

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DÉBORA DALLA VECCHIA

EFEITO NEUROPROTETOR E COMPORTAMENTAL DO *Hypericum*
perforatum EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.

PONTA GROSSA
2013

DÉBORA DALLA VECCHIA

EFEITO NEUROPROTETOR E COMPORTAMENTAL DO *Hypericum perforatum* EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

PONTA GROSSA

2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

D144 Dalla Vecchia, Débora
 Efeito neuroprotetor e comportamental
 do *Hypericum perforatum* em um modelo
 animal de Doença de Parkinson/ Débora
 Dalla Vecchia. Ponta Grossa, 2013.
 84f.

 Dissertação (Mestrado em Ciências
 Farmacêuticas - Área de Concentração:
 Fármacos, Medicamentos e Biocências
 Aplicadas à Farmácia), Universidade
 Estadual de Ponta Grossa.
 Orientador: Prof. Dr. Edmar Miyoshi.
 Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel
 Fernandes.

 1.Doença de Parkinson. 2.*Hypericum*
 perforatum. 3.Comportamento.
 4.Neuroproteção. 5.Depressão. I.Miyoshi,
 Edmar. II. Fernandes, Daniel. III.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615

DÉBORA DALLA VECCHIA

EFEITO NEUROPROTETOR E COMPORTAMENTAL DO *Hypericum perforatum* EM UM MODELO ANIMAL DE DOENÇA DE PARKINSON.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia.

Ponta Grossa, 22 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Edmar Miyoshi – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Marcelo Machado Ferro
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Dr. Rui Daniel Prediger
Universidade Federal de Santa Catarina

***Dedico esse trabalho aos meus
pais, Adroaldo e Inês e ao meu
irmão Eduardo, pelo apoio,
incentivo, paciência e amor que
sempre me dedicaram. Essa
conquista é nossa, amo vocês.***

AGRADECIMENTOS

Á **Deus** que me guiou durante toda vida, me deu forças nos momentos difíceis e me mostrou que todo esforço vale a pena.

Ao meu orientador e amigo, **Prof. Dr. Edmar Miyoshi** pela oportunidade, pela confiança e, sobretudo, por dividir comigo sua sabedoria de forma paciente e prestativa. Agradeço sua disposição para me orientar e me incentivar no caminho da pesquisa científica.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Daniel Fernandes**, que me permitiu ingressar no mestrado, pelos conselhos que me dedica desde a graduação, pela atenção e gentileza de sempre. Além de tudo, obrigada por me permitir trabalhar na área com a qual possuo mais afinidade.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Machado Ferro**, que foi sempre prestativo e colaborou nos experimentos presentes nesse trabalho. Agradeço a amizade e todo o conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, **Adroaldo e Inês**, bases da minha existência, pela educação que me proporcionaram e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão **Eduardo** pelo auxílio e pela parceria desde sempre.

Ao meu namorado **Bruno**, que me ajudou e me apoiou em tudo que precisei. Agradeço por seu amor e incentivo, que me dão ânimo para seguir em frente.

À **Marissa**, minha companheira de mestrado e amiga, pelos desabafos, pelo companheirismo, por todas as risadas e pela ajuda de sempre.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Ana Flávia, Camila, Caroline, Danilo, Guilherme e Josyel** pela ajuda no desenvolvimento do projeto e por tornar os dias no laboratório mais divertidos.

À **Lea Chioca** pelo auxílio no teste de natação forçada, bem como pelo incentivo e apoio.

Aos colegas de turma: **Anelise, Francine, Daniele, Gisele, Thaís, Stéfanie, Yvanna, Antônio e Willian** pela amizade, pelas conversas e risadas compartilhadas. Com vocês tudo se tornou mais divertido.

A **Silvielen**, minha melhor amiga, pelo apoio e por aguentar minhas queixas e desabafos pacientemente, sempre com bons conselhos.

Ao **William, Geison, Karine, Laryssa e Conrado**, amigos queridos, pela amizade sincera e momentos de descontração que me proporcionaram.

Aos **Professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPG** pela dedicação e competência que me motivaram a ingressar na carreira docente e científica.

À **Universidade Estadual de Ponta Grossa**, pelo espaço, pelo suporte e por ter sido minha casa nos últimos 7 anos.

Ao **Prof. Dr. Rui Daniel Prediger** e sua equipe da **Universidade Federal de Santa Catarina** pelo auxílio na realização do Western Blot.

Às funcionárias do biotério **Maria e Marilene**, sempre gentis e atenciosas, anjos da guarda dos animais utilizados nesse estudo.

À **Fundação Herbarium de Saúde e Pesquisa** pela doação do extrato de *Hypericum perforatum* utilizado nestes experimentos.

À **CAPES** pelo apoio financeiro.

Finalmente, a **todas as pessoas** que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, minha eterna gratidão.

*"Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e
nunca se arrepende."*

Leonardo Da Vinci

RESUMO

O objetivo deste estudo foi testar o potencial neuroprotetor do extrato alcoólico do *Hypericum perforatum* sobre neurônios dopaminérgicos de ratos lesionados pela toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como modelo animal de DP. Ratos tiveram 6-OHDA estereotaxicamente infundida no feixe prosencefálico medial, unilateralmente para o teste de comportamento rotatório e bilateralmente para os demais testes. O *Hypericum perforatum* foi administrado nas doses de 100, 200 e 400 mg/Kg por gavagem durante 35 dias, iniciando-se o tratamento 28 dias antes da lesão. No teste de comportamento rotatório, a lesão unilateral com 6-OHDA causou um aumento no número de rotações contralaterais e esse efeito foi revertido pelo tratamento com *Hypericum perforatum*. No teste de preferência a sacarose houve redução significativa do comportamento tipo depressivo nos animais lesados com 6-OHDA e tratados com *Hypericum perforatum*. No teste de natação forçada, os animais 6-OHDA tratados com *Hypericum perforatum* permaneceram menos tempo imóveis quando comparados aos animais tratados com veículo. No teste do campo aberto, foi observada redução significativa da função locomotora nos grupos lesados com 6-OHDA, no entanto, de acordo com os dados obtidos no teste de natação forçada, o prejuízo motor não influenciou o tempo de imobilidade. No teste de reconhecimento social, animais 6-OHDA tratados com *Hypericum perforatum* tiveram um desempenho significativamente melhor do que os animais 6-OHDA tratados com veículo. No teste de discriminação olfativa, não houve diferença na capacidade de discriminação de odores, sendo que possivelmente não houve prejuízo na olfação dos animais lesados com 6-OHDA. Esses resultados sugerem que o *Hypericum perforatum* reduziu a morte dos neurônios dopaminérgicos. Essa possível neuroproteção foi confirmada através da análise de Imunodeteção de proteínas (Western Blot), através da expressão da enzima Tirosina Hidroxilase (TH). Em conjunto, esses resultados caracterizam o *Hypericum perforatum* como possível fármaco a ser utilizado no tratamento da DP.

Palavras-Chave: Doença de Parkinson, *Hypericum perforatum*, comportamento, neuroproteção, depressão.

ABSTRACT

The objective of this study was to test the potential neuroprotective action of *Hypericum perforatum* alcoholic extract on dopaminergic neurons lesioned in rat by the toxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) as an animal model of PD. The 6-OHDA was stereotaxically infused in rats into the medial forebrain bundle unilaterally to test rotational behavior and bilaterally to other tests. *Hypericum perforatum* was administered at doses of 100, 200 and 400 mg/kg by gavage for 35 days, starting 28 days before the treatment of the lesion. In the test of rotational behavior, a unilateral lesion with 6-OHDA caused an increase in the number of contralateral rotations and this effect was reversed by treatment with *Hypericum perforatum*. In the sucrose preference test was significant reduction in depressive-like behavior in animals injured with 6-OHDA-treated and *Hypericum perforatum*. In the forced swimming test, 6-OHDA animals treated with *Hypericum perforatum* kept less time immobile when compared to 6-OHDA animals treated with vehicle. In the open field test, we observed a significant reduction of locomotor function in the injured groups with 6-OHDA, however, according to results obtained in the forced swimming test, the motor impairment did not affect the immobility time. In the social recognition test, animals treated with 6-OHDA *Hypericum perforatum* performed significantly better than animals treated with 6-OHDA vehicle. In the olfactory discrimination test, there was no difference in the ability to discriminate odors, and possibly did not olfaction loss in animals injured with 6-OHDA. These results suggest that *Hypericum perforatum* reduced the death of dopaminergic neurons. This potential neuroprotection was confirmed by analysis of Immunodetection of proteins (Western Blot) by expression of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH). Together, these results characterize the *Hypericum perforatum* as a possible drug to be used in the treatment of PD.

