

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação *in vitro* do Efeito Neurotóxico, Antioxidante e Anticolinesterásico de
Alcalóides e Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em Fatias de
Hipocampo Submetidas à Privação de Oxigênio e Glicose

EDUARDO LUIS KONRATH

PORTO ALEGRE, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Investigação *in vitro* do Efeito Neurotóxico, Antioxidante e Anticolinesterásico de Alcalóides e Avaliação de Parâmetros de Estresse Oxidativo em Fatias de Hipocampo Submetidas à Privação de Oxigênio e Glicose

Dissertação apresentada por
Eduardo Luis Konrath para
obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Amélia T. Henriques

Co-orientador: Profa. Dra. Christianne Gazzana Salbego

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 02 de maio de 2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Carlos Severo Dutra Filho

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Carmem Regla Vargas

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dr^a. Vera Maria Steffen

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

K82I Konrath, Eduardo Luis

Investigação in vitro do efeito neurotóxico, antioxidante e anticolinesterásico de alcalóides e avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em fatias de hipocampo submetidas à privação de oxigênio e glicose / Eduardo Luis Konrath – Porto Alegre : UFRGS, 2006. - xxvi, 195p.: il., gráf., tab.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Alcalóides indólicos. 2. Atividade antioxidante. 3. Isquemia. 4. Neurotoxicidade. I. Henriques, Amélia Teresinha. II. Salbego, Christianne Gazzana. III. Título.

CDU: 547.94

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, bem como nos laboratórios 37 e 38 do Departamento de Bioquímica. Para o desenvolvimento dos ensaios de atividade antioxidante, contamos com o auxílio da Dra Alexandra Latini e do Prof. Dr. Moacir Wajner, do Programa de Pós Graduação em Bioquímica, desta universidade.

Agradecemos aos órgãos de financiamento à pesquisa CAPES, CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro e bolsas concedidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Entre sótãos e porões segue o rio do meio. Não interrompe seu curso quando dormimos ou comemos, quando amamos ou nos frustramos, quando executamos projetos ou achamos que nossa força acabou.

Na margem, garças distraídas. Inesperadamente, uma delas joga-se no que parece ser o mergulho definitivo, mas voltará depois de varar o escuro, bico apontando para um sol que já não cega mais.

Uma torrente vara a nossa casa: demora-se no cotidiano, dispara nas euforias, arrasta destroços ou empurra esperanças, às vezes por gargantas noturnas. Mas há de emergir – com os ímpetos de um parto – numa explosão de claridade.
Isso, somos.

LYA LUFT

*A meus alicerces: minha mãe, meus amigos e
todos que me amam,
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul por me proporcionar desde sempre uma formação gratuita e de altíssima qualidade.

À professora Amélia Henriques por acreditar no meu potencial durante todos esses anos, como bolsista de iniciação científica, e agora como mestrando.

À professora Christianne Salbego, muito obrigado pelo carinho, pela acolhida, pelos ensinamentos bioquímicos desde o início, pela paciência e por ter aceitado me co-orientar durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas de mestrado do laboratório de Farmacognosia pelas risadas nos momentos em que era necessário descontraír, pelo companheirismo e amizade.

À Fabiane Farias, minha chefinha querida, por me transformar no que sou hoje e por toda a bagagem científica que ela me proporcionou desde sempre.

Às colegas de mestrado e de aulas teóricas Daniela Conrado, Marina Scopel, Melissa Schwanz, Daniela Albring, Carolina Passos, Marcelo Arbo, Raquel Giordani, Daniela Fritz e Carolina Nör, pelas conversas, risadas e injeções de ânimo.

Aos amigos Guilherme Pizzoli, e Rafaela Marin, muito obrigado pela amizade inigualável, pelas conversas de incentivo e pela alegria contagiante.

À Melissa Nassif, minha amiga iluminada e amada, obrigado pelo carinho e pela ajuda imensurável durante as situações difíceis deste trabalho e à Patrícia Schuck, minha amiga amada, por me escutar quando batia aquelas crises e por toda a ajuda que me ofereceu durante este trabalho e sempre.

À Alexandra Latini, obrigado por aceitar ajudar em meu trabalho e por ser um exemplo de competência e dedicação.

Às minhas bolsistas Katiane Santin e Juliana Hoppe, por toda dedicação, paciência, competência, amizade e pela ajuda fundamental na realização deste trabalho.

Aos amigos Gabriele Hampel, Liciane Costa, Marina Leite, Rodrigo Paiva, Vanessa Emmel, Vanessa Hoffmann por estarem sempre do meu lado.

A Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando meus passos, proporcionando-me tantas oportunidades e colocando em meu caminho tantas pessoas maravilhosas.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xvii
LISTA DE TABELAS	xix
LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
RESUMO	xxiii
ABSTRACT	xxv
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS.....	7
CAPÍTULO 1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS ALCALÓIDES BOLDINA, VINCAMINA, RESERPINA E PSICOLATINA EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (POG).....	11
1.1 Introdução	13
1.1.1 Doenças neurodegenerativas.....	13
1.1.2 A isquemia cerebral.....	15
1.1.2.1 Eventos envolvidos na morte celular após a isquemia.....	16
1.1.2.2 Morte celular isquêmica.....	20
1.1.2.3 A vulnerabilidade seletiva do hipocampo.....	20
1.1.2.3.1 A morte celular tardia.....	21
1.1.2.3.2 Morte neuronal isquêmica seletiva no hipocampo.....	22
1.1.2.4 Modelos experimentais de isquemia.....	22
1.1.2.4.1 Modelos experimentais <i>in vivo</i>	22
1.1.2.4.2 Modelos experimentais <i>in vitro</i>	23
1.1.2.4.2.1 A cultura organotípica.....	24
1.1.2.4.2.2 Fatias hipocampais submetidas à POG.....	25
1.1.2.5 Métodos para a avaliação da neurotoxicidade em fatias de hipocampo.....	26
1.2 Objetivos.....	29
1.3 Revisão da Literatura.....	30
1.4 Parte Experimental.....	38
1.4.1 Materiais.....	38
1.4.1.1 Animais.....	38
1.4.1.2 Reagentes utilizados.....	38

1.4.1.2.1 Alcalóides.....	39
1.4.2 Métodos.....	40
1.4.2.1 Avaliação da pureza dos alcalóides utilizando cromatografia líquida de alta eficiência.....	40
1.4.2.2 Preparo das soluções de alcalóides e dos meios de incubação.....	41
1.4.2.3 Preparo das fatias hipocampais.....	42
1.4.2.4 Indução do dano celular por privação de oxigênio e glicose nas fatias hipocampais.....	43
1.4.2.5 Verificação do efeito dos alcalóides sobre o tecido hipocampal.....	45
1.4.2.5.1 Avaliação da morte celular pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) intracelular.....	45
1.4.2.5.2 Avaliação da viabilidade mitocondrial pelo método de MTT.....	46
1.4.3 Avaliação do modelo.....	47
1.4.4 Análise estatística.....	48
1.5 Resultados.....	49
1.5.1 Avaliação do modelo.....	49
1.5.2 Avaliação do efeito do alcalóide boldina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose.....	51
1.5.3 Avaliação do efeito do alcalóide vincamina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose.....	54
1.5.4 Avaliação do efeito do alcalóide reserpina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose.....	57
1.5.5 Avaliação do efeito do alcalóide psicotatina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose.....	60
1.6 Discussão.....	63
CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DA BOLDINA.....	73
2.1 Introdução.....	75
2.1.1 Radicais livres.....	75
2.1.2 Lipoperoxidação e métodos para sua avaliação em sistemas biológicos.....	76
2.1.3 Defesas antioxidantes no cérebro.....	79
2.1.3.1 Enzimas antioxidantes.....	79
2.1.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos.....	80

2.1.4 Suscetibilidade do cérebro a danos oxidativos.....	81
2.1.5 A isquemia e o estresse oxidativo.....	82
2.2 Objetivos.....	84
2.3 Revisão da Literatura.....	85
2.4 Parte Experimental.....	90
2.4.1 Materiais.....	90
2.4.1.1 Animais.....	90
2.4.1.2 Reagentes utilizados.....	90
2.4.1.3 Alcalóides.....	91
2.4.2 Métodos.....	91
2.4.2.1 Preparo das fatias hipocampais.....	91
2.4.2.2 Indução de dano celular por privação de oxigênio e glicose (POG) nas fatias hipocampais.....	92
2.4.2.3 Preparação dos homogeneizados de hipocampo.....	94
2.4.2.4 Potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR).....	94
2.4.2.4.1 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade antioxidante (TAR) de fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de oxigênio e glicose.....	95
2.4.2.4.2 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antioxidante total (TRAP) para a boldina.....	96
2.4.2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da medida de lipoperoxidação de fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de oxigênio e glicose na presença de boldina.....	97
2.4.2.5.1 Preparo das soluções de boldina.....	97
2.4.2.5.2 Ensaio de detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	97
2.4.2.6 Determinação da quantidade de proteínas.....	98
2.4.2.7 Análise estatística.....	98
2.5 Resultados.....	100
2.5.1 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade antioxidante total (TAR) de fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de oxigênio e glicose.....	100
2.5.2 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito antioxidante da boldina pela medida do potencial antioxidante total (TRAP).....	101
2.5.3 Avaliação <i>in vitro</i> da medida de lipoperoxidação de fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de oxigênio e glicose na presença de boldina.....	102

2.6 Discussão.....	104
CAPÍTULO 3 DETERMINAÇÃO <i>IN VITRO</i> DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA PARA A BOLDINA E ALCALÓIDES INDÓLICOS	111
3.1 Introdução.....	113
3.1.1 A doença de Alzheimer.....	113
3.1.2 Terapia colinomimética para a doença de Alzheimer.....	115
3.2 Objetivos.....	118
3.3 Revisão da Literatura.....	119
3.4 Parte Experimental.....	124
3.4.1 Materiais.....	124
3.4.1.1 Reagentes utilizados.....	124
3.4.1.2 Alcalóides.....	124
3.4.2 Métodos.....	126
3.4.2.1 Determinação da atividade anticolinesterásica.....	126
3.4.2.2 Determinação da atividade antioxidante.....	127
3.5 Resultados.....	129
3.5.1 Determinação da atividade anticolinesterásica.....	129
3.5.2 Determinação da atividade antioxidante.....	130
3.6 Discussão.....	132
DISCUSSÃO GERAL.....	137
CONCLUSÕES.....	145
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	149
ANEXOS.....	187

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Cascata neurotóxica na isquemia e na recirculação.....	17
Figura 1.2 Representação esquemática de uma fatia transversal de hipocampo.....	21
Figura 1.3 Estruturas dos alcalóides derivados da vincamina.....	31
Figura 1.4 Estruturas dos alcalóides boldina, psicolatina e reserpina.....	40
Figura 1.5 Seqüência de reações que resultam no complexo corado para a determinação da atividade enzimática da LDH.....	46
Figura 1.6 Reação de abertura do anel tetrazólio do sal de MTT por ação de desidrogenases mitocondriais.....	46
Figura 1.7 Efeito <i>in vitro</i> do MK-801 sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	50
Figura 1.8 Efeito <i>in vitro</i> do MK-801 sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	50
Figura 1.9 Efeito <i>in vitro</i> da boldina 1 e 10 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	52
Figura 1.10 Efeito <i>in vitro</i> da boldina 50 e 100 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	52
Figura 1.11 Efeito <i>in vitro</i> da boldina 1 e 10 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	53
Figura 1.12 Efeito <i>in vitro</i> da boldina 50 e 100 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	53
Figura 1.13 Efeito <i>in vitro</i> da vincamina 1 e 10 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	55
Figura 1.14 Efeito <i>in vitro</i> da vincamina 50 e 100 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	55
Figura 1.15 Efeito <i>in vitro</i> da vincamina 1 e 10 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	56
Figura 1.16 Efeito <i>in vitro</i> da vincamina 50 e 100 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	56
Figura 1.17 Efeito <i>in vitro</i> da reserpina 1 e 10 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	58
Figura 1.18 Efeito <i>in vitro</i> da reserpina 50 e 100 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	58
Figura 1.19 Efeito <i>in vitro</i> da reserpina 1 e 10 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	59

Figura 1.20 Efeito <i>in vitro</i> da reserpina 50 e 100 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	59
Figura 1.21 Efeito <i>in vitro</i> da psicolatina 1 e 10 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG...	61
Figura 1.22 Efeito <i>in vitro</i> da psicolatina 50 e 100 μ M sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	61
Figura 1.23 Efeito <i>in vitro</i> da psicolatina 1 e 10 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	62
Figura 1.24 Efeito <i>in vitro</i> da psicolatina 50 e 100 μ M sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.....	62
Figura 2.1 Mecanismo proposto para a formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico.....	78
Figura 2.2 Mecanismo de ação da quimiluminescência induzida pela termólise do ABAP e amplificada pelo luminol.....	95
Figura 2.3 Reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malonodialdeído (MDA).....	98
Figura 2.4 Efeito da POG sobre o potencial antioxidante total (TRAP) em fatias hipocampais.....	100
Figura 2.5 Efeito da POG sobre a reatividade antioxidante total (TAR) em fatias hipocampais.....	101
Figura 2.6 Efeito da boldina e do Trolox na medida do TRAP.....	102
Figura 2.7 Efeito da POG e da boldina (1 e 10 μ M) sobre a peroxidação lipídica em fatias de hipocampo de ratos submetidas à POG.....	103
Figura 2.8 Efeito da POG e da boldina (50 μ M) sobre a peroxidação lipídica em fatias de hipocampo de ratos submetidas à POG.....	103
Figura 3.1 Estruturas dos alcalóides coronaridina, ajmalicina, venalstonina, andrangina, voacangina, ibogaína, vincadiformina, voacristina e cantin-6-ona.....	125
Figura 3.2 Reação da enzima acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila e em camada delgada.....	126
Figura 3.3 Reação do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila com um composto antioxidante e com um radical livre.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Parâmetros cromatográficos para a análise dos alcalóides.....	41
Tabela 1.2 Composição das soluções Krebs-Henseleit modificadas, empregadas nos ensaios com boldina.....	43
Tabela 1.3 Composição das soluções Krebs-Henseleit modificadas empregadas nos ensaios com vincamina, reserpina e psicolatina.....	44
Tabela 2.1 Composição das soluções Krebs-Henseleit modificadas em mM (meios de pré-incubação, controle e POG).....	93
Tabela 2.2 Composição do tampão fosfato de sódio (em mM).....	94
Tabela 3.1 Efeitos dos alcalóides quanto à atividade anticolinesterásica.....	130
Tabela 3.2 Efeitos dos alcalóides quanto à atividade antioxidante analisada no momento da aplicação e após 4 horas.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS

- 4-HNE: 4-hidroxi-2-trans-nonenal.
- 4VO: oclusão dos 4 vasos.
- ABAP: 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano).
- ACh: acetilcolina.
- AChE: acetilcolinesterase.
- ANOVA - análise de variância de uma via.
- APP: precursor amilóide de proteína.
- ATP: adenosina-5'-trifosfato
- AVC: acidente vascular cerebral.
- A β : peptídeo beta-amilóide.
- BHE: barreira hematoencefálica.
- CAT: catalase.
- CCD: cromatografia em camada delgada.
- CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.
- DCFH-DA: 2',7'-diclorofluoresceína diacetato.
- DG: giro denteado.
- DMSO: dimetilssulfóxido.
- DNA: ácido desoxirribonucléico.
- DPPH: hidrato de 2,2-difenil-1-picrilidrazila.
- EO: estresse oxidativo.
- ER: espécies reativas.
- GR: glutationa redutase.
- GSH: glutationa reduzida.
- GPx: glutationa peroxidase.
- HEPES: ácido *N*-2-hidroxietilpiperazina-*N'*-etano sulfônico.
- iNOS: óxido nítrico sintase induzível.
- LDH: lactato desidrogenase.
- LOOH: hidroperóxidos lipídicos.
- LPO: lipoperoxidação.
- MCA: artéria cerebral média.
- MDA: malonodialdeído.
- MTT: (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio.

NAD⁺: adenina dinucleotídeo oxidado.
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido.
NFT: neurofibrilares intracelulares.
NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato.
NOS: óxido nítrico sintase.
POG: privação de oxigênio e glicose.
ROS: espécies reativas do oxigênio.
SNC: sistema nervoso central.
SOD: superóxido dismutase.
SPSS - *statistical package for the social sciences*.
TAR: reatividade antioxidante total.
TBA: ácido tiobarbitúrico.
TBA-RS: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.
TCA: ácido tricloroacético.
TMP: tetrametoxipropano.
TRAP: potencial antioxidante total.

RESUMO

As doenças neurodegenerativas tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson e desordens cerebrovasculares constituem-se em uma das principais causas de morbidade e de mortalidade na vida adulta. Além disso, o desequilíbrio entre os sistemas de geração e de proteção antioxidante celulares, chamado de estresse oxidativo, desempenha um papel importante nos danos neuronais causados pelos processos isquêmicos, provocando alterações funcionais em macromoléculas e promovendo a lipoperoxidação de membranas. Substâncias com dupla atividade anticolinesterásica e antioxidante vêm sendo consideradas como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento farmacológico da doença de Alzheimer, incentivando a investigação e o estudo de produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos novos e eficientes. Nesse estudo empregamos um modelo *in vitro* de fatias hipocâmpais de ratos, submetidas à privação de oxigênio e glicose (POG) e os métodos de avaliação da toxicidade dos alcalóides empregados foram a liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) citosólica e redução do MTT (viabilidade mitocondrial). Os alcalóides boldina e vincamina promoveram um aumento de 40 % na liberação de LDH nas fatias que sofreram POG na concentração de 100 μM , além de aumentos significativos na liberação desta enzima também nas fatias controles. Psicolatina e reserpina também tiveram efeitos neurotóxicos. Foi verificado que a POG em fatias hipocâmpais promove uma diminuição nas medidas do potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR), de 63 % e 16,5 %, respectivamente, além de causar um aumento nos níveis de malonodialdeído liberado pelas fatias, detectado pelo ensaio de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Entretanto, este efeito foi revertido pela presença de boldina nas concentrações de 10 μM e de 50 μM . Este mesmo alcalóide, com reconhecida atividade antioxidante, também demonstrou ser um seqüestrador de radicais peróxila mais potente que o padrão Trolox. Além disso, os alcalóides indólicos monoterpênicos coronaridina, venalstonina, andrangina, vincadiformina e voacristina, além da boldina, exibiram potentes atividades antioxidante e anticolinesterásica em ensaios autobiográficos *in vitro*.

Palavras-chave: atividade antioxidante, alcalóides indólicos, isquemia, neurotoxicidade.

ABSTRACT

In vitro Investigation of Neurotoxic, Antioxidant and Acetylcholinesterasic Effects of Alkaloids and Evaluation of Stress Oxidative Parameters on Hippocampal Slices Submitted to Oxygen and Glucose Deprivation.

Neurodegenerative disorders, such as Alzheimer, Parkinson and cerebrovascular diseases are one of the major causes of morbidity and mortality in the middle aged and the elderly. Also, the imbalance between the activity of free radicals generation and scavenging systems, called oxidative stress, plays a important role in the neuronal damages caused by ischemia, leading to functional alterations in macromolecules and promoting lipoperoxidation in membranes. Acetylcholinesterase inhibitors and antioxidant compounds have been extensively investigated as new pharmacological strategies for the symptomatic treatment of Alzheimer disease. In this way, natural products are potentially important in an attempt to develop newer and safer drugs. In the present study, we selected the *in vitro* model of oxygen and glucose deprivation (OGD) in hippocampal slices and the methods used to assess the neurotoxicity of the alkaloids were cellular lactate dehydrogenase (LDH) release and reduction of MTT salt (mitochondrial activity). Both alkaloids boldine and vincamine 100 μ M promoted a 40 % increase in LDH release in POG slices, as well as significant increases in the activity of this enzyme in control slices. Psychollatine and reserpine had also neurotoxic effects. It was also verified that OGD decreased the measurements of total antioxidant potential (TRAP) in 63 % and the total antioxidant reactivity (TAR) levels in 16.5 %, as well as an increase in the malondialdehyde levels by slices, which was detected by thiobarbituric acid-reactive substances (TBA-RS). However, this effect was prevented by the presence of boldine 10 μ M and 50 μ M. This alkaloid is a known antioxidant and it displayed a potent scavenger activity for peroxy radicals, when compared with Trolox. Another finding is that the monoterpene indole alkaloids coronaridine, venalstonine, andrangine, vincadiformine, voacristine and also boldine exhibited both potent antioxidant and acetylcholinesterase inhibitor activities in *in vitro* autobiographic assays.

Key-words: antioxidant activity, indole alkaloids, ischemia, neurotoxicity.

INTRODUÇÃO GERAL

Plantas medicinais representam historicamente uma das principais e mais disseminadas fontes de medicação pela população em geral e, apesar do aumento no uso de medicamentos sintéticos nos últimos anos, seu emprego tem sido ainda o tratamento de escolha para muitas populações no mundo inteiro, sendo para algumas a única fonte de medicação (HALBERSTEIN, 2005).

Mais recentemente, o uso de plantas tem envolvido não somente o seu uso como tal, mas também como matéria-prima para o isolamento de compostos ativos, como a morfina, isolada do ópio ainda no início do século XIX (BALUNAS & KINGHORN, 2005) tornando-se o primeiro produto natural a ser comercializado no mundo, em 1826 (NEWMAN *et al.*, 2003). Diversos outros alcalóides ainda hoje empregados na terapêutica tiveram sua descoberta baseada no uso popular. Alcalóides como a quinina (isolada de espécies de *Cinchona* sp., nativa dos Andes), atropina e escopolamina (obtidas de plantas da família das Solanáceas empregadas pelos antigos gregos) e a reserpina (isolada de *Rauwolfia serpentina*, de uso popular na Índia) são exemplos importantes (GANELLIN, 1993).

Aproximadamente 28% das novas entidades químicas estudadas no período de 1981 – 2002 são de origem natural e cerca de 20% das demais podem ser consideradas como derivadas de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003). Características comuns de moléculas naturais, como centros quirais e complexos sistemas de anéis com heteroátomos tornam tais produtos bastante interessantes do ponto de vista químico (KOEHN & CARTER, 2005), tanto para o seu uso em si como fármaco, como ponto de partida para a síntese de novas moléculas, através de modificações estruturais (BALUNAS & KINGHORN, 2005).

Diversos alcalóides foram ou ainda são empregados na terapêutica como importantes ferramentas para a elucidação de efeitos farmacológicos, respostas fisiológicas e mecanismos bioquímicos, tendo desempenhado um importante papel na descoberta e no estudo de receptores e canais iônicos (CORDELL *et al.*, 2001). O estudo com alcalóides também permitiu avanços importantes na Química Orgânica, nas áreas de síntese orgânica, desenvolvimento de fármacos e de síntese quiral (CORDELL *et al.*, 2001).

O processo de bioprospecção na indústria farmacêutica pode ser considerado mais eficiente em relação à química combinatória no sentido em que os produtos naturais representam uma fonte inesgotável de novas e diversas moléculas. Além disso, o aprimoramento das técnicas de isolamento, da elucidação estrutural dos componentes químicos e da automação de ensaios biológicos também têm colaborado decisivamente (MATHEW & ELLMAN, 1997).

Levando-se em consideração o custo de investimento e o grande retorno econômico de um novo fármaco, a indústria farmacêutica tem realizado enormes investimentos em doenças como Alzheimer, derrames, doenças cardíacas e depressão (LITTLEHALES, 1999), de forma que ensaios biológicos *in vitro* e automatizados possam constituir uma realidade mais eficaz para a triagem biológica de milhares de compostos (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Nesse sentido, os alcalóides indólicos constituem uma classe de metabólitos secundários que vem sendo extensivamente investigada quanto a uma série de efeitos terapêuticos, como atividade antitumoral, antiinflamatória, antimalárica, antiviral, bactericida e ação estimulante central (CORDELL *et al.*, 2001). Alguns destes compostos, como a vincamina, alcalóide isolado de *Vinca minor* L. (Apocynaceae) e seus derivados semi-sintéticos, são empregados atualmente como agentes protetores contra distúrbios cerebrovasculares e danos neuronais induzidos por processos de isquemia cerebral (SUN & TAKEUCHI, 1989; MAZÁK *et al.*, 2003). Outra substância empregada como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos com ação neuroprotetora é a fisostigmina, alcalóide indólico clássico inibidor da enzima acetilcolinesterase, e primeira substância empregada para melhorar a disfunção colinérgica na doença de Alzheimer (KOZIKOWSKY & TÜCKMANTEL, 1999; SCHRIPSEMA *et al.*, 2003).

Inicialmente, a avaliação biológica de qualquer nova entidade química, seja biológica ou sintética, deve passar obrigatoriamente por ensaios *in vitro*. As vantagens desse tipo de ensaio são várias, dentre elas, a redução do número de animais empregados, rapidez, custo mais baixo e importantes informações sobre mecanismos moleculares que podem ser obtidas (FASTREZ, 1997; GEBHARDT, 2000).

Assim, o presente trabalho visou avaliar biologicamente através de um modelo experimental *in vitro* que simula condições isquêmicas, parâmetros de estresse oxidativo sobre fatias hipocâmpais submetidas à privação de oxigênio e glicose, e a ação de diferentes alcalóides indólicos e da boldina neste mesmo modelo. Além disso, atividades antioxidante e anticolinesterásica também foram avaliadas para os alcalóides.

OBJETIVOS

Objetivo Geral:

O objetivo geral deste trabalho é a avaliação biológica dos efeitos de alcalóides indólicos e do alcalóide aporfínico boldina através de ensaios *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- Verificar o efeito dos alcalóides vincamina, boldina, reserpina e psiclatina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de oxigênio e glicose através da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) intracelular e da viabilidade mitocondrial, pela redução do sal MTT;
- Investigar o efeito da privação de oxigênio e glicose sobre fatias de hipocampo de ratos quanto aos parâmetros de estresse oxidativo potencial antioxidante total (TRAP) e reatividade antioxidante total (TAR);
- Avaliar o potencial de lipoperoxidação *in vitro* da boldina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidas à privação de oxigênio e glicose através do método de detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS);
- Comparar o potencial antioxidante *in vitro* da boldina em relação ao Trolox através de ensaios de medida do potencial antioxidante total (TRAP);
- Avaliar o efeito anticolinesterásico *in vitro* para a boldina e para os alcalóides indólicos vincamina, coronaridina, ajmalicina, venalstonina, andrangina, voacangina, ibogaína, reserpina, vincadiformina, voacristina, cantin-6-ona e psiclatina;
- Analisar o potencial antioxidante *in vitro* para a boldina e para os alcalóides indólicos vincamina, coronaridina, ajmalicina, venalstonina, andrangina, voacangina, ibogaína, reserpina, vincadiformina, voacristina, cantin-6-ona e psiclatina através do ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila).

CAPÍTULO 1

***AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS ALCALÓIDES BOLDINA, VINCAMINA,
PSICOLATINA E RESERPINA EM FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS
SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE (POG)***

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas constituem uma das causas principais de morbidade na vida adulta por afetar justamente a qualidade de vida e as funções que fazem a vida dos seres humanos ser especial, como a memória, cognição, linguagem, personalidade e movimentos mais especializados (PRICE, 1999; FORMAN *et al.*, 2004). Dentre as desordens do SNC, podemos destacar a epilepsia, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, doença de Parkinson, além de distúrbios cerebrovasculares resultantes de casos de infarto do miocárdio. Algumas destas doenças são comuns enquanto outras são menos freqüentes, mas em conjunto elas afetam uma grande parcela da população. Para cada uma dessas doenças, em grande parte das vezes, apenas tratamentos sintomáticos estão disponíveis.

As desordens cerebrovasculares, popularmente conhecidas como derrames, afetam um amplo espectro da população, podendo levar na maioria das vezes a uma incapacidade física e/ou mental permanente. Uma série de fatores de risco podem estar intimamente ligados a esses casos, como hipertensão, hipercolesterolemia e diabetes (PRICE, 1999). Estes distúrbios são uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre adultos e idosos, constituindo a terceira maior causa de morte dentre os norte-americanos, com cerca de quinhentas mil vítimas a cada ano (LIPTON *et al.*, 1999).

Acidente vascular cerebral (AVC) é uma definição clínica usada para descrever sintomas de crises neurológicas causadas por distúrbios do suprimento de sangue ao cérebro. Como este órgão possui uma capacidade muito limitada de reparo a determinados danos, mudanças mínimas na disponibilização de oxigênio e de glicose a ele podem provocar danos irreversíveis (HORST & POSTIGO, 1997). Sendo os neurônios incapazes de se dividirem, toda a perda neuronal causada pelo AVC é irreversível e, portanto, afeta permanentemente o funcionamento cerebral.

A maioria dos derrames é causada por uma interrupção aguda do suprimento de sangue arterial para o cérebro, geralmente por um trombo, levando à isquemia do tecido; uma minoria de derrames é causada por ruptura de um vaso sangüíneo, levando à hemorragia (PRICE, 1999). Pelo menos 60% dos pacientes internados

morrem em hospitais como resultado de um extenso dano cerebral, somente 3 a 10% dos pacientes que sobrevivem voltam a sua vida normal (WHITE *et al.*, 2000).

A incidência de derrames depende do sexo e da idade, sendo mais prevalente para os homens, em qualquer faixa etária. Calcula-se, mundialmente, que para os homens, esta incidência é de 1,32 casos para um grupo de 1000, e para as mulheres, de 0,77 para um grupo de 1000 (HORST & POSTIGO, 1997). Homens e mulheres não diferem em relação aos fatores de risco primários para a isquemia cerebral, como pressão alta e o avanço da idade. Entretanto, uma série de estudos tem demonstrado uma diferença quanto à incidência da isquemia, uma vez que mulheres no período pré-menopausa exibem uma menor susceptibilidade a danos isquêmicos em comparação com mulheres pós-menopáusicas e homens com idades equivalentes (ALKAYED *et al.*, 2000; GARCIA-SEGURA *et al.*, 2001). Uma razão para esta neuroproteção em mulheres pré-menopausa pode estar relacionada com níveis circulantes mais altos de estrógenos, principalmente 17 β -estradiol (LIAO *et al.*, 2001; DHANDAPANI & BRANN, 2002).

Muitos pacientes que passaram por um derrame sobrevivem e sofrem as seqüelas do dano por muitos anos, tanto em nível emocional, como motor ou intelectual, de maneira que este grupo requer uma grande demanda de cuidados e tratamentos médicos (HORST & POSTIGO, 1997). Apesar dos constantes esforços, nenhum sintoma precoce ou tratamento que conduza à prevenção da ocorrência ou redução das conseqüências clínicas dos derrames foi encontrado (JUURLINK & SWEENEY, 1997).

Nos Estados Unidos, o custo total direto e indireto relacionado às doenças neurodegenerativas foi estimado em 43 bilhões de dólares em 1998 (LIPTON, 1999), um bilhão de dólares na Holanda e cerca de 154 milhões de dólares na Nova Zelândia (HORST & POSTIGO, 1997). No Brasil ainda não existem dados estatísticos classificados e organizados sobre o tema, mas certamente esses devem ser da mesma magnitude ou proporcionalmente maiores, devido às baixas condições sócio-econômicas e falta de acesso à saúde da maioria da população (TAVARES, 2003).

Entretanto, nos últimos anos, felizmente avanços significativos têm sido realizados no sentido de esclarecer os aspectos genéticos e os mecanismos celulares e moleculares de algumas das doenças neurodegenerativas, bem como o desenvolvimento de modelos *in vivo* e *in vitro*, fundamentais para os estudos da grande variedade de mecanismos patogênicos envolvidos nas desordens do SNC (PRICE, 1999; FORMAN *et al.*, 2004). Uma das principais estratégias terapêuticas pesquisadas é a neuroproteção, visando reduzir a vulnerabilidade do tecido cerebral à isquemia. Como o SNC é mais vulnerável à isquemia que a maioria dos outros tecidos, é fundamental que os mecanismos celulares envolvidos nesta vulnerabilidade possam ser identificados e bloqueados (PRICE, 1999).

1.1.2 A isquemia cerebral

A isquemia e a hipóxia constituem importantes condições patofisiológicas de lesão cerebral e são alvos de intensa investigação. A isquemia é conceituada como uma redução severa ou um bloqueio completo do fluxo sanguíneo, enquanto que a hipóxia relaciona-se com a redução do conteúdo de oxigênio no sangue ainda circulante que pode ainda remover metabólitos (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

O metabolismo energético normal no cérebro possui algumas características bastante particulares, incluindo uma taxa metabólica alta, estoques de energia limitados e uma alta dependência do metabolismo aeróbico de glicose (DUGAN & CHOI, 1999). Este órgão possui uma dependência bastante crítica de um contínuo fluxo sanguíneo para suprimento de oxigênio e glicose, tornando-o, deste modo, mais vulnerável ao dano isquêmico que os demais tecidos.

O tipo mais freqüente de isquemia em humanos é a isquemia focal, definida como a interrupção do fluxo de sangue para uma parte do cérebro. Outro tipo é a isquemia global, resultante da interrupção transitória do fluxo sanguíneo para todo o cérebro, como a que ocorre durante uma parada cardíaca. Além dos danos causados pela falta de oxigênio e metabólitos durante a isquemia, a volta da circulação sanguínea (reperfusão) pode aumentar ainda mais o dano neuronal, especificamente em áreas vulneráveis do cérebro (TAYLOR *et al.*, 1996).

1.1.2.1 Eventos envolvidos na morte celular após a isquemia

Devido ao seu elevado consumo de oxigênio, combinado com seus baixos estoques de carboidratos, o cérebro é um órgão muito sensível à hipóxia-isquêmica. Estudos experimentais identificaram quatro processos dominantes que, sozinhos ou combinados, levam ao dano neuronal: aumento de cálcio intracelular, neurotoxicidade mediada por receptores glutamatérgicos, formação de radicais livres e acidose láctica (TAYLOR *et al.*, 1996; JUURLINK & SWEENEY, 1997; DIRNAGL *et al.*, 1999; FRANTSEVA *et al.*, 2001).

A interrupção da circulação de sangue desencadeia uma cascata de eventos que leva à morte celular (Figura 1.1). Quando os estoques de energia se esgotam (o ATP é somente depletado pelo uso e não é sintetizado devido à falta de oxigênio na cadeia respiratória), o potencial de membrana é perdido e os neurônios sofrem despolarização. Conseqüentemente, os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem são ativados e aminoácidos excitatórios são liberados no espaço extracelular, principalmente o glutamato (CHOI, 1995; DE KEYSER *et al.*, 1999; CHERUBINI *et al.*, 2005). Ao mesmo tempo, os processos dependentes de energia, como a recaptação pré-sináptica de neurotransmissores, são bloqueados. A ativação de receptores glutamatérgicos leva ao aumento de cálcio intracelular, por abertura direta de canais de cálcio (receptores ionotrópicos) ou através de receptores ligados à proteínas G (receptores metabotrópicos). Como resultado da ativação glutamatérgica, íons Na^+ e Cl^- entram nos neurônios através de canais iônicos, juntamente com a água, levando a um inchamento das células, causando edema (DIRNAGL *et al.*, 1999).

A exposição dos neurônios ao glutamato em excesso pode causar um edema neuronal, devido à despolarização mediada por Na^+ , Cl^- e água. Esta água que entra pode levar à lise osmótica das células prejudicando o funcionamento neuronal. Uma excessiva quantidade de Ca^{2+} entra através dos canais modulados por receptores de aminoácidos excitatórios, ativando diversas enzimas que podem aumentar o dano celular (FAROOQUI *et al.*, 1994).

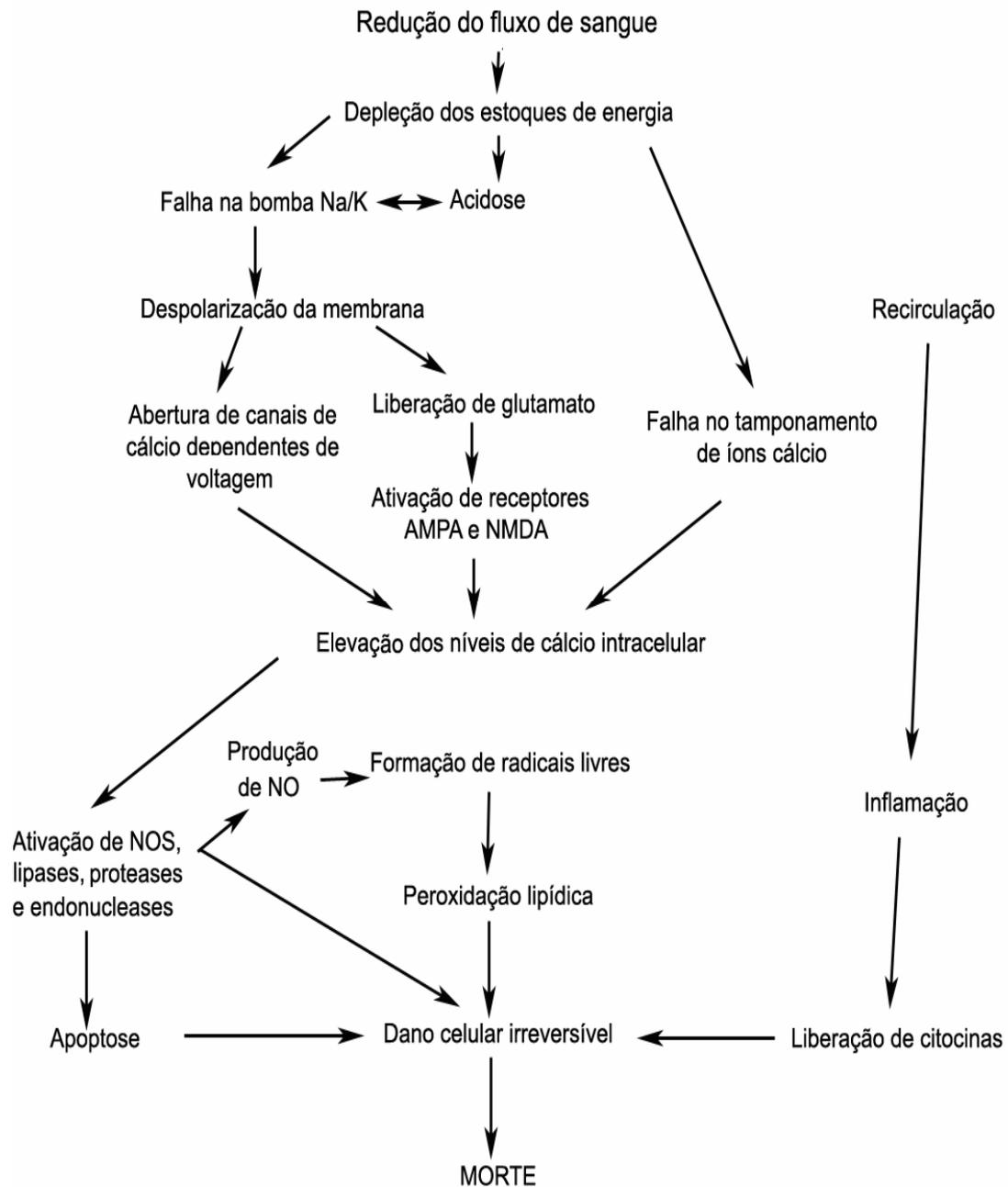


Figura 1.1 Cascata neurotóxica na isquemia e na recirculação. Alguns eventos principais são a despolarização descontrolada, excitação por glutamato, aumento de cálcio intracelular, geração de radicais livres, ativação de enzimas e inflamação. Adaptada de DE KEYSER *et al.*, 1999.

A liberação de excessivas quantidades de glutamato e de outros aminoácidos excitatórios no espaço extracelular durante a isquemia causa a superativação de receptores, contribuindo para o dano neuronal, processo este conhecido como excitotoxicidade (CHOI & ROTHMAN, 1990).

Os níveis de Ca^{2+} extracelular decrescem durante a isquemia, presumivelmente devido ao influxo deste para as células lesadas, aumentando a concentração interna de Ca^{2+} . Este aumento se deve também à liberação de Ca^{2+} dos estoques internos. A perda da homeostase do cálcio está envolvida na degeneração neuronal (FAROOQUI *et al.*, 1994). O aumento da concentração de cálcio interno constitui uma etapa chave na injúria induzida pela exposição das células neuronais a concentrações tóxicas de glutamato, semelhante ao observado na isquemia (CHOI, 1995).

O aumento em demasia no Ca^{2+} intracelular, um dos principais segundos mensageiros celulares, inicia uma série de eventos citoplasmáticos e nucleares, causando danos no tecido através da ativação de enzimas proteolíticas, endonucleases, fosfolipases, quinases e outras enzimas que causam danos em vários locais da célula, levando-a à morte (MITANI *et al.*, 1993), além de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (SWEENEY *et al.*, 1995). Um dos eventos que ocorrem é a ativação da fosfolipase A_2 e da ciclooxygenase, gerando radicais livres e esgotando os estoques endógenos de antioxidantes, aumentando o dano através de peroxidação lipídica e lesões na membrana, assim como o óxido nítrico gerado pela enzima óxido nítrico sintase, que também promove danos ao tecido e pode levar à apoptose (SWEENEY *et al.*, 1995; PHILLIS *et al.*, 1996; IADECOLA, 1997; CHERUBINI *et al.*, 2005).

A acidose láctica também afeta drasticamente o metabolismo e as funções celulares, contribuindo deste modo, para o dano neuronal. Os níveis de ácido láctico aumentam bruscamente devido à glicólise anaeróbica, uma fonte alternativa de ATP durante a isquemia. Este processo, juntamente com a alta pressão de CO_2 , causa uma acidose que pode baixar o pH do tecido isquêmico de 7,3 para 6,0, dependendo das concentrações iniciais de glicose disponíveis para conversão em ácido láctico. Outra fonte geradora de acidose é a hidrólise do ATP que gera prótons, os quais não podem ser reciclados pela fosforilação oxidativa, pois a isquemia leva rapidamente

ao seu bloqueio (FAROOQUI *et al.*, 1994).

A liberação excessiva de glutamato e o aumento do cálcio intracelular são dois eventos iniciais e cruciais na morte celular por lesão isquêmica, combinados ainda com a falta de ATP, culminando no panorama geral que pode ser observado na Figura 1.1.

A inibição da síntese de proteínas parece estar relacionada com a falta de ATP e a conseqüente morte neuronal, uma vez que a morte nas áreas vulneráveis é precedida por uma severa inibição na síntese protéica, e a restauração da síntese previne a injúria neuronal (HOSSMANN, 1993).

Uma série de alterações bastante graves na barreira hematoencefálica (BHE) também podem ocorrer gradualmente após o insulto isquêmico, uma vez que as células endoteliais e os astrócitos que compõem esta barreira sofrem danos significativos. Assim, componentes do compartimento vascular, como citocinas e células inflamatórias, podem atravessar a BHE e alcançar o parênquima cerebral (DUGAN & CHOI, 1999). Agentes antioxidantes podem auxiliar na preservação da integridade da BHE após o evento da isquemia seguida da reperfusão.

