalho, a morte dos neurônios dopaminérgicos ocorre rapidamente, apresentando um perfil não-progressivo. Zuch et al. (2000) avaliaram as alterações morfológicas a curto prazo (6, 12, 24, 36, 48, 72 e 96 horas) após a administração de 6-OHDA

no FPM e relataram neurodegeneração já nas primeiras 6 horas após a infusão de 6-OHDA, evidenciada pela marcação positiva com Fluoro-Jade, que se liga a neurônios em processo de degeneração. No trabalho citado, o pico de neurotoxicidade da 6-OHDA foi observado 48 horas após a lesão. Já em um trabalho anterior, realizado por Jeon et al. (1995), foi demonstrada proeminente morte neuronal 12 horas após a lesão, antes mesmo de qualquer evidência de degeneração estriatal. Esses trabalhos, somados aos resultados obtidos por outros autores (Sauer et al., 1994; Lee et al., 1996), mostram que o início de degeneração é rápido, iniciando poucas horas após infusão de 6-OHDA. Assim, intervenções farmacológicas realizadas nesse espaço de tempo poderiam alterar o curso de morte celular, retardando-o ou acelerando-o.

Até o momento não determinamos os fatores que levaram ao aumento da morte dos neurônios dopaminérgicos após a administração do extrato em um dos regimes testados. Entre os compostos com atividade biológica isolados de *H. perforatum* e *H. polyanthemum*, descatacam-se os derivados floroglucínóis. Em extrato de *H. perforatum*, o floroglucinol hiperforina recebe atenção por aumentar os níveis de DA e de outras monoaminas em diferentes regiões encefálicas (Muller et al., 2001; Rommelspacher et al., 2001) e por sua capacidade de alterar a fluidez de membranas neuronais (Eckert e Muller, 2001). A hiperforina e extratos padronizados em hiperforina apresentam ação citotóxica *in vitro* e *in vivo*. A ação citotóxica desse composto é em parte mediada por mecanismos apoptóticos, pois é capaz de ativar a caspase-3 e caspase-9 em linhagem de células de eritroleucemia (Hostanska et al., 2003) e, quando administrada *in vivo*, apresentar perfil pró-apoptótico no córtex de animais (Tadros et al., 2009). Adicionalmente, em culturas de neurônios corticais, a hiperforina aumenta a liberação de Ca^{2+} mitocondrial, elevando os níveis desse íon no citosol (Tu et al., 2010), o que leva ao desencadeamento de eventos que podem culminar na morte da célula através de mecanismos apoptóticos.

Ferraz et al. (2005b,c) demonstraram a ação antiproliferativa de extrato de *H. polyanthemum* e de três benzopiranos (HP1, HP2, HP3) sobre diferentes linhagens de células tumorais. Entre os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 previamente isolados (Ferraz et al., 2001), HP1 aumentou a frequência de aparecimento de micronúcleos em medula óssea de ratos tratados com o

composto, indicando ação genotóxica (de Barro Falcão Ferraz et al., 2009). Além disso, a uliginosina B aumenta a secreção da proteína S100B em fatias hipocámpais agudas de rato (Biasibetti, 2009). Essa proteína, de acordo com sua concentração no meio extracelular, pode apresentar ação trófica ou tóxica sobre neurônios (Van Eldik e Wainwright, 2003).

As ações da hiperforina e de compostos presentes em *H. polyanthemum* podem indicar um possível mecanismo de ação pró-apoptótico do extrato utilizado. No entanto, destacamos que esses dados foram observados em trabalhos *in vitro* utilizando culturas de distintas linhagens celulares. Ainda, parte das ações citotóxicas observadas nos trabalhos citados pode ser dependente ou não de apoptose.

Entretanto, alguns trabalhos relatam a ação protetora de *H. perforatum*. Mohanasundari et al. (2006) demonstraram que a administração do extrato de *H. perforatum* em combinação ao tratamento com bromocriptina, em camundongos no modelo de DP induzido por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), melhora o desempenho dos animais em diferentes tarefas de maneira mais pronunciada que o tratamento apenas com bromocriptina. Além disso, o extrato desta espécie apresentou ação neuroprotetora em um modelo experimental de lesão de medula espinhal em camundongos, onde foi observada redução de diversos parâmetros inflamatórios e melhora gradual do tecido lesionado (Genovese et al., 2006).

Verificar o efeito de derivados floroglucínóis e de outros compostos presentes em extrato de *H. polyanthemum* no modelo de DP induzido por 6-OHDA, é uma possível estratégia de elucidação dos mecanismos subjacentes a sua ação tóxica.