Key-words: Parkinson's disease, *Hypericum perforatum*, behavior, neuroprotection, depression.

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ATP	Adenosina Tri Fosfato
COX-2	Ciclooxygenase 2
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
EDTA	Ácido etileno-dinitro-tetra-acético
GSH	Glutathione
GSHx	Glutathione Peroxidase
HP	<i>Hypericum perforatum</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
MAO	Monoamino Oxidase
MDA	Malondialdeído
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido Nítrico
O ₂	Oxigênio
O ₂ •	Ânion Superóxido
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RID	Ratio of Investigation Duration
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Subcutânea
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Substância Negra pars compacta
SNC	Sistema Nervoso Central
TBS	Tampão Tris-salina
TBS-T	Tampão Tris-salina com Tween-20
TH	Tirosina Hidroxilase
TNF-α	Fator de necrose tumoral

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Número de Rotações Ipsilaterais.....	42
Figura 1 - Representação Esquemática da Via Nigroestriatal.....	17
Figura 2 - <i>Hypericum perforatum</i>	23
Figura 3 - Estrutura Química da 6-Hidroxidopamina (6-OHDA).....	28
Figura 4 - Linha do tempo representando o esquema de realização do teste de comportamento rotatório.....	33
Figura 5 - Linha do tempo representando o esquema de realização dos testes de Preferência a Sacarose e Reconhecimento Social.....	34
Figura 6 - Linha do tempo representando o esquema de realização dos testes de Natação Forçada, Campo Aberto e Discriminação Olfativa.....	36
Figura 7 - Número de rotações contralaterais no 7° dia pós cirurgia.....	40
Figura 8 - Número de rotações contralaterais no 14° dia pós cirurgia.....	41
Figura 9 - Número de rotações contralaterais no 21° dia pós cirurgia.....	42
Figura 10 - Consumo da solução de Sacarose.....	43
Figura 11 - Consumo de Água.....	44
Figura 12 - Consumo Total (Água+Sacarose).....	44
Figura 13 - Tempos da Primeira e da Segunda Exploração no Teste de Reconhecimento Social com mesmo rato.....	45
Figura 14 - Tempos da Primeira e da Segunda Exploração no Teste de Reconhecimento Social com rato diferente.....	46
Figura 15 – Tempo de imobilidade na natação forçada.....	47
Figura 16 - Tempo de natação na natação forçada.....	48
Figura 17 – Tempo de escalada na natação forçada.....	49
Figura 18 – Número de Quadrantes Cruzados no campo aberto.....	50
Figura 19 - Número de Levantadas no campo aberto.....	51
Figura 20 – Tempo de exploração no sepilho novo.....	52
Figura 21 - Tempo de exploração no sepilho velho.....	52
Figura 22- Western Blot Tirosina Hidroxilase.....	53

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 DOENÇA DE PARKINSON	13
1.1.1 Etiologia e Epidemiologia	13
1.1.2 Neuropatologia	14
1.1.3 Sintomas	18
1.1.4 Tratamento	21
1.2 Hypericum perforatum	22
1.2.1 Aspectos Botânicos	23
1.2.2 Constituição Química	24
1.2.3 Atividades Biológicas	25
1.3 MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA	26
2. OBJETIVOS	30
2.1 GERAL	30
2.2 ESPECÍFICOS	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAIS	31
3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	32
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	33
3.3.1 Comportamento Rotatório Induzido Por Apomorfina	33
3.3.2 Teste De Preferência À Sacarose	34
3.3.3 Teste De Reconhecimento Social	35
3.3.4 Teste De Natação Forçada Modificado	36
3.3.5 Campo Aberto	37
3.3.6 Discriminação Olfativa	38
3.4 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT)	38
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4. RESULTADOS	40
4.1 Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina	40
4.2 Teste de Preferência a Sacarose	43
4.3 Teste de Reconhecimento Social	45
4.5 Teste de Campo Aberto	49
4.6 Teste de Discriminação Olfativa	51
4.7 Imunodeteccção de Proteínas (Western Blot)	53
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

1.1.1 Etiologia e Epidemiologia

Trata-se de uma doença neurodegenerativa crônica e progressiva, que foi descrita inicialmente em 1817 pelo médico inglês James Parkinson após a observação de pacientes que apresentavam lentidão de movimentos, tremor de repouso e rigidez muscular (MENEZES; TEIVE, 2003).

Em 1875, Jean Martin Charcot batizou a enfermidade como Doença de Parkinson, em homenagem a James Parkinson. Além disso, fez importantes descobertas com relação aos sintomas, diagnóstico diferencial e tratamentos. Charcot relatou que sintomas cognitivos também acometiam os doentes, quebrando assim o paradigma de que a DP causava apenas sintomas motores (DUVOISIN, 1991).

A Doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurodegenerativas relacionadas a idade de maior incidência no mundo, sendo superada apenas pela doença de Alzheimer. Geralmente acomete pessoas com idade mais avançada, por volta de 60 anos, mas existem casos de manifestação da mesma em adultos jovens (em torno de 45 anos). Esses números tendem a crescer cada vez mais, pois a expectativa de vida vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Segundo a Organização das Nações Unidas, existem aproximadamente 810 milhões de idosos no mundo e em 2020, espera-se que essa parcela da população totalize 1 bilhão de pessoas. No Brasil o número de idosos chega a 20,6 milhões e o número de casos estimados da DP varia em torno de 250 mil e estima-se que existam de 100 casos da doença a cada 100.000 habitantes. Os homens são mais frequentemente afetados que as mulheres (LANG; LOZANO, 1998; ONU, 2012).

A prevalência desta doença é de aproximadamente 0,5% em pessoas com mais de 50 anos de idade e 1% da população mundial com idade superior a 60 anos (LEVY & FERREIRA, 2003).

O período de latência para o desenvolvimento da doença não é conhecido, porém acredita-se que esteja entre 5 e 7 anos para se instalar completamente, embora possa variar de acordo com a etiologia. (LANG; LOZANO, 1998; SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

1.1.2 Neuropatologia

A DP caracteriza-se por perda progressiva de neurônios dopaminérgicos pigmentados na substância negra *pars compacta* (SNc) lateral e ventral do mesencéfalo, acarretando em diminuição dos níveis de dopamina (DA) no corpo estriado, alterando todo o processamento das informações pelos núcleos da base (OBESO et al., 2000; SULZER, 2007; DA CUNHA, et al., 2007; DA CUNHA, et al., 2009). Esses núcleos ou gânglios da base compõem um grupo de núcleos subcorticais que possuem como função primordial o controle dos movimentos voluntários; são eles: estriado (caudado e putâmen), globo pálido (interno e externo), núcleo subtalâmico, e SN (*pars compacta* e *reticulata*) (BURCH; SHEERIN, 2005).

Em exames *post mortem* de pacientes de Parkinson, observa-se uma despigmentação da SNc. Isso ocorre, pois juntamente com a DA, a neuromelanina (pigmento de coloração escura) é produzida. Portanto, com a morte neuronal, a região fica mais clara quando comparada aos cérebros de pessoas sem a doença (SPILLANTINI et al., 1997). Essa região, juntamente com os núcleos da base, desempenha um importante papel no controle motor, bem como no comportamento afetivo. Também ocorre degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da área tegmentar ventral bem como outros neurônios podem ser afetados, reduzindo a concentração de outros neurotransmissores além da dopamina. Isso acontece no *locus coeruleus* (noradrenalina), núcleo motor dorsal do vago, núcleo basal de Meynert (acetilcolina) e núcleos da Rafe (serotonina) (LIMONGI, 2003; SHAPIRA et al., 2006).