A isquemia e a reperfusão favorecem a formação de radicais livres (SCHALLER & GRAF, 2004). Depois da isquemia, as mitocôndrias estão debilitadas em função da abstinência de oxigênio. Quando o fluxo sanguíneo é restaurado (reperfusão), a disponibilidade de oxigênio aumenta, bem como as reações bioquímicas que geram radicais livres. A mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres após a lesão (FRANTSEVA *et al.*, 2001). O oxigênio que volta a circular pode não ser usado totalmente pela fosforilação oxidativa, gerando radicais livres extremamente danosos para o tecido (PHILLIS *et al.*, 1996). Observa-se também uma redução nos antioxidantes endógenos (ácido ascórbico, ácido úrico, α -tocoferol, entre outros), e os que existem são usados na tentativa de consumir os radicais que estão sendo produzidos. O principal agente é o radical hidroxil, que causa, principalmente, peroxidação lipídica das membranas dos neurônios vulneráveis (SWEENEY *et al.*, 1995). Outro componente do dano celular é a inflamação, que causa liberação de citocinas, contribuindo para a severidade da lesão (ASHENER, 1998).

1.1.2.2 Morte celular isquêmica

A morte de neurônios após um insulto isquêmico pode ser imediata ou tardia. A morte imediata é causada pelo mecanismo necrótico, enquanto a tardia pode ocorrer por necrose ou apoptose (CAO *et al.*, 2001; GRAHAM & CHEN, 2001; ZHAN *et al.*, 2001). A apoptose é a morte celular programada, em que a célula morre em resposta à ativação de um programa genético específico, enquanto a necrose parece ser a resposta das células à perda de ATP, acompanhada pelo influxo massivo de Ca^{2+} (SWEENEY *et al.*, 1995).

Ainda não há um consenso entre o tipo de morte que ocorre após a lesão isquêmica. Utilizando modelos *in vivo*, alguns pesquisadores observaram apenas necrose (COLBOURNE *et al.*, 1999; YAMASHIMA, 2000), enquanto outros observaram necrose combinada com apoptose ou apenas apoptose (ZENG & XU, 2000; CAO *et al.*, 2001; ZHAN *et al.*, 2001).

1.1.2.3 A vulnerabilidade seletiva do hipocampo

Os neurônios diferem em sua sensibilidade ao insulto isquêmico e em sua habilidade para se recuperarem de tal injúria. Assim, algumas populações neuronais de distintas regiões do cérebro apresentam-se mais suscetíveis do que outras ao dano neuronal causado por uma isquemia. Este fenômeno clássico da neuropatologia é conhecido como “vulnerabilidade seletiva” e os possíveis fatores que o determinam têm sido amplamente pesquisados na tentativa de elucidá-lo. Essa morte celular seletiva tem sido mais intensivamente estudada na formação hipocampal (DAVIS & ANTONAWICH, 1991).

Populações de células que se encontram próximas no cérebro podem apresentar uma vulnerabilidade diferente a equivalentes intensidades de isquemia. Apesar de, atualmente, saber-se muito sobre a anatomia, a fisiologia e a bioquímica do SNC, resta ainda muito a descobrir sobre as causas dessa vulnerabilidade diferenciada de populações específicas em resposta a esse tipo de lesão. O dano depois da isquemia global ocorre principalmente na região CA1 do hipocampo e, em menor extensão, a certas sub-regiões do neocórtex, tálamo e estriato (SCHREIBER & BAUDRY, 1995).

No hipocampo, as células piramidais da região CA1 são sensíveis, enquanto que as células piramidais da região vizinha CA3 são resistentes (Figura 1.2). No giro denteado (DG), as células granulares são resistentes, enquanto no hilo somente uma subpopulação de células parece ser vulnerável (HSU *et al.*, 1994; YANG *et al.*, 2000). Depois de 20-30 minutos de isquemia *in vivo* no rato, as áreas CA1, CA2 e o hilo são afetadas, enquanto as células das regiões CA3 e DG permanecem aparentemente normais. Os neurônios da região CA1 e do hilo são, talvez, os mais vulneráveis de todo o cérebro. Resumindo, a vulnerabilidade do hipocampo à isquemia segue a seqüência: CA1, hilo > CA2 > CA3 > DG. É importante ressaltar que, apesar dos neurônios morrerem após o insulto, as células astrogliais e vasculares sobrevivem, garantindo a resposta plástica do cérebro (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). Essa morte diferencial já foi demonstrada tanto *in vivo* (ORDY *et al.*, 1993; HSU *et al.*, 1994; VALENTIM *et al.*, 2001), quanto *in vitro* (BERNAUDIM *et al.*, 1998; VALENTIM *et al.*, 2003).

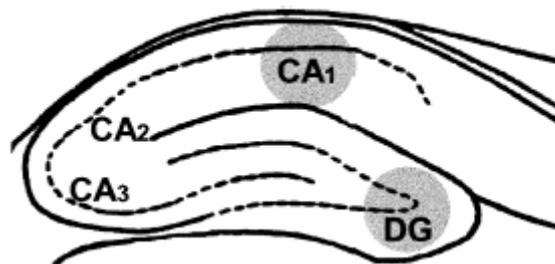


Figura 1.2 Representação esquemática de uma fatia transversal de hipocampo mostrando a região CA1, mais sensível ao insulto isquêmico, e as regiões CA2, CA3 e DG, de menor sensibilidade (VALENTIM *et al.*, 1999).

1.1.2.3.1 A morte celular tardia

Outra característica fascinante da isquemia cerebral global é que nenhum dano significativo é observado até 3 ou 4 dias depois do insulto. Este fenômeno é conhecido como “morte celular tardia” (HSU *et al.*, 1994; BARTUS *et al.*, 1998; KIRINO, 2000). As duas populações de células vulneráveis do hipocampo não sofrem degeneração de maneira semelhante. As do hilo do giro denteado degeneram dentro de 24 horas, enquanto as células piramidais da região CA1 não morrem até 3-4 dias depois do insulto. A vulnerabilidade seletiva e o atraso no início

da degeneração das células da região CA1 sugerem a presença de alguns neurônios ainda viáveis que podem estar comprometidos, mas ainda deixam uma janela de oportunidade para intervenção farmacológica alguns dias depois da isquemia (ORDY *et al.*, 1993).

1.1.2.3.2 Morte neuronal isquêmica seletiva no hipocampo

O hipocampo é uma estrutura que caracteriza a vulnerabilidade seletiva ao insulto isquêmico (SCHREIBER & BAUDRY, 1995; CANDELARIO-JALIL *et al.*, 2001), fato que pode ser constatado tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vivo*, por exemplo, 5 minutos de isquemia global causam morte tardia em quase todas as células piramidais da região CA1 sem afetar as outras populações celulares, enquanto que 20 minutos causam a morte celular dos neurônios em CA3, mas quase não afetam as células granulares do giro denteado (DG) (KIRINO & SANO, 1984; KIRINO *et al.*, 1985) ou os interneurônios em CA1 (FERRER *et al.*, 1995).

Uma das hipóteses para explicar a vulnerabilidade das células da área CA1 refere-se ao aumento na liberação de glutamato durante a isquemia. Conforme exposto anteriormente, a superativação de receptores glutamatérgicos pode levar a um excesso de íons cálcio livres na célula, ativando proteases, endonucleases, síntese de radicais livres, além da ativação de genes de morte celular (SCHREIBER & BAUDRY, 1995), eventos que só ocorrem em CA1.

1.1.2.4 Modelos experimentais de isquemia

Para tornar possível a investigação dos mecanismos envolvidos na morte celular, além do estudo de fármacos e de outras substâncias que possam atuar como agentes neuroprotetores ou neurotóxicos, são empregados modelos experimentais de isquemia cerebral, os quais são capazes de reproduzir as condições isquêmicas com razoável eficiência.

1.1.2.4.1 Modelos experimentais *in vivo*

Os modelos experimentais de isquemia *in vivo* podem ser globais, quando afetam todo o cérebro, ou focais, quando afetam uma pequena região; permanentes quando sem recirculação sangüínea ou transitórios quando seguidos de reperfusão.

A simulação da isquemia cerebral global requer a interrupção das quatro principais artérias extracranianas no rato, simulando distúrbios circulatórios globais que acontecem durante um ataque cardíaco ou hipotensão aguda (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991). O modelo experimental mais usado neste caso é o da oclusão dos 4 vasos (4VO), que inclui a cauterização das artérias vertebrais seguida de oclusão temporária das artérias carótidas comuns (FAROOQUI *et al.*, 1994; VALENTIM *et al.*, 1999). Os danos celulares isquêmicos, associados à vulnerabilidade seletiva do hipocampo, são amplamente usados para analisar mecanismos básicos de danos neuronais e para a avaliação do efeito de substâncias com potencial uso terapêutico (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991).

No caso da isquemia cerebral focal, os modelos experimentais visam interromper artérias cerebrais específicas, afetando somente uma pequena parte do cérebro. O modelo mais comum é a oclusão da artéria cerebral média (MCA). (FAROOQUI *et al.*, 1994; LOETSCHER *et al.*, 2001).

1.1.2.4.2 Modelos experimentais *in vitro*

As técnicas *in vitro* são importantes ferramentas de estudo para diversas doenças neurodegenerativas, uma vez que constituem-se em modelos mais simples para os estudos moleculares que os ensaios com animais *in vivo* (PRINGLE *et al.*, 1997). Atualmente, o cultivo de células ou tecidos tem sido bastante empregado em estudos de processos neurodegenerativos (NEWELL *et al.*, 1993; VORNOV *et al.*, 1994; WILDE *et al.*, 1997).

Os modelos experimentais de isquemia *in vitro* utilizam células ou tecido cerebral expostos à condição de privação de oxigênio e glicose (POG) e são assim chamados porque, na verdade, são modelos onde são produzidas condições similares, mas não idênticas às produzidas *in vivo*. Estes modelos permitem estudar a resposta celular ao insulto isquêmico através de um sistema no qual as condições podem ser perfeitamente controladas. Danos hipoglicêmicos e hipóxicos podem ser produzidos facilmente em cultura de células através da redução do nível de glicose no meio de cultura e colocando a cultura em uma câmara anaeróbica, respectivamente (FAROOQUI *et al.*, 1994).

Apesar da privação de glicose e oxigênio ser a principal perturbação durante a isquemia *in vitro*, o sangue contém ainda muitos outros fatores que podem determinar a ocorrência do dano isquêmico. Além disso, durante a isquemia *in vivo* há o acúmulo de substâncias neurotóxicas no meio extracelular. Durante os estudos *in vitro*, a cultura de células é geralmente cercada por excesso de meio extracelular, de forma que o acúmulo destes produtos possa ser atenuado. Esses são os principais obstáculos dos estudos da isquemia por POG. (FAROOQUI *et al.*, 1994).

Entretanto, a POG pode ser considerada como um método relativamente simples e capaz de reproduzir *in vitro* condições e aspectos importantes de uma isquemia *in vivo*, como por exemplo, a vulnerabilidade seletiva das células da região CA1 (TAVARES *et al.*, 2001), de forma que o uso de fatias hipocâmpais submetidas à POG é considerado adequado para o estudo da lesão celular isquêmica, assim como para a avaliação de substâncias com potencial neuroprotetor ou neurotóxico.

1.1.2.4.2.1. A cultura organotípica

As culturas organotípicas têm se tornado uma importante alternativa para o estudo da morte neuronal induzida por hipóxia/hipoglicemia e para simular a isquemia (BERNAUDIN *et al.*, 1998; CIMAROSTI *et al.*, 2001).

Este modelo de cultura foi desenvolvido em 1981 por GÄHWILLER e colaboradores (1981) e foi modificado por STOPPINI e colaboradores (1991). Basicamente, trata-se de um método que mantém fatias de um determinado tecido em cultivo sobre uma interface entre o ar e o meio de cultivo, podendo assim permanecer por diversas semanas. Uma das principais características da cultura organotípica é a de manter a organização do tecido *in vivo*, como por exemplo a organização celular existente no hipocampo (STOPPINI *et al.*, 1991; GÄHWILLER *et al.*, 1997).

A idade dessas culturas é denotada em EPD, dia pós-natal equivalente (*equivalent postnatal day*), o qual corresponde à idade que o animal tinha quando as fatias foram colocadas em cultivo somado ao número de dias de permanência *in vitro* (BRUCE *et al.*, 1995).

As culturas organotípicas de hipocampo são uma alternativa bastante

interessante para o estudo da isquemia cerebral, pois essas culturas mantêm muitos aspectos da isquemia *in vivo*, como a morte neuronal tardia e a vulnerabilidade seletiva (STRASSER & FISCHER, 1995; LAAKE *et al.*, 1999; NORABERG *et al.*, 1999; CIMAROSTI *et al.*, 2001).

1.1.2.4.2.2 Fatias hipocampais submetidas à POG

Uma alternativa para a metodologia *in vitro* é a utilização do tecido cerebral sem prévio cultivo. Neste método utiliza-se, por exemplo, fatias de hipocampo (400 µm de espessura) que imediatamente após serem extraídas são expostas a uma condição de privação de oxigênio e glicose. Este modelo foi primeiramente descrito por MORO e colaboradores (1998) e vem sendo extensamente usado como modelo para o estudo de eventos isquêmicos, inclusive na investigação de lesões e neuroproteção (MORO *et al.*, 1998; DE ALBA *et al.*, 1999a; DE ALBA *et al.*, 1999b; CÁRDENAS *et al.*, 2000; MORO *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2004a; SIQUEIRA *et al.*, 2004b).

Neste caso, com o intuito de mimetizar uma condição de isquemia *in vitro*, a POG pode ser induzida ao se submergirem fatias de tecidos em um meio livre de glicose em uma atmosfera saturada de nitrogênio (LAAKE *et al.*, 1999; PRINGLE *et al.*, 1999; BREDER *et al.*, 2000; STRIGGOW *et al.*, 2000). Adicionalmente, o uso de fatias hipocampais pode ser particularmente interessante, desde que boa parte da organização celular e de conexões intercelulares seja preservada (NEWMAN *et al.*, 1989; PELLMAR, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995).

Além disso, o uso de fatias de tecido cerebral em um modelo de isquemia pode proporcionar uma série de vantagens em relação a ensaios *in vivo* para a avaliação de mecanismos envolvendo danos neuronais isquêmicos, tais como o acesso direto e imediato ao compartimento extracelular, devido à ausência da barreira hematoencefálica; um controle absoluto das condições externas do meio onde as fatias se encontram; as conexões intercelulares podem ser preservadas, não alterando, desta forma, a morfologia do tecido animal e, finalmente, pode ser uma excelente ferramenta para estudos farmacológicos quantitativos (DE ALBA *et al.*, 1999b).

1.1.2.5 Métodos para a avaliação da neurotoxicidade em fatias de hipocampo

Os danos celulares ao tecido cerebral produzidos a partir de um episódio isquêmico são resultantes de um conjunto de eventos patofisiológicos desencadeados não apenas durante o período de isquemia em si, mas também a partir do período de reoxigenação (GERASIMOV *et al.*, 2004). A análise dos mecanismos de lesão neuronal propiciadas pela privação de oxigênio e glicose demonstra a existência de vários eventos interdependentes e com um grande número de interações. Por este motivo, vários são os métodos possíveis empregados para a determinação do grau de injúria celular proporcionado pela isquemia cerebral. Dentre os ensaios relatados na literatura e estudados em modelos *in vitro* de POG para a avaliação da neurotoxicidade, são possíveis metodologias que utilizam a própria fatia de hipocampo, neste caso envolvendo a atividade de determinadas enzimas, ou então com o uso do meio de incubação que banha a fatia, para a quantificação de substâncias liberadas a partir da lesão isquêmica, cuja determinação possa ser proporcional ao grau de injúria.

O imunocontéudo de diversas enzimas relacionadas à morte celular isquêmica pode ser determinado a partir da separação das proteínas das fatias de hipocampo através de eletroforese, como a óxido nítrico sintase induzível, ou iNOS. Uma excessiva produção de óxido nítrico a partir da iNOS parece estar relacionada aos danos celulares que ocorrem após a POG, uma vez que sua expressão torna-se bastante elevada durante o período de recuperação, na isquemia cerebral *in vitro* ou *in vivo* (CÁRDENAS *et al.*, 1998; DE ALBA *et al.*, 1999b; CÁRDENAS *et al.*, 2000; PORCIÚNCULA *et al.*, 2003). Estudos anteriores demonstraram que a expressão desta enzima ocorre rapidamente após a isquemia (cerca de 2-3 horas depois), sugerindo que o óxido nítrico possa participar do processo patogênico desencadeado nos estágios iniciais da isquemia cerebral (MORO *et al.*, 1998). A óxido nítrico sintase induzível pode ser determinada em fatias também a partir de sua atividade máxima, através do monitoramento da conversão de L-[U-¹⁴C] arginina em [U-¹⁴C] citrulina, permitindo a quantificação da isoforma cálcio-dependente e independente, a partir de condições como a presença ou ausência de substrato e concentrações variadas de cálcio (DE ALBA *et al.*, 1999a; DE ALBA *et al.*, 1999b).

A viabilidade mitocondrial pode ser avaliada a partir do ensaio de MTT, através da formação de um derivado formazan púrpura formado pela redução do anel tetrazólio do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Esta redução ocorre na mitocôndria por ação de succinato desidrogenases presentes nas fatias de hipocampo, proporcionando uma medida da atividade enzimática da mitocôndria de células viáveis (LOBNER, 2000). Estudos indicam que esta redução possa ocorrer também fora da mitocôndria, em outros sistemas bioquímicos (LIU *et al.*, 1997), mas este ensaio tem sido empregado com eficiência para a avaliação de danos neuronais após uma variedade de situações de insulto, incluindo a POG (LOO & RILLEMA, 1998).

O próprio meio de incubação que banha as fatias de hipocampo pode ser empregado para a avaliação da morte celular, a partir da liberação de determinados compostos da célula lesada. Os níveis de glutamato e aspartato, aminoácidos excitatórios liberados em elevadas concentrações durante os primeiros minutos de reoxigenação de fatias de hipocampo submetidas à POG, podem ser quantificados através de CLAE com detector de fluorescência acoplado, após derivatização dos aminoácidos com reagentes específicos (DE ALBA *et al.*, 1999b; MORO *et al.*, 2000). A enzima enolase neuronal-específica, marcador específico de danos neuronais, pode ser determinada e quantificada pela sua liberação a partir de neurônios lesados pela POG, através de radioimunoensaio (DE ALBA *et al.*, 1999b; MORO *et al.*, 2000; FONTELLA *et al.*, 2005). Outra enzima cuja atividade pode ser determinada diretamente a partir de sua liberação pelas fatias hipocampais submetidas à POG para o meio de incubação é a lactato desidrogenase. Este ensaio foi originalmente proposto visando à medida da morte neuronal necrótica (KOH & CHOI, 1987), uma vez que a LDH, uma enzima citosólica, é liberada por células destruídas ou que sofreram danos após um insulto (LOBNER, 2000). Entretanto, foi demonstrado que o efluxo de LDH pode servir como marcador tanto para a morte celular por necrose como por apoptose, e esta liberação é proporcional ao número de células com danos (KOH & CHOI, 1987; KOH & COTMAN, 1992). Esta atividade enzimática pode ser determinada tanto através da medida espectrofotométrica da oxidação do NADH na presença de piruvato (DE ALBA *et al.*, 1999a; DE ALBA *et al.*, 1999b; LOBNER, 2000; MORO *et al.*, 2000; SOBRADO *et al.*, 2004) como na redução do NAD, com a subsequente conversão de lactato em piruvato (SIQUEIRA

et al., 2004a; FONTELLA *et al.*, 2005). Esse evento é possível devido ao fato da lactato desidrogenase ser uma enzima que catalisa uma reação reversível, isto é, a interconversão entre lactato e piruvato, com a participação do NAD como coenzima (MOSS & HENDERSON, 1998).

1.2 OBJETIVOS

Os objetivos gerais deste capítulo foram a verificação do efeito *in vitro* dos alcalóides indólicos vincamina, reserpina e psicotina e do alcalóide aporfínico boldina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose, através da quantificação da liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) para o meio extracelular e da medida da viabilidade mitocondrial.

1.3 REVISÃO DA LITERATURA

Alcalóides indólicos constituem um grupo de substâncias de grande importância econômica às quais são atribuídas importantes atividades farmacológicas (SCHRIPSEMA *et al.*, 2003). Cerca de 2000 moléculas desta classe de substâncias já foram isoladas, e dentre esses compostos, os alcalóides isolados da vinca são alguns dos mais estudados, devido a seus efeitos sobre o SNC e para o tratamento de diferentes tipos de câncer (CARLINI, 2003; ANDRADE *et al.*, 2005).

Os alcalóides indólicos da vinca com relevante atividade farmacológica podem ser divididos em duas classes principais: os alcalóides diméricos citotóxicos isolados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), tendo como principais representantes a vimblastina, vincristina e alcalóides análogos, empregados na terapêutica há várias décadas como eficazes agentes antitumorais, e a vincamina, juntamente com seus derivados sintetizados que visaram explorar seu efeito vasodilatador cerebral e neuroprotetor (ERDŐ *et al.*, 1996; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2004).

A vincamina [I], principal alcalóide com núcleo indol extraído das folhas de *Vinca minor* L. (Apocynaceae), possui marcantes atividades neuroprotetoras para distúrbios cerebrais em pacientes idosos, incluindo distúrbios de memória, vertigens e distúrbios relacionados a isquemias transitórias (OLPE *et al.*, 1982). Estudos posteriores comprovaram a eficácia deste alcalóide em proporcionar significativa redução de lesões cerebrais provocadas por isquemia em gerbilos após oclusão da artéria carótida lateral, quando comparadas ao grupo controle, além de menores distúrbios relacionados à locomoção pós-isquêmica (RITSCHER *et al.*, 1985). O efeito protetor da vincamina pode estar relacionado com sua atribuída atividade vasodilatadora e metabólica cerebral, através da redistribuição do fluxo sanguíneo para as zonas isquêmicas, proporcionando um aumento na utilização de oxigênio e glicose (ARAKI *et al.*, 1991a; ARAKI *et al.*, 1991b). Esta importante atividade farmacológica possibilitou o surgimento de formas farmacêuticas para o tratamento de distúrbios cerebrovasculares, como a especialidade Vincagil[®], da Aventis Pharma, comercializado no Brasil em cápsulas de 30 mg (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004).

O sucesso medicinal deste alcalóide inspirou a busca de novos agentes que poderiam ser empregados no tratamento farmacológico de distúrbios isquêmicos cerebrais, motivando ainda a síntese de diversos compostos análogos, empregando a vincamina como protótipo, conforme pode ser visualizado na Figura 1.3 (MAZÁK *et al.*, 2003). Dessa maneira, modificações foram realizadas no sistema estrutural da molécula, em especial no grupamento acetila situado na posição 14 da molécula, além da introdução de ligação dupla entre as posições 14 e 15, inexistente na vincamina.

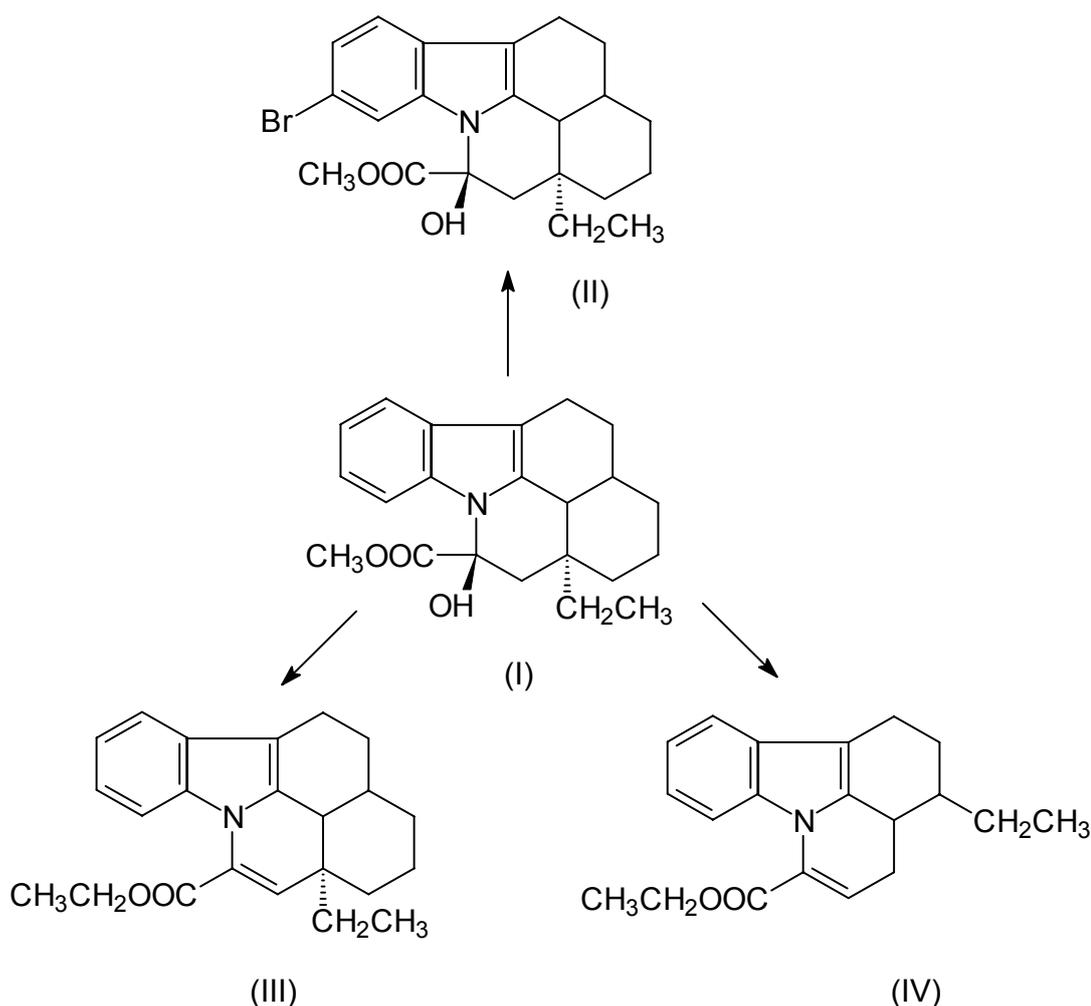


Figura 1.3 Estruturas dos alcalóides derivados da vincamina (I): brovincamina (II), vimpocetina (III) e vinconato (IV).

Os efeitos destes análogos foram comparados em um experimento onde a sobrevivência de ratos submetidos a uma situação de hipóxia onde os animais foram expostos por 80 segundos ao gás nitrogênio puro foi comparada (KING, 1987). Administrados por via intraperitoneal, a vimpocetina [III] foi mais potente (16,6 mg/kg),

seguido por outro derivado, o vinconato [IV] (25 mg/kg), e então a vincamina (47 mg/kg), de menor atividade que seus derivados neste ensaio.

Tratamento crônico com brovincamina [II] e apovincamina nas doses de 2,5 a 10 mg/kg proporcionou uma redução dose-dependente na distância intercapilar em cérebros de ratos senescentes, produzindo um aumento no suprimento sanguíneo (JUCKER *et al.*, 1990). Sabe-se que a densidade de vasos capilares se torna bastante reduzida tanto na região CA1 do hipocampo quanto na região do córtex frontal em animais idosos (HICKS *et al.*, 1983) e a distância intercapilar resultante nos animais idosos tratados com os derivados da vincamina foi comparável à distância intercapilar encontrada nos animais controles adultos.

A brovincamina, apesar de não aumentar diretamente a concentração de oxigênio no cérebro logo após sua administração, possibilitou um aumento no fluxo sanguíneo cerebral em animais isquêmicos com oclusão da artéria carótida em um dos hemisférios (YAMAGUCHI *et al.*, 1992). Este efeito pode estar associado ao poder vasodilatador deste derivado, que atua possivelmente bloqueando os canais de cálcio (KATSURAGI *et al.*, 1984). Tanto a brovincamina quanto a vincamina são empregadas para o tratamento de distúrbios cardiovasculares e cerebrovasculares pela sua análoga capacidade vasodilatadora, mas de menor intensidade em comparação ao verapamil (SUN & TAKEUCHI, 1989).

Vincamina, vincanol e vimpocetina são potentes inibidores dos canais de Na⁺ voltagem-dependente, fato observado a partir de dados experimentais *in vitro* em culturas de neurônios corticais em concentrações micromolares (44, 72 e 40 μ M, respectivamente) e *in vivo* (ERDŐ *et al.*, 1996). O bloqueio dos canais de sódio pode ser benéfico não apenas como mecanismo de ação para substâncias anticonvulsivantes, mas também como agentes neuroprotetores, diminuindo a magnitude nas lesões isquêmicas (TAYLOR & MELDRUM, 1995).

Para a vimpocetina, outro derivado sintético do alcalóide vincamina, experimentos demonstraram seu efeito de prevenir danos isquêmicos na região CA1 de hipocampus de ratos submetidos a um modelo de oclusão dos 4 vasos (4VO), a partir de sua administração (10 mg/kg) por via intraperitoneal 15 minutos antes da indução isquêmica (SAUER *et al.*, 1988). Esta substância mostrou efeitos benéficos

na circulação cerebral e nas funções celulares durante processos de isquemia aguda e reperfusão (KING, 1987), uma vez que a vimpocetina tenha sido originalmente concebida como vasodilatador cerebral (KÁRPÁTI & SZPORNY, 1976). Diversos estudos foram feitos a fim de se identificar o alvo molecular responsável pelo seu efeito neuroprotetor, com evidências de que sua ação protetora possa estar relacionada com a inibição de canais de Na⁺ voltagem-dependente (LAKICS *et al.*, 1995) e com a inibição indireta de processos moleculares iniciados pelo aumento dos níveis de Ca²⁺ intracelular (KANEKO *et al.*, 1990). Além disso, demonstrou-se que a vimpocetina possui a capacidade de se ligar ao receptor glutamatérgico NMDA (N-metil-D-aspartato) de maneira similar ao zinco e inibi-lo, na concentração de 100 µM (KANEKO *et al.*, 1991). Também protege os neurônios corticais da excitotoxicidade (ERDŐ *et al.*, 1990) e inibe a liberação de acetilcolina estimulada por aminoácidos excitatórios. Apesar do mecanismo de ação neuroprotetor da vimpocetina não estar completamente esclarecido, já foram demonstradas suas características antioxidantes *in vitro*, como seu efeito seqüestrador para radicais hidroxila, inibição da peroxidação lipídica em cérebros de ratos e efeito protetor em modelos de estresse oxidativo, mediados tanto pelo sistema Fe²⁺/ascorbato como pela proteína beta amilóide (PEREIRA *et al.*, 2003). Mais recentemente, considerou-se a vimpocetina como um inibidor de canais de Ca²⁺/Na⁺ voltagem dependente, efeito este associado a sua neuroproteção através de estudos *in vivo* (BONOCZK *et al.*, 2000; LENDVAI *et al.*, 2003). Este derivado pode ser encontrado em especialidades farmacêuticas comercializadas no Japão, China e Hungria, como o Calan[®] comprimidos e grânulos, com 5 mg de vimpocetina, com indicações de melhorar sintomas de distúrbios cerebrovasculares relacionados com seqüelas de isquemia e de hemorragia cerebral (JAPAN MEDICAL PRODUCTS INTERNATIONAL TRADE ASSOCIATION, 1999).

Outro derivado sintético da vincamina desenvolvido para melhorar o metabolismo cerebral e para proteção contra danos neuronais causados pela isquemia é o vinconato (IINO *et al.*, 1992). Foi evidenciado que sua administração oral proporciona melhoras na atenção, cognição, atividade psicomotora e concentração em pacientes idosos (SALETU *et al.*, 1984). Este derivado distribui-se mais facilmente no cérebro, uma vez que o alcalóide permeia mais facilmente através da BHE, diminuindo o acúmulo de cálcio em áreas cerebrais como o tálamo,

estriato e substância negra, dos níveis observados após a isquemia induzida em gerbilos, nas doses de 100 e 300 mg/kg (ARAKI *et al.*, 1991a), não havendo indícios de proteção ao hipocampo. Além disso, o vinconato foi eficaz em minimizar danos relacionados, como distúrbios no metabolismo da glicose, edema cerebral e queda na síntese de proteínas, evidenciando seu efeito benéfico contra danos cerebrais, quando administrado oralmente na dose de 5 mg/kg (ARAKI *et al.*, 1991b). Em um modelo onde foi empregada a oclusão dos 4 vasos em ratos, o tratamento com vinconato (50 e 200 mg/kg por via i.p.) antes da isquemia suprimiu perdas neuronais na região CA1 do hipocampo após a queda no fluxo sanguíneo cerebral, com diminuição na liberação de aminoácidos excitatórios como o glutamato e o ácido aspártico via estimulação dos receptores muscarínicos pré-sinápticos (IINO *et al.*, 1992). Estudos anteriores forneceram indícios de que esta substância pudesse ter afinidade pelos receptores muscarínicos, supondo-se que a liberação de glutamato no hipocampo de ratos possa ser modulada de maneira inibitória pelos receptores muscarínicos (KODA *et al.*, 1989). Estes resultados sugerem que o vinconato possa ser efetivo no tratamento de desordens cerebrais induzidas por condições de hipóxia, como a isquemia. Mais recentemente demonstrou-se que esta substância pode induzir a transdução de sinais para a atuação de hormônios e neurotransmissores após processos isquêmicos, estimulando também a atividade de segundos mensageiros celulares (KATSURA *et al.*, 1997).

Outro alcalóide indólico, a reserpina, foi primeiramente isolada das raízes de *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex. Kurz (Apocynaceae), planta empregada para insanidade e distúrbios mentais na Índia há mais de 3000 anos, devido a suas propriedades hipotensoras e tranqüilizantes (BARREIRO, 1990; ITOH *et al.*, 2005). O emprego deste alcalóide pelos países ocidentais para o tratamento da hipertensão teve início há cerca de 50 anos atrás, quando finalmente descobriu-se que a reserpina era a responsável pelos efeitos cardiovasculares atribuídos ao vegetal (GILANI & RAHMAN, 2005). Estudos comprovam que em concentrações baixas este alcalóide provoca a depleção sináptica de algumas catecolaminas e aminas biogênicas das terminações nervosas, dentre as quais, noradrenalina, serotonina e dopamina, afetando seu armazenamento por ligação à proteína transportadora que acumula esses neurotransmissores em vesículas específicas (CURZON, 1990; RANG *et al.*, 2000a; METZGER *et al.*, 2005). Desta maneira, a reserpina pode

provocar diversos efeitos centrais, como depressão e sintomas de parkinsonismo como tremor e catalepsia, motivo pelo qual atualmente este alcalóide é empregado apenas experimentalmente e não mais como fármaco anti-hipertensivo (RANG *et al.*, 2000a; GILANI & RAHMAN, 2005). No Brasil, algumas especialidades farmacêuticas contendo reserpina são comercializadas com indicações terapêuticas para casos de hipertensão, como a Ortoserpina[®] (Makros) comprimidos de 0,25 mg e Rauserpin[®] (Breves), comprimidos de 0,10 mg. Também são comercializadas algumas associações contendo reserpina e fármacos diuréticos, como hidroclortiazida e clortalidona, possuindo a mesma indicação (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004).

Vários experimentos relatam o uso da reserpina em modelos animais que simulam a discinesia orofacial tardia ou aguda com características semelhantes àquelas propiciadas pela doença de Parkinson, incluindo movimentos involuntários repetitivos que envolvem a boca, a face e a língua (DUTRA *et al.*, 2002; BURGER *et al.*, 2005; FARIA *et al.*, 2005), sendo esta substância então considerada como uma importante ferramenta farmacológica para o estudo da modulação das funções sinápticas e neuronais (METZGER *et al.* 2002).

O estudo terapêutico e dos mecanismos de ação da reserpina como fármaco pode ser considerado como um marco para o início da pesquisa da relação entre catecolaminas e aminas biogênicas e as causas da depressão e doença de Parkinson, estimulando o desenvolvimento de fármacos psicoativos mais modernos (GILANI & RAHMAN, 2005).

A psicolatina (umbelatina), alcalóide indolmonoterpênico glicosilado majoritário de *Psychotria umbellata* Vell. (Rubiaceae) possui efeito analgésico e antinociceptivo dose-dependente em ratos, quando testado nas doses de 100-300 mg/kg (BOTH *et al.*, 2002). A analgesia relatada está associada com a ativação de receptores opióides, tendo sido revertida com o uso de naloxona. Os resultados obtidos sugerem o envolvimento de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA para o mecanismo de ação da psicolatina, uma vez que este alcalóide atuou de modo sinérgico quando co-administrado com MK-801 (dizocilpina), um antagonista glutamatérgico não competitivo (BOTH *et al.*, 2002). Além deste, outro importante indício de que a psicolatina possa ter efeitos centrais é sua relação estrutural com a serotonina, neurotransmissor cujos receptores estão presentes em áreas cerebrais

envolvidas com processos de memória e aprendizado (MENESES & HONG, 1997; KHALIFA, 2003). Baseado nessa hipótese, através de ensaios comportamentais a psicotatina demonstrou possuir atividade ansiolítica em ratos, nas doses de 7,5 e 10 mg/kg, efeito antidepressivo na dose de 3 e 7,5 mg/kg, comparável aos fármacos imipramina e fluoxetina e prejuízos na aquisição e consolidação de aprendizado e memória (100 mg/kg), demonstrando em todos os casos implicação de receptores serotoninérgicos do tipo 5HT_{2A/C} para os efeitos (BOTH *et al.*, 2005). Outros experimentos também verificaram que este alcalóide atua como um antagonista glutamatérgico, através de sua capacidade de atenuar convulsões em ratos induzidas pela administração de NMDA (0,3 mg/kg), na dose de 100 mg/kg, além de reduzir significativamente, nas doses de 7,5 e 10 mg/kg uma hiperlocomoção também em ratos, estimulada pelo antagonista MK-801 (BOTH *et al.*, 2006). Este mesmo estudo investigou a atuação da psicotatina quanto ao comportamento de escalada induzido por apomorfina, sugerindo o envolvimento deste alcalóide como um antagonista dopaminérgico para receptores D1 e D2. Desta maneira, o perfil psicofarmacológico para a psicotatina pode ser explicado através de seu envolvimento com receptores serotoninérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos, podendo ser considerado como um potencial antipsicótico (BOTH *et al.*, 2006).

A boldina, um alcalóide aporfínico e fenólico isolado das cascas e folhas de *Peumus boldus* Mol. (Monimiaceae), tem sido bastante estudada quanto a sua grande capacidade em seqüestrar radicais livres em diversos modelos experimentais. Seu potente efeito antioxidante observado a partir de dados experimentais em sistemas biológicos e abióticos está com certeza relacionado a sua estrutura química, que possui dois grupamentos fenólicos altamente reativos (O'BRIEN *et al.*, 2005). Assim, muitos estudos foram realizados a fim de se comprovar sua atividade e verificar seu mecanismo antioxidante, de forma que essa molécula possa ser atualmente classificada como um eficiente seqüestrador de radicais hidroxilas, mas pouco reativo para radicais superóxido (CEDERBAUM *et al.*, 1992; JANG *et al.*, 2000; YOUN *et al.*, 2002). O potencial antioxidante *in vitro* da boldina tem sido explorado em diversos experimentos, estando relatadas sua eficiência em baixas concentrações de poder inibir a peroxidação lipídica em homogeneizados de tecido cerebral de ratos (SPEISKY *et al.*, 1991a; CASSELS *et al.*, 1995) e em células hepáticas isoladas de ratos (CEDERBAUM *et al.*, 1992;

MARTINEZ *et al.*, 1992; BANNACH *et al.*, 1996) e de humanos (KRINGSTEIN & CEDERBAUM, 1995). Além de propriedades citoprotetoras, são também descritas para a boldina efeitos citotóxicos para células cancerosas (STEVIGNY *et al.*, 2005), além de ausência de ação mutagênica ou genotóxica para este alcalóide em microrganismos (MORENO *et al.*, 1991).

Outros efeitos farmacológicos atribuídos à boldina estão relacionados com suas propriedades coleréticas, colagogas e hepatoprotetoras *in vivo* (LANHERS *et al.*, 1991; SPEISKY & CASSELS, 1994) confirmando o seu uso popular, uma vez que muitas especialidades contendo extratos de boldo ou preparações semelhantes são comercializadas e empregadas como espécies digestivas. Há relatos na literatura de que o boldo-do-Chile possua efeito sedativo e hipnótico leve (SPEISKY & CASSELS, 1994), e para a boldina propriedades neurolépticas são também descritas, atuando como anticonvulsivante quando comparado ao haloperidol e promovendo catalepsia, hipotermia e prolongando a anestesia induzida por tiopental (ZETLER, 1988). Estes efeitos inibitórios no SNC *in vivo* indicam que o mecanismo de ação da boldina possa ser mediado através do bloqueio de receptores de dopamina. Posteriormente, estudos indicaram que este alcalóide possui grande afinidade por receptores dopaminérgicos dos tipos D1 e D2 (ASENCIO *et al.*, 1999; SOBARZO-SÁNCHEZ, 2000), revertendo quadros de comportamentos estereotipados induzidos por apomorfina em ratos. Tudo indica que a boldina possa atuar como um antagonista dopaminérgico, mas seu curto tempo de meia-vida plasmática associado com sua difícil distribuição em determinadas regiões cerebrais tornam difíceis os estudos para a avaliação desta propriedade *in vivo* (ASENCIO *et al.*, 1999; JIMÉNEZ & SPEISKY, 2000).

1.4 PARTE EXPERIMENTAL

1.4.1 Materiais

1.4.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, de idade máxima de 60 dias, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas com no máximo cinco ratos em cada uma delas, com livre acesso a água e alimento em ciclos de claro/escuro de 12 horas (07:00 – 19:00 h), em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade monitorada.

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para a experimentação animal relatados por GOLDIM (1995).

Os animais foram decapitados com guilhotina e seus cérebros dissecados. Os animais foram sacrificados isoladamente dos demais, sendo o equipamento limpo antes da decapitação de cada animal. Quanto ao descarte do material biológico, o mesmo foi acondicionado em sacos plásticos e colocado sob refrigeração, utilizando *freezer* somente para este fim. O recolhimento foi realizado por uma empresa especializada em descarte de material biológico.

Todos os experimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética desta universidade, sob o número de cadastro 2005410.

1.4.1.2 Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (PA), e a água para o preparo das soluções foi destilada e deionizada (Milli-Q).