Os resultados obtidos, resumidos na Figura 16, indicam que, dependendo do protocolo de administração, o extrato piora a assimetria motora dos animais por aumentar a lesão induzida por 6-OHDA. Então, podemos sugerir cautela na avaliação de extratos de *H. polyanthemum* como possibilidade terapêutica de diferentes enfermidades, como por exemplo, na depressão em pacientes com DP, pois ficou evidenciada sua potencialidade tóxica no modelo aqui utilizado.

REGIME DE TRATAMENTO	ROTAÇÕES COM METILFENIDATO	TESTE DA FITA ADESIVA	IMUNOCONTEÚDO DE TH
3 administrações em 24h iniciadas 4h pós lesão	<i>sem alteração</i>	<i>sem alteração</i>	<i>não realizado</i>
3 administrações em 24h iniciadas 24h pós lesão	<i>aumento</i>	<i>prejuízo</i>	<i>redução</i>
3 administrações em 24h iniciadas 48h pós lesão	<i>sem alteração</i>	<i>sem alteração</i>	<i>não realizado</i>
3 administrações em 24h iniciadas pré-teste	<i>sem alteração</i>	<i>sem alteração</i>	<i>não realizado</i>
2 administrações durante 5 dias iniciadas 48h pós lesão	<i>aumento</i>	<i>não realizado</i>	<i>não realizado</i>

Figura 16. Resultados obtidos relacionando os regimes de tratamento e as avaliações comportamentais e de imunistoquímica realizadas.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho, pretendemos primeiramente complementar as avaliações não realizadas até o momento. Também, avaliar a ação do extrato e de compostos isolados, como a Uliginosina B, em animais não lesionados com 6-OHDA (SHAM) e animais não submetidos à cirurgia estereotáxica, a fim de verificar se a morte dos neurônios dopaminérgicos está vinculada a uma ação tóxica do extrato *per se* ou se ocorre por aumentar a lesão provocada pela 6-OHDA. Pretendemos verificar também marcadores de degeneração celular e atividade apoptótica em diferentes regiões encefálicas de animais tratados com o extrato e compostos isolados.

9. REFERÊNCIAS

Albertsmeier, M., P. Teschendorf, E. Popp, R. Galmbacher, P. Vogel, B. W. Bottiger. Evaluation of a tape removal test to assess neurological deficit after cardiac arrest in rats. **Resuscitation**, 2007; 74(3): 552-8.

Almeida Q. J., J. S. Frank, E. A. Roy, M. E. Jenkins, S. Spaulding, A. E. Patla, M. S. An evaluation of sensorimotor integration during locomotion toward a target in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2005; 134(1):283–293.

Barneoud, P., E. Descombris, N. Aubin, D. N. Abrous. Evaluation of simple and complex sensorimotor behaviours in rats with a partial lesion of the dopaminergic nigrostriatal system. **Eur J Neurosci**, 2000; 12(1): 322-36.

Battisti, J. J., N. J. Uretsky, L. J. Wallace. Importance of environmental context in the development of amphetamine- or apomorphine-induced stereotyped behavior after single and multiple doses. **Pharmacol Biochem Behav**, 2000; 66(2): 435-41.

Biasibetti, R. Uliginosina B e buspirona aumentam a secreção de S100B em fatias hipocâmpais. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

Boecker, H., A. Ceballos-Baumann, P. Bartenstein, A. Weindl, H. R. Siebner, T. Fassbender, F. Munz, M. Schwaiger, B. Conrad. Sensory processing in Parkinson's and Huntington's disease: investigations with 3D H(2)(15)O-PET. **Brain**, 1999; 122 (9):1651-65.

Butterweck, V., A. Wall, U. Lieflander-Wulf, H. Winterhoff, A. Nahrstedt. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry**, 1997; 30 Suppl 2: 117-24.

Carlsson, T., M. Carta, A. Munoz, B. Mattsson, C. Winkler, D. Kirik, A. Bjorklund. Impact of grafted serotonin and dopamine neurons on development of L-DOPA-induced dyskinesias in parkinsonian rats is determined by the extent of dopamine neuron degeneration. **Brain**, 2009; 132(Pt 2): 319-35.

Castaneda, E., S. Fleming, M. A. Paquette, K. Boat, J. Moffett, E. K. Stachowiak, D. C. Bloom, M. K. Stachowiak. Assessment of recovery in the hemiparkinson rat: drug-induced rotation is inadequate. **Physiol Behav**, 2005; 84(4): 525-35.

Costall, B., R. J. Naylor, V. Nohria. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a potential model for the detection of neuroleptic activity. **Eur J Pharmacol**, 1978; 50(1): 39-50.