Ocorre também uma diminuição na atividade da enzima glutamato descarboxilase, enzima responsável pela biossíntese do ácido γ -aminobutírico (GABA), que pode ser consequência da neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (GERLACH E RIEDERER, 1996).

Estima-se que os sintomas motores da DP começam a se manifestar quando há em torno de 70% de redução da quantidade de dopamina na região nigroestriatal. Além da redução dos níveis de dopamina, nota-se uma leve redução dos níveis de serotonina e noradrenalina, intensificando sintomas cognitivos, como o comportamento tipo depressivo (BEZARD et al., 2001; DEUMENS et al., 2002).

O mecanismo responsável pela perda neuronal não está completamente elucidado, porém acredita-se que essa perda resulte de uma combinação de fatores ambientais e genéticos. Sabe-se que o estresse oxidativo, excitotoxicidade e neuroinflamação têm papel fundamental na neurodegeneração (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA et al., 1999; HALD; LOTHARIUS, 2005; HIRSCH; HUNOT; HARTMANN et al., 2005; MOSLEY et al., 2006; WERSINGER; SIDHU, 2006; FUKAE; MIZUNO; HATTORI, 2007). Sugere-se que esses fatores desencadeadores ocorrem por envelhecimento cerebral, toxinas presentes no ambiente (exposição a herbicidas, pesticidas e certos metais como manganês), predisposição genética, isquemia cerebral, encefalite viral, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), excedendo a capacidade antioxidante, etc. Portanto, a hipótese mais aceita é que a DP é uma doença multifatorial, decorrente de uma soma de fatores genéticos e ambientais (LANGSTON, 1996).

O estresse oxidativo parece ser o principal causador da morte dos neurônios dopaminérgicos. Os neurônios, de forma geral, utilizam grandes somas de oxigênio (O_2): em humanos o cérebro representa apenas uma pequena porcentagem do peso corporal, porém processa 20% do consumo basal de O_2 . O O_2 é utilizado através da mitocôndria, para produzir o ATP necessário para manter suas características fisiológicas. A cadeia respiratória da mitocôndria é responsável pela produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e notavelmente do ânion superóxido nos tecidos humanos. Em condições fisiológicas, 1-2% do O_2 consumido é convertido a ROS. Por isso, a disfunção mitocondrial acarreta danos no transporte de elétrons e leva a morte neuronal.

Grande parte do O_2 utilizado na cadeia respiratória da mitocôndria é convertido em ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), que quando não captado pelos sistemas antioxidantes endógenos, gera graves danos em macromoléculas,

comprometendo os tecidos neuronais. Foram detectados níveis reduzidos de glutathione (GSH), que constitui o principal sistema redox de controle do estresse oxidativo, em amostras *post mortem* da SN de pacientes parkinsonianos quando comparados às amostras controles (EMERIT; EDEAS; BRICAIRE, 2003).

Neurônios dopaminérgicos podem favorecer o ambiente para a produção de ROS. A metabolização da DA produz $-O\cdot_2^-$, $-OH\cdot$ e $-H_2O_2$, e a auto-oxidação da DA produz DA-quinona, molécula esta que danifica proteínas reagindo com resíduos de cisteína. A deficiência energética relacionada à mitocôndria pode levar ao rompimento de vesículas que armazenam DA, aumentando sua concentração no citossol ocasionando danos em macromoléculas (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Além disso, as ROS estão envolvidas em processos apoptóticos e em mecanismos de excitotoxicidade (KOKOSZKA et al., 2001).

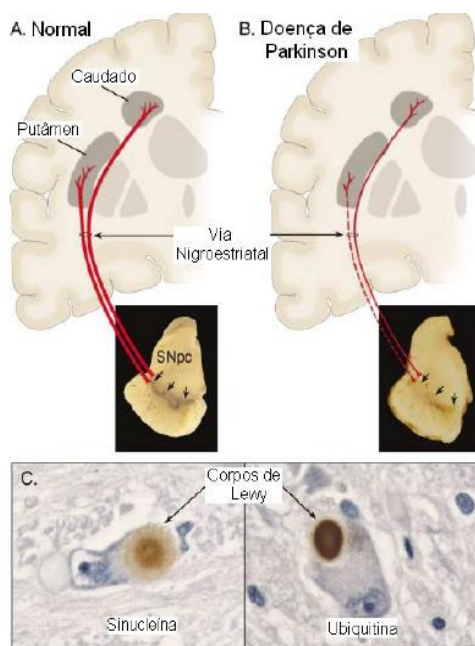
O processo neurodegenerativo também é acompanhado por ativação de macrófagos residentes no encéfalo (micróglia), acarretando na liberação e aumento da expressão de mediadores inflamatórios pelas células da glia (p.ex. NF- κ B, IL-1, IL-6, COX-2) (BOKA et al., 1994; HUNOT et al., 1999; MCGEER; MCGEER, 2004; HUNTER et al., 2007). Estudos demonstram que a liberação de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio a partir da micróglia causam severos danos em neurônios, além de que os neurônios dopaminérgicos são muito suscetíveis a esses danos (YOU DIM; RIEDERER, 1997). A SNc é uma das regiões cerebrais com maior concentração de micróglia, que quando ativada constitui a forma de defesa do sistema nervoso central (SNC), mas ao mesmo tempo libera substâncias que aumentam a neurotoxicidade e influenciam na neurodegeneração (JENNER; OLANOW 1996).

Além dos macrófagos residentes, neutrófilos e macrófagos derivados de monócitos da corrente sanguínea podem induzir neurodegeneração. Os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias recrutadas durante inflamação aguda, tanto em tecidos neurais como em tecidos não neurais, porém este fenômeno é mais tardio no SNC. Neutrófilos agem, fisiologicamente, como células fagocitárias, mas acredita-se que os mesmos podem contribuir para o agravamento do processo lesivo durante trauma tecidual, tanto em tecidos neurais como em tecidos não neurais, em seres humanos e em animais de experimentação (POPOVICH et al, 1999, 2001, 2002)

Em 85% das autópsias de pessoas com DP diagnosticada podem ser observadas estruturas chamadas de corpos de Lewy, formados principalmente pelas proteínas α -sinucleína e ubiquitina, nos neurônios remanescentes. A agregação de α -sinucleína desencadeia o mecanismo celular que conduz à morte progressiva de determinadas populações neuronais (SHIMOHAMA et al. 2003; EMBORG, 2004).

Tratam-se de inclusões eosinofílicas intracelulares de origem protéica que se acumulam em neurônios em processo de degeneração, especialmente nos neurônios dopaminérgicos da SNc (BLANDINI et al., 2000; SULZER, 2007). Esses agregados protéicos acumulam-se nos neurônios, onde ao ultrapassar uma determinada quantidade, acarretam neurotoxicidade com consequente morte neuronal e concomitante redução da aferência dopaminérgica para o estriado (KOO; LEE; IM, 2008).

FIGURA 1: Representação Esquemática da Via Nigroestriatal Normal (A) e na Doença de Parkinson (B). (C) detalhe Das Inclusões Citoplasmáticas (Corpos de Lewy)



FONTE: DAUER e PRZEDORSKI (2003)

Esses processos culminam com a morte desses neurônios por apoptose, que consiste em um mecanismo de morte celular de forma que a célula ativa (ou é forçada a devido a um estímulo danoso) um mecanismo de autodestruição que leva a retração e por último à fagocitose pela micróglia.

Mochizuki e colaboradores mostraram a presença de marcadores para morte celular apoptótica em locais de neurodegeneração neuronal no cérebro de pacientes com DP.

1.1.3 Sintomas

Hoje se sabe que além dos clássicos distúrbios do movimento, outros sintomas como: depressão, prejuízo de memórias procedurais, disfunção olfatória, hipotensão ortostática, incontinência urinária, constipação intestinal, sialorréia, entre outros, também podem aparecer com a evolução da doença (DUBOIS; PILLON, 1997; LIEBERMAN, 2006; REIJNDERS et al., 2008; GRAHN, PARKINSON; OWEN, 2009; TOLOSA et al., 2009).