As placas de 24 poços e as de 96 poços, todas descartáveis e estéreis, foram da marca TTP, Suíça. Para a preparação dos meios de incubação para a indução da privação de oxigênio e glicose (POG) foram empregados CaCl_2 , KCl, NaCl e NaHCO_3 da Merck; sacarose da marca Synth; MgCl_2 da Isofar; Na_2HPO_4 da Nuclear;

KH_2PO_4 da Reagen; MgSO_4 da Riedel e HEPES, da Sigma, além da mistura carbogênica $\text{CO}_2:\text{O}_2$ (5:95 %) – White Martins. O kit utilizado para a medida da atividade da enzima LDH (lactato desidrogenase) foi da marca Doles Reagentes, Goiânia, Brasil, constituído de substrato (solução de lactato 0,1 M e 1,10-fenantrolina 0,005 M em Tris 0,2 M e pH 8,8), solução estabilizadora (HCl 0,1 M), alumínio férrico (solução de sulfato de ferro amoniacal 0,012 M) e solução de NAD-FMS para reconstituição no momento do uso, na concentração final de 15,82 mM de NAD (adenina dinucleotídeo oxidado) e 3,73 mM de FMS (fenazina metossulfato). A solução padrão de lactato desidrogenase presente no kit equivalia a 350 U.I./ L. O MTT, ou brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, foi adquirido da Sigma Chemicals, assim como o ácido tricloroacético (TCA). O DMSO (dimetilssulfóxido) empregado foi da marca Nuclear. O MK-801, ou maleato de (+)-5-metil-10,11,diidro-5H-dibenzo ciclohepten-5,10-imina utilizado para a validação do modelo experimental (Research Biochemicals International) foi gentilmente cedido pela Profa Dra. Elaine Elisabetsky, deste Programa de Pós Graduação.

1.4.1.2.1 Alcalóides

Os alcalóides vincamina [I], boldina (Sigma Chemicals) e [V] cloridrato de reserpina (Merck) [VII] foram adquiridos comercialmente, enquanto que psicolatina [VI] foi previamente extraída e purificada a partir de extrato etanólico de folhas de *Psychotria umbellata* Vell. (Rubiaceae). A verificação do grau de pureza dos alcalóides foi realizada através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando-se sistemas analíticos adequados.

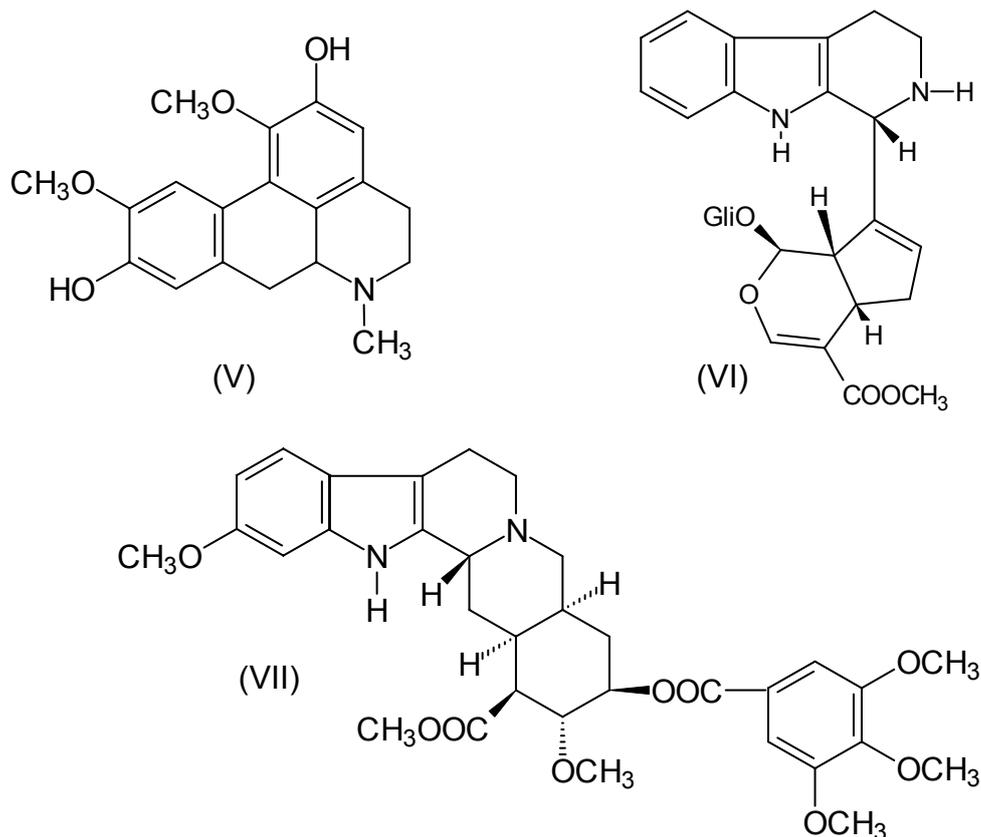


Figura 1.4 Estruturas dos alcalóides boldina (V), psicotatina (VI) e reserpina (VII).

1.4.2 Métodos

1.4.2.1 Avaliação da pureza dos alcalóides utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

Soluções dos alcalóides reserpina, boldina, vincamina e psicotatina foram preparadas em metanol (grau analítico para CLAE/MERCK) até uma concentração final de 1 mg/ ml. Após filtração empregando membrana hidrofílica de fluoreto de polivilideno (PVDF; Millipore; 0,45 μ m; 13 mm), procedeu-se à injeção de 10 μ l das amostras para verificação dos perfis cromatográficos e análise do grau de pureza, seguindo os parâmetros especificados na tabela 1.1.

A fase móvel utilizada para a análise, constituída de solventes com alto grau de pureza como acetonitrila e água ultrapura, foi filtrada previamente através de membrana (Millipore; 0,45 μ m) e desaerada durante 10 minutos em banho de ultrassom. O sistema utilizado foi gradiente linear, partindo-se de 100 % do sistema

A até 100 % do sistema B, num tempo total de 15 minutos de análise para cada alcalóide.

Tabela 1.1 Parâmetros cromatográficos para a análise dos alcalóides.

Características	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695
Detector	Fotodiodos Waters PDA 996 Waters UV/VIS 2487
Coluna	Symmetry® C18 Waters ¹
Pré-coluna	Lichrospher® Merck ²
Sistema de eluição	Gradiente linear
Fase móvel	A) Acetonitrila : Água ⁴ (5:95) B) Acetonitrila (100)
Vazão	0,7 ml/min
Volume de injeção	10 µl
Comprimento de onda	200-400 nm (CLAE/DAD)
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

¹ Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 4,6 x 75 mm / 3,5 µm

² Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10 x 4 mm / Bondapak® Waters C18 (37-55 µm)

1.4.2.2 Preparo das soluções de alcalóides e dos meios de incubação

Após a verificação do grau de pureza dos alcalóides a serem empregados nos experimentos, procedeu-se a preparação das soluções dos mesmos.

Para o preparo das soluções de psiclatina e reserpina, os alcalóides foram solubilizados em água Milli-Q até uma concentração de 10 mM em balão volumétrico e então fracionados em alíquotas de 1 mL, conservados em eppendorfes sob refrigeração à – 80 °C para posterior descongelamento no momento do uso. A preparação das soluções de vincamina seguiu o mesmo procedimento anterior, mas devido ao fato de não ser um sal solúvel, e sim uma base livre de alcalóide, sua solubilização foi realizada com a adição de gotas de HCl 0,1M à suspensão da substância em água Milli-Q, para a formação do cloridrato de vincamina.

As soluções de boldina empregadas para cada ensaio foram preparadas por dissolução do alcalóide em água Milli-Q e então solubilização em ultrassom durante dez minutos. Após este procedimento, alíquotas de 1 mL de uma solução 10 mM

foram fracionadas em eppendorfes e também conservadas sob refrigeração à – 80 °C para posterior descongelamento no momento do uso. O preparo e a manipulação das soluções foi realizado em local pouco iluminado e os eppendorfes envoltos em papel alumínio a fim de se minimizar a reação de fotólise do alcalóide (SPEISKY *et al.*, 1993; KRINGSTEIN & CEDERBAUM, 1995).

Todos os alcalóides foram incorporados aos meios de incubação e adicionados às fatias em todos os momentos do experimento, ou seja, pré-incubação, POG e recuperação. Para a realização de uma curva de concentrações, para cada alcalóide foram empregadas quatro concentrações diferentes (1µM, 10 µM, 50 µM e 100 µM). Em cada experimento foram empregadas no máximo duas diferentes concentrações, no total de três ensaios para cada duas concentrações.

1.4.2.3 Preparo das fatias hipocampais

Ratos Wistar machos com cerca de 2 meses de idade foram mortos por decapitação sem anestesia prévia. Cada cérebro foi rapidamente removido, os hipocampos dos dois hemisférios dissecados sobre uma placa de Petri com papel filtro sobre gelo, e então colocados sobre o disco de Teflon de um fatiador de tecido Mcllwain (The Mickle Laboratory Engineering Co). Fatias transversais de 400 µm de espessura foram cortadas e, transferidas para uma placa de Petri contendo solução Krebs-Henseleit modificada, denominada meio de pré-incubação em pH 7,2, onde foram delicadamente separadas com o auxílio de pincéis.

Logo após, fatias da região dorsal do hipocampo foram selecionadas e transferidas, com pincéis, para placas de 24 poços, sendo colocada uma fatia por poço. Para cada experimento foram sempre preparadas duas placas em paralelo: Controle e POG, sendo cada uma delas pré-incubada na presença de 500 µL de meio de pré-incubação, em incubadora a 37 °C com uma atmosfera de 5% em CO₂ (MORO *et al.*, 1998).

Uma menor concentração de cálcio e uma maior de magnésio (tabelas 1.2 e 1.3), diferente das concentrações fisiológicas, são empregadas para inibição dos receptores NMDA, prevenindo uma lesão mediada por seu estímulo (AITKEN *et al.*, 1995). A seguir, as fatias a serem lesionadas foram expostas à POG.

Durante a padronização deste ensaio, duas diferentes composições de meios e tempos de incubação foram testados durante o processo de padronização desta técnica. Desta maneira, o bloco de experimentos com o alcalóide boldina foi realizado empregando-se um meio Krebs-Henseleit distinto em relação aos experimentos com os demais alcalóides (Tabelas 1.2 e 1.3). Os meios de incubação empregados para a boldina seguiram composição semelhante aos meios de cultivo empregados em culturas organotípicas realizadas pelo grupo de pesquisa onde o presente trabalho foi realizado (CIMAROSTI *et al.*, 2001; TAVARES *et al.*, 2001).

1.4.2.4 Indução de dano celular por privação de oxigênio e glicose (POG) nas fatias hipocampais

Após o período de pré-incubação (15 minutos para os ensaios com a vincamina, psicolatina e reserpina, e 30 minutos para os ensaios com a boldina), as fatias a serem expostas à POG foram lavadas com um meio denominado meio de privação de oxigênio e glicose (meio POG), de pH 7,2, uma vez que as células em presença de oxigênio e ausência de glicose metabolizam seus estoques internos de glicose. A seguir, o meio foi rapidamente trocado por outro de idêntica composição, porém nitrogenado para promover o deslocamento do oxigênio presente. Para isso, o meio POG foi previamente borbulhado com nitrogênio por 10 minutos antes de ser utilizado.

Tabela 1.2 Composição das soluções Krebs-Henseleit modificadas, em mM (meios de pré-incubação, controle e POG) empregadas nos ensaios com boldina.

Composto	Concentração (meio de pré-incubação)	Concentração (meio controle)	Concentração (meio POG)
NaCl	120	136,89	136,89
KCl	2	5,36	5,36
CaCl ₂ .H ₂ O	0,5	1,26	1,26
HEPES	25	25	25
MgSO ₄ .6H ₂ O	10	0,44	0,44
NaHCO ₃	-	4	-
KH ₂ PO ₄	1,18	0,44	0,44
Na ₂ HPO ₄	-	0,34	0,34
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	0,49	0,49
Glicose	11	36	-

Tabela 1.3 Composição das soluções Krebs-Henseleit modificadas, em mM (meios de pré-incubação, controle e POG) empregadas nos ensaios com vincamina, reserpina e psicolatina.

Composto	Concentração (meio de pré-incubação)	Concentração (meio controle)	Concentração (meio POG)
NaCl	120	120	120
KCl	2	2	2
CaCl ₂ .H ₂ O	0,5	2	2
MgSO ₄ .6H ₂ O	10	1,19	1,19
NaHCO ₃	26	2,6	2,6
KH ₂ PO ₄	1,18	1,18	1,18
Glicose	11	11	-

A placa foi então colocada dentro de uma câmara de anóxia, a qual foi imediatamente fechada, com o oxigênio do seu interior depletado através de sucessivas aplicações de vácuo e nitrogênio. O conjunto com pressão positiva de nitrogênio foi mantido dentro de uma estufa a 37 °C por 45 minutos para os ensaios com o alcalóide boldina (LAAKE, *et al.*, 1999; CIMAROSTI *et al.*, 2001; TAVARES, *et al.*, 2001) e 30 minutos para os ensaios com os demais alcalóides (GUERRERO *et al.*, 2004).

Ao final deste tempo, a placa foi retirada da câmara de anóxia, o meio POG rapidamente removido e as fatias lavadas com meio Krebs-Henseleit modificado, denominado meio controle de pH 7,3, contendo glicose. Em seguida, a placa POG foi incubada juntamente com a placa Controle, que corresponde às fatias que não sofreram lesão isquêmica. As fatias controle permaneceram na incubadora durante o período correspondente à indução da privação de oxigênio e glicose (POG). Nesse caso, após o tempo de isquemia o meio foi trocado por meio controle novo, da mesma forma e paralelamente com as amostras submetidas à POG.

Finalmente, as placas contendo as fatias hipocâmpais expostas à POG e as fatias controle retornaram para a incubadora, onde permaneceram por 3 horas à 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂, correspondentes ao período de recuperação.

1.4.2.5 Verificação do efeito dos alcalóides sobre o tecido hipocampal

Após 3 horas, as placas contendo as fatias foram retiradas da incubadora para proceder às etapas finais do experimento, a fim de se avaliarem os possíveis efeitos dos alcalóides boldina, vincamina, psicolatina e reserpina sobre o grau de lesão celular produzido a partir da privação de oxigênio e glicose nas fatias de hipocampo de ratos. As metodologias escolhidas para este fim foram a quantificação da enzima lactato desidrogenase liberada a partir das fatias de hipocampo para o meio de incubação com o uso de um kit comercial, e a análise da viabilidade mitocondrial das mesmas, avaliada através da redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, ou MTT.

1.4.2.5.1 Avaliação da morte celular pela liberação de lactato desidrogenase (LDH) intracelular

A determinação da atividade da enzima lactato desidrogenase liberada para os meios de incubação que banhavam as fatias de hipocampo foi realizada empregando-se a reação lactato/piruvato, com a geração de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) monitorada espectrofotometricamente (KOH & CHOI, 1987).

Após as três horas de recuperação, alíquotas de 25 μL dos meios de incubação das fatias de ambas as placas, POG e controle foram transferidas para uma placa de 96 poços, que já continha 5 μL de alúmen férrico 0,012 M em cada poço. Em seguida, foram pipetados 100 μL de solução de lactato 0,1 M para cada poço e a placa foi mantida a 37 °C durante 3 minutos. Após este período, a reação colorimétrica foi iniciada pela adição de 5 μL de solução de NAD 15,82 mM com FMS 3,73 mM, sendo então estabilizada pela adição de 100 μL de HCl 0,1 M, a cada 10 segundos em cada poço, depois de 5 minutos de reação. As etapas reacionais que levam à formação do complexo corado podem ser visualizadas na Figura 1.3.

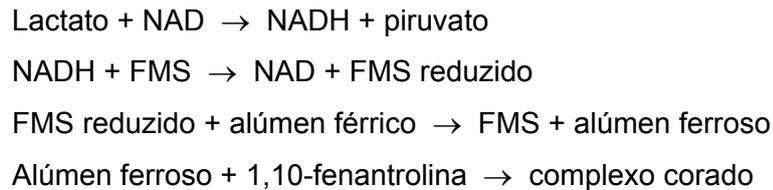


Figura 1.5 Seqüência de reações que resultam no complexo corado para a determinação da atividade enzimática da LDH.

Para cada concentração de alcalóide testado, foi realizado um branco pela adição de 25 μL do meio controle contendo a substância nas doses empregadas. A absorvância da coloração resultante da reação enzimática foi medida utilizando-se leitor de placas, com leitura em $\lambda = 492 \text{ nm}$. Paralelamente, foi realizada uma curva padrão para o experimento, com o uso de uma solução padrão de LDH 350 U.I./L. Posteriormente, as leituras das amostras foram descontadas do branco obtido para cada concentração, sendo o valor resultante multiplicado por um fator de normalização calculado a partir dos valores da curva padrão.

1.4.2.5.2 Avaliação da viabilidade mitocondrial pelo método de MTT

A viabilidade celular ou atividade mitocondrial foi determinada usando o sal de tetrazólio MTT, ou 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. Esta metodologia baseia-se na capacidade de determinadas enzimas, em especial as desidrogenases mitocondriais ativas de mitocôndrias viáveis de causar a clivagem e a redução do MTT, um sal amarelo e solúvel, em um derivado formazam púrpura e insolúvel, conforme visualizado na Figura 1.6 (MOSMANN, 1983).

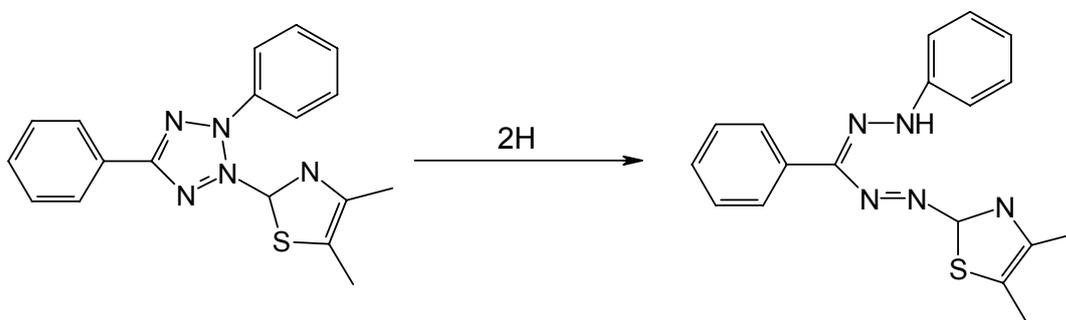


Figura 1.6 Reação de abertura do anel tetrazólio do sal de MTT por ação de desidrogenases mitocondriais e formação do derivado formazam púrpura.

Cerca de 10 minutos antes de completar as três horas de recuperação, foram pipetados 50 μL de solução de TCA 10% em um poço da placa controle, para servir

de branco. Após terminado este período, foram adicionados 45 µg/mL de uma solução de MTT a todos os poços de ambas as placas, POG e controle. Em seguida, as fatias de hipocampo foram incubadas a 37 °C em incubadora por 45 minutos, sob abrigo da luz. O derivado formazam produzido foi extraído das células, por adição de 1 mL de DMSO a cada poço das placas, cobertas com papel alumínio e agitadas por aproximadamente 30 minutos. Após este procedimento, foram pipetados 200 µL desta solução de DMSO para uma placa de 96 poços, e a densidade óptica foi medida em $\lambda= 492$ e $\lambda= 620$ nm em leitor de placas, onde a diferença Abs 492 – Abs 620 fornecia o índice de viabilidade mitocondrial. As leituras foram descontadas do valor do branco obtido, e os dados foram comparados com os controles (fatias hipocampais não submetidas à POG) aos quais atribuiu-se 100% de viabilidade.

1.4.3 Avaliação do modelo

Foram realizados dois experimentos pilotos de POG em fatias hipocampais de ratos empregando-se diferentes concentrações de MK-801, um antagonista glutamatérgico não-competitivo de receptores NMDA, a fim de se validar este ensaio *in vitro*. Esta substância é citada na literatura pela sua atividade neuroprotetora, quando empregada em ensaios utilizando modelos semelhantes de isquemia (DE ALBA *et al.*, 1999b; GERASIMOV *et al.*, 2004). Foram escolhidas as concentrações de 10 µM e de 30 µM de MK-801 para este fim, conforme dados citados na literatura (MULHOLLAND & PRENDERGAST, 2002; SOBRADO *et al.*, 2004). As mesmas condições experimentais seguidas nos ensaios com os alcalóides vincamina, reserpina e psicotina foram utilizadas para os ensaios com o MK-801, seja para composição dos meios, como para os tempos de incubação. Também foram empregadas a liberação de LDH para o meio de incubação e a redução do sal de MTT para a avaliação dos seus efeitos sobre as fatias de hipocampo submetidas à POG. Todos os valores apresentados nos gráficos representam média \pm erro padrão e estão expressos na forma de U.I./L quando avaliada a liberação da enzima LDH e na forma de porcentagem em relação ao controle, quando avaliada a viabilidade mitocondrial, considerando-se o controle na ausência de alcalóides como grupo com 100 % de viabilidade.

1.4.4 Análise estatística

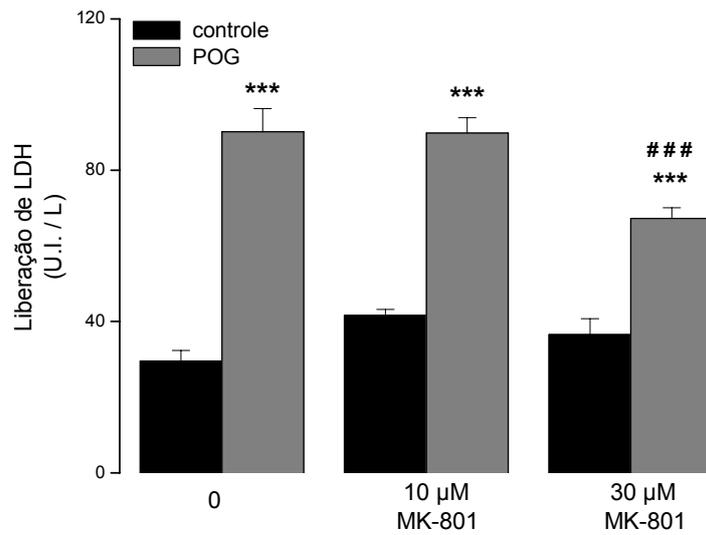
Os resultados foram expressos por média \pm erro padrão da média e analisados usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 11.0 em um computador PC compatível. Os testes estatísticos utilizados foram análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de múltipla amplitude de Duncan quando o valor de F foi significativo. Um $p < 0,05$ foi considerado significativo.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Avaliação do modelo

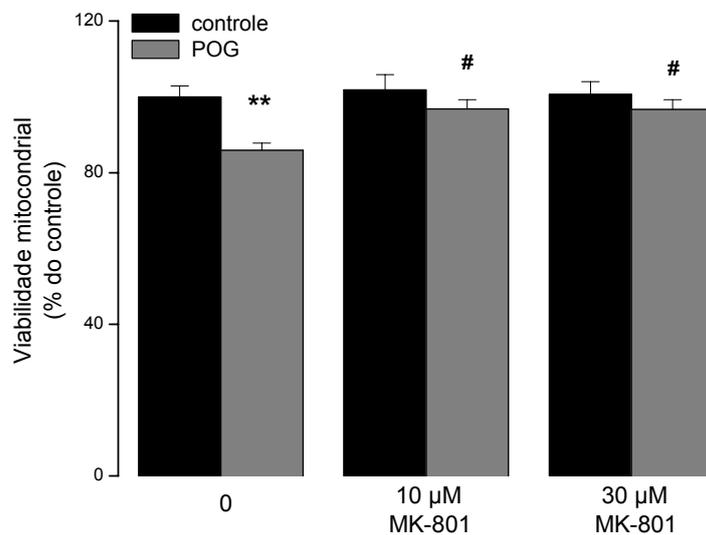
A Figura 1.7 mostra que houve uma redução significativa de cerca de 16 % na liberação de LDH pelas fatias hipocâmpais na concentração de 30 μM de MK-801, em comparação à liberação da enzima pelo grupo isquêmico (POG), redução esta não significativa para a concentração de 10 μM [$F(5,77)=42,36$; $p<0,001$].

Adicionalmente, verifica-se na Figura 1.8 que houve um aumento significativo na viabilidade mitocondrial das fatias lesadas pela privação de oxigênio e glicose, de 12 % para a concentração de 10 μM e de 11 % para a concentração de 30 μM , não caracterizando, portanto, um efeito dose-dependente crescente para este parâmetro [$F(5,70)=2,74$; $p<0,05$].



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.7 Efeito *in vitro* do MK-801 sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



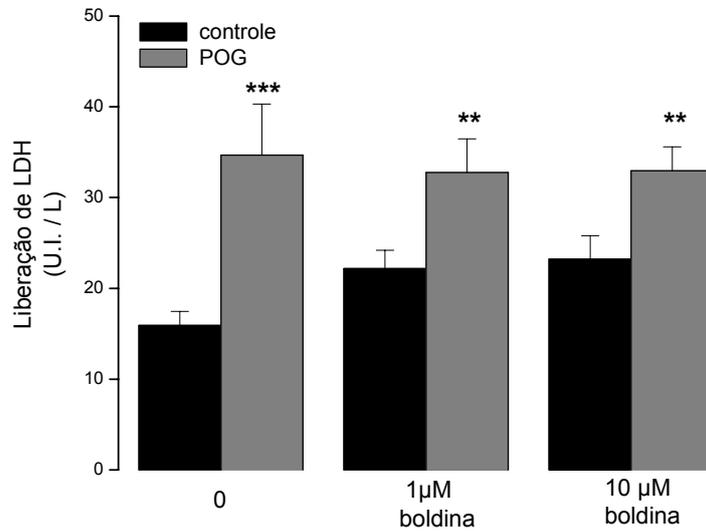
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.8 Efeito *in vitro* do MK-801 sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.

1.5.2 Avaliação do efeito do alcalóide boldina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose

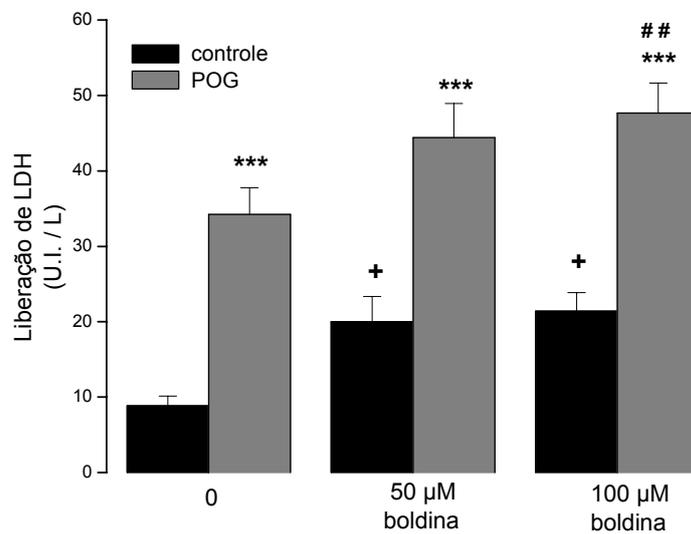
Conforme a Figura 1.9, podemos observar que a boldina nas concentrações de 1 μM e 10 μM diminuiu de maneira não significativa a liberação da enzima LDH para os meios de incubação nos grupos com fatias submetidas à POG (redução de 5,5 % e de 4,7 %, respectivamente para cada concentração). Entretanto, pode-se verificar que a presença deste alcalóide tende a promover um aumento, também não significativo, na liberação de LDH das fatias que não sofreram lesão, conforme observado nos grupos controles (aumento de 40 % e de 45,5 %, respectivamente para cada concentração) [F(5,136)=5,13; $p < 0,001$]. Nas concentrações de 50 μM e de 100 μM , verifica-se na Figura 1.10 que a boldina promoveu um aumento do efluxo de LDH tanto das fatias isquêmicas tratadas (30 % e 40%) como das fatias controle tratadas (126 % e 141 %) com o alcalóide, sugerindo maior lesão celular [F(5,112)=15,76; $p < 0,001$].

Pelo ensaio de MTT, observa-se que as concentrações de 1 μM e 10 μM de boldina promoveram um aumento na viabilidade mitocondrial das fatias isquêmicas, de 10 % e de 28 %, respectivamente, significativo apenas para a concentração mais elevada (Figura 1.11) [F(5,111)=4,84; $p < 0,001$]. Entretanto, foi verificada uma diminuição da viabilidade mitocondrial para as concentrações de 50 μM e 100 μM de boldina tanto nas fatias controle tratadas com o alcalóide (12,5 % e 18,5 %) como nas fatias isquêmicas tratadas (9,0 % e 15,0 %), em ambos os casos significativa apenas para as concentrações mais elevadas (Figura 1.12) [F(5,82)=7,90; $p < 0,001$].



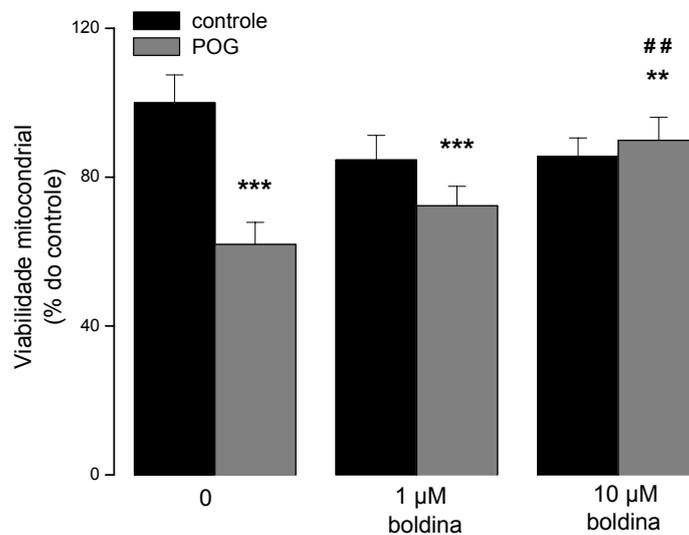
*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001 em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.9 Efeito *in vitro* da boldina 1 e 10 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



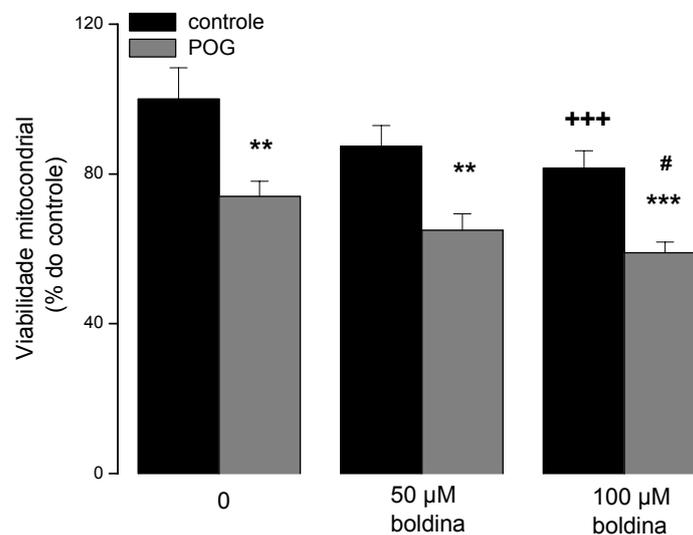
*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001 em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.10 Efeito *in vitro* da boldina 50 e 100 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.11 Efeito *in vitro* da boldina 1 e 10 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



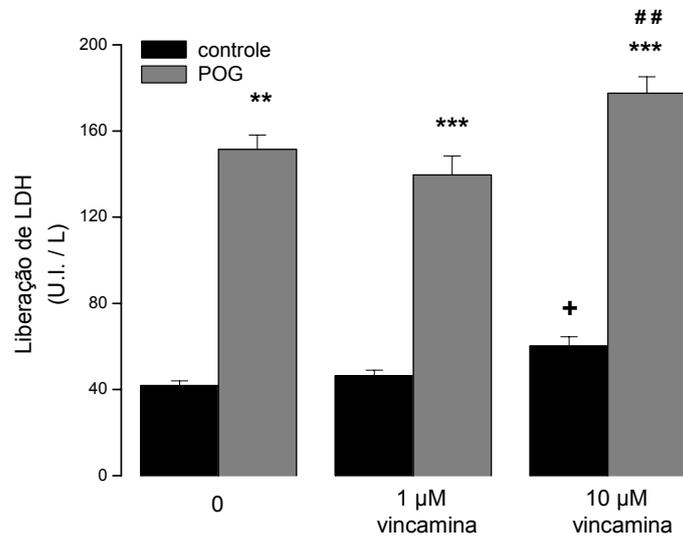
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.12 Efeito *in vitro* da boldina 50 e 100 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.

1.5.3 Avaliação do efeito do alcalóide vincamina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose

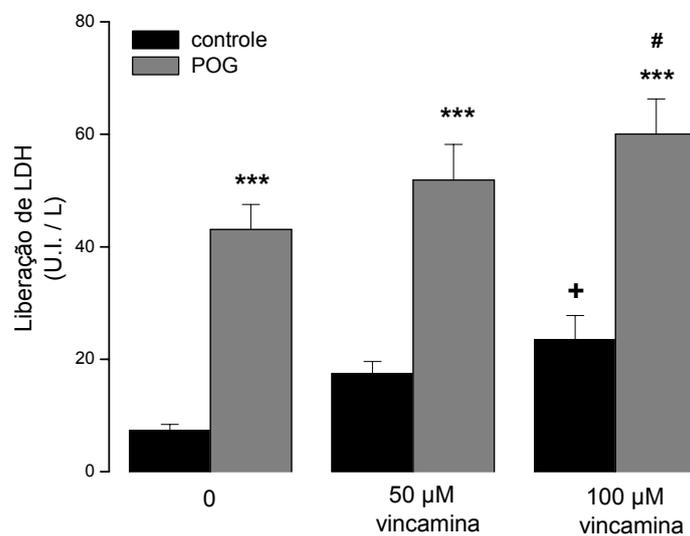
Nas concentrações de 1 e 10 μM de vincamina, verificou-se um aumento na liberação de LDH das fatias de hipocampo controle tratadas com o alcalóide, de 11 % e 44 %, respectivamente para cada concentração, mas significativo apenas para a concentração mais elevada. No grupo referente às fatias que sofreram privação de oxigênio e glicose, somente foi significativo o aumento de 17 % na liberação da enzima, promovido pela vincamina na concentração de 10 μM em comparação com as fatias isquêmicas não tratadas, conforme mostra a Figura 1.13 [$F(5,78)=108,95$; $p<0,001$]. Já a concentração de 100 μM de vincamina promoveu um grande aumento na liberação de LDH citosólico, em torno de 220 % em relação ao controle sem tratamento (Figura 1.14). Esta mesma concentração também não conseguiu reverter os danos celulares provocados pela POG, promovendo uma liberação de enzima das fatias também significativamente maior que a do grupo isquêmico sem tratamento, em cerca de 40 % [$F(5,78)=22,11$; $p<0,001$].

A Figura 1.15 mostra que a presença deste alcalóide nas fatias isquêmicas não promoveu efeitos significativos na atividade mitocondrial quando comparadas ao grupo isquêmico sem tratamento, embora seja visualizada uma tendência à diminuição da viabilidade mitocondrial nas mesmas [$F(5,81)=4,63$; $p<0,001$]. Já a vincamina na concentração de 50 μM promoveu uma diminuição significativa de 17 % neste parâmetro no grupo controle, em comparação ao controle sem alcalóide, enquanto que vincamina 100 μM foi significativamente igual ao controle não tratado. Nas fatias que sofreram isquemia, a concentração de 50 μM foi significativamente igual ao grupo POG sem tratamento, enquanto que 100 μM de vincamina promoveu um aumento significativo de 12 % da viabilidade mitocondrial em relação ao POG sem tratamento, conforme visto na Figura 1.16 [$F(5,92)=7,83$; $p<0,001$].



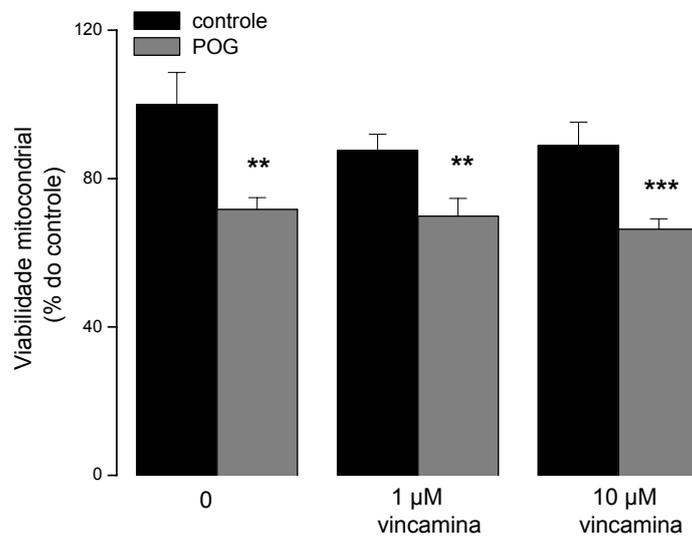
*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001 em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.13 Efeito *in vitro* da vincamina 1 e 10 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



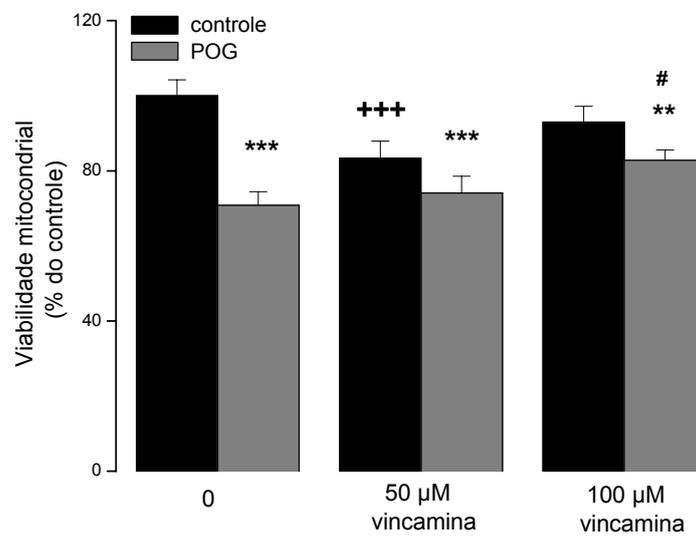
*p<0,05;**p<0,01;***p<0,001 em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.14 Efeito *in vitro* da vincamina 50 e 100 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.15 Efeito *in vitro* da vincamina 1 e 10 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



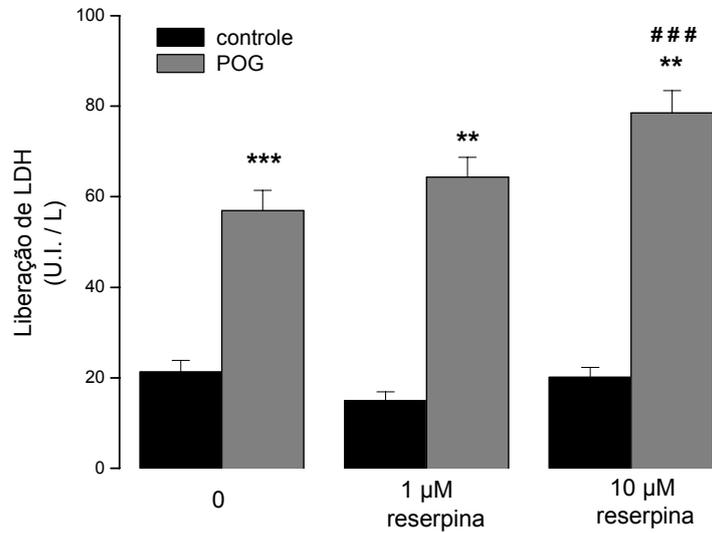
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.16 Efeito *in vitro* da vincamina 50 e 100 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.

1.5.4 Avaliação do efeito do alcalóide reserpina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose

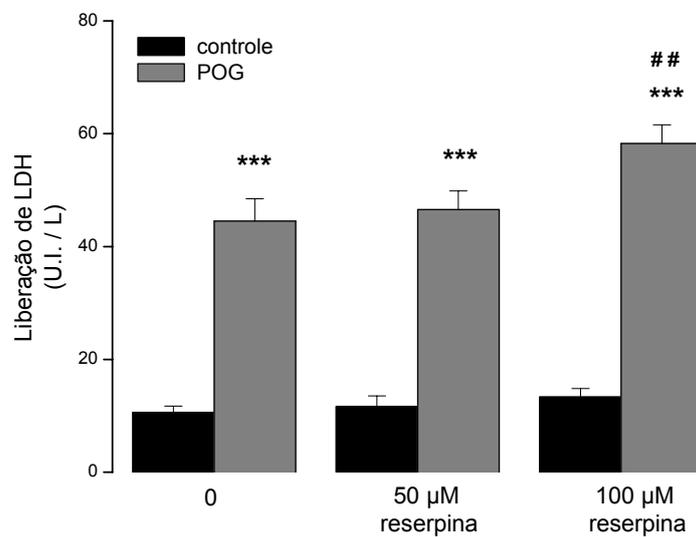
Não foram observadas diferenças significativas entre as fatias de hipocampo controles tratadas e não tratadas com reserpina, embora pode-se visualizar uma tendência à redução na liberação de LDH para as concentrações de 1 e 10 μM (Figura 1.17). Nas fatias que sofreram POG, a presença de reserpina na concentração de 10 μM promoveu um aumento significativo de 38 % na liberação da enzima em relação ao grupo isquêmico sem tratamento [$F(5,90)=56,88$; $p<0,001$]. Pode-se visualizar na figura 1.18 que as concentrações de 50 e 100 μM não promoveram efeitos significativos no efluxo de LDH celular nas fatias controles, mas a concentração de 100 μM quando presente nas fatias isquêmicas promoveu um aumento de 31 % na sua liberação. A presença de reserpina 50 μM também promoveu um aumento da liberação, mas neste caso não significativo [$F(5,78)=57,61$; $p<0,001$].

Da mesma maneira, as concentrações de 1 e 10 μM de reserpina não promoveram alterações significativas na viabilidade mitocondrial nos grupos controles, embora percebe-se que as fatias com 10 μM de alcalóide foram 3,4 % mais viáveis (Figura 1.19). Não houve diferenças significativas também entre os grupos isquêmicos para estas concentrações [$F(5,81)=8,19$; $p<0,001$]. Para 50 e 100 μM , houve um aumento significativo na viabilidade mitocondrial nas fatias controles (13 % e 17 % para cada concentração, respectivamente). Para os grupos isquêmicos, os efeitos do alcalóide não foram significativos (Figura 1.20) [$F(5,80)=21,91$; $p<0,001$].