Dall'Agnol, R., A. Ferraz, A. P. Bernardi, D. Albring, C. Nor, I. Sarmiento, L. Lamb, M. Hass, G. von Poser, E. E. Schapoval. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, 2003; 10(6-7): 511-6.

Dauer, W. and S. Przedborski. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, 2003; 39(6): 889-909.

de Barros Falcao Ferraz, A., J. da Silva, L. I. Deimling, R. Santos-Mello, A. Sharlau, G. L. von Poser, J. N. Picada. Genotoxicity evaluation of three benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Planta Med**, 2009; 75(1): 37-40.

Desmurget, M., Y. Rossetti, C. Problanc, G. E. Stelmach, M. Jeannerod. Representation of hand position prior to movement and motor variability. **Can J Physiol Pharmacol**, 1995; 73(2): 262-72.

Deumens, R., A. Blokland, J. Prickaerts. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol**, 2002; 175(2): 303-17

Duman, R., G. R. Heninger, E. J., Nestler. A molecular and cellular theory of depression. **Arch Gen Psych**, 1997; (54):597-606.

Dev, K. K., H. van der Putten, B. Sommer, G. Rovelli. Part I: parkin-associated proteins and Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, 2003; 45(1): 1-13.

Eckert, G. P. and W. E. Muller. Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes. **Pharmacopsychiatry**, 2001; 34 Suppl 1: S22-5.

Fahn, S. and D. Sulzer. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**, 2004; 1(1): 139-54.

Ferraz, A. B. F, R. P. Limberger, S. A. Bordignon,. G. L. von Poser, A. T. Henriques. Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. **F F J**, 2005a; (20):335-39

Ferraz, A., D. H. Faria, M.N. Benneti, A. B. da Rocha, G. Schwartzmann, A. Henriques, G. L. von Poser, G. L. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, 2005b; 12(1-2): 112-5.

Ferraz, A. B., I. Grivicich, G. L. Von Poser, D. H. Faria, G. B. Kayser, G. Schwartzmann, A. T. Henriques, A.B. da Rocha. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. **Fitoterapia**, 2005c; 76(2): 210-5.

Ferraz, A. B., S. A. Bordignon, C. Staats, J. Schripsema, G. L. Lino von Poser. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, 2001; 57(8): 1227-30.

Ferraz, A. B. F., S. A. Bordignon, D. R. A. Mans, A. Schmitt, A. P. Ravazzolo, G. L. von Poser. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum* (Guttiferae). **Pharmaceut Biol**, 2002; 40:294-97.

Friede, M., H. H. Henneicke von Zepelin, J. Freudenstein. Differential therapy of mild to moderate depressive episodes (ICD-10 F 32.0; F 32.1) with St. John's wort. **Pharmacopsychiatry**, 2001; 34 Suppl 1: S38-41.

Genovese, T., E. Mazzon, M. Menegazzi, R. Di Paola, C. Muia, C., C. Crisafulli, P. Bramanti, H. Suzuki, S. Cuzzocrea. Neuroprotection and enhanced recovery with *Hypericum perforatum* extract after experimental spinal cord injury in mice. **Shock**, 2006; 25(6): 608-17.

Gnerre, C., G. L. von Poser, A. Ferraz, A. Viana, B. Testa, S. M. Rates. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **J Pharm Pharmacol**, 2001; 53(9): 1273-9.

Grabowski, M., P. Brundin, B. B. Johansson. Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. **Stroke**, 1993; 24(6): 889-95.

Graybiel, A. M. The basal ganglia. **Curr Biol**, 2000; 10(14): R509-11.

Hass, J. S., A. P. Machado Heckler, G. L. von Poser, S. M. Rates. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. **Planta Med**, 2010 *in press*; 76:1-5.

Hayes, M. W., V. S. Fung, T. E. Kimber, J. D. O'Sullivan. Current concepts in the management of Parkinson disease. **Med J Aust**, 2010; 192(3): 144-9.

Herrera-Marschitz, M., G. Arbutnott, U. Ungerstedt. The rotational model and microdialysis: Significance for dopamine signalling, clinical studies, and beyond. **Prog Neurobiol**, 2010; 90(2): 176-89.

Hostanska, K., J. Reichling, S. Bommer, M. Weber, R. Salles. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. **Eur J Pharm Biopharm**, 2003; 56(1): 121-32.

Hudson, J. L., C. G. van Horne, I. Stromberg, S. Brock, J. Clayton, J. Masserano, B. J. Hoffer, G. A. Gerhardt. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Res**, 1993; 626(1-2): 167-74.