Os pacientes se tornam passivos ou retraídos, manifestando falta de iniciativa, respondem demoradamente a questões, e os processos cognitivos são vagarosos (“bradifrenia”) (DAUE; PRZEDBORSKI, 2003; SHAPIRA et al., 2006). Usualmente existe uma assimetria nos sinais e sintomas motores extrapiramidais, o que pode ser explicado pela perda neuronal que ocorre de maneira não-homogênea nos hemisférios encefálicos (GELB; OLIVER; GILMAN, 1999).

1.1.3.1 Depressão

Um dos sintomas cognitivos mais comuns é a depressão, que atinge cerca de 40% dos pacientes de DP logo no início da doença. Esse transtorno de humor ocorre principalmente pela quantidade insuficiente de dopamina na região nigroestriatal, porém acredita-se que outras vias também estejam envolvidas (noradrenérgica, serotoninérgica, gabaérgica) (SCHRAG, 2004; TADAIESKY et al., 2008). Ocorre perda de interesse por atividades diárias, objetos e familiares além de melancolia, ansiedade e perda de auto-estima em casos mais graves (DUVOISIN, 1991; SILBERMAN et. al., 2004).

A depressão é facilmente confundida com sintomas da própria DP, tais como: lentidão, aparência triste, insônia, perda de peso, apatia, anedonia, insatisfação sexual, perda de memória e perda de energia. Por isso, na maior parte dos casos, a depressão é negligenciada e os pacientes apresentam declínios cognitivos maiores e deterioração em atividades diárias,

comprometendo ainda mais o tratamento da DP (OKUN and WATTS, 2002; CAMARGO, et. al. 2004)

Existem vários estudos relacionando DP com depressão. Troster e colaboradores demonstraram que a depressão influencia na quantidade de déficits cognitivos associados a DP. Além disso, Norman e colaboradores propuseram que a DP afeta todos os níveis de funcionamento cognitivo e a diminuição da memória está primariamente relacionada a depressão. Popovska e colaboradores falam sobre a relação da incidência de depressão relacionada à idade e ao sexo em pacientes com DP. De acordo com eles, pacientes do sexo feminino e com idade mais avançada apresentam depressão com maior frequência. Shulman e colaboradores mencionaram que muitos médicos não diagnosticam depressão, ansiedade e fadiga em mais da metade dos pacientes em consultas de rotina.

Também existem vários estudos com modelos animais utilizando toxinas como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) que comprovaram o desenvolvimento de depressão e outros sintomas cognitivos nos animais testados (LIMA et al., 2007; REKSIDLER et al., 2009). Santiago e colaboradores afirmam que modelos animais de DP induzidos por essas toxinas produzem comportamento tipo depressivo primário, acompanhado de redução de serotonina (5HT) no hipocampo. Tadaiesky e colaboradores comprovam que a morte neuronal induzida por 6-OHDA desencadeia prejuízos emocionais e cognitivos em ratos.

1.1.3.2 Prejuízo de Memória

O termo memória caracteriza-se pela aquisição, consolidação e evocação de informações. É mais correto utilizar o termo “memórias”, uma vez que podem existir tantas memórias quanto o número de experiências vividas. Como essas memórias são provenientes das mais diversas experiências, é presumível que existam diferentes áreas cerebrais responsáveis por consolidar e armazenar lembranças. De forma geral, os tipos de memórias podem ser classificados de acordo com seu tempo de retenção, sua natureza, ou conteúdo (IZQUIERDO, 2002).

Memória Declarativa ou Explícita: registram fatos, momentos e acontecimentos e são assim chamadas pelo fato de podermos evocá-las

conscientemente, tendo como relatar ou declarar de que forma elas foram adquiridas.

Memórias implícitas ou não declarativas: não podem ser explicadas através de palavras e só temos consciência de que as possuímos quando há necessidade de realização de determinadas tarefas. A memória procedural é um subtipo de memória não declarativa, que corresponde aos “hábitos” ou habilidades motoras, perceptuais e cognitivas.

Memórias Operacionais ou de trabalho (“*working memory*”): arquivam temporariamente informações necessárias para execução de tarefas imediatas, podendo ser esquecidas logo após a realização das mesmas.

Além da depressão, déficits de vários tipos de memória, acompanhados de dificuldade no aprendizado também são muito frequentes em pacientes com DP. Pelo fato dos pacientes parkinsonianos apresentarem uma depleção nos níveis de DA nos gânglios da base (GERLACH; RIEDERER, 1996; BARRIO; HUANG; PHELPS, 1997; BEZARD et al., 1997; LINDNER et al., 1999) e em outras áreas cerebrais, como o córtex pré-frontal (MARIÉ et al., 1999; STEBBINS et al., 1999), é esperado um prejuízo específico nas memórias implícitas e operacionais, respectivamente. Em estudos em animais utilizando a toxina 6-Hidroxidopamina (6-OHDA), pode-se observar alterações na memória espacial nos testes utilizando labirintos aquáticos, evidenciando déficits de memória semelhante aos encontrados nas fases iniciais da DP (FERRO et al., 2005; TADAIESKY et al., 2008).

É bastante comum o paciente de Parkinson desenvolver demência conforme a doença progride e se agrava. Esse quadro tem como principais características a lentificação do processo cognitivo, a apatia, o comprometimento da memória e das funções executivas.

Como já citado anteriormente, não apenas os núcleos da base são acometidos pela DP, mas também outras regiões cerebrais relacionadas com a memória. As alterações nos núcleos do prosencéfalo basal encontradas na DP (por exemplo, núcleo basal de Meynert) podem reduzir a atividade cortical, por diminuição da ação da acetilcolina. Essas alterações das projeções colinérgicas para o córtex cerebral, principalmente com o lobo frontal (déficit de memória operacional) também estão relacionadas com as disfunções

executivas e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da demência associada à DP (CARBON E MARIE, 2003).

1.1.3.3 Olfacção

A olfacção dos pacientes de Parkinson geralmente encontra-se comprometida. Existe dificuldade de reconhecer, distinguir e sentir odores. Esse sintoma não é exclusivo da DP, pessoas com outras doenças neurodegenerativas como o Alzheimer também apresentam deficiência na olfacção. O bulbo olfatório de mamíferos contém um grande número de interneurônios dopaminérgicos que são muito importantes no processamento de odores (MESHOLAM et al., 1998).

De acordo com análises *post mortem* de cérebros de portadores da DP, grandes quantidades de corpos de Lewy foram encontrados nos bulbos olfatórios (DANIEL; HAWKES, 1992). A explicação mais plausível seria de que possíveis toxinas ou substâncias que são responsáveis pelo desenvolvimento da doença entrariam no organismo pela cavidade nasal, se espalhando em direção ao SNC e chegando a substância negra (BRAAK et al, 2004). Estudos sugerem que esse distúrbio olfativo pode ser observado antes dos sintomas motores aparecerem. Por esse motivo, técnicas para detecção desse sintoma precoce podem ser desenvolvidas para auxiliar no diagnóstico precoce da DP (DOTY et al., 1992, 1995).

Esse sintoma é pouco estudado, visto a dificuldade de realização de testes com animais que os comprovem (BECKER et al, 2002; PREDIGER et al, 2006) .

1.1.4 Tratamento

Até os dias de hoje, não foi descoberta uma terapêutica específica que limite o curso da neurodegeneração e impeça a morte neuronal.

Os medicamentos disponíveis no mercado utilizados no tratamento da DP visam apenas controle dos sintomas motores do paciente sem impedir a progressão da doença. Desta forma, estratégias para o aumento da sobrevivência e regeneração neuronal ainda precisam ser desenvolvidas, no intuito de reposição das células perdidas com a doença (WEINER, 2004).