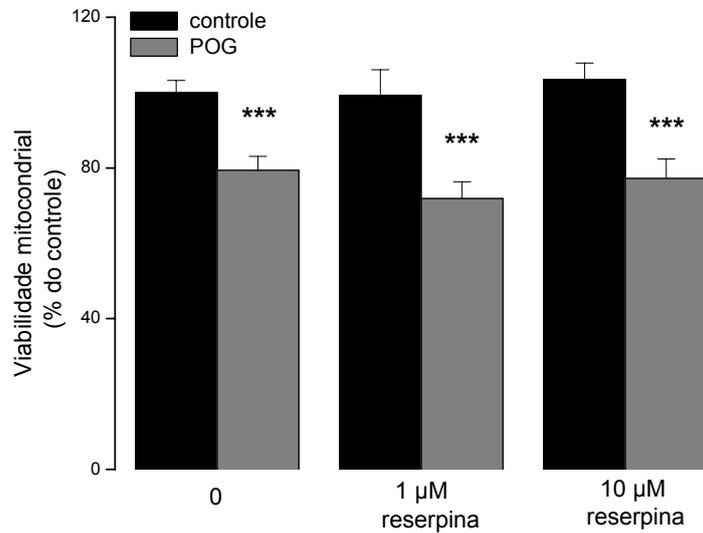
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.17 Efeito *in vitro* da reserpina 1 e 10 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



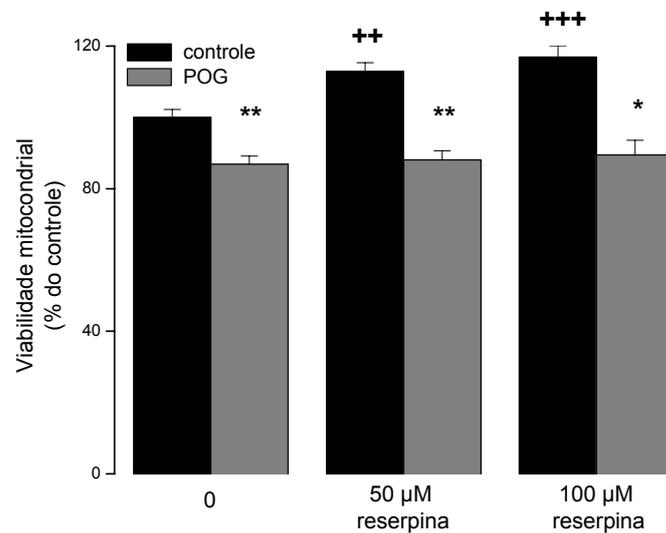
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.18 Efeito *in vitro* da reserpina 50 e 100 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.19 Efeito *in vitro* da reserpina 1 e 10 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



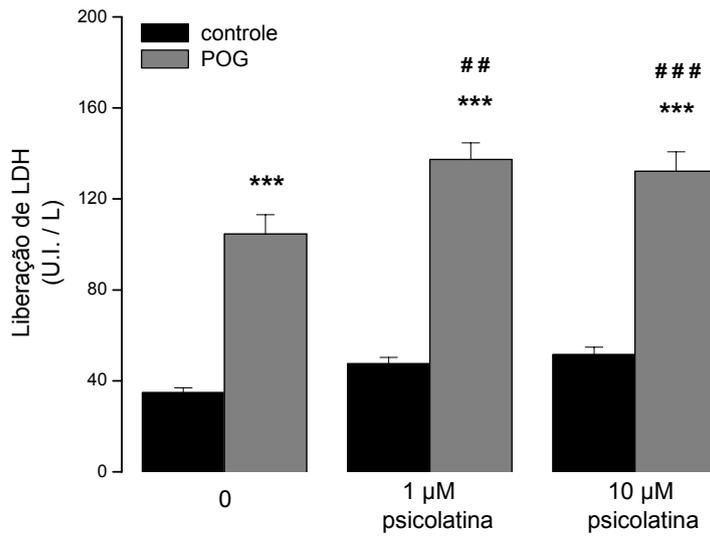
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.20 Efeito *in vitro* da reserpina 50 e 100 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.

1.5.5 Avaliação do efeito do alcalóide psicolatina sobre fatias de hipocampo de ratos submetidos à privação de oxigênio e glicose

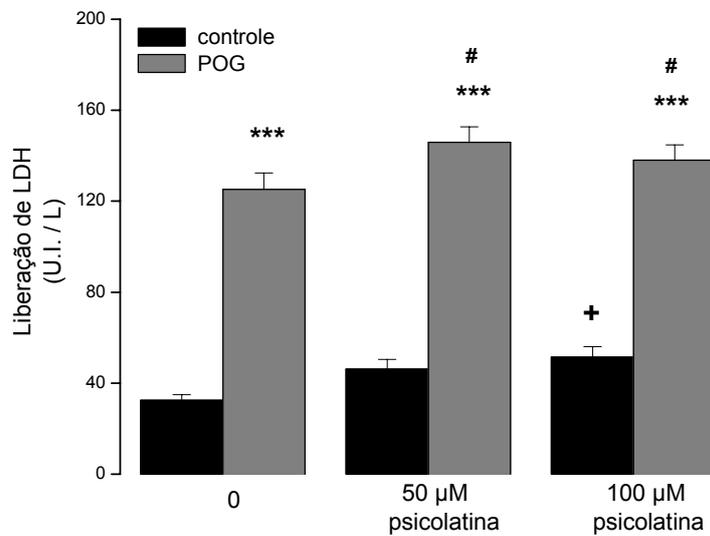
O alcalóide psicolatina nas concentrações de 1 e 10 μM não promoveu alterações significativas na liberação da enzima LDH a partir das fatias hipocâmpais entre os grupos controles tratados e o grupo não tratado (Figura 1.21). Entretanto, entre as fatias que sofreram POG, a liberação foi significativamente maior para o grupo tratado com 1 μM (31,5 %) e 10 μM de alcalóide (26,5 %), em relação às fatias isquêmicas não tratadas [$F(5,88)=66,52$; $p<0,001$]. Nas concentrações mais elevadas, houve um aumento na liberação da enzima para os grupos controles tratados em relação às fatias sem alcalóide, mas este efeito só foi significativo para 100 μM (58,5 %), conforme Figura 1.22. Entre as fatias isquêmicas, a psicolatina promoveu um aumento significativo no efluxo de LDH para o meio de incubação nas concentrações de 50 μM (16,5 %) e 100 μM (10 %), com relação ao grupo POG sem tratamento [$F(5,88)=85,40$; $p<0,001$].

As concentrações de 1 e 10 μM de psicolatina não promoveram um aumento significativo na viabilidade mitocondrial das fatias controles tratadas com o alcalóide (Figura 1.23), bem como nas fatias expostas à POG [$F(5,84)=11,53$; $p<0,001$]. Nas concentrações de 50 e de 100 μM foi observado um aumento na viabilidade mitocondrial dos grupos controle tratados com o alcalóide, significativo apenas para 50 μM (13 %), em relação ao controle não tratado (Figura 1.24). Entretanto, as mesmas concentrações de psicolatina empregadas nas fatias isquêmicas não produziram efeitos significativos entre os grupos POG tratados e não tratados [$F(5,88)=20,56$; $p<0,001$].



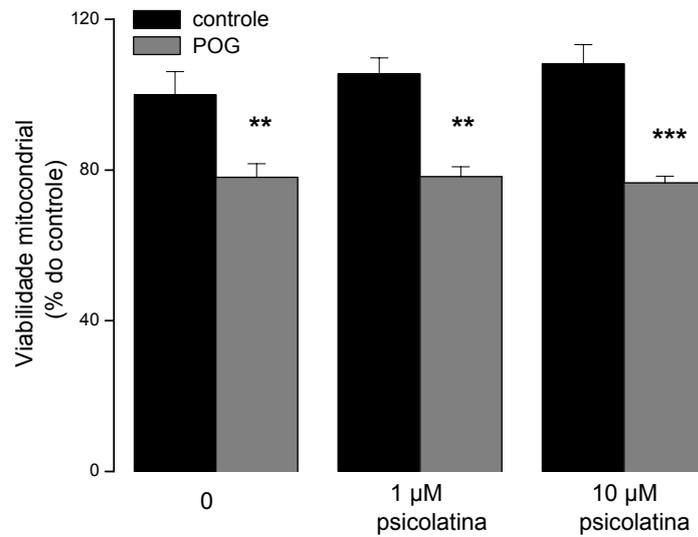
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.21 Efeito *in vitro* da psicolatina 1 e 10 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



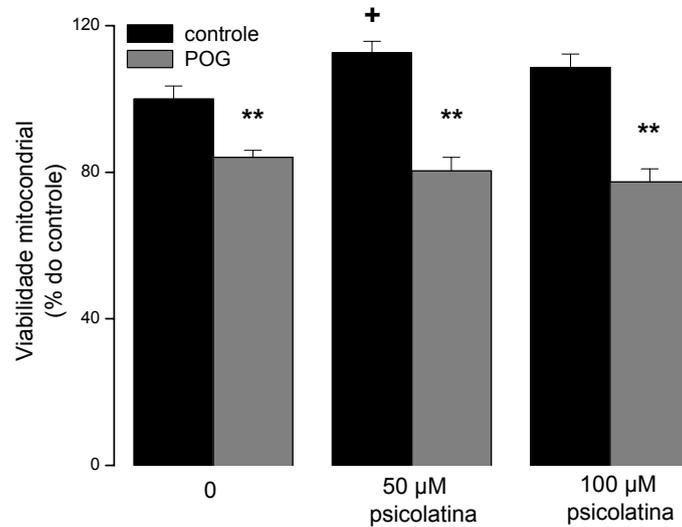
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.22 Efeito *in vitro* da psicolatina 50 e 100 μM sobre a liberação da enzima LDH a partir de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.23 Efeito *in vitro* da psicolatina 1 e 10 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao controle, + entre os grupos controles e # entre os grupos POG.

Figura 1.24 Efeito *in vitro* da psicolatina 50 e 100 μM sobre a viabilidade mitocondrial de fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG.

1.6 DISCUSSÃO

O uso de fatias de tecido cerebral tem sido bastante útil para os estudos na área de Neurociências, em especial o uso de fatias de hipocampo para a análise de danos neuronais relacionados à hipóxia e à isquemia, estudos de mecanismos de morte celular e de possíveis substâncias com propriedades neuroprotetoras (SCHURR *et al.*, 1995). Também, o uso da privação de oxigênio e glicose com o intuito de mimetizar uma condição de isquemia *in vitro* pode ser considerado interessante, uma vez que se constitui em um método relativamente simples e que reproduz vários aspectos relacionados à isquemia *in vivo*, como por exemplo, a vulnerabilidade seletiva das células CA1 do hipocampo (TAVARES *et al.*, 2001). O uso de fatias de hipocampo é bastante útil, desde que boa parte da organização celular, células inflamatórias e conexões intercelulares esteja preservada e íntegra (PELLMAR, 1995; TAYLOR *et al.*, 1995). Particularmente, o interesse em se utilizar este tipo de tecido em modelos *in vitro* de isquemia possui relação direta com as funções fisiológicas atribuídas a esta região cerebral, sobretudo o estudo dos danos celulares isquêmicos deste órgão, uma vez que lesões hipocâmpais induzidas por casos de isquemia podem estar associadas a déficits de memória e de aprendizagem, sobretudo na região CA1 do hipocampo (SCHMIDT-KASTNER & FREUND, 1991; NETTO, 1993). O modelo de POG escolhido para a realização deste trabalho tem sido bastante descrito na literatura, e emprega fatias de hipocampo sem cultivo prévio submersas em um meio sem glicose e submetidas a uma atmosfera nitrogenada, a fim de se mimetizar uma condição isquêmica. Este modelo experimental vem sendo extensamente empregado para a investigação de danos relacionados a eventos isquêmicos e neuroproteção (MORO *et al.*, 1998; CÁRDENAS *et al.*, 2000; MORO *et al.*, 2000).

Assim, uma vez escolhido o método *in vitro* para a avaliação dos efeitos neuroprotetores em potencial para os diferentes alcalóides selecionados, tornou-se necessária a verificação do desempenho deste método, que deveria ser realizada com o uso de um agente neuroprotetor capaz de bloquear algum dos eventos que se seguem após o insulto isquêmico. Desta maneira, escolhemos um antagonista glutamatérgico não competitivo de receptores NMDA, o MK-801. Esta substância sintética produz uma atenuação dose-dependente na ligação do glutamato tanto *in vitro* quanto *in vivo*, presente em elevadas concentrações extracelulares durante a

POG, aos seus receptores, contribuindo para a diminuição da excitotoxicidade, um mediador-chave da perda neuronal conseqüente deste processo (GOTTI *et al.*, 1990; DUGAN & CHOI, 1999). O uso deste antagonista NMDA para fins comparativos do grau de neuroproteção entre substâncias analisadas é amplamente relatado, e foram escolhidas duas diferentes concentrações (10 e 30 μM) conforme dados também da literatura (BOECK *et al.*, 2004; GERASIMOV *et al.*, 2004; SOBRADO *et al.*, 2004). Somente a concentração de 30 μM para o MK-801, a mais elevada, foi eficaz em reduzir significativamente a liberação da enzima lactato desidrogenase das fatias hipocâmpais isquêmicas em cerca de 15 %, em comparação com as fatias isquêmicas não tratadas. Entretanto, a diminuição da viabilidade mitocondrial dos grupos isquêmicos foi significativamente revertida na presença da substância para ambas as concentrações, sem haver indícios de toxicidade *in vitro* neste modelo para este antagonista, uma vez que não houve alterações na liberação de LDH ou na redução do sal de MTT entre as fatias controles na presença e na ausência de MK-801. Desta maneira, pudemos nos certificar que o modelo experimental estava respondendo de forma adequada a substâncias com propriedades neuroprotetoras.

Dentre os métodos existentes para a avaliação da morte celular induzida pela privação de oxigênio e glicose em fatias de hipocampo de ratos e para verificação de potencial efeito neuroprotetor de produtos naturais, selecionamos a medida da atividade da enzima lactato desidrogenase e o método de MTT (LOBNER, 2000). A liberação de LDH intracelular foi originalmente empregada para a medida da morte celular por necrose (KOH & CHOI, 1987), mas estudos posteriores indicaram seu uso também para a medida da enzima liberada por morte neuronal por apoptose (KOH & COTMAN, 1992), estando esta metodologia atualmente validada para a verificação dos danos celulares propiciados pela POG em fatias de hipocampo (DE ALBA *et al.*, 1999b; MORO *et al.*, 2000). O outro método de verificação escolhido foi a viabilidade mitocondrial usando o MTT. Esse sal tem sido bastante utilizado no desenvolvimento de ensaios colorimétricos para análise da sobrevivência de células de mamíferos, uma vez que esse ensaio detecta células vivas e não células mortas e ainda, sinais gerados pelo grau de ativação dessas células (MOSMANN, 1983). Esse método pode ainda ser usado para medir toxicidade, proliferação e ativação

celular, e tem sido empregado para a quantificação de danos neuronais após uma variedade de insultos em diversos sistemas bioquímicos (LOO & RILLEMA, 1998).

Inicialmente, a seleção dos alcalóides empregados nos experimentos foi dirigida tentando-se escolher substâncias com potencial capacidade neuroprotetora para danos celulares resultantes de episódios isquêmicos. Desta maneira, alcalóides com conhecida e relatada atividade farmacológica no sistema nervoso central foram selecionados, e o objetivo do presente trabalho foi de contribuir com novos dados para os estudos já iniciados com essas substâncias. O fato de serem escolhidos principalmente alcalóides indólicos para este trabalho baseou-se no fato de que a vincamina e várias moléculas com núcleo indólico derivadas desta, como o vinconato, vinpocetina e brovincamina, têm comprovadas propriedades neuroprotetoras para os danos hipocâmpais isquêmicos, havendo inclusive especialidades farmacêuticas comercializadas com esse intuito. Assim, o objetivo geral deste capítulo do trabalho foi a busca de novos agentes protetores para danos neuronais causados pela isquemia *in vitro* a partir de substâncias conhecidas e estudadas na literatura, tanto com propriedades neuroprotetoras já descritas como também em potencial. A escolha das concentrações dos alcalóides vincamina, psicotatina e reserpina neste modelo isquêmico *in vitro* foi dificultada pela falta de estudos empregando concentrações micromolares desses compostos, uma vez que a literatura somente fornece subsídios de doses para experimentos *in vivo*, motivo pelo qual optamos pela realização de uma curva de concentrações, de 1, 10, 50 e 100 μM para cada um dos alcalóides.

Preparações galênicas contendo boldo ou boldina em sua composição têm sido usadas popularmente há várias décadas para o tratamento de distúrbios hepáticos e digestivos (SPEISKY & CASSELS, 1994; O'BRIEN *et al.*, 2005). A boldina e extratos hidroalcoólicos de boldo (*Peumus boldus* Mol.) apresentam uma grande diversidade de efeitos biológicos relatados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, estando a grande maioria relacionada à característica principal deste alcalóide ser um potente antioxidante. As concentrações citadas para estes efeitos podem variar, de 2 a 10 μM para prevenir a lipoperoxidação de microsomas hepáticos humanos isolados e a inativação do citocromo P4502E1 por ação oxidativa catalisada por ATP e ferro (KRINGSTEIN & CEDERBAUM, 1995), de 16 a 20 μM para inativar completamente a autooxidação de homogeneizado de tecido cerebral (CASSELS *et*

al., 1995), de 10 a 100 μM para prevenir a lipoperoxidação de membranas de eritrócitos induzida por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (SPEISKY *et al.*, 1991a) e 200 μM para efeito citoprotetor e inibidor da lipoperoxidação induzida por hidroperóxido de *t*-butila em hepatócitos de ratos isolados (BANNACH *et al.*, 1996). Em ensaios *in vivo*, a boldina nas doses de 10 e 20 mg/kg não promoveu ação antiinflamatória em ratos, empregando-se o modelo de edema em pata induzido pela carragenina (LANHERS *et al.*, 1991), na dose de 40 mg/kg demonstrou ser um antagonista dopaminérgico seletivo para receptores D1 na região do estriato em camundongos (ASENCIO *et al.*, 1999) e antagonista para receptores D2 na mesma região cerebral em camundongos, alterando significativamente a concentração de dopamina e seus metabólitos (LOGHIN *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos com a boldina sugerem que sua presença nas fatias de hipocampo possa por si só induzir danos celulares nas fatias de hipocampo submetidas ou não à POG. A citotoxicidade da boldina é verificada em todas as concentrações empregadas para as fatias dos grupos controles, uma vez que este alcalóide promoveu um aumento na liberação de LDH em todos os momentos, mas significativo somente para 50 e 100 μM . Não houve diferenças significativas entre as fatias isquêmicas tratadas ou não com boldina nas concentrações de 1 a 50 μM , mas verificamos que existe uma tendência ao aumento de liberação de LDH para o meio de incubação, efeito este somente significativo para a dose mais elevada, de 100 μM . Esta concentração demonstrou, portanto, ser a mais tóxica para as fatias hipocâmpais, uma vez que por análise da viabilidade mitocondrial, esta concentração não reverteu os danos propiciados pela isquemia, promovendo ainda uma diminuição significativa desta viabilidade quando presente nas fatias do grupo controle não isquêmico.

Já é bastante conhecida a relação entre a elevada produção de radicais livres em episódios isquêmicos devido à excitotoxicidade e ao influxo celular de íons Ca^{2+} , e o conseqüente dano celular provocado pelo estresse oxidativo nas células neuronais (TRAYSTMAN *et al.*, 1991; SUN & CHEN, 1998). Estudos *in vitro* anteriores com culturas de células relacionam a presença de boldina à diminuição da morte celular na presença de dopamina em cultura de células PC12, e este efeito protetor foi atribuído a características deste alcalóide ser seqüestrador de radicais hidroxila, os quais poderiam lesionar as mitocôndrias e promover a apoptose celular

(YOUN *et al.*, 2002). Nesse trabalho, a toxicidade para este alcalóide poderia ser explicada a partir de sua distribuição e concentração tecidual alcançada a partir de sua administração, uma vez que dados farmacocinéticos indicam que após a administração oral de boldina em ratos, este alcalóide alcançou concentrações na ordem de nanomolar encontradas no tecido cerebral (JIMÉNEZ & SPEISKY, 2000), uma disponibilidade muito baixa em comparação às concentrações testadas. Aliado a esse fato, o curto tempo de meia vida deste alcalóide nos leva a pressupor que em elevadas concentrações a boldina seja realmente tóxica para o tecido cerebral, efeito este acentuado por ação de outra situação lesiva em potencial para as células neuronais, a privação de oxigênio e glicose. A concentração de 10 μM deste alcalóide, em contrapartida, foi a única que promoveu um aumento na viabilidade mitocondrial, sem efeitos significativos na liberação de LDH durante a POG, de forma que possa ser considerada a única concentração benéfica em potencial.

A vincamina e seus derivados são extensivamente descritos na literatura como compostos empregados em casos de distúrbios cerebrovasculares, devido a suas propriedades vasodilatadoras, melhorando tanto o fluxo sanguíneo cerebral como a utilização de oxigênio e glicose pelas áreas afetadas pela isquemia (KATSURAGI *et al.*, 1984; SUN & TAKEUCHI, 1989). Derivados sintéticos da vincamina, como o vinconato e a vinpocetina foram concebidos para melhor atravessarem a barreira hematoencefálica e alcançarem o hipocampo, a fim de prevenirem danos neuronais isquêmicos nesta região cerebral (ARAKI *et al.*, 1991a; ARAKI *et al.*, 1991b). Assim, grande parte dos estudos realizados com essas substâncias analisa os efeitos e mecanismos de ação em modelos experimentais *in vivo*. Na dose de 30 mg/kg a vincamina previniu deficits de memória induzidos pela hipóxia e pela administração de escopolamina em ratos (DENOBLE *et al.*, 1986), na dose de 47 mg/kg houve um aumento no número de ratos que sobreviveram após exposição ao gás nitrogênio puro por 80 segundos, enquanto que a vinpocetina e o vinconato foram eficazes nas doses de 16,6 e 25 mg/kg (KING, 1988). Em experimentos *in vitro*, foram empregadas concentrações de vincamina entre 1 e 100 μM , que foram capazes de atenuar a excitabilidade dos neurônios piramidais na região CA1 do hipocampo (OLPE *et al.*, 1982), de 26 μM para prevenção de morte celular induzida em cultura de células corticais e de 72 μM para bloqueio de canais de Na^+ (ERDÖ *et al.*, 1996).

Nossos resultados obtidos com a vincamina sugerem que a concentração menos tóxica avaliada foi a mais baixa testada, de 1 μM , uma vez que dentre as quatro concentrações a liberação de LDH só foi reduzida, embora não significativamente, para esta concentração de alcalóide, efeito este também verificado pela viabilidade mitocondrial, que foi significativamente igual a das fatias controles na ausência de vincamina. As concentrações de 10 e de 100 μM foram as mais tóxicas, pois promoveram um aumento significativo da liberação da enzima lactato desidrogenase, de 17 % e de 40 %, respectivamente, em relação ao grupo isquêmico sem tratamento, efeito também verificado para a concentração de 50 μM , embora o aumento nesse caso não tenha sido significativo. Em contrapartida, quando avaliamos a viabilidade mitocondrial, verificamos que a concentração de 100 μM , que promoveu grande liberação de LDH após a POG, também promoveu um aumento na viabilidade mitocondrial das fatias que sofreram tal lesão. Esse fato sugere a hipótese de que a vincamina quando presente nas fatias hipocâmpais que sofreram privação de oxigênio e glicose possa colaborar com os danos celulares provocados pela isquemia, através do extravazamento de uma maior quantidade de LDH intracelular, mas sem produzir danos significativos sobre as mitocôndrias durante processos isquêmicos. A vincamina é descrita como um fraco antagonista competitivo para os canais de cálcio, eficaz somente na concentração de 705 μM , enquanto que seu derivado brovincamina é considerado um potente antagonista, eficaz na concentração de 135 μM e de potência comparável a do verapamil (SUN & TAKEUCHI, 1989). Este fato pode em parte explicar o efeito no aumento da viabilidade, uma vez que as mitocôndrias sofrem danos isquêmicos devido a abertura de seus poros por ação de radicais livres e acúmulo de cálcio celular (LIPTON, 1999). Nesta concentração de vincamina, seu efeito antagônico pode ter sido somente verificado em nível mitocondrial, necessitando de uma concentração maior, como a relatada na literatura para haver diminuição significativa da lesão celular.

Não existem relatos de efeito neuroprotetor para a vincamina em modelos de isquemia *in vitro* e nem para seus derivados análogos, somente em ensaios *in vivo*. Neste caso, tanto o metabolismo do alcalóide como sua distribuição tecidual após sua administração em animais possam desempenhar um importante papel quanto

aos efeitos promovidos nesses modelos, quando comparados aos resultados obtidos em fatias hipocâmpais no presente trabalho.

Para o alcalóide reserpina, a grande maioria das doses relatadas partiam de experimentos *in vivo*, motivo pelo qual resolvemos seguir para esta substância a mesma curva de concentrações empregada anteriormente para os demais alcalóides.

Verificamos que a reserpina não promoveu efeitos significativos na liberação de LDH e nem na viabilidade mitocondrial quando presente nas fatias controles, e nas concentrações de 50 e 100 μM percebemos ainda um aumento significativo na viabilidade mitocondrial quando presente nos grupos não isquêmicos, de forma que este alcalóide possa ser considerado menos tóxico que a boldina e vincamina, que exibiram efeitos neurotóxicos em potencial. Entretanto, as concentrações de 10 e de 100 μM colaboraram com o dano celular promovido pela privação de oxigênio e glicose, através do aumento na liberação de LDH para o meio de incubação das fatias. Em nenhuma concentração testada houve diminuição significativa da viabilidade mitocondrial, de forma seus efeitos tóxicos estejam possivelmente relacionados com danos às membranas celulares.

Da mesma maneira, o alcalóide psicolatina também possui efeitos psicofarmacológicos já descritos na literatura, todos obtidos através de ensaios *in vivo*, de maneira que novamente optamos pela realização de uma curva de concentrações com este alcalóide.

Verificamos que em todas as concentrações de psicolatina testadas houve demonstração de efeitos tóxicos para as fatias de hipocampo, uma vez que este alcalóide colaborou com um aumento significativo na liberação de LDH intracelular nos grupos submetidos à POG em todas as concentrações. Não houve alterações significativas na viabilidade mitocondrial nos grupos isquêmicos, mas dentre os grupos controles, 50 μM demonstrou reduzir a viabilidade significativamente em relação ao controle sem alcalóide.

Vários efeitos comportamentais foram atribuídos à psicolatina, sendo seu perfil psicofarmacológico estabelecido bastante complexo, envolvendo a modulação tanto de receptores serotoninérgicos quanto glutamatérgicos e dopaminérgicos

(BOTH *et al.*, 2006). Foi descrita sua atividade antagonista para receptores NMDA em ratos e também efeito sinérgico quando co-administrado com MK-801 em teste de analgesia também em ratos (BOTH *et al.*, 2002), o que tornou esse alcalóide bastante interessante para verificação de seus efeitos num modelo de isquemia *in vitro*, onde a excitotoxicidade induzida pelo glutamato pode contribuir de maneira importante para os danos neuronais produzidos (GASIC & HOLLMANN, 1992). Entretanto, uma hipótese possível para os resultados *in vitro* seria de que os efeitos sobre os receptores glutamatérgicos seriam verificados apenas quando a psicotatina fosse administrada *in vivo*, de maneira que ela possa atenuar a ligação do glutamato a seus receptores, o que não foi verificado em experimentos *in vitro*.

Conforme citado anteriormente, múltiplos e independentes mecanismos, incluindo danos por radicais livres, perda da competência de tradução, ativação de proteólise e indução de apoptose estão envolvidos na morte neuronal pós-isquêmica, e nesse caso a grande dificuldade seria encontrar um fármaco que pudesse intervir em todas as etapas deste processo (WHITE *et al.*, 2000). Assim, a atividade *in vitro* para esses alcalóides não demonstra que tenham ou não uso terapêutico, pois modelos *in vitro* livres de efeitos farmacocinéticos e de biotransformação, como o usado aqui, são um indicador de efeito e de que os alcalóides vincamina, boldina, reserpina e psicotatina merecem atenção.

Alcalóides indólicos com efeitos neurotóxicos já foram descritos anteriormente na literatura (MROUE *et al.*, 1996), e a toxicidade apresentada pela psicotatina, em todas as concentrações e para os demais alcalóides em algumas concentrações foi evidenciado neste modelo experimental de isquemia *in vitro*. Para a ibogaína, um agente antagonista para os receptores NMDA, assim como a psicotatina (POPIK *et al.*, 1995; LAYER *et al.*, 1996), há relatos de danos excitotóxicos para as células de Purkinje, produzindo lesões neuronais nesta região cerebral (O'HEARN & MOLLIVER, 2004), apesar de seu uso estar relacionado no tratamento para abstinência de drogas de abuso.

Em relação à vincamina e seus derivados, apesar de serem extensivamente citados como importantes fármacos empregados em distúrbios cerebrovasculares (MAZÁK *et al.*, 2003) e de seus efeitos farmacológicos relacionados à diminuição de lesões neuronais provocadas por isquemia serem muito estudadas em ensaios *in*

vivo, não há relatos de ensaios *in vitro* em modelos isquêmicos citados na literatura para esses alcalóides.

Nesse caso, muito importante é a limitação imposta pelos ensaios *in vitro* com relação aos efeitos sistêmicos e complexos, que podem ser responsáveis por respostas benéficas ou adversas e somente detectáveis através de propostas de investigação *in vivo* (GEBHARDT *et al.*, 2000).

Percebemos que muitos dos efeitos tóxicos discutidos para os alcalóides empregados possuem relação com sua concentração empregada, muito elevada para a obtenção de efeitos benéficos no tecido cerebral, e com as características farmacocinéticas das substâncias, que nesse caso não puderam ser avaliadas por se tratar de um ensaio *in vitro* e que talvez fossem imprescindíveis para mediar uma possível atividade neuroprotetora em episódios isquêmicos, uma vez que todos eles possam ser considerados neuroprotetores em potencial.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE FATIAS DE HIPOCAMPO DE RATOS SUBMETIDAS À PRIVAÇÃO DE OXIGÊNIO E GLICOSE E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO DA BOLDINA

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Radicais livres

Radicaís livres são espécies que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica, capazes de existência independente. Esses elétrons desemparelhados podem alterar a reatividade química de um átomo ou molécula, tornando-a mais reativa que seu correspondente não-radical, devido à sua capacidade de seqüestrar elétrons de outras moléculas. Estas espécies podem iniciar reações capazes de danificar macromoléculas como proteínas, lipídios e DNA, assim como as membranas biológicas (PAAL, 2002).

Estas moléculas são continuamente produzidas durante o metabolismo oxidativo normal, como, por exemplo, na cadeia respiratória nas mitocôndrias, onde ocorre a redução tetravalente do oxigênio formando uma molécula de água. Neste processo, cerca de 1 a 5 % de todo o oxigênio consumido escapa na forma de radicaís livres (HALLIWELL, 1992). As moléculas derivadas da redução incompleta do oxigênio são chamados de espécies reativas do oxigênio (ROS) e são representadas pelo radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) o intermediário peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o altamente reativo radical hidroxila (OH^{\bullet}). Outras moléculas reativas diferentes das ROS podem ser geradas na célula, tanto na mitocôndria quanto no citosol. Elas são as espécies reativas do nitrogênio (RNS), representadas principalmente pelo óxido nítrico (NO^{\bullet}) e pelo peroxinitrito ($ONOO^-$). O ON^{\bullet} é formado pela ação da enzima óxido nítrico sintase a partir de arginina, enquanto que o $ONOO^-$, é formado quando o ON^{\bullet} é combinado com o $O_2^{\bullet-}$. Outras moléculas reativas são formadas durante processos de oxidação, como por exemplo, os radicaís peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}), gerados durante a oxidação dos lipídios.

Os intermediários peróxido de hidrogênio e peroxinitrito não são por definição radicaís livres, mas podem levar à geração destes através de várias reações químicas. Desta forma, os radicaís livres e moléculas relacionadas podem ser denominados de espécies reativas (ER) (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001; HALLIWELL, 2001).

Reações oxidativas com potencial gerador de radicais livres em condições fisiológicas são bastante importantes em várias outras reações biológicas, como aquelas do citocromo P450s, da enzima ciclooxigenase dentre outras, as quais são necessárias para o funcionamento celular normal. A produção de ER também está envolvida na sinalização de funções biológicas e na ativação e migração de leucócitos durante o processo inflamatório. Leucócitos, macrófagos e neutrófilos são capazes de realizar uma redução monovalente do oxigênio molecular até o radical superóxido através da enzima NADPH oxidase, além da enzima mieloperoxidase, que catalisa a reação de conversão de H_2O_2 em hipoclorito. Além disso, proteínas contendo metais ficam disponíveis nos sítios de inflamação, como a hemoglobina liberada de hemácias lisadas, podendo causar a degradação dos anéis heme da hemoglobina e da mieloglobina pelo excesso de H_2O_2 , liberando íons ferro. Tanto íons ferro quanto íons cobre podem reagir com H_2O_2 através de reações em série, chamadas reações de Fenton e Haber-Weiss, gerando radicais hidroxila, ER mais reativa e tóxica (HALLIWELL, 1992; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

2.1.2 Lipoperoxidação e métodos para sua avaliação em sistemas biológicos

Danos oxidativos em macromoléculas podem ser causados diretamente pelo excesso de radicais livres gerados, incluindo, destruição específica de proteínas, danos ao DNA e a peroxidação lipídica. O radical livre nesses casos ataca uma molécula, seqüestrando um átomo de hidrogênio de um grupamento químico (HALLIWELL, 1992).

A lipoperoxidação (LPO) constitui-se num processo fisiológico normal e está envolvida na renovação das membranas celulares, bem como na produção de eicosanóides (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Entretanto, níveis aumentados na LPO das membranas podem afetar a integridade dos processos fisiológicos por alterar diretamente a fluidez, permeabilidade, potencial elétrico, atividade de proteínas, receptores e canais iônicos de membrana, podendo levar ainda à ruptura de membranas de organelas e da própria célula. As membranas celulares, formadas principalmente por lipídios poliinsaturados, são particularmente vulneráveis ao ataque de radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999a).

A LPO é uma reação em cadeia (Figura 2.1), iniciada pelo ataque de uma ER, principalmente radicais hidroxila, a um grupamento metileno da cadeia lateral de um ácido graxo poliinsaturado. A retirada de um elétron de grupamentos metileno bis-aliílicos, ou seja, aqueles com ligações duplas conjugadas, é facilitada pelo fato da ligação dupla adjacente diminuir a energia de ligação dos átomos de hidrogênio presentes no próximo carbono. O radical formado no carbono estabiliza-se por um rearranjo molecular formando um dieno conjugado ou, mais comumente, combina-se com oxigênio molecular formando um radical peroxila. Estes radicais formados são capazes de abstrair íons hidrogênio de outra molécula de lipídio, e o carbono radicalar formado pode reagir com O₂ para formar outro radical peroxila, propagando-se assim a reação em cadeia da LPO. Outro destino para o radical peroxila pode ser sua combinação com o hidrogênio por ele abstraído formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH), assim como peróxidos e endoperóxidos cíclicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999a).

Os produtos finais da decomposição dos LOOH acumulados na célula por efeito da LPO são vários, dentre os quais destacam-se os aldeídos saturados, como o hexanal; hidrocarbonetos voláteis, como o etano, etileno e pentano; e aldeídos insaturados, como o malonodialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (4-HNE). Sob condições fisiológicas, o MDA pode atacar proteínas e também reagir com as bases do DNA, induzindo lesões mutagênicas, enquanto que o 4-HNE pode induzir danos mitocondriais, citotóxicos, hepatotóxicos, mutagênicos e genotóxicos (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990; ESTERBAUER *et al.*, 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999a).

Sendo a LPO um processo complexo e que ocorre em múltiplos estágios, diversas técnicas foram desenvolvidas para a avaliação da peroxidação em sistemas biológicos, cada uma através da medida de um parâmetro específico. Dessa maneira, são descritos ensaios para a medida da perda de substrato pelo consumo de ácidos graxos insaturados durante a LPO, ensaios para a determinação de LOOH, medida da absorção de dienos conjugados na região do UV, o uso de cromatografia gasosa para a quantificação de hidrocarbonetos voláteis, dentre outros. Os aldeídos MDA e 4-HNE podem ser detectados e quantificados através de sua fluorescência e absorção no UV, podendo-se empregar neste caso cromatografia líquida (CLAE). O ensaio de detecção de espécies reativas ao ácido

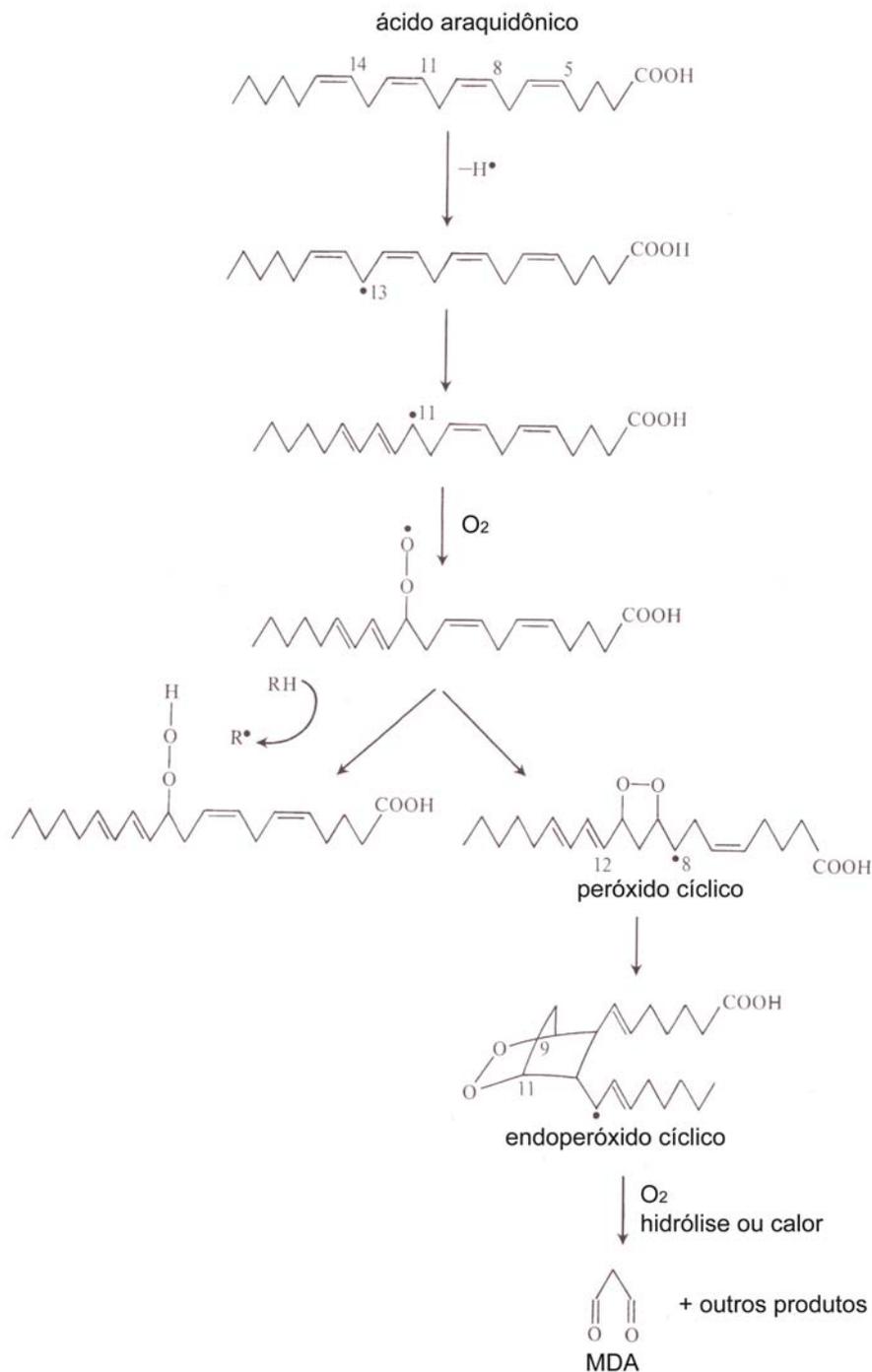


Figura 2.1 Mecanismo proposto para a formação de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos cíclicos a partir do ácido araquidônico. Adaptado de HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999a.

tiobarbitúrico (TBA-RS) é um dos métodos *in vitro* mais antigos empregados para a detecção de MDA e amplamente usado, por ser um método simples e que pode ser aplicado para diversos materiais biológicos, como plasma, tecidos e urina, bem como em homogêneos de tecidos frescos (ESTERBAUER & CHEESEMAN, 1990; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999b).

2.1.3 Defesas antioxidantes no cérebro

A importância do processo de geração de radicais livres pode ser avaliada pelo grande número e diversidade de antioxidantes presentes nas células. As defesas celulares contra as espécies reativas podem ser classificadas em duas classes, a dos antioxidantes de natureza enzimática, e outra de antioxidantes não-enzimáticos.

2.1.3.1 Enzimas antioxidantes

As principais defesas antioxidantes enzimáticas celulares são a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a superóxido dismutase (SOD). A enzima SOD é uma defesa essencial contra o íon superóxido, catalisando a reação de dismutação de dois destes radicais em peróxido de hidrogênio. A ação da SOD inibe muitas reações de auto-oxidação dependentes de metais (incluindo as catecolaminas) que tendem a ser propagadas na presença do radical superóxido (FRIDOVICH, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE 1999c). Diferentes tipos de SOD são encontradas no cérebro, como as que contêm cobre e zinco no sítio ativo (CuZnSOD), presentes no citoplasma; e manganês (MnSOD), encontradas na matriz mitocondrial (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001).

As ações de todos os tipos de SOD geram H_2O_2 , que pode ser removido diretamente pela catalase, uma enzima exclusivamente peroxissomal, na maioria dos tecidos (CHANCE *et al.*, 1979). A CAT catalisa a hidrólise do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Embora presente em todas as partes do corpo, no cérebro ela se encontra em menores proporções (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001).

A enzima GPx pode ser considerada como o maior sistema protetor contra a LPO induzida exógena e endogenamente. Há dois tipos de GPx, uma que emprega selênio como cofator, encontrada no citosol e mitocôndria; e outra independente de

selênio, encontrada no citosol e que metaboliza apenas hidroperóxidos orgânicos (WENDEL, 1981). A redução do peróxido de hidrogênio em água pela GPx ocorre com a concomitante oxidação da glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSH). Esta, por sua vez, é reciclada novamente a GSH, através da enzima glutathiona redutase (GR), que está acoplada à GPx (CHANCE *et al.*, 1979).

2.1.3.2 Antioxidantes não-enzimáticos

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, em baixas concentrações, retardam ou previnem a oxidação de determinados substratos. Assim, eles podem atuar como protetores contra a oxidação de biomoléculas por radicais livres, impedindo a reação desencadeada pelos mesmos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999c). Uma relação próxima entre nutrição e defesa antioxidante pode ser considerada, uma vez que alguns destes compostos de baixo peso molecular, como o ácido ascórbico e o α -tocoferol, são obtidos exclusivamente da dieta e não são sintetizados *in vivo* (HALLIWELL, 2001; CUI *et al.*, 2004).

O tripeptídeo glutathiona (GSH) é o principal tiol livre na maioria das células e participa de diversos processos biológicos, incluindo remoção de hidroperóxidos lipídicos, proteção contra radiações ionizantes e proteção do grupamento sulfidril de proteínas contra oxidação. Atua também como um cofator enzimático e é particularmente importante na reação catalisada pela GPx, conforme descrito anteriormente (CHANCE *et al.*, 1979; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999c).