Jacobs, J. V. and F. B. Horak. R. E. Burke. Abnormal proprioceptive-motor integration contributes to hypometric postural responses of subjects with Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2006; 141(2): 999-1009.

Jeyasingham, R. A., A. L. Baird, A. Meldrum, S. B. Dunnett. Differential effects of unilateral striatal and nigrostriatal lesions on grip strength, skilled paw reaching and drug-induced rotation in the rat. **Brain Res Bull**, 2001; 55(4): 541-8.

Kartnig, T., I. Gobel, B. Heydel. Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell cultures of various *Hypericum* species and their chemotypes. **Planta Med**, 1996; 62(1): 51-3.

Kim, H. L., J. Streltzer, D. Goebert. St. John's wort for depression: a meta-analysis of well-defined clinical trials. **J Nerv Ment Dis**, 1999; 187(9): 532-8.

Kirik, D., B. Georgievska, A. Bjorklund. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson disease. **Nat Neurosci**, 2004; 7(2): 105-10.

Kirik, D., C. Rosenblad, A. Bjorklund. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Exp Neurol**, 1998; 152(2): 259-77.

Konczak J., K. Krawczewski, P. Tuite, P. Tuite, M. Maschke. The perception of passive motion in Parkinson's disease. **J Neurol**, 2007 254(5):655–663.

Jeon, B. S., V. Jackson-Lewis, R. E. Burke. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. **Neurodegeneration**, 1995; 4(2)131-37.

Lee, C. S., H. Sauer, A Bjorklund. Dopaminergic neuronal degeneration and motor impairments following axon terminal lesion by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Neuroscience**, 1996; 72(3): 641-53.

Lewis, G. N., W. D. Byblow, R. G. Carson. Phasic modulation of corticomotor excitability during passive movement of the upper limb: effects of movement frequency and muscle specificity. **Brain_Res**, 2001; 900(2): 282-94.

Linde, K., G. Ramirez, C. D. Mulrow, A. Pauls, W. Weidenhammer, D. Melchart. St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. **BMJ**, 1996; 313(7052): 253-8.

Maschke, M., P. J. Tuite, K. Krawczewski, K. Pickett, J. Konczak. Perception of heaviness in Parkinson's disease. **Mov Disord**, 2006; 21(7): 1013-8.

Mohanasundari, M., M. S. Srinivasan, S. Sethupathy, M. Sabesan. Enhanced neuroprotective effect by combination of bromocriptine and *Hypericum perforatum* extract against MPTP-induced neurotoxicity in mice. **J Neurol Sci**, 2006; 249(2): 140-4.

Mukhida, K., K. A. Baker, D. Sadi., I. Mendez. Enhancement of sensorimotor behavioral recovery in hemiparkinsonian rats with intrastriatal, intranigral, and intrasubthalamic nucleus dopaminergic transplants. **J Neurosci**, 2001; 21(10): 3521-30.

Muller, W. E., A. Singer, M. Wonnemann. Hyperforin--antidepressant activity by a novel mechanism of action. **Pharmacopsychiatry**, 2001; 34 Suppl 1: S98-102.

Nör, C., D. Albring, A. B. F. Ferraz, J. Schripsema, V. Pires, P. Sonnet, D. Guillaume, G. L. von Poser. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobranthys* section. **Bioch Syst Ecol**, 2004; 32 (1): 517-19.

Park, H. J., P. H. Lee, O. Y. Bang, G. Lee, Y. H. Ahn. Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. **J Neurochem**, 2008; 107(1): 141-51.

Pezzoli, G. and M. Zini Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future. **Expert Opin Pharmacother**, 2010; 11(4): 627-35.

Protais, P., J. Costentin, J. C. Schwartz. Climbing behavior induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in striatum. **Psychopharmacology (Berl)**, 1976; 50(1): 1-6.

Rates, S.M.K., J. Rego, J. A. F. Viana, G. L. von Poser, J. Costentin. Extrato vegetal neuroativo, composição farmacêutica compreendendo o mesmo e processo para sua produção. INPI, PI0900614-1, 2009.

Rates, S.M.K., J. Rego, J. A. F. Viana, G. L. von Poser, J. Costentin. Neuroactive plant extract, pharmaceutical composition containing it and production process. PCT/EP2010/051816 European Patent Office, The Hague, 2010.

Rickards C. and Cody F.W.J. Proprioceptive control of wrist movements in Parkinson's disease. **Brain**, 1997; 120:977-990.