A escolha do medicamento a ser utilizado depende da gravidade da doença, comprometimento funcional, co-morbidades, expectativas pessoais e questões relacionadas ao trabalho do paciente. O uso da levodopa deve ser retardado o máximo possível, pois esse medicamento pode causar uma série de efeitos colaterais indesejáveis ao paciente e terá que ser utilizado pelo resto da vida do mesmo. Tratamentos alternativos com drogas não-dopaminérgicas incluem selegilina e amantadina ou anticolinérgicos, lembrando que esses últimos, causam sérias reações adversas e requerem aumento das doses com o passar do tempo (MYIASAKI et al., 2006).

Antes de se iniciar o uso da levodopa, podem ser utilizados fármacos agonistas dopaminérgicos (quando há necessidade de se iniciar a terapia dopaminérgica). No momento que o paciente não responde mais a esses tratamentos, inicia-se a utilização da levodopa associada a um inibidor periférico da descarboxilase. O principal efeito colateral decorrente do tratamento com a levodopa é a discinesia, que debilita ainda mais a qualidade de vida do paciente (RASCOL et al., 2000).

Os fármacos usados no tratamento dos sintomas motores da doença, frequentemente agravam a sintomatologia cognitiva e podem levar ao aparecimento de alucinações após longo período de utilização.

1.2 Hypericum perforatum

As plantas medicinais tem sido cada vez mais estudadas e utilizadas para o tratamento de diversas doenças como uma alternativa à medicamentos sintéticos. A planta *Hypericum perforatum* L. (Figura 2), conhecida popularmente como Erva de São João, é um exemplo de planta que vem sendo cada vez mais utilizada na clínica.

FIGURA 2. *Hypericum perforatum* L.



FONTE: BEERHUES, 2006.

1.2.1 Aspectos Botânicos

- Nome científico: ***Hypericum perforatum* L.**
- Sinonímia: hipérico, orelha-de-gato, alecrim-bravo, arruda-de-São-Paulo, arruda-do-campo, milfurada, Erva de São João e St. John`s Wort.
- Colheita: antes ou durante a floração (BILIA *et al.*, 2002).
- Partes utilizadas: as preparações farmacêuticas mais comuns são feitas a partir das partes aéreas da planta (MENNINI & GOBBI, 2004).
- Aspectos botânicos: a planta é um arbusto perene pertencente à família das Hypericaceae, amplamente encontrada na Europa, Ásia, norte da África e América do Norte (GAMBARANA *et al.*, 1999). O gênero *Hypericum* é representado por 89 espécies, das quais 43 são endêmicas e a espécie mais abundante e mais conhecida é a *Hypericum perforatum* L. (ÇIRAK *et al.*, 2006). Esta possui um tamanho médio de 60 cm. As folhas apresentam pontos transparentes ou glândulas oleosas que secretam óleo formando uma camada incolor sobre as folhas. As flores são amarelo-alaranjadas brilhantes. O cálice e a corola são marcados com pontos pretos; as sépalas e as pétalas são em número de cinco e as pétalas são salpicadas com pontos pretos (BILIA *et al.*, 2002).

No Brasil algumas espécies encontradas, principalmente na região sul, são *Hypericum brasiliense*, *Hypericum myrianthum* e *Hypericum caprifoliatum*, a qual também apresenta atividade antidepressiva (DAUDT *et al.*, 2000).

O nome “hypericum” tem origem do Grego e refere-se à suposta capacidade da planta de fazer as pessoas voarem por poder evocar espíritos. A palavra “perforatum” tem origem do Latim e significa “perfurado”, pois as folhas, quando submetidas à luz, revelam pontos translúcidos dando a impressão de que as folhas são perfuradas.

1.2.2 Constituição Química

Análises fitoquímicas das partes aéreas têm revelado a presença de uma grande variedade de substâncias com atividades biológicas diversas (RODRIGUEZ LANDA & CONTRERAS, 2003).

GREESON *et al.*, (2001) relacionaram esses principais constituintes:

- Naftodiantronas: hipericina e pseudohipericina (flores e brotos);
- Floroglucínóis: hiperforina e adiperforina (flores e brotos);
- Flavonóides: quercetina (folhas), hiperósido (talo), quercetrina, rutina, campferol, mirecetina, amentoflavona, 13,118-biapegenina (brotos);
- Procianidinas: procianidina, catequina, polímeros, epicatequinas (flores e brotos);
- Tanino: ácido tanínico;
- Aminoácidos: GABA, cisteína, glutamina, leucina, lisina, ortinina, prolina, treonina;
- Óleos essenciais: terpenos e álcool;
- Fenilpropanos: ácido cafeíco, ácido clorogênico;
- Xantonas;
- Outros compostos: ácidos orgânicos, peptídeos, polissacarídeos.

As preparações de *Hypericum perforatum* são geralmente, padronizadas pela concentração de hipericina, que pode variar de 0,1 a 0,3% do extrato alcoólico. O conteúdo de hiperforina varia de 1 a 5% e, apesar de ser um composto instável a luz e ao ar, pode ser encontrado e mantido no extrato por longos períodos se bem estocado (MENNINI & GOBBI, 2004).

1.2.3 Atividades Biológicas

Na última década, principalmente na Europa e nos Estados Unidos, o uso dessa planta tornou-se importante como uma terapia alternativa para o tratamento de transtornos do humor, especialmente em casos de depressão leve a moderada (RODRÍGUEZ; CONTRERAS, 2003; SKALISZ et al., 2004; LINDE, BERNER; KRISTON., 2008; LINDE et al., 2005; LINDE; KNUPPEL et al., 2005).

Durante muito tempo, a atividade antidepressiva da planta *Hypericum perforatum* foi atribuída a hipericina. Entretanto, estudos clínicos e experimentais indicam que a hiperforina seja o composto envolvido nesta atividade. As diferentes propriedades dos compostos ativos e seus diferentes níveis de produção, por exemplo, alta concentração de hipericina encontrada em temperaturas altas enquanto hiperforina em temperaturas mais baixas podem indicar meios para o desenvolvimento de estratégias de comercialização com produção de compostos bioativos específicos (COUCEIRO et al., 2006).

A dose recomendada do *Hypericum perforatum* L, para o tratamento de depressão leve ou moderada, é de 900mg/dia de extrato padronizado a 0,3% hipericina. Altas doses de 1.200 para 1.800 mg/dia parecem ter atividade no tratamento de casos de depressão grave (CASS, 2003).

Os principais efeitos colaterais decorrentes do tratamento com *Hypericum perforatum* L são problemas gastrointestinais, reações alérgicas, fadiga, inquietação, fotossensibilidade e síndrome serotoninérgica, esta quando administrado com outros antidepressivos (RODRÍGUEZ-LANDA; CONTRERAS, 2003).

Além disso, estudos mostram que o *Hypericum perforatum* tem efeito antiinflamatório devido a substâncias presentes em sua composição. Huang e colaboradores (2011) compararam diferentes espécies de *Hypericum*, descobrindo que existem 4 substâncias na estrutura do *Hypericum perforatum* responsáveis pelo efeito antiinflamatório, sendo a principal delas a pseudohiperforina, que inibiu significativamente a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), NO, fator de necrose tumoral (TNF- α), e interleucina-1 (IL-1). Birt e

colaboradores encontraram 4 principais constituintes no extrato de *Hypericum perforatum* responsáveis por inibir a produção de prostaglandinas: amentoflavona, ácido clorogênico, pseudohipericina e quercetina (BIRT et al., 2009). Estas também possuem características antioxidantes. El-Sherbiny e colaboradores propuseram que o tratamento de ratos com extrato de *Hypericum perforatum* aumentam os níveis cerebrais de malondialdeído (MDA), glutathione peroxidase (GSHPMx), glutathione (GSH), enzimas que compõem o sistema antioxidante endógeno (EL-SHERBINY et al., 2003). Benedi e colaboradores sugeriram que o extrato seco de *Hypericum perforatum* tem atividade antioxidante relevante *in vitro*, reduzindo a geração de ROS e peroxidação lipídica (BENEDI et al., 2004).