Tanto o ácido ascórbico quanto a glutathiona estão presentes em grandes concentrações no sistema nervoso central (SNC), enquanto que no plasma o ácido úrico é o principal antioxidante não-enzimático encontrado (EVELSON *et al.*, 2001). As principais funções do ácido ascórbico e da glutathiona são de regenerar o α -tocoferol a partir do radical tocoferil (WARD & PETERS, 1995; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999c). O α -tocoferol é um antioxidante lipossolúvel capaz de interromper a reação em cadeia da LPO na porção lipídica das membranas celulares (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001), devido principalmente ao seu grupamento fenol, que elimina rapidamente radicais peroxila e os converte em radicais tocoferila, muito menos reativos (HALLIWELL, 2001).

Outros importantes antioxidantes não-enzimáticos incluem a melatonina, hormônio produzido a partir da metilação e acetilação da serotonina, e de particular interesse para o SNC; além de agentes quelantes de metais, fármacos como selegilina, carvedilol, estatinas e *N*-acetilcisteína e produtos naturais, como os flavonóides, carotenóides, ácidos fenólicos e o licopeno (HALLIWELL, 1991; WAJNER *et al.*, 2004).

2.1.4 Suscetibilidade do cérebro a danos oxidativos

O termo “estresse oxidativo” (EO) pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de ER de oxigênio e de nitrogênio nos sistemas biológicos e o sistema de defesa antioxidante, havendo um distúrbio no balanço do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante endógeno, levando a eventuais danos em macromoléculas do organismo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999a). O dano celular originado pelo EO tem sido relacionado à patologia de várias desordens do SNC, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, acidentes vasculares cerebrais, demência, síndrome de Down, choque e edema cerebral, entre outras (RESNICK & PARKER, 1993; GILGUN-SHERKI *et al.*, 2001).

O cérebro é particularmente vulnerável ao EO devido a vários fatores, principalmente por apresentar uma elevada taxa de atividade oxidativa metabólica; alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, substratos para a LPO; elevado consumo de oxigênio em relação aos demais tecidos; altas concentrações cerebrais de ferro, as quais são liberadas em formas capazes de catalisar formação de ER, LPO e autooxidação de neurotransmissores; formação e liberação de ER durante o metabolismo fisiológico da dopamina pela enzima monoaminoxidase (MAO) e pela liberação do glutamato, aminoácido excitatório e ainda o fato de que os danos oxidativos no cérebro tendem a ser cumulativos ao longo do tempo (GUTTERIDGE *et al.*, 1991; EVANS, 1993; RESNICK & PARKER, 1993; HALLIWELL, 2001; CUI *et al.*, 2004). Além disso, as defesas antioxidantes no cérebro são bastante modestas, com baixas concentrações das enzimas antioxidantes, em relação a outros órgãos como o fígado. Em particular, os níveis de catalase são muito baixos na maioria das regiões cerebrais (BRANNAN *et al.*, 1981). Entretanto, os microvasos responsáveis pela manutenção da integridade da barreira hematoencefálica em ratos possuem elevadas quantidades de GPx, GR e CAT, em comparação com o restante do

cérebro, o que é fundamental para o normal funcionamento deste órgão (HALLIWELL, 2001).

2.1.5 A isquemia e o estresse oxidativo

A isquemia cerebral, particularmente o período no qual a circulação sanguínea é reestabelecida, torna-se um processo gerador de grandes quantidades de radicais livres. Em condições de hipóxia isquêmica e de reoxigenação/reperfusão, o equilíbrio entre a produção de ER e o sistema de defesa antioxidante é perdido, possibilitando a formação de uma série de danos ao tecido cerebral, que são mediados por radicais livres (MATSUYAMA, 1997).

A ausência de oxigênio e glicose, substratos para a formação de ATP, causa a depleção energética nas células nervosas e é o ponto de partida para vários eventos deletérios (CHERUBINI *et al.*, 2005). A falta de ATP promove despolarização das membranas, devido à atividade reduzida de bombas, como a Na⁺/K⁺-ATPase, induzindo-se distúrbios nos gradientes iônicos transmembrana. Em seguida, ocorre influxo excessivo de íons Ca²⁺ extracelulares através de canais voltagem-dependente e também liberação de glutamato para o espaço extracelular (LIPTON, 1999). A excessiva liberação de glutamato é mediada também pela estimulação de terminais pré-sinápticos e pelo distúrbio do sistema de recaptção de glutamato, o qual é voltagem-dependente. O excesso de cálcio intracelular acumulado estimula uma série de enzimas, como proteína quinases e óxido nítrico sintase, constituindo-se num importante mecanismo que leva à morte neuronal (CHOI & ROTHMAN, 1990).

Excessiva produção de ER de oxigênio e de nitrogênio, como as ER radicais superóxido e hidroxila, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico desempenha um papel crítico aos danos induzidos pela isquemia seguida por uma reperfusão (TOMINAGA *et al.*, 1993; DIMAGL *et al.*, 1995). Estas espécies reativas podem atuar tanto diretamente, ligando-se e oxidando proteínas, DNA e lipídios da área isquêmica, como indiretamente, interagindo de maneira negativa nas rotas de sinalização celulares normais ou na regulação gênica (TRAYSTMAN *et al.*, 1991).

Assim, quando a quantidade de radicais livres aumenta significativamente no tecido cerebral, há um elevado risco de danos neuronais devido à alta suscetibilidade deste tecido ao estresse oxidativo, conforme citado anteriormente.

2.2 OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo consistem na investigação do efeito da privação de oxigênio e glicose em fatias de hipocampo de ratos sobre os parâmetros de estresse oxidativo capacidade antioxidante total (TRAP), reatividade antioxidante total (TAR) e sobre os níveis de MDA, assim como a investigação do efeito do alcalóide boldina sobre os níveis de MDA em fatias de hipocampo de ratos que foram expostas à privação de oxigênio e glicose, através da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Também foi avaliada a capacidade antioxidante da boldina através do método de TRAP.

2.3 REVISÃO DA LITERATURA

A boldina é um alcalóide majoritário encontrado tanto nas folhas como nas cascas do boldo-do-Chile (*Peumus boldus* Molina, Monimiaceae), uma árvore com crescimento abundante na região úmida e central do Chile (SPEISKY & CASSELS, 1994; O'BRIEN *et al.*, 2005). A presença desta substância é bastante distinta nas diferentes partes do vegetal, de forma que nas folhas do boldo, a concentração de boldina esteja em torno de 0,12 % a 0,14 %, enquanto que nas cascas da planta ela esteja presente em concentrações de até 6 % (URZÚA *et al.*, 1983; GOTTELAND *et al.*, 1995; QUEZADA *et al.*, 2004).

Preparações farmacêuticas contendo extratos de boldo têm sido tradicionalmente empregadas durante décadas para o tratamento de uma variedade de sintomas e doenças, como reumatismo, dores de cabeça, dores menstruais, inflamações do trato urinário, dispepsia, assim como sedativo e indutor do sono (SPEISKY & CASSELS, 1994). Entretanto, o boldo é popularmente empregado devido a suas propriedades digestivas, coleréticas e colagogas, principais indicações para o uso desta planta (JIMÉNEZ & SPEISKY, 2000). Entretanto, a confirmação da atividade colerética com o uso de modelos experimentais animais apropriados é bastante controversa, uma vez que doses bastante elevadas, tanto de extratos hidroalcoólicos de boldo como de boldina pura são necessárias para exibir tal efeito (LANHERS *et al.*, 1991).

Estudos farmacocinéticos conduzidos com este alcalóide sugerem que concentrações hepáticas superiores àquelas necessárias para exercerem efeitos antioxidantes e citoprotetores *in vitro* são alcançadas, embora seu tempo de meia-vida plasmática, de 30 minutos, seja extremamente pequeno, tanto a partir de administração oral quanto intravenosa (JIMÉNEZ & SPEISKY, 2000). Por via oral, a boldina é rapidamente absorvida, e alcança maiores concentrações teciduais no fígado, seguido pelo cérebro e pelo coração.

Uma série de atividades farmacológicas têm sido atribuídas à boldina, como efeito imunomodulador *in vitro* para células isoladas de pacientes com leucemia linfocítica crônica (GONZÁLEZ-CABELLO *et al.*, 1994); relaxante da musculatura lisa intestinal (SPEISKY *et al.*, 1991b); atividade tripanossomicida *in vitro* para

epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (MORELLO *et al.*, 1994); bloqueador neuromuscular para o diafragma através de interações com o receptor pós-sináptico de acetilcolina (KANG & CHENG, 1998); bloqueador dos canais de cálcio em útero, artéria aorta e córtex cerebral isolados de ratos (IVORRA *et al.*, 1993a; IVORRA *et al.*, 1993b; MARTÍNEZ *et al.*, 1999) e antagonista *in vivo* para os α -adrenorreceptores em artéria aorta de ratos (ELTZE *et al.*, 2002). Além disso, devido a sua semelhança estrutural com a apomorfina, um agonista dopaminérgico, a boldina também possui descritas atividades neurolépticas *in vivo*, como efeito anticonvulsivante e antinociceptivo, o que pode ser provavelmente mediado via bloqueio de receptores dopaminérgicos D2 (ZETLER, 1988). Estudos posteriores confirmaram que este alcalóide possui elevada afinidade *in vitro* tanto para receptores dopaminérgicos D1 como D2 (ASENCIO *et al.*, 1999; SOBARZO-SÁNCHEZ *et al.*, 2000), mas relativa fraca atividade antagonista *in vivo* para os receptores das regiões do bulbo olfatório e em estriato de ratos (ASENCIO *et al.*, 1999). Este mesmo estudo verificou que a boldina reverteu em parte os sintomas de comportamentos estereotipados induzidos pela administração de apomorfina em ratos, sem afetar o metabolismo da dopamina no estriato cerebral dos animais.

No entanto, a boldina tem sido atualmente explorada devido a sua potente atividade antioxidante, previamente verificada por meio de uma série de modelos experimentais descritos na literatura. Este alcalóide possui duas hidroxilas fenólicas adjacentes a dois grupamentos metoxilas, característica química comum a vários compostos que exibem elevada capacidade antioxidante (BURTON *et al.*, 1985). Assim, atividades farmacológicas atribuídas à boldina, tais como antitumoral, citoprotetora, antiinflamatória e antipirética têm sido associadas às propriedades seqüestradoras de radicais livres desta molécula, particularmente aos grupamentos fenóis nela presentes (O'BRIEN *et al.*, 2005). Considerando que a presença de elevadas concentrações de radicais livres esteja associada com o surgimento ou progressão de determinadas doenças, como alguns tipos de cânceres e desordens neurodegenerativas e cardiovasculares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999a), estudos têm sido realizados a fim de se demonstrar a efetividade da boldina em inibir ou retardar condições patofisiológicas nas quais estejam envolvidos radicais livres ou produtos de lipoperoxidação como mediadores de danos celulares.

A atividade citoprotetora atribuída à boldina está associada a sua capacidade de poder inibir a peroxidação lipídica *in vitro*, protegendo as células contra o estresse oxidativo e possíveis danos. Com o uso de uma suspensão de eritrócitos, este alcalóide inibiu a lipoperoxidação e a lise celular induzida por ABAP, ou 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropano), além de prevenir a autooxidação de homogeneizados de tecido cerebral de ratos (SPEISKY *et al.*, 1991a). Este mesmo estudo sugeriu que a boldina possa gerar um metabólito a partir de sua interação com radicais livres, e que este produto seja ainda mais eficiente em poder seqüestrar radicais livres neste sistema. Além disso, concentrações micromolares do alcalóide foram eficazes em prevenir danos celulares induzidos pela lipoperoxidação em células hepáticas, pela presença de hidroperóxido de *t*-butila (CEDERBAUM *et al.*, 1992). Também verificou-se o efeito da boldina em inibir a LPO induzida por Fe²⁺/cisteína e por NADPH/Fe³⁺-ATP em membranas microssomais hepáticas, pela medida de TBA-RS (RÍOS *et al.*, 1990; KRINGSTEIN & CEDERBAUM, 1995) e sua capacidade em proteger a deoxirribose contra a degradação induzida por Fe³⁺-EDTA na presença de peróxido de hidrogênio (UBEDA *et al.*, 1993). Sua presença também promoveu a inibição da produção de óxido nítrico em mitocôndrias (YOUN *et al.*, 2002), resultados estes que estabelecem o mecanismo de ação antioxidante da molécula de boldina como um potente seqüestrador de radicais hidroxilas.

Além de lipídios, proteínas também podem ser alvos biológicos para o ataque de espécies reativas, e desta maneira danos oxidativos podem ser causadores de muitas patologias, como aterosclerose, catarata e processos inflamatórios (O'BRIEN *et al.*, 2005). Assim, estudos demonstraram que a boldina é capaz de inibir a perda da atividade catalítica *in vitro* de enzimas como a lisozima, quando em contato com radicais peroxilas (CASSELS *et al.*, 1995). Este efeito está associado com a inibição da oxidação de resíduos de triptofano da enzima, de forma que a boldina possa proteger não somente lipídios, mas também aminoácidos envolvidos na atividade catalítica de determinadas enzimas (JIMÉNEZ *et al.*, 2000).

Seu potencial como um agente neuroprotetor *in vitro* também já foi discutido, uma vez que a boldina atenuou danos celulares induzidos pela oxidação de catecolaminas em neurônios, além de inibir a apoptose e a morte celulares induzidas pela presença de dopamina (YOUN *et al.*, 2002). Tanto a dopamina quanto a 6-hidróxi-dopamina são capazes de promover a geração de ER, além de inibirem a

cadeia respiratória e permitir a abertura de poros mitocondriais, efeitos que podem promover danos celulares. Entretanto, em ensaios *in vivo* este alcalóide foi ineficaz em promover proteção contra a ação neurotóxica de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), um composto inibidor da cadeia transportadora de elétrons e que produz sintomas de Parkinson (LOGHIN *et al.* 2003).

Moléculas antioxidantes também podem ser dotadas de efeito antiinflamatório, uma vez que ER de oxigênio estão envolvidas tanto na conversão do ácido araquidônico mediado por cicloxigenases e lipoxigenases em intermediários pró-inflamatórios, assim como sua produção durante o fenômeno inflamatório, associado à infiltração de leucócitos (JAESCHKE, 1995). Dessa maneira, estudos anteriores verificaram efeito antiinflamatório para um extrato hidroalcoólico de folhas de *Peumus boldus* empregando-se o ensaio de edema em pata de rato induzido por carragenina, mas este efeito não se reproduziu quando boldina isolada foi administrada (LANHERS *et al.*, 1991). Experimentos posteriores, em contrapartida, verificaram que a boldina foi eficaz em reduzir o edema induzido pelo mesmo ensaio, e também em prevenir o aumento de temperatura retal por ação de pirogênicos, em coelhos (BACKHOUSE *et al.*, 1994). Em modelos de inflamação crônica, o alcalóide foi eficaz em prevenir lesões histológicas e edema no cólon intestinal de ratos por ação de ácido acético, sendo verificada uma diminuição na atividade da mieloperoxidase, indicando que a boldina possa atuar inibindo o processo de infiltração de neutrófilos até o tecido lesado (GOTTELAND *et al.*, 1997).

Em um modelo de diabetes induzida pela ação de estreptozotocina em ratos, a boldina foi eficaz em prevenir danos causados por ação do estresse oxidativo proporcionado pela doença (JANG *et al.*, 2000). Sua administração *in vivo* preveniu significativamente o aumento nos níveis de glicose plasmática, assim como perda de peso e a elevação nos níveis de malonodialdeído e carbonilas de proteínas oxidadas em células pancreáticas.

SANTANAM e colaboradores (2004) investigaram o efeito da boldina sobre a aterosclerose *in vivo*, e verificaram que sua administração promoveu uma diminuição nas áreas das lesões ateroscleróticas em ratos alimentados com uma dieta rica em lipídios. Além disso, como os níveis plasmáticos para colesterol, LDL, HDL e triglicerídeos permaneceram inalterados quando comparados ao grupo controle, tal

efeito está vinculado a sua capacidade antioxidante. Atividade antiplaquetária *in vitro* também foi observada para o alcalóide, através da inibição da agregação de plaquetas induzida pelo ácido araquidônico e colágeno, efeito este possivelmente associado à inibição da formação de tromboxano A₂ (TENG *et al.*, 1997).

Além de sistemas biológicos, o efeito antioxidante da boldina foi também analisado em sistemas abióticos, sendo considerado como uma alternativa para o uso de compostos sintéticos em alimentos como óleos e alimentos contendo lipídios poliinsaturados (O'BRIEN *et al.*, 2005). Seu potencial antioxidante em alimentos foi inicialmente verificado pela inibição da LPO e conseqüente rancificação de óleo de peixe, com eficácia superior ao butil-hidróxitolueno (BHT) e butil-hidróxianisol (BHA), empregados comumente em indústria alimentícia (VALENZUELA *et al.*, 1991). Também em óleos comestíveis, a boldina foi mais eficaz que a quercetina ou o α -tocoferol para evitar a oxidação térmica dos mesmos (GANGA *et al.*, 1998; MÉNDEZ *et al.*, 1998).

Em produtos alimentícios, a boldina promoveu proteção contra a oxidação mediada pela ação da radiação UV e por ação do oxigênio molecular, processos que iniciam a deterioração de alimentos. Assim, este alcalóide também é considerado como um potente *quencher* de moléculas de O₂ no estado excitado, inibindo a oxidação de resíduos de triptofano de proteínas (ZANOCCO *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 2002).

Estudos de toxicidade realizados com este alcalóide, conduzidos tanto em células isoladas quanto em modelos animais, indicam que a molécula possua uma relativa baixa toxicidade. Além disso, a boldina possui baixa capacidade de induzir mutagênese em células haplóides (MORENO *et al.*, 1991), além de não propiciar um aumento significativo na freqüência de aberrações cromossomais *in vitro*, ou em células ósseas *in vivo* (TAVARES e TAKAHASHI, 1994). Os efeitos de sua administração aguda e crônica durante a gravidez também foram analisados, chegando-se à conclusão de que em doses de 500 mg/kg não há indícios de efeito abortivo, de mal-formações fetais e nem de danos hepatotóxicos (ALMEIDA *et al.*, 2000).

2.6 DISCUSSÃO

O termo estresse oxidativo é definido como uma condição decorrente da alteração da taxa entre a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio nos sistemas biológicos e as defesas antioxidantes, havendo um distúrbio no balanço do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante endógeno, levando a eventuais danos oxidativos em macromoléculas do organismo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999a).

Nesse contexto, as espécies reativas parecem estar envolvidas em uma série de doenças ou alterações patológicas que afetam o sistema nervoso central, destacando-se as doenças de Alzheimer e de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e acidentes vasculares cerebrais (RESNICK & PARKER, 1993; GILGUNSHERKI *et al.*, 2001). Em muitos casos, as ER geradas produzem alterações funcionais em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, podendo induzir a morte celular (SUN & CHEN, 1998).

Evidências também relacionam a produção de radicais livres com lesões neuronais decorrentes de processos isquêmicos e excitotóxicos no SNC (FRANTSEVA *et al.*, 2001). Estudos anteriores já demonstraram que uma geração excessiva de ER nos neurônios da região do hipocampo durante a isquemia/reperfusão depende da ativação de receptores glutamatérgicos e está também associada à elevação nos níveis de cálcio intracelulares (VELAZQUES *et al.*, 1997). Os mecanismos envolvendo esta produção de ER dependente de cálcio incluem a reação xantina/xantina oxidase, ativação da enzima NOS e também a fosfolipase A2, dentre outras (SAUNDERS & HORROCKS, 1987; HEINZEL *et al.*, 1992; FRANTSEVA *et al.*, 2001). Entretanto, a grande fonte geradora de espécies reativas a partir de processos isquêmicos é a mitocôndria, contribuindo para as reações deletérias iniciadas por cascatas bioquímicas que têm como ponto de partida o aumento no cálcio intracelular e o estresse oxidativo (FRANTSEVA *et al.*, 2001).

Embora a reperfusão, ou seja, o reestabelecimento da circulação sangüínea com aporte de oxigênio e glicose para as áreas lesadas, pode prevenir o surgimento de lesões cerebrais permanentes, este processo por outro lado também pode trazer

uma série de conseqüências deletérias para as células neuronais (CHERUBINI *et al.*, 2005). A partir da reperfusão, o estresse oxidativo rapidamente se estabelece, e numerosas reações não enzimáticas ocorrem no citosol e/ou em organelas celulares (SCHALLER & GRAF, 2004).

A partir dessas evidências relacionando doenças neurodegenerativas com uma excessiva produção de espécies reativas e estresse oxidativo, um número crescente de estudos tem sido realizados a fim de se detectar parâmetros de estresse oxidativo em cérebros de pacientes afetados por tais doenças (WAJNER *et al.*, 2004). Uma vez que a quantificação direta de radicais livres e de moléculas oxidadas em cérebro é bastante difícil, uma série de substâncias biológicas tem sido investigadas como possíveis marcadores periféricos para o estresse oxidativo decorrente de processos isquêmicos (CHERUBINI *et al.*, 2005). Dentre os produtos decorrentes da lipoperoxidação, o MDA é um marcador biológico cujos níveis correlacionam-se com a extensão dos danos celulares neuronais (CHERUBINI *et al.*, 2005). Além disso, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos também têm sido propostos como marcadores indiretos de estresse oxidativo. Reduzidas concentrações de antioxidantes como o ácido ascórbico, glutathiona e α -tocoferol e também a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes CAT, GPx e SOD relacionam-se com danos cerebrais provenientes de privação de oxigênio e glicose (CHERUBINI *et al.*, 2005).

Nesse sentido, a detecção da TAR tem se tornado uma interessante alternativa para a avaliação da integridade do complexo de defesas antioxidantes totais de organismos e fluidos de origem animal, pelo fato de não avaliar cada um dos componentes deste sistema isoladamente, mas como um conjunto (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999b). Desta maneira, a determinação do TRAP pode medir a resistência da defesa antioxidante de determinado sistema bioquímico sob condições de estresse oxidativo, que pode ser desencadeado por algumas condições patológicas (LISSI *et al.*, 1995).

No presente trabalho, avaliamos os efeitos da privação de oxigênio e glicose em fatias de hipocampo de ratos sobre a capacidade antioxidante total do tipo não enzimática a partir da avaliação do potencial antioxidante total (TRAP) e da reatividade total antioxidante (TAR) de acordo com metodologia previamente

descrita na literatura (LISSI *et al.*, 1992; LISSI *et al.*, 1995). A medida do TRAP determina a quantidade de antioxidantes presentes na amostra, enquanto que o ensaio de TAR indica sua reatividade ou qualidade do antioxidante (LISSI *et al.*, 1995).

A etapa de reperfusão sangüínea após o processo isquêmico modificou tanto a reatividade antioxidante como o potencial antioxidante total, conforme demonstram os resultados obtidos. As fatias de hipocampo submetidas à POG promoveram uma diminuição de 63 % na medida do TRAP em relação às fatias que não sofreram isquemia, enquanto que as fatias isquêmicas diminuíram em 16,5 % o valor do TAR em relação às fatias do grupo controle. Os resultados indicam que o TRAP foi o parâmetro mais sensível em comparação ao TAR para a avaliação de mudanças nas defesas antioxidantes de natureza não enzimática nas fatias de hipocampo, proporcionada pelo estresse oxidativo.

Esses resultados concordam com estudos prévios realizados em músculo esquelético de ratos, onde foi verificado que a privação de oxigênio e glicose proporcionou uma diminuição de cerca de 2,5 vezes na medida do TRAP para o grupo isquêmico em relação ao grupo controle (ZIMIANI *et al.*, 2005). Além disso, o mesmo estudo verificou que o radical óxido nítrico desempenha um papel importante nos danos propiciados pelo estresse oxidativo a partir da hipóxia/isquêmica, devido à elevada expressão da enzima iNOS durante o processo de reperfusão, que pode induzir a morte neuronal sob tais condições. Por outro lado, BÄGENHOLM e colaboradores (1997) investigaram a formação de radicais livres em cérebros de ratos neonatos de 7 dias submetidos à hipóxia isquêmica *in vivo* e verificaram um aumento de cerca de 3 vezes na formação de radicais semi-dehidroascorbato, uma espécie gerada a partir da oxidação do radical ascorbato, como parte de sua atividade antioxidante.

Um estudo comparativo entre os níveis de radicais livres gerados e a atividade das defesas antioxidantes de diferentes estruturas cerebrais de ratos jovens (2 meses de idade), adultos (6 meses de idade) e idosos (24 meses de idade) demonstrou que o homogeneizado de hipocampo de ratos adultos e idosos exibiu um grande decréscimo tanto na medida do TRAP como na medida do TAR, enquanto que as demais regiões exibiram modificações em apenas uma medida ou

então não demonstraram alterações dependentes da idade (SIQUEIRA *et al.*, 2005). Além disso, o hipocampo de ratos idosos exibiu maiores níveis de radicais livres medidos através da formação de produtos da modificação oxidativa do *probe* exógeno 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), além de menor atividade da enzima GPx, sugerindo que as alterações nas defesas antioxidantes dependentes da idade sejam mais evidentes nesta região cerebral, de forma que o hipocampo possa ser considerado, em comparação com o cerebelo, estriato e córtex, mais suscetível ao estresse oxidativo e mais predisponível, portanto, a doenças neurodegenerativas.

Da mesma maneira que para homogeneizados de tecidos, a capacidade antioxidante de produtos naturais também pode ser medida pelo TRAP, considerado como um método inicial bastante conveniente para *screening* de metabólitos isolados e extratos vegetais com potencial atividade antioxidante (DESMARCHELIER *et al.*, 1998; POLYDORO *et al.*, 2004; BERNARDI *et al.*, 2005). Substâncias com atividade antioxidante são capazes de inibir a quimiluminescência induzida pela termólise do ABAP, e o tempo desta inibição, denominado tempo de indução, é diretamente proporcional ao potencial antioxidante total da molécula.

Em estudos anteriores, a boldina nas concentrações de 10 a 100 μ M foi capaz de prevenir a lipoperoxidação de eritrócitos e a perda de atividade para a enzima lisozima, sendo ambos os processos induzidos a partir da geração de radicais peroxila *in vitro* pela presença de ABAP nos sistemas (SPEISKY *et al.*, 1991a; CASSELS *et al.*, 1995; LOGHIN *et al.*, 2003). Também já foi demonstrada a eficácia da boldina em prevenir a oxidação de resíduos de triptofano da lisozima, mediado via produção de radicais peroxila (JIMÉNEZ *et al.*, 2000). LOGHIN *et al.* (2003) demonstraram que a boldina foi duas vezes mais potente que o Trolox para prevenir a inativação da lisozima por radicais peroxila em comparação a outros derivados sintéticos deste alcalóide.

Nossos resultados indicam que a boldina exibiu uma marcante atividade seqüestradora para radicais livres, conforme demonstrada através da redução da emissão de luz pelos radicais luminol. Sendo assim, verificamos a partir deste ensaio que a boldina reduziu a intensidade de quimiluminescência, e foi cerca de 3 a 6x mais potente que o Trolox para seqüestrar radicais peroxila, uma vez que esta

metodologia se baseia fundamentalmente na geração de tais espécies (LISSI *et al.*, 1995; POLYDORO *et al.*, 2004).

Além disso, este alcalóide também promoveu uma redução significativa na lipoperoxidação em fatias de hipocampo de ratos submetidas a condições de isquemia, verificado através da quantificação da liberação de MDA conforme o método de detecção de TBA-RS.

A determinação da concentração de MDA representa uma maneira eficiente para se detectar a peroxidação lipídica em diversos sistemas biológicos, e por este motivo, técnicas para sua análise têm sido amplamente empregadas nos meios científicos (DRAPER & HADLEY, 1990). Dentre os métodos utilizados, o ensaio TBA-RS tem sido descrito como um método mais simples e próprio para emprego em materiais biológicos de origem animal, além de ser um dos mais antigos citados na literatura (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999b).

Sendo assim, a boldina foi eficaz em diminuir a liberação de malonodialdeído nas fatias hipocampais que sofreram lesões isquêmicas por inibir a cascata de lipoperoxidação por ação do estresse oxidativo proporcionado pela privação de oxigênio e glicose. Os resultados demonstram que somente as concentrações mais elevadas de boldina empregadas foram capazes de alterar a liberação deste produto final de lipoperoxidação, e dentre estas, a concentração de 10 μM proporcionou uma proteção cerca de 42 % maior para as fatias de hipocampo quando comparada à dose de 50 μM . Estudos anteriores demonstraram que, através de uma curva de doses empregando concentrações desde 10 até 100 μM , a concentração de 20 μM foi a mais eficaz em diminuir a autooxidação *in vitro* de homogeneizados de cérebro de ratos, efeito verificado através da detecção de espécies reativas ao TBA-RS (SPEISKY *et al.*, 1991a). Além disso, a boldina na concentração de 15 μM reduziu em 50 % a lipoperoxidação de microssomos, empregando-se a mesma metodologia (CEDERBAUM *et al.*, 1992). Neste mesmo estudo, os autores discutiram a possibilidade deste alcalóide poder inibir a peroxidação lipídica do tipo não enzimática através da complexação dos íons Fe^{3+} presentes no sistema reacional, catalisadores desta reação. JANG e colaboradores (2000) estudaram o efeito da administração de boldina por via oral durante 8 semanas em ratos Wistar com diabetes induzida por ação da estreptozotocina. Dessa maneira, os autores

verificaram que o alcalóide proporcionou uma diminuição significativa nos danos teciduais produzidos pelo estresse oxidativo no fígado, pâncreas e rins, conforme o emprego da detecção de espécies reativas ao TBA-RS. Também uma redução nos danos em proteínas nesses órgãos, medidos pela quantificação de carbonilas geradas foi demonstrada para a boldina, efeitos estes atribuídos à característica antioxidante deste alcalóide.

Investigações têm sido realizadas a fim de se elucidar o mecanismo de ação antioxidante da boldina, e foi demonstrado que, apesar de sua atividade seqüestradora para radicais peroxila gerados pela termólise do ABAP, este alcalóide não reage de maneira eficiente com ânions superóxido (CEDERBAUM *et al.*, 1992; JANG *et al.*, 2000). Entretanto, o peróxido de hidrogênio na presença de íons ferro, manganês ou cobre é capaz de produzir radicais hidroxila, e esta espécie reativa é seqüestrada de maneira potente pela boldina (CEDERBAUM *et al.*, 1992). Este resultado é bastante interessante e promissor, uma vez que os radicais hidroxila constituem-se em uma das ER que produzem mais danos *in vivo*, atacando e oxidando biomoléculas como lipídios, proteínas, DNA e carboidratos (HALLIWELL, 1992).

A lipoperoxidação é uma das maiores conseqüências dos danos mediados por radicais livres ao tecido cerebral, e esta reação em cadeia continua até que todo o substrato seja consumido ou então ela é interrompida por ação de antioxidantes (CHERUBINI *et al.*, 2005). Além disso, a LPO induzida pelo estresse oxidativo pode produzir alterações na recaptção de glutamato e na função mitocondrial, favorecendo o surgimento de danos proporcionados pela excitotoxicidade (KELLER *et al.*, 1997). Além disso, o estresse oxidativo pode levar a alterações significantes na estrutura molecular das membranas quanto a suas propriedades biofísicas, como fluidez e assimetria (JOSEPH *et al.*, 2000). Também este fenômeno pode contribuir para a morte neuronal através de mecanismos cálcio-dependentes, uma vez que o processo isquêmico produz um aumento nos níveis de cálcio citosólicos, proporcionando também a geração de radicais livres (JOSEPH *et al.*, 2000; FRANTSEVA *et al.*, 2001). Os produtos finais da lipoperoxidação são extremamente danosos para as células neuronais. O MDA, em condições fisiológicas, é capaz de atacar rapidamente proteínas e causando lesões mutagênicas no DNA, e o aldeído

insaturado 4-HNE é extremamente citotóxico e provoca danos mitocondriais, lise e morte celulares (DRAPER & HADLEY, 1990; ESTERBAUER *et al.*, 1991).

Nesse sentido, a investigação do potencial antioxidante de produtos de origem natural para a prevenção de danos celulares contra o estresse oxidativo é importante, uma vez que estudos recentes indicam uma série de compostos candidatos em potencial para a prevenção de doenças neurodegenerativas (SUN & CHEN, 1998). Dentre esses compostos, a boldina é uma substância com grande potencial para uso como antioxidante na terapêutica, devido a suas propriedades citoprotetoras e de seqüestrar espécies reativas (JIMÉNEZ & SPEISKY, 2000).

A habilidade da boldina de atuar como um potente antioxidante e seqüestrador de radicais livres tem sido extensivamente relatada na literatura durante as últimas décadas e evidências demonstram que esta molécula possa interagir contra espécies reativas, podendo prevenir ou retardar a oxidação tanto de lipídios, como de proteínas e ácidos nucleicos.

Sendo assim, nossos resultados reforçam a característica deste alcalóide fenólico de poder atuar como um eficiente antioxidante em um sistema biológico *in vitro* suscetível a reações mediadas por radicais livres, mas desta vez verificado através da lipoperoxidação de lipídios de membrana de fatias hipocâmpais de ratos, induzida pela privação de oxigênio e glicose. Esta atividade antioxidante pode estar certamente relacionada ao grande número de atividades farmacológicas atribuídas a este alcalóide, tanto através de ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (O'BRIEN *et al.*, 2005). Dessa maneira, a eficácia da boldina como antioxidante e sua relativa baixa toxicidade observada em estudos com animais justificam seu emprego em ensaios clínicos como um antioxidante para ser empregado na terapêutica.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO IN VITRO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERÁSICA PARA A BOLDINA E ALCALÓIDES INDÓLICOS

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 A doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa irreversível e progressiva, caracterizada por perda de memória e danos nas funções cognitivas, estando ambos os processos associados com morte neuronal (BERG *et al.*, 1993; BARINAGA, 1995; YAMAZAKI *et al.*, 1996). Outros sintomas descritos para esta doença são distúrbios comportamentais, alterações da personalidade e declínio da capacidade de raciocínio (PARIHAR & HEMNANI, 2004). Esta patologia afeta atualmente cerca de 15 milhões de pessoas no mundo inteiro, cerca de 2 % da população em países industrializados, constituindo-se em um dos distúrbios neurológicos mais comuns (FORMAN *et al.*, 2004; MATTSON, 2004). Dados estatísticos indicam que a doença de Alzheimer seja responsável por cerca de 50 a 60 % dos casos de demência entre indivíduos acima dos 65 anos de idade, afetando cerca de 5 milhões de pessoas somente nos Estados Unidos (FRANCIS *et al.*, 1999; PRICE, 1999). De maneira geral, esta doença tornou-se bastante freqüente nas últimas décadas devido ao progressivo aumento da expectativa de vida da população mundial, uma vez que esta desordem acompanha o processo de envelhecimento (KOZIKOWSKI & TÜCKMANTEL, 1999). Estima-se que o número de indivíduos afetados pela doença em 2050 triplique nos Estados Unidos e Europa, alcançando números como 13,2 e 16,2 milhões de pessoas afetadas, respectivamente (HEBERT *et al.*, 2003; WANCATA *et al.*, 2003).

Alguns fatores de risco podem estar envolvidos com esta patologia, como diabetes, doenças cardiovasculares, baixo nível educacional, dietas com alto nível calórico e sedentarismo (SCHMID *et al.*, 1994; GALKIN *et al.*, 2003) e estima-se uma vida média de 8 anos a partir do diagnóstico dos primeiros sintomas clínicos da doença no indivíduo até sua morte (HOFFMAN *et al.*, 1996).

A doença de Alzheimer foi primeiramente descrita em 1907 por Alois Alzheimer, um patologista alemão, que descreveu alterações no tecido cerebral de uma paciente que havia morrido de um distúrbio mental incomum para a época (PARIHAR & HEMNANI, 2004). Foi por ele verificada a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares nas regiões do neocórtex e hipocampo e essa condição

foi associada aos sintomas da paciente, que possuía problemas cognitivos e de memória (FORMAN *et al.*, 2004).

As regiões cerebrais mais comprometidas pelas alterações bioquímicas decorrentes da doença de Alzheimer são aquelas associadas às funções mentais superiores, havendo grande perda neuronal no córtex frontal, parietal e temporal, além do hipocampo (WEST *et al.*, 1994). Os neurônios da região CA1 do hipocampo são particularmente suscetíveis a essa patologia, e essa vulnerabilidade seletiva pode estar relacionada à expressão de genes que possam tanto prevenir como promover a morte celular, incluindo receptores glutamatérgicos e fatores neurotróficos, entre outros (MATTSON, 2004).

Dentre as características moleculares mais evidentes relacionadas à doença de Alzheimer, estão a deposição extracelular de peptídeo β -amilóide, ou A β , derivado do precursor amilóide de proteína (APP), em placas senis, a presença de emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFT), disfunção colinérgica, intensa perda neuronal e alterações sinápticas no córtex cerebral, hipocampo e outras regiões cerebrais essenciais para a cognição e memória (PARIHAR & HEMNANI, 2004).

As placas são resultado de deposição de fibrilas e agregados amorfos de A β , presentes em elevadas quantidades e provenientes de proteínas altamente solúveis que se converteram gradualmente em polímeros fibrilares insolúveis com estruturas β cruzadas, acumulando-se no citosol e núcleo de células nervosas, ou no espaço extracelular (FORMAN *et al.*, 2004). As funções do APP, o precursor do peptídeo β -amilóide, não são ainda bem esclarecidas (DE STROOPER & ANNAERT, 2000), embora seu metabolismo pela ação de enzimas secretases seja bem estudado. A clivagem do APP por uma α -secretase ocorre no meio de sua estrutura, dando origem a fragmentos peptídicos não-amilóides. Entretanto, a clivagem seqüencial do APP por ação de β e γ -secretases gera uma variedade de peptídeos A β , de característica amilóide (HAASS & DE STROOPER, 1999).

Os emaranhados neurofibrilares constituem-se em agregados intracelulares contendo uma proteína associada a microtúbulos (TAU) que está hiperfosforilada e com modificações oxidativas (CASSERLY, 2004). Tanto as placas senis como os

emaranhados estão em áreas cerebrais associadas com o aprendizado, memória e comportamento, de forma que esses locais exibam um menor número de sinapses e danos neuronais, relacionados com essas anormalidades moleculares e celulares (PARIHAR & HEMNANI, 2004). Todo esse processo resulta em perda neuronal e dano sináptico, com subsequente comprometimento da memória, coordenação motora e raciocínio, além da capacidade cognitiva e demência (VIEGAS *et al.*, 2004).

A ação neurotóxica do peptídeo A β envolve a geração de radicais livres e alterações na homeostase quanto à permeabilidade celular para íons Ca²⁺, uma vez que a interação entre os oligômeros de β -amilóide com íons Fe²⁺ ou Cu⁺ resulta na produção de H₂O₂, uma espécie reativa de oxigênio. Quando o acúmulo de A β ocorre na região da membrana plasmática, ocorre lipoperoxidação resultante do estresse oxidativo proporcionado pela produção de ER, com produção de 4-hidroxinonal, um aldeído neurotóxico e também oxidação de algumas proteínas, como ATPases e canais iônicos. Além disso, o peptídeo A β pode provocar estresse oxidativo mitocondrial, resultando em danos na cadeia transportadora de elétrons e produção elevada de radicais superóxido. Também, a interação do H₂O₂ com os íons Fe²⁺ ou Cu⁺ pode gerar radicais hidroxila, potentes indutores da lipoperoxidação das membranas, agravando os danos proporcionados pelos radicais livres neste quadro patológico (MATTSON, 2004).

3.1.2. Terapia colinomimética para a doença de Alzheimer

Duas principais hipóteses têm sido empregadas para o estudo e esclarecimento dos mecanismos moleculares da doença de Alzheimer, sendo uma das hipóteses sobre a deposição amilóide e outra sobre o déficit colinérgico (PARIHAR & HEMNANI, 2004). Vários modelos animais foram empregados para demonstrar que disfunções colinérgicas são suficientes para induzir perda de memória em sistemas que mimetizam o quadro patológico da doença (BARTUS & EMERICH, 1999).

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor encontrado no cérebro e nas junções neuromusculares, exibindo duas classes principais de receptores, os nicotínicos e os muscarínicos. Alguns de seus efeitos nos receptores musculares

incluem a contração dos músculos lisos, dilatação dos vasos sanguíneos e regulação da taxa de batimentos cardíacos, enquanto que nos receptores cerebrais seus efeitos estão relacionados ao controle das funções motoras, cognição e memória (GIACOBINI, 1998; KOZIKOWSKI & TÜCKMANTEL, 1999; RANG *et al.*, 2000b). Tanto a atividade como permanência da ACh no organismo são regulados por dois tipos distintos de colinesterases. A acetilcolinesterase (AChE), presente nas fendas sinápticas das sinapses colinérgicas, tem como função hidrolisar este neurotransmissor, regulando suas concentrações livres, e a butirilcolinesterase, localizada no fígado, pele, cérebro e músculos lisos, não está associada às sinapses e sua função ainda é desconhecida, mas seu subtipo plasmático está associado à inativação de fármacos com grupamento éster (RANG *et al.*, 2000b).

O fundamento da hipótese colinérgica baseia-se no perfil terapêutico de fármacos potencializadores da função colinérgica central, uma vez que eles proporcionam melhoras no perfil cognitivo e também em alguns efeitos comportamentais oriundos da doença de Alzheimer. Além disso, os neurônios presentes nas sinapses colinérgicas são seletivamente destruídos durante o decurso da doença, e a atividade da enzima colina-acetiltransferase, responsável pela síntese de ACh, fica comprometida (HOCK, 1995; VIEGAS *et al.*, 2004).

As principais estratégias farmacológicas exploradas atualmente para equilibrar a disfunção colinérgica em pacientes com doença de Alzheimer incluem a inibição da degradação da acetilcolina e a administração de agonistas para receptores nicotínicos (MAELICKE *et al.*, 2000; MAELICKE *et al.*, 2001). Entretanto, a maior limitação para o uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase na terapêutica é que neurônios colinérgicos intactos são necessários para sintetizar ACh, de forma que estes fármacos sejam mais benéficos antes que ocorra grande degeneração neuronal (HOCK, 1995).

Os fármacos inibidores da degradação da ACh reduzem a velocidade de hidrólise da acetilcolina e aumentam o seu tempo de meia-vida, e vêm sendo uma das alternativas terapêuticas mais utilizadas por apresentarem melhores resultados no controle da doença, sem serem capazes de impedir sua evolução em nenhum de seus níveis (MAELICKE *et al.*, 2000). Baseado nos avanços obtidos em investigação sobre as razões moleculares do surgimento da doença de Alzheimer, que o uso de

inibidores da AChE é considerada a forma mais eficiente de controle dos sintomas desta patologia, fato este que tem motivado a busca por novos modelos estruturais que possam ser mais eficientes e mais potentes para o controle da evolução desta patologia (QUIK & JEYARASASINGAM, 2000; TABARRINI *et al.*, 2001).

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos deste capítulo consistem na avaliação da capacidade antioxidante através do ensaio colorimétrico de redução do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) e da avaliação do potencial inibitório sobre a enzima acetilcolinesterase para a boldina e para os alcalóides indólicos vincamina, coronaridina, ajmalicina, venalstonina, andrangina, voacangina, ibogaína, reserpina, vincadiformina, voacristina, psicolatina e cantin-6-ona.