Robson, NKB. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characters of the genus. **Bull Br Mus Nat Hist (Bot)**, 1981; 8:55-226

Robson, NKB. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29 *Brathis* (Part 2) and 30. *Trigynobrathys*. **Bull Br Mus Nat Hist (Bot)**, 1990; 20:1-151

Rommelspacher, H., B. Siemanowitz, M. Mannel. Acute and chronic actions of a dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and a hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurones in rat nucleus accumbens. **Pharmacopsychiatry**, 2001; 34 Suppl 1: S119-26.

Sapolsky, R. M. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. **Biol Psych**, (48):755-65.

Sauer, H. and W. H. Oertel. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a

combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**, 1994; 59(2): 401-15.

Schallert, T., S. M. Fleming, J. L. Leasure, J. L. Tillerson, S. T. Bland. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, 2000; 39(5): 777-87.

Shen, J. and M. R. Cookson. Mitochondria and dopamine: new insights into recessive parkinsonism. **Neuron**, 2004; 43(3): 301-4.

Simola, N., M. Morelli, A. R. Carta. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, 2007; 11(3-4): 151-67.

Stolz, E., J. Haas, D. Hasse, L. Graziotin, G. L. von Poser, S. M. K. Rates. Antinociceptive effect of uliginosin B, a phloroglucinol isolated from species of *Hypericum* natives to south Brazil, is mediated by dopaminergic and serotonergic neurotransmission. Trabalho apresentado ao 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009; Ribeirão Preto-SP.

Sulzer, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci**, 2007; 30(5): 244-50.

Tadros, M. G., M. R. Mohamed, A. M. Youssef, G. M Sabry, N. A. Sabry, A. E. Khalifa. Proapoptotic and prepulse inhibition (PPI) disrupting effects of *Hypericum perforatum* in rats. **J Ethnopharmacol**, 2009; 122(3): 561-6.

Teulings, H. L., J. L. Contreras-Vidal, G. E. Stelmach, C. H. Adler. Parkinsonism reduces coordination of fingers, wrist, and arm in fine motor control. **Exp Neurol**, 1997; 146(1): 159-70.

Torres, E. M. and S. B. Dunnett. Amphetamine induced rotation in the assessment of lesions and grafts in the unilateral rat model of Parkinson's disease. **Eur Neuropsychopharmacol**, 2007; 17(3): 206-14.

Tu, P., J. Gibon, A. Bouron. The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. **J Neurochem**, 2010; 112(1): 204-13.

Ungerstedt, U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. **Acta Physiol Scand Suppl**, 1971; 367: 49-68.

Van Eldik, L. J. and M. S. Wainwright. The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. **Restor Neurol Neurosci**, 2003; 21(3-4): 97-108.

Vaugoyeau, M., S. Viel, C. Assaiante, B. Amblard, J. P. Azulay. Impaired vertical postural control and proprioceptive integration deficits in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2007; 146(2): 852-63.

Viana, A. F. Estudo das moléculas potencialmente antidepressivas e analgésicas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 202p. Tese (doutorado) – Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, 2007.

Viana, A. F., A. P. Heckler, R. Fenner, S. M. Rates. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Braz J Med Biol Res**, 2003; 36(5): 631-34.

Viana, A., J. C. do Rego, G. von Poser, A. Ferraz, A. P. Heckler, J. Costentin, S. M. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, 2005; 49(7): 1042-52.

Viana, A. F., J. C. do Rego, L. Munari, N. Dourmap, A. P. Heckler, T. D. Costa, G. L. von Poser, J. Costentin, S. M. Rates. *Hypericum caprifoliatum* (Guttiferae) Cham. & Schltdl.: a species native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundam Clin Pharmacol**, 2006; 20(6): 507-14.

Viana, A. F., S. M. K. Rates, B. Naudin, F. Janin, J. Costentin, J. C. do Rego. Effects of acute or three-day treatments of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl. (Guttiferae) extract or of two established antidepressants on basal and stress-induced increase in serum and brain corticosterone levels. **Psychopharm**, 2008 (1)1-10.

Weiner, W. J. Initial treatment of Parkinson disease: levodopa or dopamine agonists. **Arch Neurol**, 2004; 61(12): 1966-69.

Whishaw, I. Q., E. Castaneda, B. P. Gorny. Dopamine and skilled limb use in the rat: more severe bilateral impairments follow substantia nigra than sensorimotor cortex 6-hydroxydopamine injection. **Behav Brain Res**, 1992; 47(1): 89-92.

Zuch, C. L. V. K. Nordstroem, L. A. Briedrick, G. R. Hoernig, A. C. Granholm, P. C. Bickford. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion. **J Comp Neurol**, 200; 427(3):440-54.