Outra propriedade do *Hypericum perforatum* é o efeito nootrópico. Trofimiuk e colaboradores demonstraram que a planta melhorou significativamente a memória espacial dependente do hipocampo, além de melhorar outras funções cognitivas (TROFIMIUK et al., 2005; TROFIMIUK; BRASZKO 2008). Kraus e colaboradores sugeriram um efeito neuroprotetor do *Hypericum perforatum* em cultura de neurônios desafiados com peptídeo β -amilóide (KRAUS et al., 2007). Por esses efeitos, o *Hypericum perforatum* tem grandes chances de ser eficaz no tratamento da DP, principalmente pelas características antiinflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras, retardando a evolução da doença. Concomitantemente, o efeito antidepressivo da planta também é de extrema importância nesses pacientes, uma vez que apresentam quadros depressivos no decorrer da doença, além de evitar o prejuízo de memória procedural pelo seu efeito nootrópico (MENEZES; TEIVE, 2003).

1.3 MODELOS ANIMAIS DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA

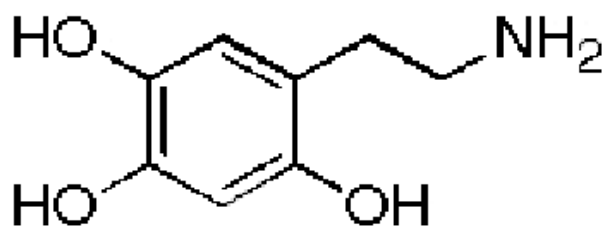
Os modelos animais são ferramentas de extrema importância para estudo da evolução e tratamento das doenças. Para que sejam válidos, esses modelos devem ser fidedignos aos efeitos das doenças que acometem seres humanos, mesmo que não sigam o mesmo curso da doença. Nas afecções neurológicas, os modelos animais permitem estudos invasivos, que geralmente são inviáveis em cérebros humanos (GERLACH; RIEDERER, 1996, RODRIGUEZ et al., 2001).

A DP é uma doença exclusiva da espécie humana, não se manifestando espontaneamente em animais. Esse fato indica que essa doença é somente observada em animais (p.e. macacos ou roedores) através da administração de agentes neurotóxicos, como a 6-OHDA, metanfetamina, reserpina, rotenona ou MPTP (GERLACH; RIEDERER, 1996).

Para se estudar novos tratamentos para a DP é necessário utilizar modelos animais que mimetizem alguns aspectos da doença. Um dos modelos mais utilizados é a administração intracerebral de uma neurotoxina chamada 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (HEIKKILA et al., 1981; SCHNEIDER et al., 1984; GERLACH; RIEDERER, 1996; SCHWARTING; HUSTON, 1996; FUKUZAKI et al., 2000; BOVE, SERRATS et al., 2005; YUAN et al., 2005; BLANDINI, et al., 2007; TADAIESKY et al., 2008A; B; DA CUNHA et al., 2009).

A 6-OHDA (Figura 3) é uma das neurotoxinas mais comuns utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da SNc, tanto *in vitro* como também *in vivo* (BLUM et al., 2001). É incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesionar. A ação específica da 6-OHDA sobre a via dopaminérgica nigroestriatal é conseguida pela administração estereotáxica dessa toxina na substância negra, no feixe prosencefálico medial ou no estriado (PRZEDBORSKI et al., 1995; SCHWARTING et al., 1996). A 6-OHDA é captada pelo neurônio através de transportadores, sofre oxidação semelhante à da dopamina e gera radicais livres. Como a 6-OHDA também apresenta semelhança estrutural com a noradrenalina, transportadores desta monoamina também podem captar a 6-OHDA, levando esses neurônios a morte. Como o objetivo em um modelo animal de doença de Parkinson é a morte de neurônios dopaminérgicos, geralmente se utiliza um fármaco que bloqueie os transportadores de noradrenalina, juntamente com a administração de 6-OHDA. Os fármacos mais utilizados para tal são os antidepressivos tricíclicos como: desipramina, nortriptilina e imipramina (SCHOBER, 2004; BOVE et al., 2005).

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA)



A 6-OHDA produz lesões na SNc pela indução da produção de H_2O_2 e radicais livres, participando da reação de Fenton e é tóxica para o complexo I mitocondrial (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970; GERLACH; RIEDERER, 1996; BLUM et al., 2001; BETARBET et al., 2002). A 6-OHDA também pode induzir a ativação da micróglia (BOVE et al., 2005; MILLER et al., 2009). A micróglia ativada promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios (p.ex. NF- κ B, IL-1, IL-6, COX-2) responsáveis pela produção de radicais livres (MCGEER; MCGEER, 2004; HUNTER et al., 2007) e posterior morte neuronal.

Esse modelo pode ser utilizado tanto para realizar lesões unilaterais como bilaterais. Em lesões unilaterais, geralmente se administra uma maior quantidade de 6-OHDA na estrutura cerebral de interesse. Esse modelo unilateral é mais utilizado para realizar o teste de comportamento rotatório, sendo que por apresentar um hemisfério cerebral intacto, quando desafiados com agonistas dopaminérgicos (apomorfina) o animal tende a rodar contralateralmente a lesão e quando se administram fármacos liberadores de dopamina (anfetaminas) o animal roda ipsilateralmente (mesmo lado) a lesão. O modelo bilateral (injeção de 6-OHDA nos dois hemisférios) caracteriza um modelo mais fidedigno da doença. A DP acomete, geralmente, os dois hemisférios cerebrais, por esse motivo, através do modelo bilateral, podem ser avaliados os sintomas motores e cognitivos da doença através dos testes que avaliam o comportamento dos animais (TADAIESKY et al., 2008; GREGORIO et al., 2009; SANTIAGO et al., 2010)

Com o uso deste modelo animal, pode-se estudar alterações neuroquímicas (FERRO et al., 2005; DA CUNHA et al., 2008; TADAIESKY et al., 2008B; GREGORIO et al., 2009), motoras (principalmente em modelos bilaterais) (DA CUNHA et al., 2008; GREGORIO et al., 2009), prejuízos de

memória (DA CUNHA et al., 2007; TADAIESKY et al., 2008B; DA CUNHA et al., 2009) e depressão (TADAIESKY et al., 2008b) associadas à DP.

Devido as características antioxidantes, antiinflamatórias e nootrópicas da planta, o presente trabalho visa identificar um possível efeito neuroprotetor da mesma, bem como observar seus efeitos no comportamento, utilizando para tal modelo animal de Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA.

1. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar os efeitos celulares, neuroquímicos e comportamentais do *Hypericum perforatum* no modelo animal de doença de Parkinson induzido pela administração intracerebral de 6-OHDA.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar se o *Hypericum perforatum* consegue promover menos morte de neurônios dopaminérgicos induzida pela administração de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial.
- Avaliar se o *Hypericum perforatum* promove menos rotações contralaterais à lesão, utilizando apomorfina, através da administração unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial.
- Avaliar se o *Hypericum perforatum* consegue reverter as alterações motoras induzidas pela administração bilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial.
- Avaliar se o *Hypericum perforatum* consegue reverter o prejuízo de memória em animais com lesão de neurônios dopaminérgicos induzida pela administração bilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial.
- Avaliar se o *Hypericum perforatum* consegue reverter o comportamento tipo depressivo em animais induzido pela administração bilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial.
- Avaliar se o *Hypericum perforatum* influencia na reversão de possível disfunção olfativa induzida pela 6-OHDA administrada bilateralmente no feixe prosencefálico medial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais da UEPG, nº de Processo CEUA 14/2011/Protocolo UEPG-7821/2011. Os estudos foram realizados utilizando-se ratos Wistar machos, com três meses de idade e peso em torno de 300g. Esses animais foram procedentes do biotério da UEPG, mantidos em biotério climatizado (22°C), com ciclo claro/escuro de 12 h (ciclo claro inicia às 07:00 h) e ração *ad libitum*. Também foram utilizados ratos Wistar jovens (com um mês de idade) para realização do teste de reconhecimento social. Os animais foram divididos de acordo com os testes realizados. Para o teste de comportamento rotatório induzido por apomorfina, foram utilizados 96 animais, divididos em 3 grandes grupos de 32 ratos por mês. Para os testes de preferência a sacarose e reconhecimento social, também foram utilizados 3 grupos contendo 32 animais cada. Da mesma forma, nos testes de natação forçada, campo aberto e discriminação olfativa, foram utilizados 3 grupos de animais contendo 32 animais. Esses 32 animais utilizados por mês foram divididos em 8 grupos da seguinte maneira: animais controle SHAM-operados tratados com veículo, SHAM-operados tratados com extrato seco de *Hypericum perforatum* 0,3% solubilizado em salina (100mg/kg, 200mg/kg ou 400mg/kg), animais com lesão na via nigroestriatal tratado com veículo e animais com lesão na via nigroestriatal tratados com *Hypericum perforatum* solubilizado em salina (100mg/kg, 200mg/kg ou 400mg/kg). O número amostral final de animais variou de 8 a 11 animais por grupo em todos os testes realizados. Esse número não é fixo, pois a mortalidade dos animais durante e após a realização da cirurgia estereotáxica geralmente é alta e difícil de ser prevista.