3.3 REVISÃO DA LITERATURA

A fisostigmina, um alcalóide indólico presente nas sementes da fava-de-Calabar (*Physostigma venenosum* Balf., Leguminosae), é considerado como um protótipo de alguns fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase, empregados na terapêutica para a doença de Alzheimer (KOZIKOWSKY & TÜCKMANTEL, 1999). Esta substância é uma amina terciária e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica para produzir efeitos colinérgicos centrais (SCHRIPSEMA *et al.*, 2003), sendo um dos primeiros fármacos empregados para o tratamento desta doença, através de administração oral e intravenosa (GIACOBINI, 1998). Apesar de excelente inibidor da enzima, este alcalóide é bastante instável à hidrólise, apresentando uma duração de ação muito curta e efeitos colaterais de ação colinérgica bastante pronunciados e freqüentes, como ataque e parada cardíaca, além de baixa absorção intestinal. Assim, uma série de derivados análogos estruturais foram sintetizados, como a neostigmina, uma amina quaternária potente inibidora da AChE, de forma que a fisostigmina seja empregada atualmente em aplicações tópicas para o tratamento de glaucoma (GIACOBINI, 1998; HOSTETTMAN *et al.*, 2003; SCHRIPSEMA *et al.*, 2003). A rivastigmina, outro análogo da fisostigmina, está sendo empregada na terapêutica desta doença, possuindo ação longa e efeitos colaterais de menor intensidade (FORETTE *et al.*, 1999; TAYLOR, 2003). Este fármaco é comercializado no Brasil como Excelon[®] (Novartis), na forma farmacêutica cápsulas (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004).

Outro alcalóide empregado na terapia da doença de Alzheimer é a galantamina, isolada de várias espécies de plantas da família Amaryllidaceae, como *Galanthus nivalis* L. e *Leucojum aestivum* L. (HOSTETTMAN *et al.*, 2003). Esta substância produziu em pacientes um grau de melhora cognitiva e também demonstrou ativar alguns subtipos de receptores nicotínicos, atuando aparentemente como um modulador alostérico positivo e melhorando a resposta do receptor a acetilcolina, aumentando a freqüência de abertura de canais iônicos (MAELICKE *et al.*, 2000). A galantamina mostrou ser um inibidor da AChE seletivo, reversível, competitivo e de ação longa, de maneira que seus efeitos terapêuticos perdurem até mesmo após o término do tratamento (LÓPEZ *et al.*, 2002). Devido ao seu excelente perfil terapêutico, um grande avanço no planejamento de fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer foi decorrente da descoberta de seu

duplo mecanismo de ação, como inibidor da enzima AChE e como ligante potencializador alostérico nos receptores nicotínicos cerebrais (QUICK & JEYARASASINGAM, 2000; MAELICKE *et al.*, 2000). A galantamina é comercializada no Brasil sob o nome Reminyl[®] (Janssen-Silag), na forma farmacêutica comprimidos, nas dosagens de 4, 8 e 12 mg (KOROLKOVAS & FRANÇA, 2004). Dessa maneira, este alcalóide também serve atualmente como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos (MICHAELIS, 2003), o que estimulou a busca por novos metabólitos na família Amaryllidaceae com potencial inibidor para a acetilcolinesterase. Assim, um alcalóide isolado de *Eucharis grandiflora*, a sanguinina (9-O-desmetilgalantamina), mostrou-se 10 vezes mais ativo que a própria galantamina em ensaios *in vitro*, além de outros derivados deste alcalóide, como a 11-hidroxigalantamina e a epinorgalantamina (LÓPEZ *et al.*, 2002).

O musgo *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev (Huperziaceae), empregado na medicina tradicional chinesa para o tratamento de febres e inflamações, é fonte de vários alcalóides sesquiterpênicos inibidores da acetilcolinesterase, denominados huperzinas (CORDELL *et al.*, 2001). O principal alcalóide deste grupo, a huperzina A, é um inibidor potente, reversível e altamente específico para a AChE, cuja potência *in vitro* é igual ou superior à da fisostigmina, galantamina, donepezil e tacrina, mas com menos efeitos colaterais (ZANGARA, 2003). Através de estudos *in vivo* com ratos, este alcalóide produziu uma maior inibição da AChE quando comparada com donepezil, rivastigmina e tacrina, indicando uma maior biodisponibilidade e facilidade em cruzar a barreira hematoencefálica (LIANG & TANG, 2004). Além disso, a huperzina A é um fraco inibidor da butirilcolinesterase presente no soro humano, de forma que esta seletividade pela AChE pode sugerir um perfil de efeitos adversos menos significativos (SCOTT & GAO, 2000). O seu mecanismo de ação também tem sido extensivamente estudado e foi verificado que este alcalóide tem ação antagonista *in vitro* para receptores NMDA, protegendo os neurônios da excitotoxicidade induzida pelo glutamato (VED *et al.*, 1997). Também foi verificado em estudos clínicos que a huperzina A promove uma diminuição nos danos provocados pelos radicais livres em pacientes tratados com a substância (XU *et al.*, 1999), com redução dos efeitos deletérios induzidos pelo H₂O₂, como geração de malonodialdeído e atenuação na queda das atividades das enzimas CAT e GPx

(XIAO *et al.*, 1999). Em ensaios *in vivo*, o alcalóide reduziu os efeitos da disfunção cognitiva causada pela infusão intracerebroventricular do peptídeo A β em ratos (WANG *et al.*, 2001). Empregando-se modelos de isquemia, a huperzina A conferiu proteção a células expostas à POG (ZHOU *et al.*, 2001a), além de proteção histopatológica e comportamental contra isquemia global transitória em roedores (ZHOU *et al.*, 2001b). Nos Estados Unidos, esta substância ainda não foi aprovada pela agência FDA (*Food and Drug Administration*) para comercialização como medicamento, sendo vendido apenas como suplemento alimentar com indicações para perda de memória (ZANGARA, 2003).

Estudos têm demonstrado a relação entre as propriedades neurotóxicas do acúmulo de peptídeo A β , observado na doença de Alzheimer, com produção excessiva de radicais livres e aumento na permeabilidade intracelular para o cálcio (CALABRESE *et al.*, 2000). O estresse oxidativo proporcionado por esse quadro é considerado um fator de risco na incidência e na evolução de disfunções cognitivas que ocorrem durante o envelhecimento e em situações de demência, desempenhando um papel chave em desordens neurodegenerativas (JENNER, 1996; BUTTERFIELD *et al.*, 1999). Ensaios comprovam que alguns antioxidantes, como o α -tocoferol e a melatonina protegem as células da apoptose induzida pelo A β , uma vez que os efeitos neurotóxicos provocados por este peptídeo são em parte mediados pela produção de espécies reativas (BEHL *et al.*, 1992; BACHURIN *et al.*, 1999; CHYAN *et al.*, 1999).

Dessa maneira, o uso de antioxidantes na terapêutica na tentativa de se minimizarem seus efeitos danosos ou de reduzir sua formação pode ser uma abordagem benéfica para o tratamento da doença de Alzheimer (CHOI *et al.*, 2001).

Derivados indólicos são bastante freqüentes nos tecidos biológicos, e a porção indol constitui-se num sítio antioxidante bastante reativo, com o nitrogênio como centro ativo. Um dos compostos desta classe mais abundantes é o triptofano, aminoácido constituinte de numerosas proteínas e capaz de gerar o radical triptofanila, sob condições de estresse oxidativo (STOLC, 1999).

O hormônio melatonina (5-metoxi-*N*-acetil triptamina), produzido pela hipófise e responsável pelo ciclo de vigília do organismo, possui efeitos antioxidantes *in vitro*

para radicais hidroxila, superóxido, ácido hipocloroso e peroxinitrito, reduzindo danos causados ao DNA em culturas expostas à radiação ionizante (MARSHALL *et al.*, 1996). Esta substância também proporcionou proteção para fatias hipocâmpais de ratos expostas a condições de hipóxia e reoxigenação, diminuindo os danos na região CA1 do hipocampo provocados por ER (VLKOLINSKY *et al.*, 1998). Além de atuar diretamente como seqüestradora, a melatonina também possui efeitos de regular positivamente a expressão de enzimas antioxidantes, proporcionando, por exemplo, o aumento da atividade da glutathione peroxidase em cérebros de ratos. Entretanto, as concentrações necessárias para este efeito *in vitro* são muitas vezes superiores às concentrações encontradas *in vivo*, sendo discutível, portanto, seu efeito seqüestrador endógeno (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999c). Seu precursor, o neurotransmissor serotonina (5-hidroxi triptamina), inibe de forma mais eficiente a lipoperoxidação *in vitro*, e seu mais potente efeito antioxidante se deve ao fato da hidroxila fenólica da serotonina estar livre, e não metilada como no caso da melatonina (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999c).

Dentro da classe dos carbazóis (derivados indólicos tricíclicos), o composto representante de atividade farmacológica mais pronunciada é o carvedilol, um potente bloqueador β_1 e β_2 não-seletivo de terceira geração, com efeitos vasodilatadores por bloquear também os receptores α_1 adrenérgicos. Por possuir um centro assimétrico, ao enantiômero R foi atribuído o efeito β_1 bloqueador e aos enantiômeros R e S o efeito α_1 adrenérgico, de maneira que a mistura racêmica, empregada clinicamente, exiba um mais amplo espectro farmacológico (DULIN & ABRAHAM, 2004). O carvedilol também possui efeitos antioxidantes marcantes, como a inibição da lipoperoxidação em membranas de células de miocárdio, inibição da liberação de O_2 por neutrófilos, efeito seqüestrador para radicais peroxila e ácido hipocloroso e manutenção das defesas antioxidantes endógenas, como a concentração de α -tocoferol e de glutathione (FEUERSTEIN & RUFFOLO, 1995). Atribui-se ao núcleo indólico o efeito antioxidante da molécula (DULIN & ABRAHAM, 2004). Efeito neuroprotetor para o carvedilol foi demonstrado com a administração subcutânea em gerbilos antes e após um modelo de isquemia induzida, proporcionando cerca de 52 % de proteção em relação ao grupo controle em termos de magnitude de lesão neuronal na região CA1 do hipocampo (LYSKO *et al.*, 1992), tanto pelo seu efeito seqüestrador quanto por possuir baixo efeito antagonista para

os receptores glutamatérgicos NMDA e por bloquear os canais de Na⁺ responsável pela liberação de glutamato durante a isquemia (LYSKO *et al.*, 1998).

Outra substância indólica sintetizada com múltiplas atividades farmacológicas e marcante atividade antioxidante é a estobadina, classificada como um derivado piridoindol ou γ carbolina. Este composto já possui comprovados efeitos neuroprotetores tanto *in vivo* quanto *in vitro* em modelos animais de isquemia/reperfusão, promovendo menor peroxidação lipídica, menor oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), fator determinante para o surgimento de aterosclerose (HORÁKOVÁ & STOLC, 1998) além de efeito seqüestrador para radicais hidroxila, alcóxila, peróxila e de reparar aminoácidos oxidados (KYSELOVA *et al.*, 2003). Desta maneira, o poder antioxidante para ER parece ser responsável pela atividade neuroprotetora em modelos isquêmicos animais, uma vez que nenhuma interação foi detectada da estobadina com os receptores NMDA (STOLC, 1999).

Todas essas substâncias são de grande potencial para serem usadas como agentes preventivos ou de uso no tratamento de doenças neurodegenerativas, podendo servir como modelos para o desenvolvimento de novos agentes neuroprotetores mais ativos e seguros (STOLC, 1999).

3.6 DISCUSSÃO

Uma série de estudos anteriores já demonstrou que o sistema nervoso central, em especial o tecido cerebral, é especialmente vulnerável ao estresse oxidativo devido ao seu metabolismo energético com elevado consumo de oxigênio, por possuir grandes quantidades de lipídeos poliinsaturados e escassez de substâncias antioxidantes, em relação aos outros tecidos (REITER, 1995). Algumas evidências demonstram a relação entre a doença de Alzheimer e danos celulares provocados pela intensa geração de espécies reativas no cérebro de pacientes com esta patologia, como a presença de proteínas oxidadas e de 4-hidroxinonenal, um marcador de lipoperoxidação, quando comparado ao cérebro de pessoas normais (MONTINE *et al.*, 1997; SCHIPPLING *et al.*, 2000). Sabe-se que o depósito de peptídeo β -amilóide induz a lipoperoxidação e a liberação de seus produtos, que se ligam covalentemente a proteínas, causando uma série de danos. Um exemplo é a ligação do 4-HNE à proteína TAU, induzindo sua desfosforilação e causando o acúmulo de emaranhados neurofibrilares, um dos marcadores moleculares mais estudados da doença de Alzheimer, relacionado à perda das funções neuronais e danos sinápticos (PARIHAR & HEMNANI, 2004).

Dessa maneira, o uso do clássico seqüestrador de radicais livres α -tocoferol tem sido empregado com certo sucesso em triagens clínicas para o tratamento da doença de Alzheimer. Tanto o α -tocoferol quanto o ácido ascórbico reduzem a quantidade de radicais livres presentes no hipocampo e córtex cerebrais, o que fez suscitar um considerável interesse por essas substâncias. Para ambos antioxidantes, estudos demonstram que quando empregados em tratamentos a longo prazo, particularmente para pacientes em grupo de risco para Alzheimer (fumantes e indivíduos acima de 65 anos, por exemplo), os resultados demonstraram que houve diminuição tanto da progressão da doença como do número de novos casos (PARIHAR & HEMNANI, 2004).

Nesse contexto, o uso de antioxidantes provenientes de produtos naturais tem recebido crescente atenção, uma vez que eles podem ser uma alternativa para o uso de produtos sintéticos, servindo como modelo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de várias doenças, incluindo a doença de Alzheimer (CUENDET *et al.*, 1997). A busca por metabólitos de plantas com capacidade

seqüestradora para espécies reativas tem revelado vários tipos de substâncias capazes de proteger as células da lipoperoxidação, tanto por prevenir danos mitocondriais devido ao estresse oxidativo como neutralizando ER em microssomos celulares (HARAGUSHI, 2001).

Da mesma maneira, o estudo fitoquímico de várias espécies vegetais e também de microorganismos que possam fornecer novos modelos de substâncias anticolinesterásicas tem sido estimulado pela diversidade de compostos inibidores da AChE conhecidos e também pela possibilidade de se explorar modos de ação distintos (VIEGAS *et al.*, 2004). A principal alternativa farmacológica empregada para o tratamento sintomático dos pacientes com Alzheimer baseia-se no uso de inibidores da enzima acetilcolinesterase, como a galantamina e rivastigmina, e estes fármacos têm proporcionado uma série de efeitos benéficos para os sintomas comportamentais, cognitivos e funcionais desta doença (GIACOBINI, 1998; SCARPINI *et al.*, 2003).

Embora sejam conhecidos alcalóides indólicos anticolinesterásicos, como a fisostigmina, poucos estudos foram realizados neste sentido até o momento. A análise fitoquímica de *Haplophyton crooksii* L. Benson (Apocynaceae) levou ao isolamento de 15 alcalóides indolmonoterpênicos e todos eles tiveram tal efeito. Dentre todos eles, os de maior atividade inibitória foram a 16-decarbometoxivinervina, a 10-metoxi-N1-metilpericiclina e a acuamidina, analisados através de ensaio colorimétrico *in vitro* (MROUE *et al.*, 1996). Outro estudo realizado com esta classe de alcalóides levou ao isolamento de 10 alcalóides do tipo iboga de *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miers (Apocynaceae), dentre os quais coronaridina, voacangina, rupicolina, afinisina e voacangina hidroxindolenina foram os de evidente atividade inibitória para AChE (ANDRADE *et al.*, 2005).

Alcalóides indólicos têm sido extensivamente investigados quanto a uma série de efeitos farmacológicos, como atividade antiinflamatória, antiviral, antitumoral, bactericida, citotóxica, antiparasitária dentre outras (HENRIQUES *et al.*, 1996; CORDELL *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2004). Além dos alcalóides da vinca empregados para o tratamento de alguns tipos de câncer, ibogaína e coronaridina têm sido bastante investigados devido a suas propriedades psicoativas, uma vez que eles são capazes de interferir com a dependência química de morfina e cocaína

e são considerados agentes anti-aditivos em potencial (POPIK *et al.*, 1995; LAYER *et al.*, 1996; CARLINI, 2003). Além disso, voacangina possui descritas atividades antimalárica *in vitro* para *Plasmodium falciparum* e também propriedades antimicobacterianas (RASTOGI *et al.*, 1998; FEDERICI *et al.*, 2000).

No presente trabalho, verificamos de forma inédita a atividade anticolinesterásica *in vitro* para alguns alcalóides indólicos pouco estudados quanto a possíveis efeitos farmacológicos. Os mais potentes inibidores da enzima AChE foram ibogaína e reserpina além de coronaridina e voacangina, cuja atividade já foi investigada anteriormente, empregando outro método de detecção para a inibição enzimática (ANDRADE *et al.*, 2005). Outros alcalóides também inibidores da acetilcolinesterase são a venalstonina, a andrangina, a vincadiformina e a voacristina, embora tenham sido menos potentes quando comparados à referência galantamina em sua concentração mais diluída (0,01 mM).

Quanto à atividade antioxidante *in vitro*, praticamente todos os alcalóides por nós testados, com exceção da vincamina e da cantin-6-ona tiveram efeito em reduzir o radical DPPH e descolorir a placa em seu ponto de aplicação. Entretanto, algumas das substâncias, como ajmalicina, reserpina e psicolatina não reagiram rapidamente com a 2,2-difenil-1-picrilidrazila, e só mostraram-se antioxidantes após 4 horas de reação na cromatoplaça. Através de comparação com a concentração mais baixa de quercetina (referência) empregada, os alcalóides mais potentes foram coronaridina, ajmalicina, venalstonina, andrangina, boldina, vincadiformina, voacristina e psicolatina, embora todos tenham menor potência antioxidante que a quercetina.

Dentre os alcalóides coronaridina, voacangina, ibogaína e voacristina, todos com núcleo ibogano, percebemos que todos inibiram de maneira similar a enzima AChE, com a exceção de voacristina. Este mesmo alcalóide, entretanto, possui maior efeito antioxidante *in vitro*, juntamente com a coronaridina, a única substância sem o grupamento metoxila dentre as quatro estruturas. Sugere-se, desta maneira, que os alcalóides metoxilados tenham fraca atividade antioxidante e que este efeito foi em parte revertido pela presença da hidroxila presente na voacristina, que exibiu apreciável efeito antioxidante. Adicionalmente, conclui-se que a presença da hidroxila modulou negativamente o efeito anticolinesterásico, uma vez que dentre os alcalóides deste grupo, a voacristina obteve menor atividade.

Substâncias com atividade colinérgica são rotineiramente utilizadas para melhorar as funções cognitivas dos pacientes que sofrem da doença de Alzheimer. Sabe-se que essas substâncias quando administradas juntamente com antioxidantes torna muito mais efetivo o tratamento para estes pacientes do que se fosse empregada cada substância isoladamente no tratamento (PRASAD *et al.*, 2000).

Alguns dos alcalóides analisados, como coronaridina, venalstonina, andrangina, boldina, vincadiformina e voacristina possuem tanto atividade inibitória para a enzima AChE como atividade antioxidante, e estas seriam substâncias candidatas importantes para possíveis estudos posteriores a fim de se identificar novas moléculas a serem empregadas para o tratamento da doença de Alzheimer.

DISCUSSÃO GERAL

Com o aumento da expectativa de vida, tem sido observado um conseqüente aumento na incidência e no progresso de doenças neurodegenerativas. A incidência de eventos isquêmicos cerebrais em humanos tende a aumentar com o avanço da idade, e estima-se que atualmente esta seja a terceira maior causa de morte dentre adultos e idosos, além de poder gerar incapacidade física ou mental permanente nos indivíduos afetados (AYALA *et al.*, 2001).

Nesse sentido, o cultivo de tecidos ou de células tem sido bastante empregado para o estudo de processos neurodegenerativos como uma alternativa aos ensaios *in vivo* (NEWELL *et al.*, 1993; WILDE *et al.*, 1997), uma vez que tecidos e culturas de células neuronais constituem-se em sistemas biológicos adequados e interessantes para a realização de um *screening* a partir de fármacos, extratos ou produtos isolados de origem vegetal (GEBHARDT, 2000). Algumas das vantagens dos ensaios *in vitro* são a redução do número de animais por experimento e a possibilidade de serem avaliados os mecanismos de ação para determinado efeito em nível molecular, além de um acesso rápido para funções celulares específicas e respostas também rápidas para um possível potencial terapêutico (GEBHARDT, 2000).

Atualmente, as doenças neurodegenerativas associadas ao fenômeno do envelhecimento, tais como episódios isquêmicos e doenças de Alzheimer e Parkinson são novos desafios a serem enfrentados pelos cientistas, impulsionando a pesquisa de novas moléculas potencialmente úteis para o desenvolvimento de medicamentos seguros e eficientes (HOSTETTMANN *et al.*, 2003). Dessa maneira, extratos vegetais e produtos naturais isolados têm sido amplamente explorados e estudados nesse contexto (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2000).

Os alcalóides constituem-se em um grupo de metabólitos isolados de plantas com uma grande diversidade estrutural e com um amplo espectro de atividades biológicas que, juntamente com a quantidade de produtos descritos, fazem destes produtos um dos grupos mais importantes entre as substâncias naturais com interesse terapêutico (BRUNETON, 1993; HENRIQUES *et al.*, 2003). Dentre esses metabólitos, a classe dos alcalóides indólicos possui representantes de grande valor terapêutico e comercial, como os compostos antitumorais camptotecina, isolado de *Camptotheca acuminata* Decne e seus derivados sintéticos, além de vincristina e

vimblastina, substâncias bisindólicas presentes em *Catharanthus roseus* (L.) G. Don e empregadas na terapia de várias doenças neoplásicas (CORDELL *et al.*, 2001). Atividades neuroprotetoras para o tratamento de desordens cerebrovasculares foram atribuídas para vincamina, alcalóide indólico majoritário de *Vinca minor* L. (OLPE *et al.*, 1982; ERDŐ *et al.*, 1996; MAZÁK *et al.*, 2003), fato este que motivou o nosso estudo para a busca de novos agentes com possível efeito protetor para lesões isquêmicas dentre os alcalóides indólicos. Nesse caso, investigamos o efeito da vincamina, uma vez que estudos *in vitro* ainda não haviam sido descritos para ela, além de psicolatina e reserpina, compostos com atividades biológicas para o SNC já relatadas anteriormente em diversos modelos experimentais. Também empregamos a boldina, alcalóide fenólico com marcante atividade antioxidante e com propriedades citoprotetoras e eficiente seqüestrador de espécies reativas em diversos sistemas biológicos (O'BRIEN *et al.*, 2005; KRINGSTEIN & CEDERBAUM, 1995).

O modelo experimental *in vitro* de isquemia empregado no presente trabalho vem sendo bastante empregado como alternativa aos ensaios *in vivo* para o estudo tanto de substâncias com propriedades neuroprotetoras como para a investigação de lesões neuronais (MORO *et al.*, 1998; CÁRDENAS *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2004a). A utilização de fatias de hipocampo de ratos sem cultivo prévio e submetidas a uma condição de privação de oxigênio e glicose permite mimetizar uma condição isquêmica *in vitro*, servindo ainda como uma ferramenta bastante apropriada para estudos farmacológicos quantitativos quanto à resposta celular frente aos danos proporcionados (DE ALBA *et al.*, 1999b).

Assim, avaliamos a viabilidade mitocondrial e a liberação da enzima LDH intracelular em fatias de hipocampais de ratos submetidas à POG na presença e na ausência dos alcalóides, conforme apresentado no capítulo 1 do presente trabalho. Verificamos que a POG causou uma redução na viabilidade mitocondrial (decréscimo na redução de MTT) e um aumento no dano celular (liberação de LDH) em todos os grupos experimentais na ausência de alcalóides.

Percebemos que todos os alcalóides testados promoveram um aumento na liberação de LDH citosólico para o meio de incubação, tanto nos grupos que sofreram POG como nos grupos que não sofreram tal lesão. Dentre as fatias que

não sofreram sem indução de isquemia, a vincamina na concentração de 100 µM foi o alcalóide mais neurotóxico quando presente nas fatias hipocampais, com um aumento de 220 % na liberação de LDH, seguido pela boldina na mesma concentração, induzindo um efluxo de LDH 141 % maior que as fatias na ausência do alcalóide. Já dentre as fatias que sofreram lesão isquêmica, vincamina e boldina na concentração de 100 µM induziram um aumento de 40 % na liberação de LDH citosólico em relação às fatias sem os alcalóides. Com relação à viabilidade mitocondrial, somente boldina 10 µM e vincamina 100 µM promoveram aumentos significativos neste parâmetro quando presente nas fatias isquêmicas, enquanto que reserpina 50 µM e 100 µM e psicolatina 50 µM causaram aumentos na viabilidade mitocondrial quando presentes nas fatias controles. Psicolatina promoveu liberação significativa de LDH citosólico para todas as concentrações testadas, nas fatias hipocampais que sofreram POG.

O capítulo 2 deste trabalho visou verificar os efeitos da POG sobre as fatias hipocampais quanto aos parâmetros de estresse oxidativo reatividade antioxidante total (TAR), capacidade antioxidante total (TRAP) e sobre os níveis de MDA, além da verificação do efeito antioxidante da boldina nos dois últimos parâmetros.

Já foi demonstrada anteriormente a relação entre o aumento na geração de radicais livres como resultado de eventos de isquemia cerebral e reperfusão (OLIVER *et al.*, 1990). Conseqüentemente, a modulação farmacológica dos radicais livres no evento isquêmico cerebral tem sido considerada uma estratégia efetiva e racional para a neuroproteção.

A superestimulação de receptores glutamatérgicos, devido a uma reduzida captação e/ou excessiva liberação, como na injúria isquêmica, aumentam as concentrações de cálcio intracelular, ativando vários sistemas enzimáticos que podem produzir radicais livres e causando lipoperoxidação celular (PATEL *et al.*, 1996; PAAL *et al.*, 2002). A LPO leva à formação de aldeídos como o MDA e o 4-HNE, e a quantificação destes compostos é considerada como uma medida indireta da LPO resultante da isquemia. O MDA é freqüentemente detectado através do ensaio de determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS). Selecionamos o ensaio de TBA-RS pela sua simplicidade, associado à detecção

fluorimétrica, já que esta é mais sensível e específica que os métodos espectrofotométricos para a quantificação de MDA (DRAPER & HADLEY, 1990).

Nossos resultados demonstram que a POG promoveu um aumento significativo na liberação de MDA nas fatias de hipocampo de ratos e este efeito foi revertido pela adição de boldina nas concentrações de 10 μ M e 50 μ M. Sabe-se que um dos principais efeitos deletérios do ataque de radicais hidroxilas a macromoléculas celulares é o desencadeamento da LPO (SWEENEY *et al.*, 1995). Sendo estes radicais seqüestrados de maneira eficiente pela boldina (CEDERBAUM *et al.*, 1992), sugere-se dessa maneira que este composto possua um efeito antioxidante tal que possa inibir a propagação da LPO em cadeia, sendo este o seu principal mecanismo de ação seqüestradora. Além disso, a boldina exibiu um efeito cerca de 3 a 6 vezes mais potente que o Trolox para seqüestrar radicais peroxila, demonstrando que este alcalóide seja altamente eficaz em seqüestrar espécies reativas nos modelos experimentais utilizados.

Tanto o TRAP quanto o TAR podem indicar a habilidade de determinado tecido ou composto de seqüestrar radicais peroxila e/ou radicais livres provenientes do luminol, uma vez que estes ensaios de produção de quimiluminescência baseiam-se na reação do luminol com radicais peroxila gerados pelo ABAP (LISSI *et al.*, 1992; LISSI *et al.*, 1995). Assim, a POG propiciou uma redução nos valores de TRAP e TAR, resultado do estresse oxidativo gerado pelo processo isquêmico nas fatias de hipocampo de ratos, sendo o parâmetro TRAP mais sensível para a avaliação nas alterações das defesas antioxidantes.

Dessa maneira, compostos que inibam ou minimizem os danos resultantes da LPO são potencialmente interessantes na terapêutica de processos isquêmicos, já que níveis aumentados na LPO das membranas afetam a integridade dos processos fisiológicos, como potencial de membrana, permeabilidade e podem eventualmente levar à ruptura de membranas de organelas e da própria célula (SUN & CHEN, 1998). Considerando que o dano isquêmico esteja associado a disfunções mitocondriais, assim como a inibição da cadeia respiratória (BORUTAITE *et al.*, 1995), estratégias que mantenham uma alta atividade da cadeia respiratória sem aumentar a produção de radicais livres podem ser consideradas alternativas para a intervenção terapêutica em eventos isquêmicos. Baseado nesse contexto sugere-se

que a boldina na concentração de 10 μM seja uma possível substância neuroprotetora durante processos isquêmicos, uma vez que essa concentração promoveu tanto um aumento de 28 % na atividade mitocondrial, sem alterações significativas na liberação de LDH citosólico, bem como redução de 25 % nos níveis de MDA liberados durante a POG.

Sendo assim, estes dados corroboram a idéia da vulnerabilidade do hipocampo a eventos excitotóxicos, como isquemia cerebral e desordens neurodegenerativas, uma vez que já se sabe que o hipocampo é uma das regiões cerebrais mais vulneráveis ao EO (CANDELARIO-JALIL *et al.*, 2001).

A doença de Alzheimer não possui uma fisiopatogênese ainda amplamente conhecida, mas é aceito que um dos mecanismos desta desordem neurodegenerativa seja uma grande perda de neurônios colinérgicos, fato este que explica as terapias vigentes de se potencializar a função colinérgica. Estudos demonstram que em fases adiantadas desta doença, ocorre tanto perdas qualitativas como quantitativas da atividade da enzima acetilcolinesterase (SHINOTOH *et al.*, 2000), e que são verificados agregados de AChE com o peptídeo β -amilóide em fases iniciais da doença, sendo a atividade desta enzima aumentada nas regiões próximas às placas amilóides (SÁEZ-VALERO *et al.*, 2002). Além disso, evidências demonstram a relação entre o estresse oxidativo e a doença de Alzheimer, causando o aumento na LPO, assim como oxidação de DNA, RNA e proteínas específicas, como creatina quinase e β -tubulina (SMITH *et al.*, 2000).

Assim, considerando que o estudo de antioxidantes e anticolinesterásicos de origem natural constitui uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fármacos, o capítulo 3 do presente trabalho visou à avaliação da possível atividade antioxidante frente à DPPH e inibitória para a enzima AChE para a boldina e outros alcalóides indólicos, em ensaios *in vitro*.

Quanto à atividade antioxidante, todos os alcalóides testados, com exceção da vincamina e da cantin-6-ona apresentaram atividade ao final de 4 horas de observação da placa após a revelação com o reagente, embora todos tenham exibido menor potencial antioxidante em comparação ao flavonóide quercetina, nas mesmas concentrações testadas.

O método para detecção de atividade anticolinesterásica empregando-se um corante azóico apresentado neste trabalho, desenvolvido por MARSTON e colaboradores (2002), apresenta um limite de detecção visual cerca de 10 vezes maior em relação a outro método, também colorimétrico, desenvolvido por RHEE e colaboradores (2001) e que preconiza o uso do reagente de Ellmann [ácido 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico)]. Nesse caso, a visualização da atividade enzimática aparece na forma de halos de inibição brancos sobre um fundo amarelo, enquanto que no nosso trabalho os halos de inibição formados eram brancos contra um fundo azulado, mais nítidos, portanto. Dentre os alcalóides testados, coronaridina, venalstonina, boldina, voacangina, ibogaína, reserpina, vincadiformina e voacristina apresentaram atividade inibitória para a enzima de maneira comparável ao padrão galantamina.

Assim, alcalóides como coronaridina, venalstonina, andrangina, boldina, vincadiformina e voacristina, por apresentarem tanto atividades antioxidante como anticolinesterásica, podem ser considerados uma potencial fonte de alternativas para o tratamento da doença de Alzheimer.

Desta forma, este trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento tanto sobre inéditas atividades biológicas envolvendo alcalóides indólicos, envolvendo o estudo de seus efeitos sobre possíveis efeitos neuroprotetores, antioxidantes e anticolinesterásicos, bem como o estudo de parâmetros de estresse oxidativo com o uso de fatias hipocâmpais de ratos em um modelo experimental de isquemia.

CONCLUSÕES

✓ Efeitos *in vitro* dos alcalóides boldina, vincamina, psicolatina e reserpina em fatias de hipocampo de ratos submetidos à POG:

- A presença de boldina promoveu um aumento na liberação de LDH citosólico para as fatias hipocâmpais controles, nas concentrações de 50 e 100 μM (126 % e 141 %, respectivamente) e para as fatias que sofreram lesão isquêmica, na concentração de 100 μM (40 %). Além disso, a concentração de boldina 10 μM promoveu um aumento de 28 % na viabilidade mitocondrial nas fatias do grupo POG e 100 μM promoveu diminuição deste parâmetro tanto para as fatias submetidas à POG (15 %) como para as fatias controles (18,5 %);
- A presença de vincamina promoveu um aumento na liberação de LDH intracelular nas fatias hipocâmpais que sofreram POG, nas concentrações de 10 μM (17 %) e de 100 μM (40 %) e nas fatias controles, nas concentrações de 10 μM (44 %) e 100 μM (220 %). Quanto à viabilidade mitocondrial, as concentrações de 1 e 10 μM de vincamina não promoveram alterações significativas, enquanto que 50 μM promoveu uma diminuição de 17 % no grupo controle e 100 μM promoveu um aumento de 12 % neste parâmetro bioquímico nas fatias POG;
- A presença de reserpina promoveu um aumento na liberação de LDH intracelular nas fatias hipocâmpais que sofreram lesão isquêmica, nas concentrações de 10 μM (38 %) e de 100 μM (31 %). Quanto à viabilidade mitocondrial, as concentrações de 1 μM e 10 μM de reserpina não promoveram alterações significativas, enquanto que em 50 μM e 100 μM , a reserpina promoveu um aumento na viabilidade mitocondrial nos grupos controles, de 13 % e de 17 %, respectivamente;
- A presença de psicolatina promoveu um aumento na liberação de LDH intracelular nas fatias hipocâmpais que sofreram POG, nas concentrações de 1 μM (31,5 %), 10 μM (26,5 %), 50 μM (16,5 %) e 100 μM (10 %) e nas fatias controles somente 100 μM promoveu aumento na liberação, de 58,5 %. Quanto à viabilidade mitocondrial, somente a

concentração de 50 μM promoveu alterações significativas neste parâmetro, um aumento de 13 % no grupo controle.

✓ Avaliação *in vitro* do TRAP e TAR de fatias de hipocampo de ratos submetidas à POG e avaliação *in vitro* do potencial antioxidante da boldina:

- A POG promoveu uma diminuição de 63 % para o valor de TRAP e de 16,5 % para o valor do TAR em fatias de hipocampo de ratos;
- A boldina exibe atividade seqüestradora para radicais peroxila superior quando comparada ao Trolox;
- A POG promoveu um aumento na liberação de MDA nas fatias de hipocampo de ratos, e este efeito foi revertido pela boldina nas concentrações de 10 μM (25 %) e de 50 μM (17,6 %).

✓ Determinação *in vitro* das atividades anticolinesterásica e antioxidante de diferentes alcalóides:

- Os alcalóides coronaridina, venalstonina, andrangina, boldina, voacangina, ibogaína, reserpina, vincadiformina e voacristina apresentaram atividade inibitória para a enzima acetilcolinesterase quando comparados ao padrão galantamina;
- Os alcalóides coronaridina, venalstonina, andrangina, boldina, voacangina, ibogaína, vincadiformina, voacristina, ajmalicina, psicolatina e reserpina apresentaram atividade antioxidante frente ao DPPH, embora todos de menor efeito em comparação ao padrão quercetina.

REFERÊNCIAS

AITKEN, P. G., BREESE, G. R., DEDEK, F. F., EDWARDS, F., ESPANOL, M. T., LARKMAN, P. M., LIPTON, P., NEWMAN, G. C., NOWAK, T. S., PANIZZON, K. L., RALEY-SUSMAN, K. M., REID, K. H., RICE, M. E., SARVEY, J. M., SCHOEPP, D. D., SEGAL, M., TAYLOR, C. P., TEYLER, T. J., VOULADAS, P. J. Preparative methods for brain slices: a discussion. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 59, p.139-149, 1995.

ALKAYED, N. J., MURPHY, S.J., TRAYSTMAN, R. J., HURN, P.D. Neuroprotective effects of female gonadal steroids in reproductively senescent female rats. **Stroke**, v. 31, p.161-168, 2000.

ALMEIDA, E. R.; MELO, A. M.; XAVIER, H.; E.R. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 99–102, 2000.

ANDRADE, M. T.; LIMA, J. A.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M.; CARVALHO, M. P.; EPIFANIO, R. A. Indole alkaloids from *Tabernaemontana australis* (Müell. Arg) Miers that inhibit acetylcholinesterase enzyme. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4092-4095, 2005.

ARAKI T., KOGURE K., MURAKAMI M. Prevention of abnormal calcium accumulation in postischemic gerbil brain by vinconate. **Acta Neurologica Scandinava**, v. 83, p.155-160, 1991a.

ARAKI, T., KATO, H., KOGURE, K. Protective effect of vinconate, a novel vinca alkaloid derivative, on glucose utilization and brain edema in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. **General Pharmacology**, v. 23, p.141-146, 1991b.

ASCHNER, M. Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. **Toxicological Letters**, v. 102-103, p. 283-287, 1998.

ASENCIO, M.; DELAQUERRIÈRE, B. K.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; COMOY, E.; PROTAIS, P. Biochemical and behavioural effects of boldine and glaucine on dopamine systems. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 62, p. 7-13, 1999.

AYALA, C.; GREENLUND, K. J.; CROFT, J. B.; KEENAN, N. L.; DONEHOO, R. S. Racial/ethnic disparities in mortality by stroke subtype in the United States. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, p. 1057-1063, 2001.

BACHURIN, S.; OXENKRUG, G.; LERMONTOVA, N.; AFANASIEV, A.; BEZNOSKO, B.; VANKIN, G.; SHEVTZOVA, E.; MUKHINA, T.; SERKOVA, T. N-acetylserotonin, melatonin and their derivatives improve cognition and protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 890, p. 155-166, 1999.

BACKHOUSE, N.; DELPORTE, C.; GIVERNAU, M.; CASSELS, B. K.; VALENZUELA, A.; SPEISKY, H. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. **Agents Actions**, v. 42, p. 114–117, 1994.

BÄGENHOLM, R.; NILSSON, U. A.; KJELLMER, I. Formation of free radicals in hypoxic ischemic brain damage in the neonatal rat, assessed by an endogenous spin trap and lipid peroxidation. **Brain Research**, v. 773, p. 132-138, 1997.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BANNACH, R.; VALENZUELA, A.; CASSELS, B. K.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; SPEISKY, H. Cytoprotective and antioxidant effects of boldine on tert-butyl hydroperoxide-induced damage to isolated hepatocytes. **Cellular Biology & Toxicology**, v. 12, p. 89-100, 1996.

BARINAGA, M. Missing Alzheimer's gene found. **Science**. V. 269, p. 917-918, 1995.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

BARTUS, R. T., DEAN, R. L., MENNERICK, S., EVELETH, D., LYNCH, G. Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia. **Brain Research**, v. 790, p.1-13, 1998.

BARTUS, R. T.; EMERICH, D. F. Cholinergic markers in Alzheimer's disease. **Journal of the Medical Association**, v. 282, p. 2208–2209, 1999.

BEHL, C.; DAVIS, J.; COLE, G. M.; SCHUBERT, D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 186, p. 944-950, 1992.

BERG, L.; McKEEL, D. W.; MILLER, J. P.; BATY, J.; MORRIS, J. C. Neurophatological indexes of Alzheimer's disease in demented and nondemented persons aged 80 years and older. **Archives of Neurology**, v. 50, n. 4, p. 349-358, 1993.

BERNARDI, A. P.; FERRAZ, A.; ALBRING, D. V.; BORDIGNON, S.; SCHRIPSEMA, J.; BRIDI, R.; DUTRA-FILHO, C.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 784-786, 2005.

BERNAUDIM, M., NOUVELOT, A., MACKENZIE, E. T., PETIT, E. Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. **Experimental Neurology**, v. 150, p. 30-39, 1998.

BOECK, C. R.; GANZELLA, M.; LOTTERMANN, A.; VENDITE, D. NMDA preconditioning prevents against seizures and hippocampal neurotoxicity induced by quinolinic acid in mice. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 745-750, 2004.

BONOCZK, P.; GULYAS, B.; ADAM-VIZI, V.; NEMES, A.; KARPATI, E.; KISS, B.; KAPAS, M.; SZANTAY, C.; KONCZ, I.; ZELLES, T.; VAS, A. Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: effect of vinpocetine. **Brain Research Bulletin**, v. 53, p. 245-254, 2000.

BORUTAITE, V.; MILDAZIENE, V.; BROWN, G. C.; BRAND, M. D. Control and kinetic analysis of ischemia-damaged heart mitochondria: which parts of the oxidative phosphorylation system are affected by ischemia? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1272, p. 154-158, 1995.

BOTH, F. L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A.; ELISABETSKY, E. Analgesic properties of umbellatine from *Psychotria umbellata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 5, p. 336-341, 2002.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A.; ELISABETSKY, E. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT_{2A/C} serotonin modulator. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 374-380, 2005.

BOTH, F. L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V. A.; HENRIQUES, A. T.; ELISABETSKY, E. Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the indole alkaloid psychollatine. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 342-345, 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRANNAN, T. S.; MARKER, H. S.; RAES, I. P. Regional distribution of catalase in the adult rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 36, p. 307-309, 1981.

BREDER, J.; SABELHAUS, C. F.; OPITZ, T.; REYMANN, K. G.; SCHRODER, U. H. Inhibition of different pathways influencing Na(+) homeostasis protects organotypic hippocampal slice cultures from hypoxic/hypoglycemic injury. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1779-1787, 2000.

BRUCE, A. J.; SAKHI, S.; SCHREIBER, S. S.; BAUDRY, M. Development of kainic acid and N-methyl-D-aspartic acid toxicity in organotypic hippocampal cultures. **Experimental Neurology**, v. 132, p. 209-219, 1995.

BRUNETON, J. Alcaloïdes. In: BRUNETON, J. (Ed.) **Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie**. Zaragoza: Acribia, 2^a. ed., 1991. 594 p.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BURGER, M. E.; FACHINETO, R.; ALVES, A.; CALLEGARI, L.; ROCHA, J. B. T. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. **Brain Research**, v. 1031, p. 202-210, 2005.

BURTON, G. W.; DOBA, T.; GABE, E. J.; HUGHES, L.; LEE, F. L.; PRASAD, L.; INGOLD, K. U. Autoxidation of biological molecules. Maximizing the antioxidant activity of phenols. **Journal of American Chemistry Society**, v. 107, p. 7053-7065, 1985.

BUTTERFIELD, D. A.; HOWARD, B.; YATIN, S.; KOPPAL, T.; DRAKE, J.; HENSLEY, K. Elevated oxidative stress in models of normal brain aging and Alzheimer's disease. **Life Sciences**, v. 65, p. 1883-1892, 1999.

CALABRESE, V.; BATES, T. E.; STELLA, A. M. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. **Neurochemical Research**, v. 25, p. 1315-1341, 2000.

CANDELARIO-JALIL, E.; MHADU, N. H.; AL-DALAIN, S. M.; MARTINEZ, G.; LEÓN, O. S. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. **Neuroscience Research**, v. 41, p. 233-241, 2001.

CANTUTI-CASTELVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 18, p. 367-381, 2000.

CAO, G., MINAMI, M., PEI, W., YAN, C., CHEN, D., O'HORO, C., GRAHAM, S. H., CHEN, J. Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signalling pathway in ischemic neuronal death. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 21, p.321-333, 2001.

CÁRDENAS, A.; DE ALBA, J.; MORO, M. A.; LEZA, J. C.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I. Protective effect of *N*-(3-(aminomethyl) benzyl)acetamide, an inducible nitric oxide synthase inhibitor, in brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation. **European Journal of Pharmacology**, v. 354, p. 161-165, 1998.

CÁRDENAS, A.; MORO, M. A.; HURTADO, O.; LEZA, J. C.; LORENZO, P.; CASTRILLO, A.; BORDELON, O. G.; BOSCA, L.; LIZASOAIN, I. Implication of glutamate in the expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, p. 2041-2048, 2000.

CARLINI, E. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003.

CASSELS, B. K.; ASENCIO, M. CONGET, P.; SPEISKY, H.; VIDELA, L. A.; LISSI, E. A. Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline alkaloids. **Pharmacological Research**, v. 31, p. 103-107, 1995.

CASSERLY, I. Convergence of atherosclerosis and Alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. **Lancet**, v. 9415, p. 1139-1146, 2004.

CAVIN, A.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K.; DYATMIKO, W. Use of on-flow LC/ ¹H NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1497-1501, 1998.

CEDERBAUM, A. I.; KUKIELKA, E.; SPEISKY, H. Inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation by boldine. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 1765-1772, 1992.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, v. 59, p. 527-605, 1979.

CHERUBINI, A.; RUGGIERO, C.; POLIDORI, M. C.; MECOCCHI, P. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, p. 841-852, 2005.

CHOI, D.; ROTHMAN, S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annual Review of Neuroscience**, v. 13, p. 171-182, 1990.

CHOI, D.W. Calcium: still center-stage in hypoxic/ischemic neuronal death. **Trends in Neurosciences**, v. 18, p. 58-60, 1995.

CHOI, Y. T.; JUNG, C. H.; LEE, S. R.; BAE, J. H.; BAEK, W. K.; SUH, M. H.; PARK, C. W.; SUH, S. The green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate attenuates β -amyloid induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. **Life Sciences**, v. 70, p. 603-614, 2001.

CHYAN, Y. J.; POEGGELER, B.; OMAR, R. A.; CHAIN, D. G.; FRANGIONE, B.; GHISO, J.; PAPPOLLA, M. A. Potent neuroprotective properties against the Alzheimer beta-amyloid by an endogenous melatonin-related indole structure, indole-3-propionic acid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 31, p. 21937-27942, 1999.

CIMAROSTI, H.; RODNIGHT, R.; TAVARES, A.; PAIVA, R.; VALENTIM, L.; ROCHA, E.; SALBEGO C. G. An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience Letters**, v. 23, p. 33-36, 2001.

COLDBOURNE, F., SUTHERLAND, G. R., AUER, R. N. Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. **Journal of Neurosciences**, v. 19, p. 4200-4210, 1999.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTI, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagrae blumei*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 80, p. 1144- 1152, 1997.

CUI, K.; LUO, X.; XU, K.; VEM MURTHY, M. R. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 28, n. 5, p. 771-799, 2004.

CURZON, G. How reserpine and chlorpromazine act: the impact of key discoveries on the history of psychopharmacology. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 11, p. 61-63, 1990.

DAVIS, J.; ANTONAWICH, F. Role of apoptotic proteins in ischemic hippocampal damage. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 10. p. 309-320, 1991.

DE ALBA, J.; CÁRDENAS, A.; MORO, M. A.; LEZA, J. C.; LORENZO, P.; BOSCA, L.; LIZASOAIN, I. Down-regulation of neuronal nitric oxide synthase by nitric oxide after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. **Journal of Neurochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1999a.

DE ALBA, J.; CÁRDENAS, A.; MORO, M. A.; LEZA, J. C.; LORENZO, P.; LIZASOAIN, I. Use of brain slices in the study of pathogenic role of inducible nitric oxide synthase in cerebral ischemia-reperfusion. **General Pharmacology**, v. 32, p. 577-581, 1999b.

DE KEYSER, J., SULTER, G., LUITEN, P. G. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischaemic stroke: are we doing the right thing? **Trends in Neurosciences**, v. 22, p.535-540, 1999.

DE STROOPER, B.; ANNAERT, W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. **Journal of Cellular Science**, v. 113, p. 1857-1870, 2000.

DENOBLE, V. J.; REPETTI, S. J.; GELPKE, L. W.; WOOD, L. M.; KEIM, K. L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 24, p. 1123-1128, 1986.

DESMARCHELIER, C.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. ("marcela"). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1163-1170, 1998.

DHANDAPANI, K. M. ; BRANN, D. W. Estrogen-astrocyte interactions: implications for neuroprotection. **BMC Neurosciences**, v.3, p.1-4, 2002.

DIMAGL, U., LINDAUER, U., THEM, A., SCHREIBER, S., PFISTER, H., KOEDEL, U., RESZKA, R., FREYER, D., VILLRINGER, A. Global cerebral ischemia in the rat: online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence *in vivo*. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 15, p.925-940, 1995.

DIRNAGL, U., IADECOLA, C., MOSKOWITZ, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. **Trends in Neurosciences**, v. 22, p.391-397, 1999.

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

DUGAN, L. L.; CHOI, D. W. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress. In: SIEGEL, G. J., AGRANOFF, B. W., ALBERS, R. W., MOLINOFF, P. B. (Ed.) **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6th.ed., New York: Raven Press, 1999. 1080 p.

DULIN, B., ABRAHAM, W. T. Pharmacology of carvedilol. **The American Journal of Pharmacology**, v. 93, p.3B-6B, 2004.

DUTRA, R. C.; ANDREAZZA, A. P.; ANDREATINI, R.; TUFIK, S.; VITAL, M. A. B. F. Behavioural effects of MK-801 on reserpine-treated mice. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 487– 495, 2002.

ELTZE, M.; GREBE, T.; MICHEL, M. C.; CZYBORRA, P.; ULLRICH, B. Affinity profile at α 1- and α 2-adrenoceptor subtypes and *in vitro* cardiovascular actions of (+)-boldine. **European Journal of Pharmacology**, v. 443, p. 151–168, 2002.

ERDŐ, S. L., MOLNÁR, P., LAKICS, V., BENCE, J. Z. TÖMÖSKÖZI, Z. Vincamine and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na⁺ channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 314, p.69-73, 1996.

ERDŐ, S. L., NING-SHENG, C., WOLFF, J. R., KISS, B. Vinpocetin protects against excitotoxic cell death in primary cultures of rat cerebral cortex. **European Journal of Pharmacology**, v. 187, p.551-553, 1990.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

EVANS, P. H. Free radicals in brain metabolism and pathology. **British Medical Bulletin**, v. 49, p. 577-587, 1993.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 388, p. 261-266, 2001.

FARIA, R. R.; ABÍLIO, V. C.; GRASS, C.; CHINEN, C. C.; NEGRÃO, L. T.; DE CASTRO, J. P.; FUKUSHIRO, D. F.; RODRIGUES, M. S.; GOMES, P. H.; REGISTRO, S.; CARVALHO, R. C.; D'ALMEIDA, V.; SILVA, R. H.; RIBEIRO, R. A.; FRUSSA-FILHO, R. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 993-1001, 2005.

FAROOQUI, A.A.; HAUN, S.E.; HORROCKS, L.A. Ischemia and hypoxia. In: SIEGEL, G., AGRANOFF, B., ALVERS, R. W., MOLINOFF, P. (Ed.) **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 6th. ed. New York: Raven, 1994. 1080 p.

FASTREZ, J. *In vivo* versus *in vitro* screening or selection for catalytic activity in enzymes and abzymes. **Molecular Biotechnology**, v. 7, p. 37-55, 1997.

FEDERICI, E.; PALAZZINO, G.; NICOLETTI, M.; GALEFFI, C. Antiplasmodial activity of the alkaloids of *Peschiera fuchsiaefolia*. **Planta medica**, v. 66, p. 93-95, 2000.

FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERRER, I.; SORIANO, M.A.; VIDAL, A.; PLANAS, A. M. Survival of parvalbumin-immunoreactive neurons in the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia does not depend on HSP-70 protein induction. **Brain Research**, v. 692, p. 41-46, 1995.

FEUERSTEIN, G. Z.; RUFFOLO, R. R. Carvedilol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection. **European Heart Journal**, v.16, p.38-42, 1995.

FONTELLA, F.; CIMAROSTI, H.; CREMA, L. M.; THOMAZI, A. P.; LEITE, M. C.; SALBEGO, C.; GONÇALVES, C. A.; WOFCHUK, S.; DALMAZ, C.; NETTO, C. A. Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research Bulletin**, v. 65, p. 443-450, 2005.

FORETTE, F.; ANAND, R.; GHARABAWI, G.; A phase II in patients with Alzheimer disease to assess the preliminary with efficacy and maximum tolerated dose of rivastigmine (Exelom). **European Journal of Neurology**, v. 6, p. 423-429, 1999.

FORMAN, M. S.; TROJANOWSKY, J. Q.; LEE, V. M. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. **Nature Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1055-1063, 2004.

FRANCIS, P. T.; PALMER, A. M.; SNAPE, M.; WILCOCK, G. K. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 66, p. 137-147, 1999.

FRANTSEVA, M. V., CARLEN, P. I., VELAZQUEZ, J. L. P. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p.1216-1227, 2001.

FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases and related matters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p.18515-18517, 1997.

GÄHWILER, B.H. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 4, p. 329-42. 1981.

GÄHWILER, B.H.; CAPOGNA, M.; DEBANNE, D.; MCKINNEY, R.A.; THOMPSON S.M. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 471-477, 1997.

GALKIN, V. E.; ORLOVA, A.; LUKOYANOVA, N.; VANLOOCK, M. S.; HAAG, P.; BULLARD, B.; EGELMAN, E. H. The location of ubiquitin in *Lethocerus arthrin*. **Journal of Molecular Biology**, v. 325, p. 623–628, 2003.

GANELLIN, C. R. General approaches to discovering new drugs: an historical perspective. In: GANELLIN, C. R.; ROBERTS, S. M. (Ed.) **Medicinal Chemistry: The Role of Organic Chemistry in Drug Research**. London: Academic, 2nd. ed., 1993. 302 p.

GANGA, A.; NIETO, S.; SANHUEZA, J.; ROMO, C.; SPEISKY, H.; VALENZUELA, A. Concentration and stabilization of *n*-3 poly-unsaturated fatty acids from sardine oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 75, p. 733–736, 1998.

GARCIA-SEGURA, L. M., AZCOITIA, I., DON-CARLOS, L.L. Neuroprotection by estradiol. **Progress in Neurobiology**, v. 63, p.29-60, 2001.

GASIC, G. P.; HOLLMANN, M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. **Trends in Neurosciences**, v. 54, p. 507-536, 1992.

GEBHARDT, R. *In vitro* screening of plant extracts and phytopharmaceuticals: novel approaches for the elucidation of active compounds and their mechanisms. **Planta Medica**, v. 66, p. 99-105, 2000.

GERASIMOV, V. D.; ARTEMENKO, D. P.; KRISHTAL, O. A. Therapeutic time window for the neuroprotective action of MK-801 after decapitation ischemia: hippocampal slice data. **Brain Research**, v. 1017, p. 92-97, 2004.

GIACOBINI, E. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications. **Neurochemistry International**, v. 32, p. 413-419, 1998.

GILANI, A. H.; RAHMAN, A. Trends in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 43-49, 2005.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 959-975, 2001.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direitos dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 199 p.

GONZÁLEZ-CABELLO, R.; SPEISKY, H.; BANNACH, R.; VALENZUELA, A.; FEHÉR, J.; GERGELY, P. Effects of boldine on cellular immune functions *in vitro*. **Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology**, v. 4, p. 139–145, 1994.

GOTTELAND, M.; ESPINOZA, J.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H. Effect of a dry boldo extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers. **Revista Medica de Chile**, v. 123, p. 955–960, 1995.

GOTTELAND, M.; JIMÉNEZ, I.; BRUNSER, O.; GUZMAN, L.; ROMERO, S.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H. Protective effect of boldine in experimental colitis. **Planta Medica**, v. 63, p. 311–315, 1997.

GOTTI, B., BENAVIDES, J., MACKENZIE, E. T., SCATTON, B. The pharmacotherapy of focal cortical ischaemia in the mouse. **Brain Research**, v. 522, p.290-307, 1990.

GRAHAM, S. H.; CHEN, J. Programmed cell death in cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 21, p.99-109, 2001.

GUERRERO, A.; GONZÁLEZ-CORREA, J. A.; ARREBOLA, M. M.; MUÑOZ-MARÍN- J.; SÁNCHEZ DE LA CUESTA, F.; DE LA CRUZ, J. P. Antioxidant effects of a single dose of acetylsalicylic acid and salicylic acid in rat brain slices subjected to oxygen-glucose deprivation in relation with its antiplatelet effect. **Neuroscience Letters**, v. 358, p. 153-156, 2004.

GUTTERIDGE, J. M.; CAO, W.; CHEVION, M. Bleomycin-detectable iron in brain tissue. **Free Radical Research Communications**, v. 11, p. 317-320, 1991.

HAASS, C.; DE STROOPER, B. The presenilins in Alzheimer's disease - proteolysis holds the key. **Science**, v. 286, p. 916-919, 1999.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686-699, 2005.

HALLIWELL, B. Drug antioxidant effects. **Drugs**, v. 42, n. 4, p. 569-605, 1991.

HALLIWELL, B. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction? **Annals of Neurology**, v. 32, p. 510-515, 1992.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v.18, n. 9, p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, n. 186, p. 1-63, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.) **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University, 3rd. ed., 1999a. 636 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Detection of free radicals and other reactive species: trapping and fingerprinting. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.) **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University, 3rd. ed., 1999b. 636 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Antioxidant defenses. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.) **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University, 3rd. ed., 1999c. 636 p.

HARAGUSHI, H. Antioxidative plant constituents. In: TRINGALI, C (Ed.) **Bioactive Compounds from Natural Sources**. London: Taylor & Francis, 1st. ed., 2001. 693 p.

HEBERT, L. E.; SCHERR, P. A.; BIERRLAS, J. R.; BENNETT, D. A.; EVANS, D. A. Alzheimer disease in the U.S. population: prevalence estimates using the 2000 census. **Archives of Neurology**, v. 60, p. 1119-1122, 2003.

HEINZEL, B.; JOHN, M.; KLATT, P.; BOHME, E.; MAYER, B. Ca²⁺/ calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. **Biochemical Journal**, v. 281, p. 627-630, 1992.

HENRIQUES, A. T.; MELO, A. A.; MORENO, P. R.; ENE, L. L.; HENRIQUES, J. A.; SCHAPOVAL, E. E. S. *Ervatamia coronaria*: chemical constituents and some pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, p. 19-25, 1996.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V.; MORENO, P. R. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 5^a ed., 2003. 1102 p.

HICKS, P., ROLSTEN, C., BRIZZEE, D., SAMORAJSKI, T. Age-related changes in rat capillaries. **Neurobiology of Aging**, v. 4, p.69-75, 1983.

HOCK, F. J. Therapeutic approaches for memory impairments. **Behavioural Brain Research**, v. 66, p. 143-150, 1995.

HOFFMAN, C.; RICE, D.; SUNG, H. Y. Persons with chronic conditions. Their prevalence and costs. **Journal of the American Medical Association**, v. 276, p. 1473-1479, 1996.

HORÁKOVÁ, L., STOLC, S. Antioxidant and pharmacodynamic effects of pyridoindele stobadine. **General Pharmacology**, v. 30, p.627-638, 1998.

HORST, G. T.; POSTIGO, A. Prevalence and mechanisms of cell death. In: HORST, G. T.; KORF, J. (Ed.). **Clinical Pharmacology of Cerebral Ischemia**. New Jersey: Humana, 1997. 305 p.

HOSSMANN, K. A. Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. **Progress in Brain Research**, v. 96, p.161-177, 1993.

HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. A procura dos princípios ativos. In: HOSTETTMAN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C (Ed.) **Princípios ativos de plantas Superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 2003. 152 p.

HSU, M., SIK, A., GALLYAS, F., HORVÁTH, Z., BUSKÁKI, G. Short-term and long term changes in the postischemic hippocampus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 743, p.121-139, 1994.

IADECOLA, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. **Trends in Neurosciences**, v. 20, p. 132-139, 1997.

IINO, T., KATSURA, M., KURIYAMA, K. Protective effect of vinconate on ischemia-induced neuronal damage in the rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 224, p.117-124, 1992.

ITOH, A.; KUMASHIRO, T.; YAMAGUCHI, M.; NAGAKURA, N.; MIZUSHINA, Y.; NISHI, T.; TANAHASHI, T. Indole Alkaloids and Other Constituents of *Rauwolfia serpentine*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 848-852, 2005.

IVORRA, M. D.; MARTYNEZ, F.; SERRANO, A.; D'OCÓN, P. Different mechanism of relaxation induced by aporphine alkaloids in rat uterus. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, v. 45, p. 439–443, 1993a.

IVORRA, M. D.; CHULÍA, S.; LUGNIER, C.; D'OCÓN, M. P. Selective action of two aporphines at α 1-adrenoceptors and potential-operated Ca²⁺ channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 231, p. 165–174, 1993b.

JAESCHKE, H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 209, p. 104–111, 1995.

JANG, Y. Y.; SONG, J. H.; SHIN, Y. K.; HAN, E. S.; LEE, C. S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 42, p. 361-371, 2000.

JAPAN MEDICAL PRODUCTS INTERNATIONAL TRADE ASSOCIATION. **Japan Pharmaceutical Reference (JPR)**, 5th ed., 1999. 1600 p.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. **Pathologie Biologie**, v. 44, p. 57-64, 1996.

JIMÉNEZ, I.; LISSI, E.; SPEISKY, H. Free radical-induced inactivation of lysozyme and carbonyl residue generation in protein are not necessarily associated. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, p. 247-252, 2000.

JIMÉNEZ, I.; SPEISKY, H. Biological disposition of boldine: *in vitro* and *in vivo* studies. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 254-260, 2000.

JOSEPH, J. A.; DENISOVA, J. A.; BIELINSKY, D.; FISHER, D. R.; SHUKITT-HALE, B. Oxidative stress protection and vulnerability in aging: putative nutritional implications for intervention. **Mechanisms of Aging Development**, v. 116, p. 141-153, 2000.

JUCKER, M., BÄTTIG, K., MEIER-RUGE, W. Effects of aging and vincamine derivatives on pericapillary microenvironment: stereological characterization of the cerebral capillary network. **Neurobiology of Aging**, v. 11, p.39-46, 1990.

JUURLINK, B.; SWEENEY, M. Mechanisms that result in damage during and following cerebral ischemia. **Neuroscience & Biobehavioural Reviews**, v. 21, n.2, p.121-128, 1997.

KANEKO, S., SUGIMURA, M., INOUE, T., SATOH, M. Effects of several cerebroprotective drugs on NMDA channel function: evaluation using *Xenopus* oocytes and [³H] MK-801 binding. **European Journal of Pharmacology**, v. 207, p.119-128, 1991.

KANG, J. J.; CHENG, Y. W. Effects of boldine on mouse diaphragm and sarcoplasmic reticulum vesicles isolated from skeletal muscle. **Planta Medica**, v. 64, p. 18–21, 1998.

KÁRPÁTI, E.; SZPORNÝ, L. General and cerebral haemodynamic activity of ethyl apovincamate. **Arzneimittelforschung**, v. 26, p.1908-1912, 1976.

KATSURA, M., IINO, T., XU, J., OHKUMA, S., KURIYAMA, K. Vinconate, a cognitive enhancer, and PI turnover-phospholipase C systems in the brain. **Behavioural Brain Research**, v. 83, p.75-81, 1997.

KATSURAGI, T., OHBA, M., MORI, R., KUSHIKU, K., FURUKAVA, T. Calcium antagonistic action involved in vasodilation by brovincamine. **General Pharmacology**, v. 15, p.43-45, 1984.

KELLER, J. N.; MARK, R. J.; BRUCE, A. J.; BLANC, E.; ROTHSTEIN, J. D.; UCHIDA, K.; WAEG, G.; MATTSON, M. P. 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial transport function in synaptosomes. **Neuroscience**, v. 80, p. 685-696, 1997.

KERBER, V. **Análise dos alcalóides de *Psychotria brachiceras* Müell. Arg. e *Psychotria umbellata* Vell., e o estabelecimento e caracterização de culturas de células de *Psychotria umbellata* Vell.** Porto Alegre: Curso de Pós Graduação em

Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 1999, Tese (Doutorado). 223 p.

KHALIFA, E. A. Zuclopenthixol facilitates memory retrieval in rats: possible involvement of noradrenergic and serotonergic mechanisms. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 75, p. 755-762, 2003.

KING, G. A. Protective effects of vinpocetine and structurally related drugs on the lethal consequences of hypoxia in mice. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 286, p.299-307, 1987.

KIRINO, T. Delayed neuronal death. **Neuropathology**, v. 20, p. S95-97, 2000.

KIRINO, T.; SANO, K. Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. **Acta Neuropathologica**, v.62, p. 201-208, 1984.

KIRINO, T.; TAMURA, A.; SANO, K. Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia-reversible and irreversible types of ischemic cell damage. **Progress in Brain Research**, v. 63, p. 39-58, 1985.

KODA, H. T., HASHIMOTO, T., KURIYAMA, K. Muscarinic receptor-mediated regulation of OM-853 enhanced dopamine release in striatum of rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 162, p.501, 1989.

KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206– 220, 2005.

KOH, J. Y.; CHOI, D. W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 20, p. 83-90, 1987.

KOH, J. Y.; COTMAN, C. W. Programmed cell death: its possible role in calcium channel antagonist neurotoxicity. **Brain Research**, v. 587, p. 233-240, 1992.

KOROLKOVAS, A., FRANÇA, F. F. A. C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**, Edição 2004/2005. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2004. Não paginado.

KOZIKOWSKI, A. P.; TÜCKMANTEL, W. Chemistry, pharmacology, and clinical efficacy of the Chinese nootropic agent huperzine A. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, n. 8, p. 641-650, 1999.

KRINGSTEIN, P.; CEDERBAUM, A. I. Boldine prevents human liver microsomal lipid peroxidation and inactivation of cytochrome P4502E1. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 3, p. 559-563, 1995.

KYSELOVA, Z., RACKOVA, R., STEFEK, M. Pyridoindole antioxidant stobadine protected bovine serum albumin against the hydroxyl radical mediated cross-linking *in vitro*. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 36, p.221-229, 2003.

LAAKE, J. H.; HAUG, F. M.; WIELOCH, T.; OTTERSEN, O. P. A simple *in vitro* model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence. **Brain Research Protocols**, v. 4, p. 173-184, 1999.

LAKICS, V., SEBESTYÉN, M. G., ERDŐ, S. L. Vinpocetine is a highly potent neuroprotectant against veratridine-induced cell death in primary cultures of rat cerebral cortex. **Neuroscience Letters**, v. 185, p.127-130, 1995.

LANHERS, M. C.; JOYEUX, M.; SOULIMANI, R.; FLEURENTIN, J.; SAYAG, M.; MORTIER, F.; YOUNOS, C.; PELT, J. M. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of Chile, *Peumus boldus*. **Planta Medica**, v. 57, p. 110-115, 1991.

LAYER, R. T., SKOLNICK, P., BERTHA, C. M., BANDARAGE, U. K., KUEHNE, M. E., POPIK, P. Structurally modified ibogaine analogs exhibit differing affinities for NMDA receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 309, p.159-165, 1996.

LENDVAI, B.; ZELLES, T.; ROZSA, B.; VIZI, S. A vinca alkaloid enhances morphological dynamics of dendritic spines of neocortical layer 2/3 pyramidal cells. **Brain Research Bulletin**, v. 59, n. 4, p. 257-260, 2003.

LIANG, Y. Q.; TANG, X. C. Comparative effects of huperzine A, donepezil and rivastigmine on cortical acetylcholine level and acetylcholinesterase activity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 56-59, 2004.

LIAO, S. L., CHEN, W. Y., KUO, J. S., CHEN, C. J. Association of serum estrogen level and ischemic neuroprotection in female rats. **Neuroscience Letters**, n. 297, p.159-162, 2001.

LIPTON, P. Ischemic cell death in brain neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, p.1431-1568, 1999.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DELCASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v. 17, n. 5, p. 299-311, 1992.

LISSI, E.; SALIM-HANNA, M.; PASCUAL, C.; DELCASTILLO, M. D. Evaluation of total antioxidant potencial (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 2, p. 153-158, 1995.

LITTLEHALES, C. Protecting wildlife. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 749-752, 1999.

LIU, Y.; PETERSON, D. A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 581- 593, 1997.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **Journal of Neuroscience Methods**, v. 96, p. 147-152, 2000.

LOETSCHER, H., NIEDERHAUSER, O., KEMP, J., GILL, R. Is caspase-3 inhibition a valid therapeutic strategy in cerebral ischemia? **Drug Discovery Today**, v. 6, p.671-680, 2001.

LOGHIN, F.; CHAGRAOUI, A.; ASECIO, M.; COMOY, E.; SPEISKY, H.; CASSELS, B.; PROTAIS, P. Effects of some antioxidative aporphine derivatives on striatal dopaminergic transmissión and on MPTP-induced striatal dopamine depletion in B6CBA mice. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 18, p. 133-140, 2003.

LOO, D. T.; RILLEMA, J. R. Measurement of cell death. **Methabolic Cellular Biology**, v. 57, p. 251-264, 1998.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, p. 2521-2529, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LYSKO, P. G., LYSKO, K. A., WEBB, C. L., FEUERSTEIN, G., MASON, P. E., WALTER, M. F., MASON, R. P. Neuroprotective activities of carvedilol and a hydroxylated derivative. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, p.1645-1656, 1998.

LYSKO, P. G., LYSKO, K. A., YUE, T. L., WEBB, C. L., GU, J. L., FEUERSTEIN, G. Neuroprotective effects of carvedilol, a new antihypertensive agent, in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia. **Stroke**, v. 23, p.1630-1636, 1992.

MAELICKE, A.; SCHRATTENHOLTZ, A.; SAMOCHOCKI, M.; RADINA, M.; ALBUQUERQUE, E. X. Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 113, p. 199- 206, 2000.

MAELICKE, A.; SAMOCHOCKI, M.; JOSTOCK, R.; FEHRENBACHER, A.; LUDWIG, J.; ALBUQUERQUE, E. X.; ZERLIN, M. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. **Biological Psychiatry**, v. 49, p. 279-288, 2001.

MARSHALL, K. A., REITER, R. J., POEGGELER, B., ARUOMA, O. I., HALLIWELL, B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin *in vitro*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, p.307-315, 1996.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMAN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MARTINEZ, L. A.; RIOS, J. L.; PAYA, M.; ALCARAZ, M. J. Inhibition of nonenzymic lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 12, p. 287-292, 1992.

MARTÍNEZ, S.; MADRERO, Y.; ELORRIAGA, M.; NOGUERA, M. A.; CASSELS, B. K.; SOBRAZO, E.; D'OCÓN, M. P.; IVORRA, M. D. Halogenated derivatives of boldine with high selectivity for α 1A-adrenoceptors in rat cerebral cortex. **Life Sciences**, v. 64, p.1205–1214, 1999.

MATSUYAMA, T. Free radical-mediated cerebral damage after hypoxia/ischemia and stroke. In: HORST, G. T. e KORF, J. (Ed.) **Clinical pharmacology of cerebral ischemia**. New Jersey: Humana, 1997. 305 p.

MATTHEW, J. P.; ELLMAN, J. A. Combinatorial chemistry and new drugs. **Scientific American**, p. 69-73, 1997.

MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-640, 2004.

MAZÁK, K., VÁMOS, J., NEMES, A., RÁCZ, A., NOSZÁL, B. Lipophilicity of vinpocetine and related compounds characterized by reversed-phase thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 996, p.195-203, 2003.

MÉNDEZ, E.; SANHUEZA, J.; NIETO, S.; SPEISKY, H.; VALENZUELA, A. Fatty acid composition, extraction, fractionation, and stabilization of Bullfrog (*Rana catesbeiana*) oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 75, p. 67-71, 1998.

MENESES, A.; HONG, E. Role of 5-HT1B, 5-HT2A and 5-HT2C receptors in learning. **Behavioural Brain Research**, v. 87, p. 105-110, 1997.

METZGER, R. R.; BROWN, J. M.; SANDOVAL, V.; RAU, K. S.; ELWAN, M. A.; MILLER, G. W.; HANSON, G. R.; FLECKENSTEIN, F. E. Inhibitory effect of reserpine on dopamine transporter function. **European Journal of Pharmacology**, v. 456, p. 39-43, 2002.

MICHAELIS, M. L. Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 3, p. 897-904, 2003.

MITANI, A., YANASI, H., SAKAI, K., WAKE, Y., KATAOKA, K. Origin of intracellular Ca^{2+} elevation induced by *in vitro* ischemia-like condition in hippocampal slices. **Brain Research**, v. 601, p.103-110, 1993.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTINE K. S.; OLSON S. J.; AMARNATH V.; WHETSELL J. R.; GRAHAM D. G.; MONTINE T. J. Immunohistochemical detection of 4-hydroxy-2-nonenal adducts in Alzheimer's disease is associated with inheritance of ApoE4. **American Journal of Pathology**, v. 150, p. 437-443, 1997.

MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 367-371, 1994.

MORENO, P. R.; VARGAS, V. M.; ANDRADE, H. H.; HENRIQUES, A. T.; HENRIQUES, J. A. Genotoxicity of the boldine aporphine alkaloid in prokaryotic and eukaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 260, p. 145-152, 1991.

MORO, M.A; DE ALBA, J; LEZA, J.C; LORENZO, P; FERNANDEZ, A.P; BENTURA, M.L; BOSCA, L; RODRIGO, J; LIZASOAIN, I. Neuronal expression of inducible nitric oxide synthase after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **European Journal of Neurosciences**, v. 10, p. 445-456, 1998.

MORO, M. A.; DE ALBA, J.; CÁRDENAS, A.; DE CRISTÓBAL, J.; LEZA, J. C.; LIZASOAIN, I.; DÍAZ-GUERRA, M. J. M. BOSCA, L.; LORENZO, P. Mechanisms of the neuroprotective effect of aspirine after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slices. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 1309-1318, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSS, D. W.; HENDERSON, A. R. Enzimas. In: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R (Ed.) **Tietz fundamentos de química clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4ª. ed., 1998. 836 p.

MROUE, M. A.; EULER, K. L.; GHUMAN, M. A.; ALAM, M. Indole alkaloids of *Haplophyton crooksii*. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 890-893, 1996.

MULHOLLAND, P.J.; PRENDERGAST, M.A. Post-insult exposure to (\pm) kavain potentiates *N*-methyl-*D*-aspartate toxicity in the developing hippocampus. **Brain Research**, v. 945, p.106-113, 2002.

NETTO, C. A.; HODGES, H.; SINDEN, J. D.; LEPEILLET, E.; KERSHAW, T.; SOWINSKY, P.; MELDRUM, B.; GRAY, J. CA1 foetal grafts alleviate ischaemic-induced behavioural deficits in the water maze. **Behavioural Brain Research**, v. 58, p. 107-112, 1993.

NEWELL, D. W.; HSU, S. S.; PAPERMASTER, V.; MALOUF, A. T. Colchicine is selectively neurotoxic to dentate granule cells in organotypic cultures of rat hippocampus. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 375-380, 1993.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.

NEWMAN, G. C.; HOSPOD, F. E.; WU, P. Glucose utilization of ischemic hippocampal slices. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 28, p. 23-34, 1989.

NORABERG, J.; KRISTENSEN, B. W.; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Research Protocols**, v. 3, p. 278-290, 1999.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v.159, p. 1-17, 2005.

O'HEARN, E.; MOLLIVER, M. E. Administration of a non-NMDA antagonist, GYKI 52466, increases excitotoxic Purkinje cell degeneration caused by ibogaine. **Neuroscience**, v. 127, p. 373-383, 2004.

OLIVER, C. N.; STARKE-REED, P. E.; STADTMAN, E. R.; LIU, G. J.; CARNEY, J. M.; FLOYD, R. A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 87, p. 5144-5147, 1990.

OLPE, H. R., BARRIONUEVO, G., LYNCH, G. Vincamine: a psychogeriatric agent blocking synaptic potentiation in hippocampus. **Life Sciences**, v. 31, p.1947-1953, 1982.

ORDY, J. M., WENGENACK, T. M., BIALOBOCK, P., COLEMAN, P. D., RODIER, P., BAGGS, R. B., DUNLAP, W. P., KATEST, B. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. **Experimental Neurology**, p.128-139, 1993.

PAAL, M.L. NMDA sensibilization and stimulation by peroxyntirite, nitric oxide, and organic solvents as the mechanism of chemical sensitivity in multiple chemical sensitivity. **The FASEB Journal**, v. 16, p. 1407-1417, 2002.

PARIHAR, M. S.; HEMNANI, T. Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic Interventions. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 456-467, 2004.

PATEL, M.; DAY, B. J.; CRAPO, J. D.; FRIDOVICH, I.; MCNAMARA, J. O. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. **Neuron**, v. 16, p. 345-355, 1996.

PELLMAR, T. C. Use of brain slices in the study of free-radical actions. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 59, p. 93-98, 1995.

PEREIRA, C., AGOSTINHO, P., MOREIRA, P. I., DUARTE, A. I., SANTOS, M. S., OLIVEIRA, C. R. Estratégias de neuroproteção. Efeito da vimpocetina em modelos *in vitro* de estresse oxidativo. **Acta Médica Portuguesa**, v. 16, p.401-406, 2003.

PHILLIS, J. W.; O'REGAN, M. H.; ESTEVEZ, A. Y.; SONG, D.; VANDERHEIDE, S. J. Cerebral energy metabolism during severe ischemia of varying duration and following reperfusion. **Journal of Neurochemistry**, v. 67, p. 1525-1531, 1996.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. Antioxidant, pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. **Life Sciences**, v. 74, p. 2815-2826, 2004.

POPIK, P., LAYER, R. T., SKOLNICK, P. 100 years of ibogaine: neurochemical and pharmacological actions of a putative anti-addictive drug. **Pharmacological Reviews**, v. 47, p. 235, 1995.

PORCIÚNCULA, L. O.; ROCHA, J. B.; CIMAROSTI, H.; VINADÉ, L.; GHISLENI, G.; SALBEGO, C.; SOUZA, D. O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal

slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immuncontent of inducible nitric oxide synthase. **Neuroscience Letters**, v. 346, p. 101-104, 2003.

PRASAD K. N.; HOVLAND A. R.; COLE W. C.; PRASAD K. C.; NAHREINI P.; EDWARDS-PRASAD J.; ANDREATTA C. P. Multiple antioxidants in the prevention and treatment of Alzheimer disease: analysis of biological rationale. **Clinical Neuropharmacology**, v. 23, n. 1, p. 2–13, 2000.

PRICE, D. New order from neurological disorders. **Nature**, v. 399, p.A3-A5, 1999.

PRINGLE, A.K.; IANNOTTI, F.; WILDE, G.J.C.; CHAD, J.E.; SEELEY, P.J.; SUNDSTROM, L.E. Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in *in vitro* ischemia. **Brain Research**, v. 755, p. 36-46, 1997.

QUEZADA, M.; ASECIO, M.; DEL VALLE, J. M.; AGUILERA, B. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 371-376, 2004.

QUICK, M.; JEYARASASINGAM, G. Nicotinic receptors and Parkinson's disease. **European Journal of Pharmacology**, v. 393, p. 223-230, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Transmissão noradrenérgica. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. (Ed.) **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4^a. ed., 2000a. 703 p.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Transmissão colinérgica. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. (Ed.) **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4^a. ed., 2000b. 703 p.

RASTOGI, N.; ABAUL, J.; GOH, J. S.; DEVALLOIS, A.; PHILOGENE, E.; BOURGEOIS, P. Antimycobacterial activity of chemically defined natural substances from the Caribbean flora in Guadeloupe. **FEMS Immunological and Medicinal Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 267-273, 1998.

REITER R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. **The FASEB Journal**, v. 9, p. 526–533, 1995.

RESNICK, A. Z.; PARKER, L. Free radicals and antioxidants in muscular neurological diseases and disorders. In: Poli, G.; Albano, E.; Dianzani, M. U. (Ed.) **Free Radicals: From Basic Science to Medicine**. Basel: Birkhäuser, 1993. 425 p.

RHEE, I. K.; VAN DER MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VEERPORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217-223, 2001.

RÍOS, J. L.; CHOLBI, R.; HUGUET, A. I.; MORA, A.; MAÑEZ, S.; PAIA, M.; ALCARAZ, M. J. Effects of benzylisoquinolines on lipid peroxidation and superoxide scavenging. **Planta Medica**, v. 56, p. 645-646, 1990.

RITSCHEL, W. A., MANDYBUR, T. I., GRUMMICH, K. W., VORHEES, C. V., MEANS, E. D. Experimental cerebral infarction in Mongolian gerbils: effects of vincamine on lesion size, survival and behaviour. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v.48, p.221-242, 1985.

SÁEZ-VALERO, J.; DE CEBALLOS, M. L.; SMALL, D. H.; DE FELIPE, C. Changes in molecular isoform distribution of acetylcholinesterase in rat cortex and cerebrospinal fluid after intracerebroventricular administration of amyloid beta-peptide. **Neuroscience Letters**, v. 325, p. 199-202, 2002.

SALETU, B., GRÜNBERGER, J., LINZMAYER, L., WITTEK, R. Classification and determination of pharmacodynamics of a new antihypoxic drug, vinconate, by pharmaco-EEG and psychometry. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.3, p.127, 1984.

SANTANAM, N.; PENUMETCHA, M.; SPEISKY, H.; PARTHASARATHY, S. A novel alkaloid antioxidant, boldine and synthetic antioxidant, reduced form of RU486, inhibit the oxidation of LDL *in vitro* and atherosclerosis *in vivo* in LDLR^{-/-} mice. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 203-210, 2004.

SAUER, D., RISCHKE, R., BECK, T., ROßBERG, C., MENNEL, H. D., BIELENBERG, G. W., KRIEGLSTEIN, J. Vinpocetine prevents ischemic cell damage in rat hippocampus. **Life Sciences**, v. 43, p.1733-1739, 1988.

SAUNDERS, R.; HORROCKS, G. P. Eicosanoids, plasma membranes and molecular mechanisms of spinal cord injury. **Neurochemical Pathology**, v. 7, p. 1-22, 1987.

SCARPINI, E.; SCHELTENS, P.; FELDMAN, H. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. **The Lancet Neurology**, v. 2, p. 539-547, 2003.

SCHALLER, B.; GRAF, R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 24, p. 351-371, 2004.

SCHIPPLING S.; KONTUSH A.; ARLT S.; BUHMANN C.; STURENBURG H. J.; MANN U.; THOMSEN T. M.; BEISIEGEL U. Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 351-360, 2000.

SCHMID, M. F.; AGRIS, J. M.; JAKANA, J.; MATSUDAIRA, P.; CHIU, W. Three-dimensional structure of a single filament in the *Limulus* acrosomal bundle: scruin binds to homologous helix-loop-beta motifs in actin. **Journal of Cell Biology**, v. 124, p. 341-350, 1994.

SCHMIDT-KASTNER, R.; FREUND T. F. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. **Neuroscience**, v. 4, p.599-636, 1991.

SCHREIBER, S.; BAUDRY, M. Selective neuronal vulnerability in the hippocampus – a role for gene expression? **Trends in Neurosciences**, v.18, p.446-451, 1995.

SCHRIPSEMA, J.; DAGNINO, D.; GOSMANN, G. Alcalóides indólicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Ed.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 5^a.ed., 2003. 1102 p.

SCHURR, A.; PAYNE, R. S.; HEINE, M. F.; RIGOR, B. M. Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 59, p. 129-138, 1995.

SCOTT, L. J.; GAO, K. L. Galanthamine: a review of its use in Alzheimer's disease. **Drugs**, v. 60, n. 5, p. 1095-1122, 2000.

SHINOTOH, H.; NAMBA, H.; FUKUSHI, K.; NAGATSUKA, S.; TANAKA, N.; AOTSUKA, A.; OTA, T.; TANADA, S.; IRIE, T. Progressive loss of cortical acetylcholinesterase activity in association with cognitive decline in Alzheimer's disease: a positron emission tomography study. **Annals of Neurology**, v. 48, p. 194-200, 2000.

SILVA, E. M.; CIRNE-SANTOS, C. C.; FRUGULHETTI, I.; GALVÃO-CASTRO, B.; SARAIVA, E. M.; KUEHNE, M. E.; BOU-HABIB, D. C. Anti-HIV activity of the *Iboga* congener 18-methoxycoronaridine. **Planta Medica**, v. 70, p. 808-812, 2004.

SILVA, E.; JOPIA, M.; EDWARDS, A. M.; LEMP, E.; DE LA FUENTE, J. R.; LISSI, E. Protective effect of boldo and tea infusions on the visible light-mediated pro-oxidant effects of Vitamin B2, riboflavin. **Photochemistry & Photobiology**, v. 75, p. 585–590, 2002.

SIQUEIRA, I.; CIMAROSTI, H.; FOCHESTATTO, C.; SALBEGO, C.; NETTO, C. A. Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. **Brain Research**, v. 1025, p. 226-230, 2004a.

SIQUEIRA, I.; CIMAROSTI, H.; FOCHESTATTO, C.; NUNES, D. S.; SALBEGO, C.; ELISABETSKY, E.; NETTO, C. A. Neuroprotective effects of *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) on oxygen and glucose deprivation induced damage in rat hippocampal slices. **Life Sciences**, v. 75, p. 1897-1906, 2004b.

SIQUEIRA, I. R.; FOCHESTATTO, C.; ANDRADE, A.; SANTOS, M.; HAGEN, M.; BELLO-KLEIN, A.; NETTO, C. A. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23, p. 663-671, 2005.

SMITH, M. A.; ROTTKAMP, C. A.; NUNOMURA, A.; RAINA, A. K.; PERRY, G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1502, p. 139-144, 2000.

SOBARZO-SÁNCHEZ, E. M.; ARBAOUI, J.; PROTAIS, P.; CASSELS, B. K. Halogenated boldine derivatives with enhanced monoamine receptor selectivity. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 480-484, 2000.