3.2 TRATAMENTO

O *Hypericum perforatum* foi utilizado na forma de extrato seco padronizado a 0,3% de hiperforina, proveniente do Herbarium Laboratório Botânico, juntamente com o laudo do controle de qualidade, garantindo sua composição química. O tratamento consistiu na administração por gavagem

desse extrato, solubilizado em soro fisiológico ou somente soro fisiológico (veículo) durante 28 dias antes do procedimento cirúrgico e mais 7 dias pós cirurgia. Foi escolhida essa forma de tratamento por 28 dias pré-cirurgia devido a atividade antidepressiva do *Hypericum perforatum*, que só se manifesta completamente após 3 a 4 semanas de uso. Os 7 dias de tratamento pós cirurgia foram realizados no intuito de tentar prevenir a morte neuronal decorrente de administração da 6-OHDA devido as suas propriedades antioxidantes e antiinflamatórias. Os animais do grupo controle SHAM-operados, foram submetidos a todos os procedimentos cirúrgicos dos animais lesados, exceto a injeção intracerebral de 6-OHDA, sendo esta substituída por salina.

3.2 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Todos os procedimentos de lesão da via nigroestriatal foram realizados através de cirurgia estereotáxica, para garantir a reprodutibilidade de localização das injeções das drogas.

Foi administrada nortriptilina (10 mg/Kg, i.p.), dez minutos antes da cirurgia estereotáxica, para proteger neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos, sendo que apenas os neurônios dopaminérgicos devem ser lesados. O uso de um antidepressivo tricíclico juntamente com a 6-OHDA é necessário, pois a noradrenalina apresenta grande semelhança estrutural com a dopamina e pode ser carregada pelos transportadores de noradrenalina para dentro dos neurônios noradrenérgicos causando assim a morte desses neurônios. Em seguida foi administrado Pentabiótico de uso veterinário, na dose de 1mg/kg por via i.m. O Pentabiótico é composto por: Benzilpenicilina benzatina 3.000.000UI, Benzilpenicilina procaína 1.500.000UI, Benzilpenicilina potássica 1.500.000UI, Diidroestreptomicina base (sulfato) 1.250 mg e Estreptomicina base (sulfato) 1.250 mg. Essa combinação de antibióticos tem por finalidade ampliar o espectro bacteriano e evitar o aparecimento de infecções decorrentes do procedimento cirúrgico.

Para a lesão na via nigroestriatal, os animais foram anestesiados com tiopental (50 mg/Kg, i.p.) e devidamente tricotomizados. Em seguida, foram colocados no equipamento estereotáxico. Álcool Iodado foi utilizado para fazer

a antissepsia local, sendo que em seguida aplicou-se anestésico local (lidocaína 0,2 mL com 2% de vasoconstritor) via s.c. logo abaixo da pele que recobre o crânio dos ratos.

Com auxílio de bisturi, a pele e a fáscia muscular que recobrem o crânio dos animais foram afastadas, o bregma (intersecção anterior das suturas cranianas) foi localizado e utilizado como ponto de referencia para encontrar as coordenadas do feixe prosencefálico medial, sendo essas: anteroposterior (AP), - 1,9 mm do bregma; medio-lateral (ML) $\pm$ 1,9 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 7,9 mm do crânio, segundo Paxinos e Watson (2005).

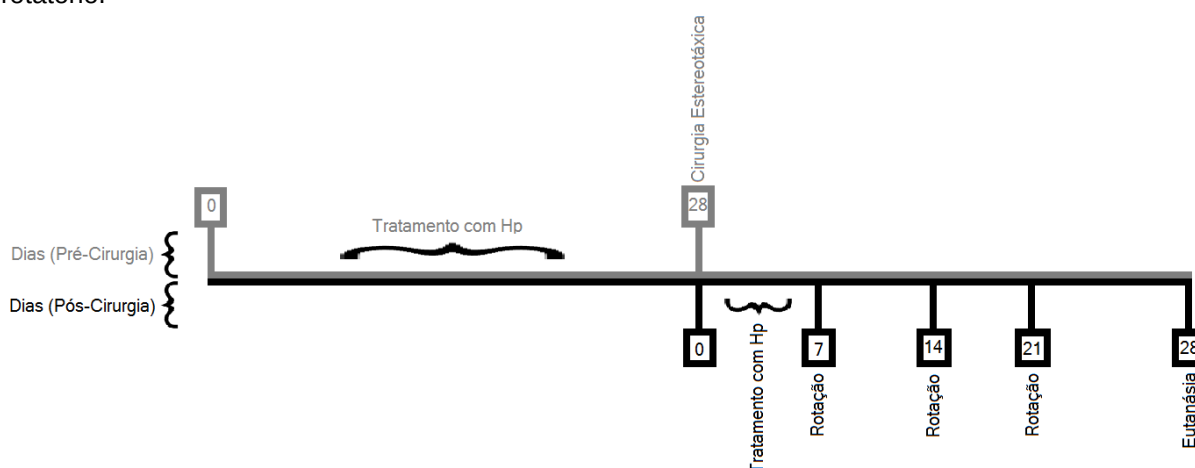
Utilizando uma broca de baixa rotação, foram feitas perfurações nos crânios, através das quais as agulhas foram inseridas e 4 μ g por hemisfério cerebral (para administrações bilaterais) ou 8 μ g (para administrações unilaterais) da toxina 6-OHDA, dissolvida com 0,2% de ácido ascórbico, foram microinjetados no feixe prosencefálico medial (FPM), conforme procedimento descrito em trabalhos anteriores (DA CUNHA et al., 2008). Durante a cirurgia, foi administrado bicarbonato de sódio i.p. (fármaco básico), para acelerar a excreção do tiopental (fármaco ácido) e evitar possíveis problemas cardiorrespiratórios no animal durante e após a cirurgia.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Comportamento Rotatório Induzido Por Apomorfina

Esse teste foi realizado com um total de 96 animais, divididos em três meses de análise (32 animais por mês). O desenho experimental desse teste está representado na figura 4. O comportamento rotatório dos animais com lesão unilateral na SNc foi observado em um cilindro de fundo cônico, onde as rotações (giros de 360°) horárias e anti-horárias foram contadas durante 60 min, após a administração por via s.c. de apomorfina dissolvida em salina (1,0 mg/kg), conforme procedimentos descrito em trabalho anterior (DA CUNHA et al., 2008). Após 7, 14 e 21 dias da cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de rotação. O experimento foi filmado através de uma câmera situada sobre o cilindro, e somente depois analisadas e quantificadas as rotações. Sempre foram confrontados um animal experimental com um animal controle.