SOBRADO, M.; RODA, J. M.; LÓPEZ, M. G.; EGEA, J.; GARCÍA, A. G. Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. **Neuroscience Letters**, v. 365, p. 132-136, 2004.

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. **Pharmacological Research**, v. 29, p. 1-12, 1994.

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K.; NIETO, S.; VALENZUELA, A.; NUÑEZ-VERGARA, L. J. Determination of boldine in plasma by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 612, p. 315-319, 1993.

SPEISKY, H.; CASSELS, B.; LISSI, E.; VIDELA, L. A. Antioxidant properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation and enzyme inactivation. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 1575-1581, 1991a.

SPEISKY, H.; SQUELLA, J. A.; NUÑEZ-VERGARA, L. J. Activity of boldine on rat ileum. **Planta Medica**, v. 57, p. 519-522, 1991b.

STEVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal and Chemical Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 2, p. 173-182, 2005.

STOLC, S. Indole derivatives as neuroprotectants. **Life Sciences**, v. 65, p.1943-1950, 1999.

STOPPINI, L.; BUCHS, P.-A.; MULLER, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 37, p. 173-182, 1991.

STRASSER U.; FISCHER G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. **Journal of Neurosciences Methods**, v. 57, p. 177-186, 1995.

STRIGGOW, F.; RIEK, M.; BREDER, J.; HENRICH-NOACK, P.; REYMANN, K. G.; REISER, G. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 97, p. 2264-2269, 2000.

SUN, A. Y.; CHEN, Y. M. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Journal of Biomedical Sciences**, v. 5, p. 401-414, 1998.

SUN, X. P.; TAKEUCHI, H. Calcium antagonistic effects of brovincamine in a snail neurone. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 94C, p.55-61, 1989.

SWEENEY, M.; YAGER, J.Y.; WALZ, W.; JUURLINK, B.H.J. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 73, p. 1525-1535, 1995.

TABARRINI, O.; CECCHETTI, V.; TEMPERINI, A.; FILIPPONI, E.; LAMPERTI, M. G.; FRAVOLINI, A. Velnacrine thiaanalogues as potential agents for treating Alzheimer's disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 2921-2928, 2001.

TAVARES, A. **Avaliação da atividade neuroprotetora do extrato de kava (*Piper methysticum*) em modelos in vitro de lesão celular**. Porto Alegre: Curso de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2003, Dissertação (mestrado). 75 p.

TAVARES, A.; CIMAROSTI, H.; VALENTIM, L.; SALBEGO, C. Profile of phosphoprotein labelling in organotypic slice cultures of rat hippocampus. **Neuroreport Letters**, v. 12, p. 2705-2709, 2001.

TAVARES, D. C.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic potential of the alkaloid boldine in mammalian cell systems *in vitro* and *in vivo*. **Mutation Research**, v. 321, p. 139-145, 1994.

TAYLOR, C. P.; BURKE, S. P.; WEBER, M. L. Hippocampal slices: glutamate overflow and cellular damage from ischemia are reduced by sodium-channel blockade. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 59, p. 121-128, 1995.

TAYLOR, C. P.; MELDRUM, B. S. Na⁺ channels as targets for neuroprotective agents. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 16, p.309, 1995.

TAYLOR, D.; OBRENOVITCH, T. P.; SYMON, L. Changes in extracellular acid-base homeostasis in cerebral ischemia. **Neurochemical Research**, v. 21, n. 9, p. 1013-1021, 1996.

TAYLOR, P. Anticholinesterase agents. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G (Ed.) **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. New York: McGraw Hill, 10th. ed., 2003. 2148 p.

TENG, C. M.; HSUEH, C. M.; CHANG, Y. L.; KO, F. N.; LEE, S. S.; LIU, K. C. Antiplatelet effects of some aporphine and phenanthrene alkaloids in rabbits and man. **Journal of Pharmaceutics and Pharmacology**, v. 49, p. 706-711, 1997.

TOMINAGA, T., SATO, S., OHNISHI, T., OHNISHI, S. Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid artery occlusion and focal cerebral ischemia in the rat: *in vivo* detection of the nitric oxide radical by electron paramagnetic spin trapping. **Brain Research**, v. 614, p.342-346, 1993.

TRAYSTMAN, R. J., KIRSCH, J. R., KOEHLER, R. C. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. **Journal of Applied Physiology**, v.71, p.1185-1195, 1991.

UBEDA, A.; MONTESINOS, C.; PAIA, M.; ALCARAZ, M. J. Iron-reducing and free-radical-scavenging properties of apomorphine and some related benzyloquinolines. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, p. 159–167, 1993.

URZÚA, A.; ACUÑA, P. Alkaloids from the bark of *Peumus boldus*. **Fitoterapia**, v. 54, p. 175-177, 1983.

VALENTIM, L. M., MICHALOWSKI, C. B., GOTTARDO, S. P. PEDROSO, L., GESTRICH, L. G., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G., RODNIGHT, R. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunocontent in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 91, p.1291-1297, 1999.

VALENTIM, L. M., GEYER, A. B., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., WORM, P.V., RODNIGHT, R., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunocontent and phosphorylation in rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 107, p.43-49, 2001.

VALENTIM, L. M., RODNIGHT, R., GEYER, A. B., HORN, A. P., TAVARES, A., CIMAROSTI, H., NETTO, C. A., SALBEGO, C. G. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunocontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. **Neuroscience**, v. 118, p.379-386, 2003.

VALENZUELA, A.; NIETO, S.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H. Inhibitory effect of boldine on fish oil oxidation. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 68, p. 935–937, 1991.

VAN DER HEIJDEN, R.; JACOBS, D. I.; SNOEIJER, W.; HALLARD, D.; VEERPORTE, R. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 607-628, 2004.

VED, H. S.; KOENIG, M. L.; DAVE, J. R.; DOCTOR, B. P. Huperzine A, a potential therapeutic agent for dementia, reduces neuronal cell death caused by glutamate. **Neuroreport**, v. 8, p. 963-968, 1997.

VELAZQUEZ, J. L.; FRANTSEVA, M.; CARLEN, P. L. *In vitro* ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in pyramidal neurons of cultured hippocampal slices. **Journal of Neurosciences**, v. 17, p. 9085-9094, 1997.

VIEGAS JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

VLKOLINSKY, R., STOLC, S., ROSS, A. Effect of stobadine, U-74389G, trolox and melatonin on resistance of rat hippocampal slices to oxidative stress. **Life Sciences**, v. 65, p.1969-1971, 1999.

VORNOV, J. J.; TASKER, R.; COYLE, J. Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. **Stroke**, v. 25, p. 457-464, 1994.

WAJNER, M.; LATINI, A.; WYSE, A.; DUTRA-FILHO, C. S. The role of oxidative damage in the neuropathology of organic acidurias: insights from animal studies. **Journal of Inherited Metabolic Diseases**, v. 27, p. 427-448, 2004.

WANCATA, J.; MUSALEK, M.; ALEXANDROWITZ, R.; KRAUGARTNER, M. Number of dementia sufferers in Europe between the years of 2000-2050. **European Psychiatry**, v. 18, p. 306-313, 2003.

WANG, R.; ZHANG, H. Y.; TANG, X. C. Huperzine A attenuates cognitive dysfunction and neuronal degeneration caused by β -amyloid protein in rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 149-156, 2001.

WARD, R. J.; PETERS, T. J. Free radicals. In: Marshall, W. J.; Banger, S. K. (Ed.) **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects**. New York: Churchill Livingstone, 1995. 777p.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-332, 1981.

WEST, M. J.; COLEMAN, P. D.; FLOOD, D. G.; TRONCOSO, J. C. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 344, p. 769–772, 1994.

WHITE, B.C.; SULLIVAN, J.M.; DEGRACIA, D.J.; O'NEIL, B.J.; NEUMAR, R.W.; GROSSMAN, L.I.; RAFOLS, J.A.; KRAUSE, G.S. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 179, p. 1-33, 2000.

WILDE, G. J.; PRINGLE, A. K.; WRIGHT, P.; IANNOTTI, F. Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals *in vitro*. **Journal of Neurochemistry**, v. 69, p. 883-886, 1997.

XIAO, X. Q.; YANG, J. W.; TANG, X. C. Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury. **Neuroscience Letters**, v. 275, p. 73-76, 1999.

XU, S. S.; CAI, Z. Y.; QU, Z.; YANG, R. M.; CAI, Y. L.; WANG, G. Q.; SU, X. Q.; ZHONG, X. S.; CHENG, R. Y.; XU, W. A.; LI, J. X.; FENG, B. Huperzine A in capsules and tablets for treating patients with Alzheimer disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 20, p. 486-490, 1999.

YAGI, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. **Methods in Molecular Biology**, v. 108, p. 101-106, 1998.

YAMAGUCHI, S., FUKUYAMA, H., YONEKURA, Y., KONISHI, J. Effect of brovincamine on cerebral circulation and metabolism in internal carotid artery occlusion examined by positron emission tomography. **European Neurology**, v.32, p.314-317, 1992.

YAMASHIMA, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p.273-295, 2000.

YAMAZAKI, T.; KOO, E. H.; SELKOE, D. J. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. **Journal of Cellular Science**, v. 109, p. 999-1008, 1996.

YANG, G., KITAGAWA, K., OHTSUKI, T., KUWABARA, K., MABUCHI, T., YAGITA, Y., TAKAZAWA, K., TANAKA, S., YANAGIHARA, T., HORI, M., MATSUMOTO, M. Regional difference of neuronal vulnerability in the murine hippocampus after transient forebrain ischemia. **Brain Research**, v. 870, p.195-198, 2000.

YOUN, Y. C.; KWON, O. S.; HAN, E. S.; SONG, J. H.; SHIN, Y. K.; LEE, C. S. Protective effect of boldine on dopamine-induced membrane permeability transition in brain mitochondria and viability loss in PC12 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 495-505, 2002.

ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacology, Biochemistry & Behavior**, v. 75, p. 675-686, 2003.

ZANOCCO, A. L.; LEMP, E.; GÜNTHER, G. A kinetic study of the reaction between boldine and singlet oxygen [$O_2(^1\Delta_g)$]. **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, v. 2, p. 1299-1302, 1997.

ZENG, Y.S.; XU, Z. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. **Neuroscience Research**, v. 37, p.113-125, 2000.

ZETLER, G. Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 296, p. 255-281, 1988.

ZHAN, R. Z., WU, C., FUJIHARA, H., TAGA, K., QI, S., NAITO, M., SHIMOJI, K. Both caspase-dependent and caspase-independent pathways may be involved in hippocampal CA1 neuronal death because of loss of cytochrome c from mitochondria in a rat forebrain ischemia model. **Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism**, v. 21, p.529-540, 2001.

ZHOU, J.; FU, Y.; TANG, X. C. Huperzine A and donepezil protect rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. **Neuroscience Letters**, v. 306, p. 53-56, 2001a.

ZHOU, J.; ZHANG, H. Y.; TANG, X. C. Huperzine A attenuates cognitive deficits and hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. **Neuroscience Letters**, v. 313, p. 137-140, 2001b.

ZIMIANI, K.; GUARNIER, F. A.; MIRANDA, H. C.; WATANABE, M. A.; CECCHINI, R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/ reperfusion as evaluated by chemiluminescence. **Nitric Oxide**, v. 13, p. 196-203, 2005.

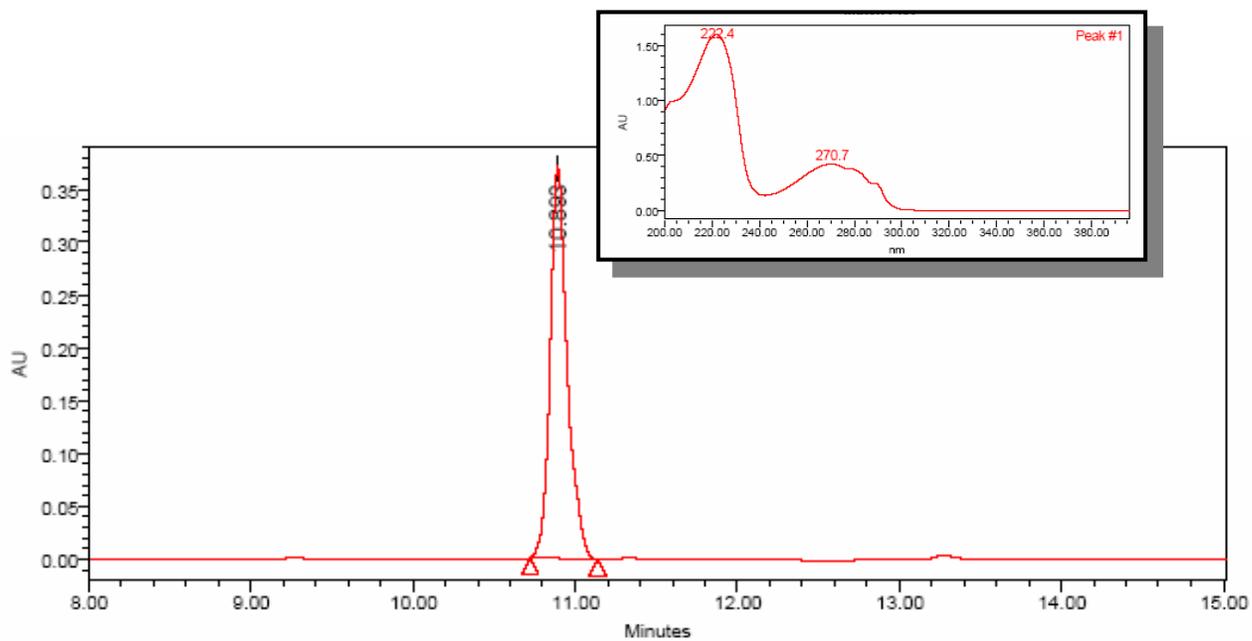


Figura A1 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide vincamina.

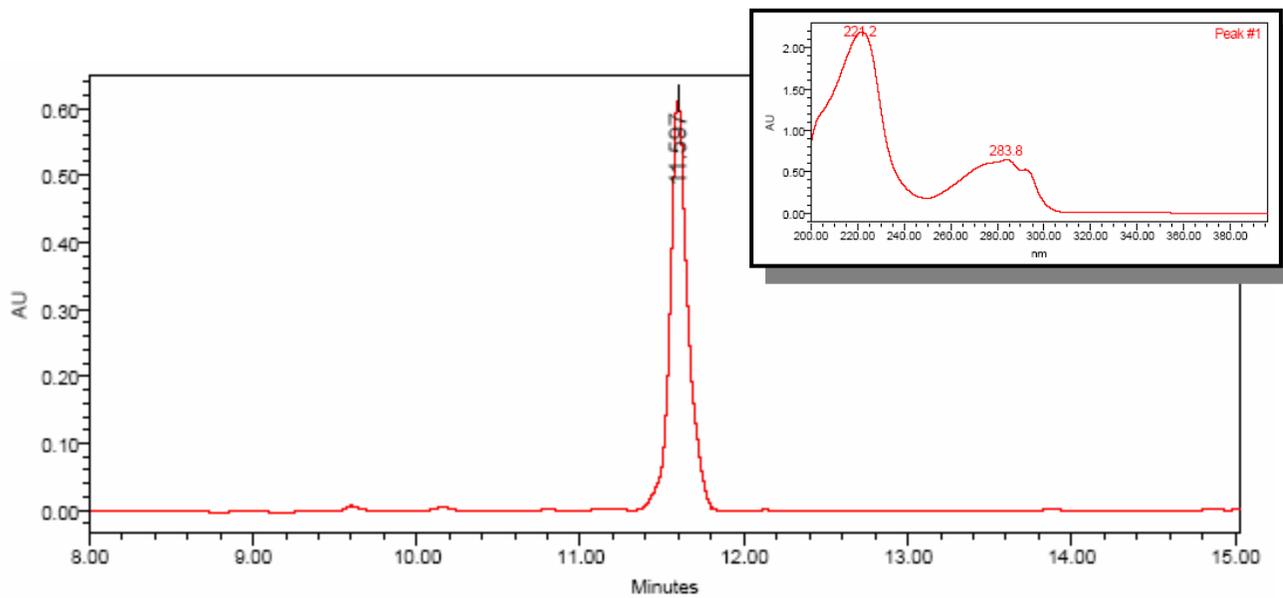


Figura A2 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide coronaridina.

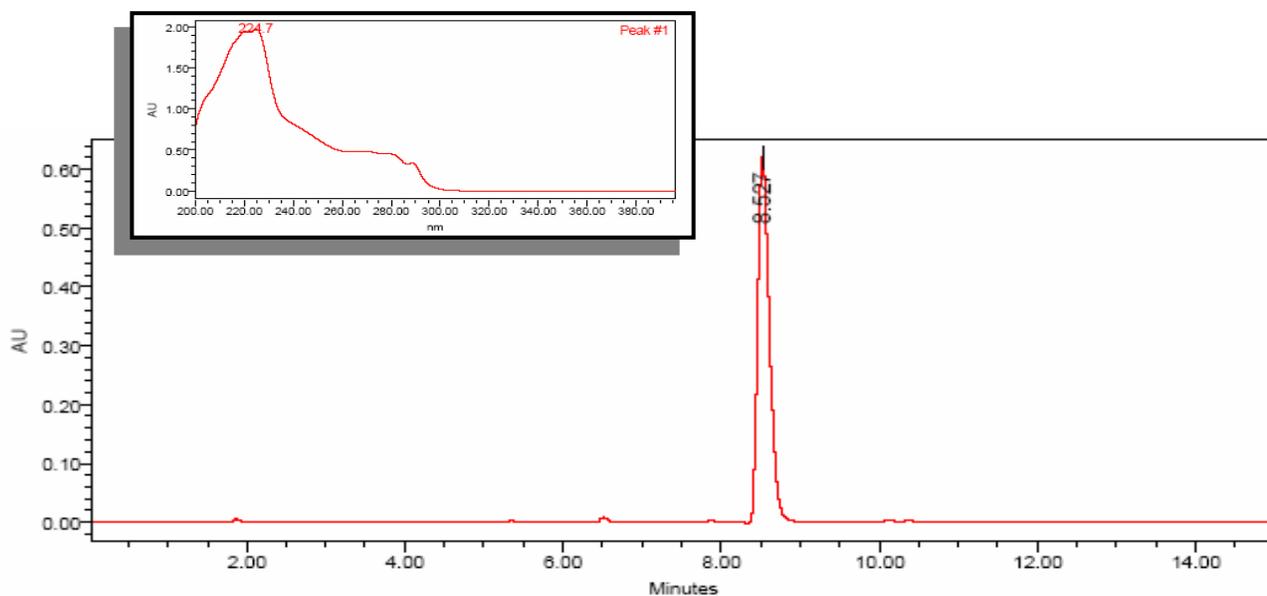


Figura A3 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide ajmalicina.

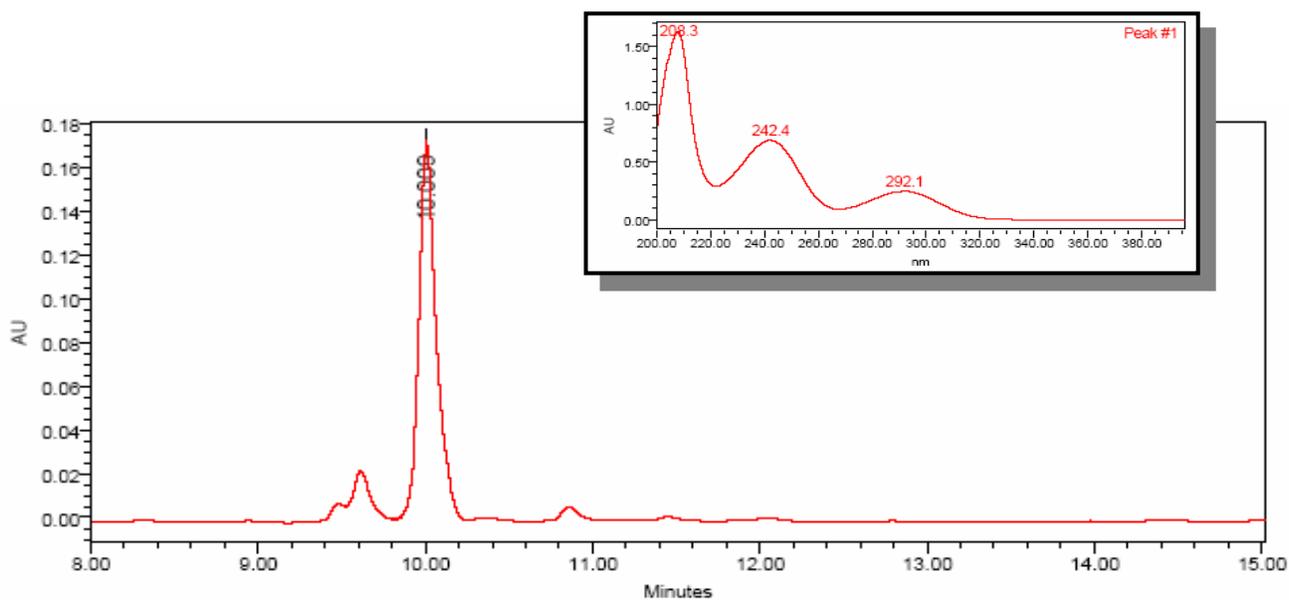


Figura A4 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide venalstonina.

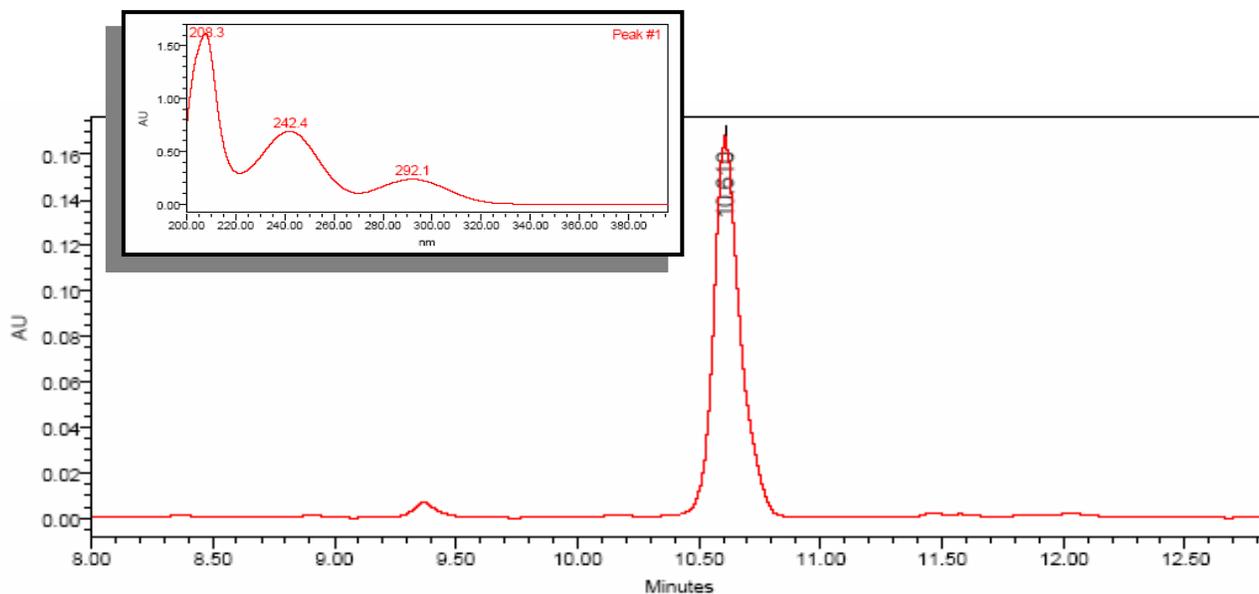


Figura A5 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide andrangina.

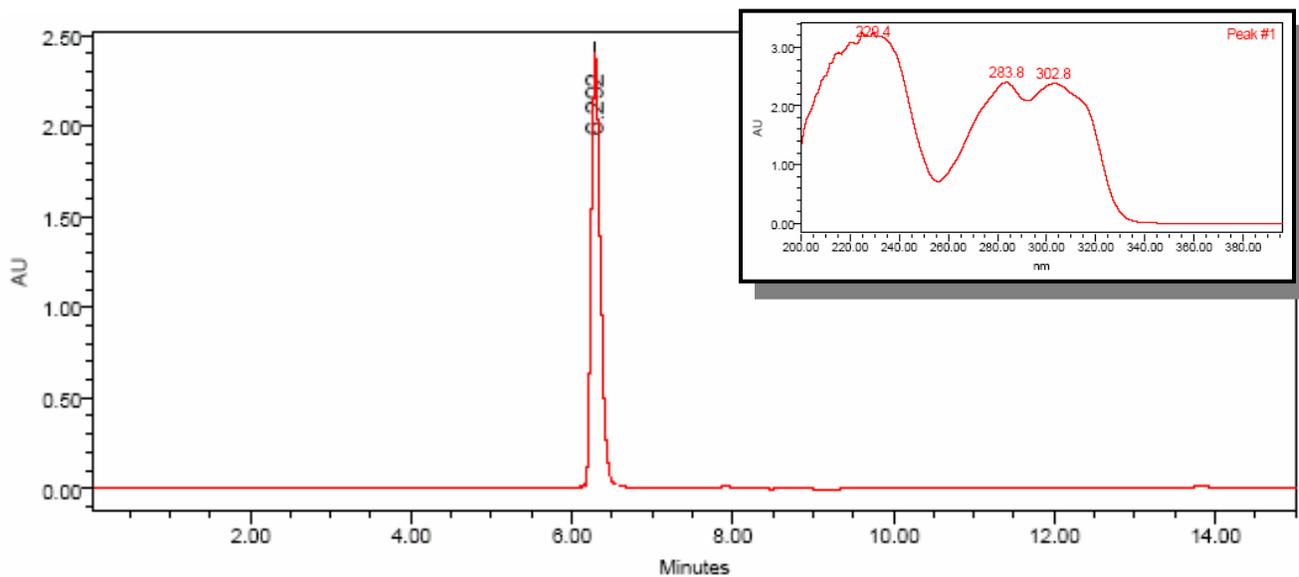


Figura A6 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide boldina.

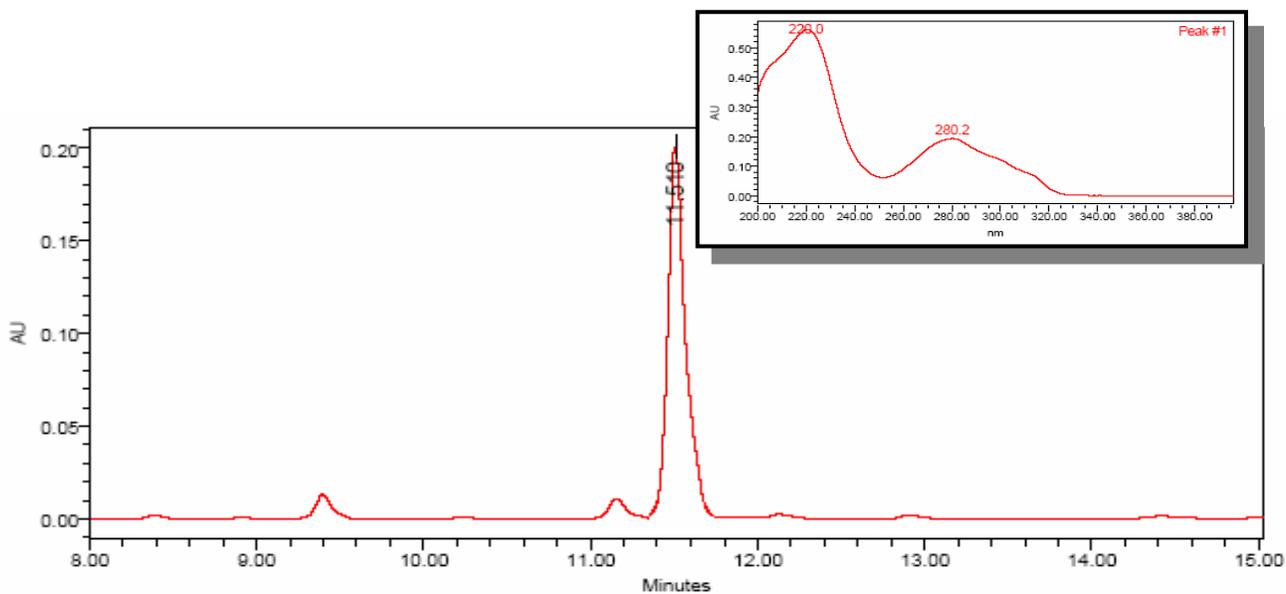


Figura A7 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide voacangina.

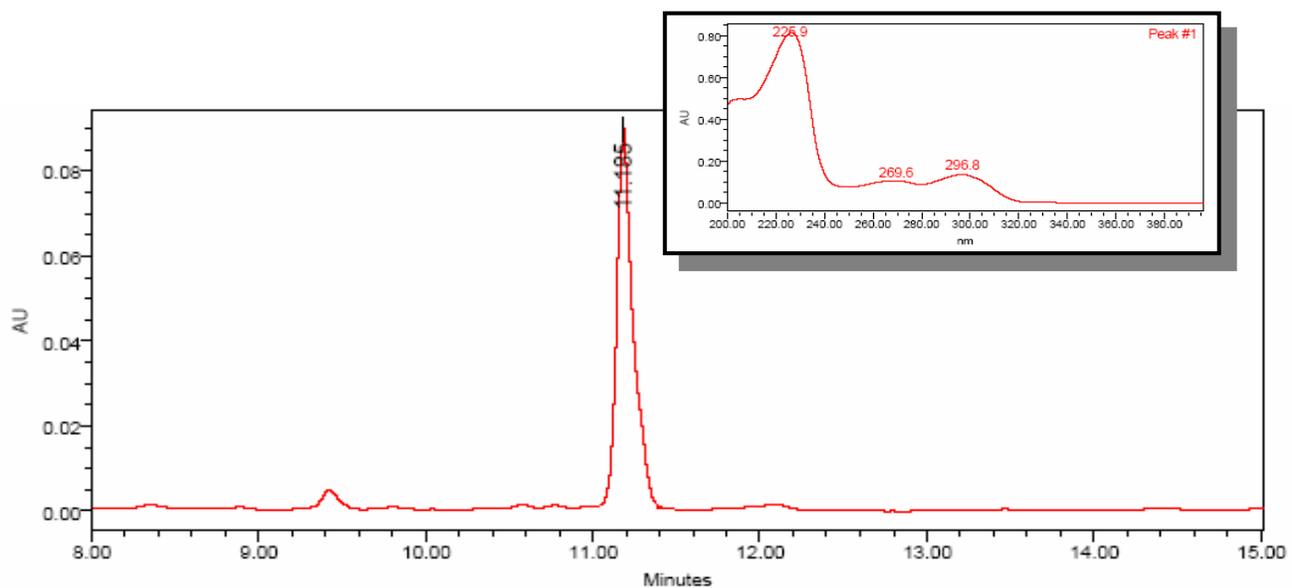


Figura A8 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide ibogaïne.

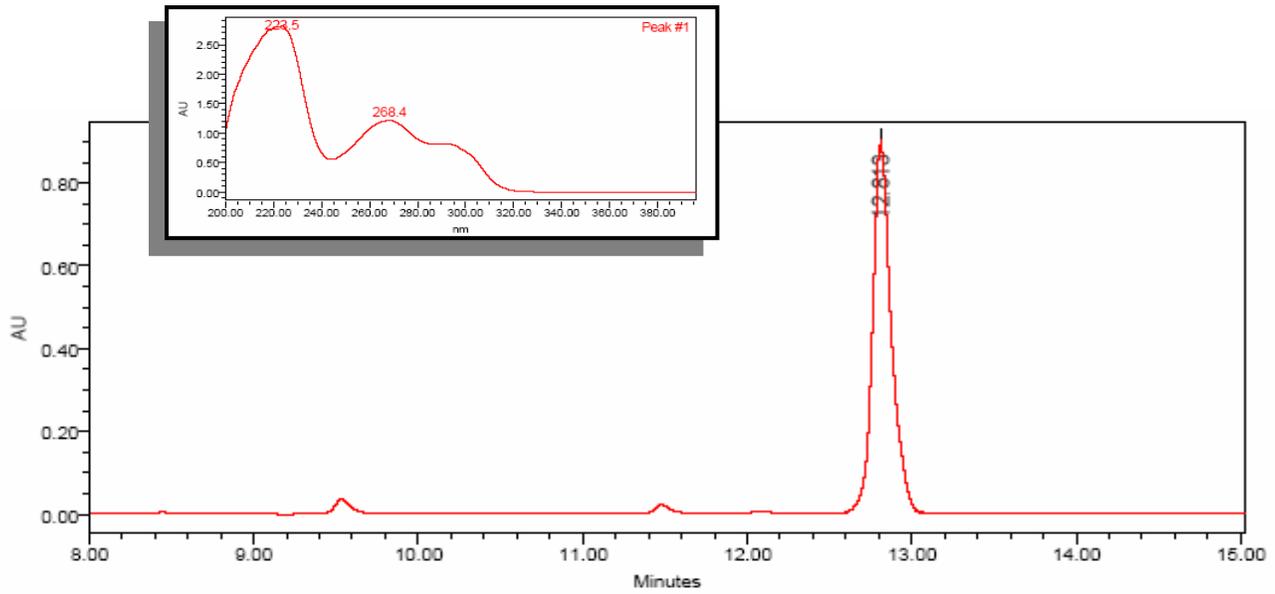


Figura A9 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide reserpina.

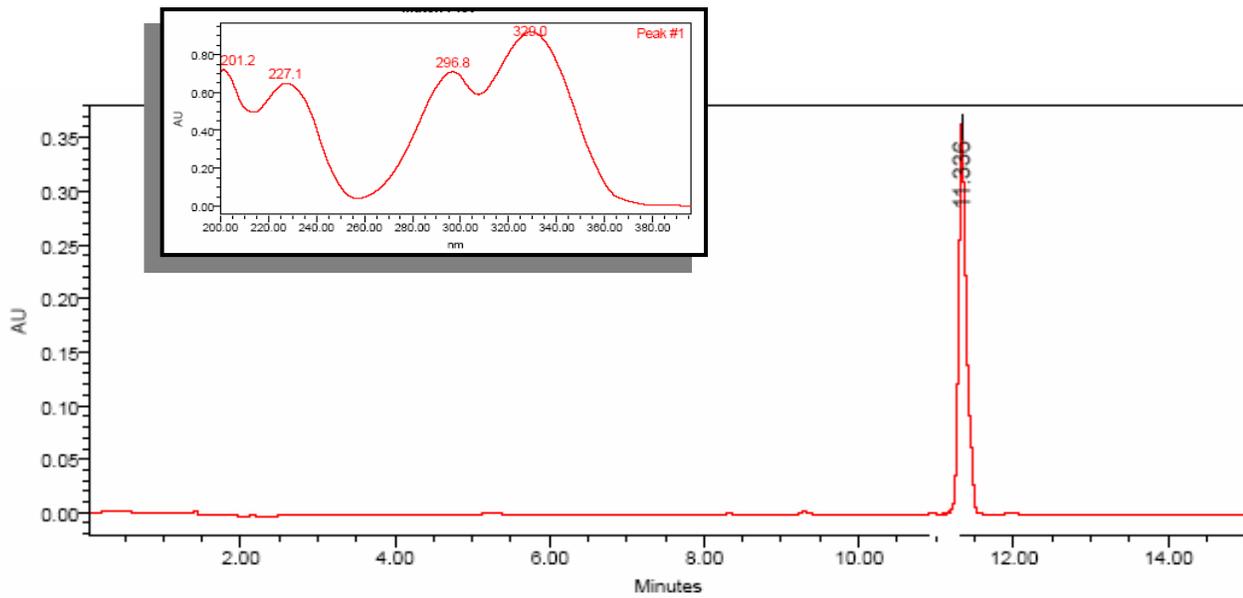


Figura A10 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide vincadiformina.

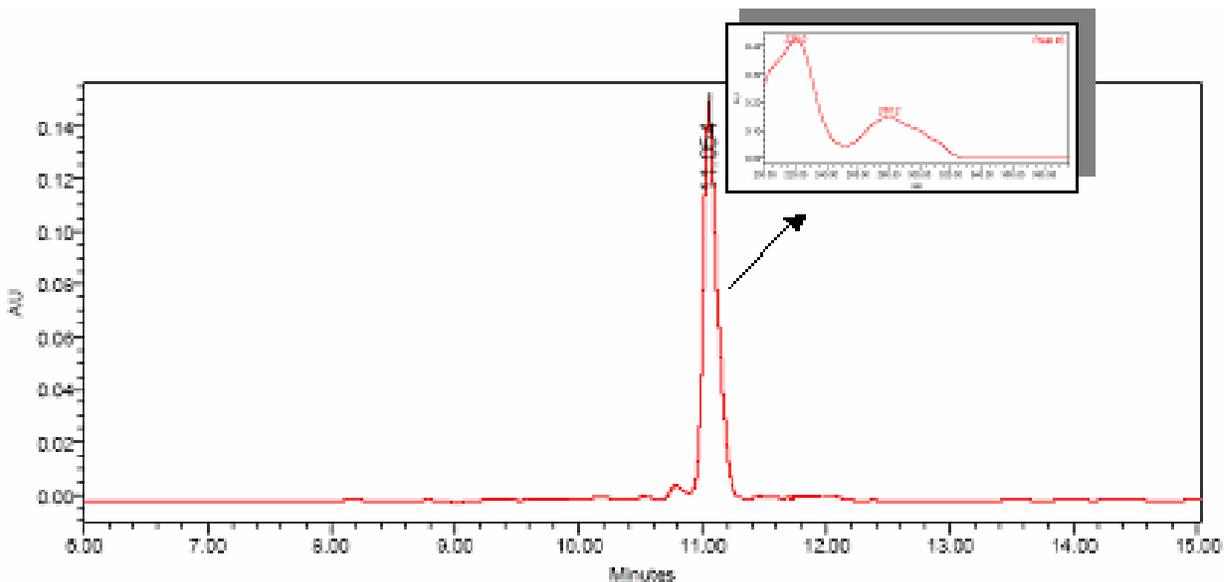


Figura A11 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide voacristina.

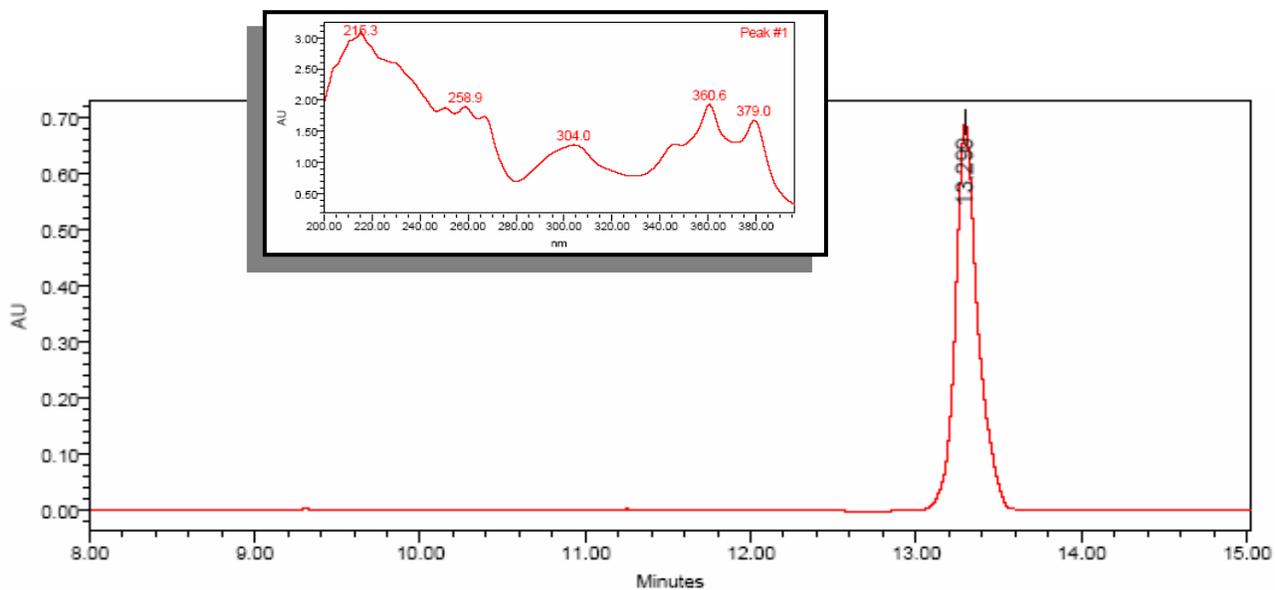


Figura A12 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide cantin-6-ona.

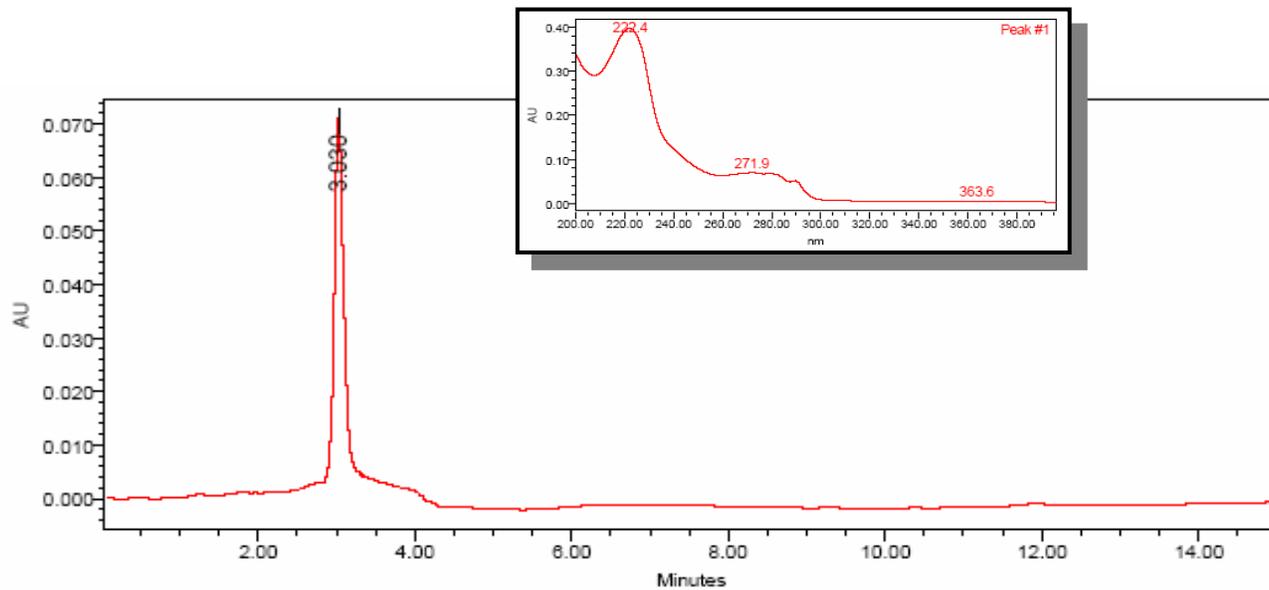


Figura A13 Cromatograma obtido por CLAE para o alcalóide psicolatina.