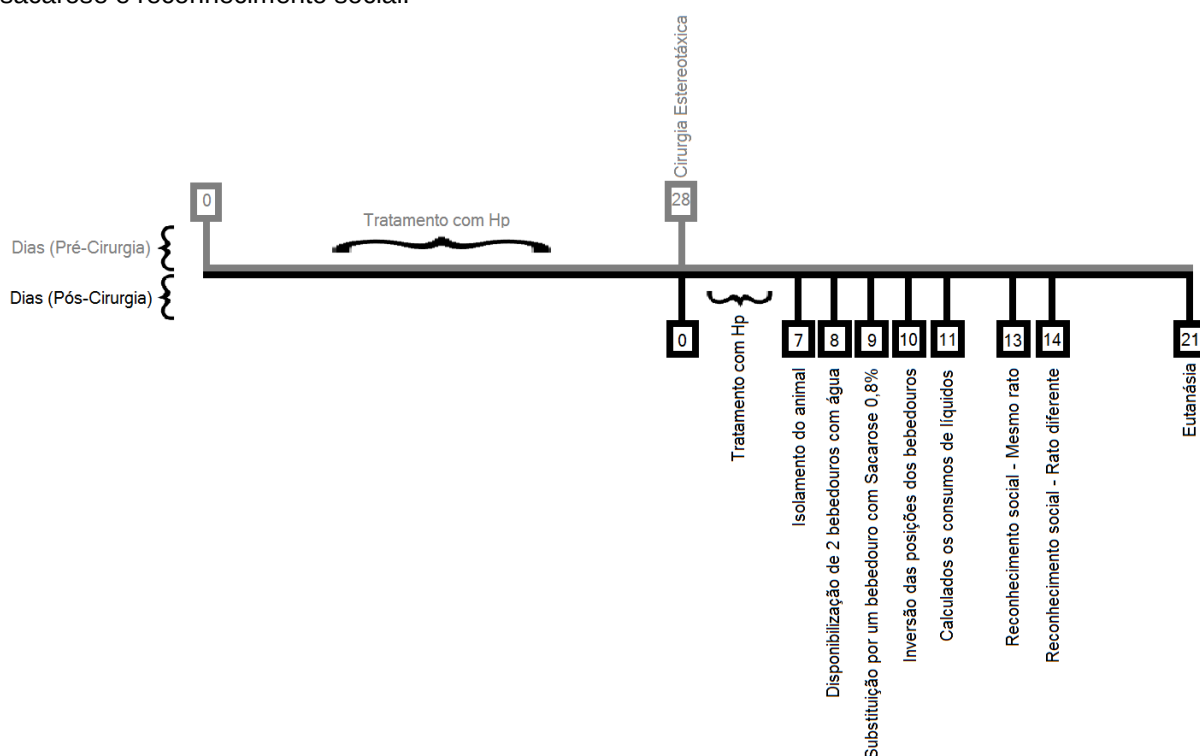
Figura 4: Linha do tempo representando o esquema de realização do teste de comportamento rotatório.



3.3.2 Teste De Preferência À Sacarose

O consumo de solução de sacarose é frequentemente usado como uma medida de anedonia em animais (CRAFT; DEVRIES, 2006). Para tal, os animais foram lesados bilateralmente. Os mesmos animais foram utilizados no teste de preferência a sacarose e reconhecimento social, totalizando 96 animais analisados (32 animais por mês), como está representado no desenho experimental e correspondente a figura 5. Uma semana após a cirurgia, os animais foram separados em um animal por caixa moradia, com acesso livre a ração. Cada animal teve acesso a 2 bebedouros durante 24 horas (fase de adaptação) com água, onde puderam consumir água em qualquer um dos bebedouros. Após esta adaptação, foi trocada a água por uma solução de sacarose 0,8% em um dos bebedouros de cada animal, como descrito previamente por Slattery e colaboradores (SLATTERY et al., 2007). Vinte quatro horas após, os bebedouros foram trocados de lado na caixa para se evitar o efeito de perseverança. O uso de um teste com 48 horas de duração permite minimizar os efeitos de neofobia e perseverança a algum local ou lado da caixa. O consumo de água e solução sacarose foi avaliado simultaneamente nos grupos SHAM e 6-OHDA, através da pesagem dos bebedouros antes e depois do teste.

Figura 5: Linha do tempo representando o esquema de realização dos testes de preferência a sacarose e reconhecimento social.



3.3.3 Teste De Reconhecimento Social

O experimento foi realizado utilizando o procedimento descrito por Dantzer e colaboradores (DANTZER et al., 1987) e padronizado por Prediger e colaboradores (PREDIGER et al., 2003; PREDIGER, et al., 2005; PREDIGER, et al., 2006), sendo este um modelo válido para o estudo da memória olfatória de curta-duração. Os mesmos animais utilizados no teste de anedonia permaneceram isolados (Figura 5) e foram utilizados para este teste no 13º dia após cirurgia (reconhecimento social utilizando o mesmo rato) e 14º dia após a cirurgia (reconhecimento social utilizando rato jovem diferente). O teste de reconhecimento social consistiu em duas apresentações sucessivas (5 min cada), separadas por um intervalo de 30 minutos. Durante a primeira apresentação, um rato (1 mês de idade) foi colocado na caixa do rato adulto, e foi registrado o tempo de investigação (cheirar, lambar, se aproximar, etc) ao rato jovem. Ao final da primeira apresentação, o rato jovem foi retirado da caixa do rato adulto, ficando isolado em uma outra caixa durante o intervalo entre as apresentações. Após um intervalo de 30 min, ou mesmo rato jovem foi reapresentado ao rato adulto, registrando-se novamente o tempo de investigação do animal adulto durante a segunda apresentação ou um rato

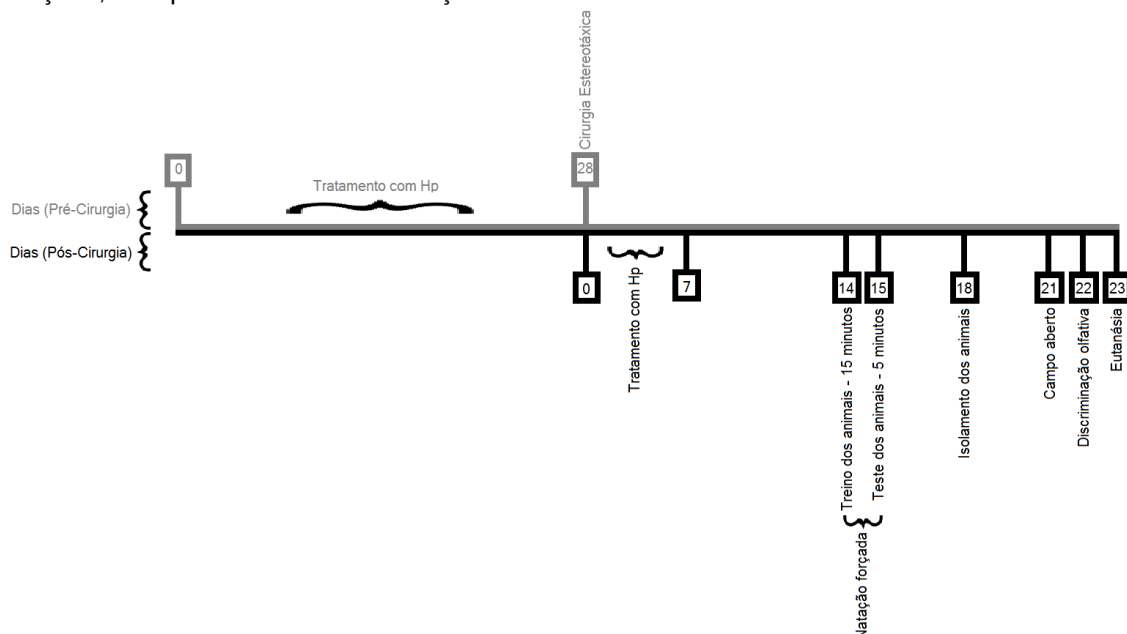
jovem diferente foi introduzido na caixa, registrando o tempo de segunda apresentação . O que acontece neste tipo de experimento é que quando se utiliza um intervalo pequeno (menor que 40 min) entre as duas apresentações, o rato adulto é capaz de reconhecer o jovem para o qual foi previamente apresentado, verificando-se uma redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação. Entretanto, quando se utiliza um intervalo superior a 40 min entre as duas apresentações, o rato adulto perde a capacidade de reconhecimento, não sendo verificada redução no tempo de investigação durante a segunda apresentação. O tempo gasto na investigação do rato adulto foi medido e em seguida, para cada animal, expresso como a razão entre a segunda exposição e primeira exposição (Ratio of Investigation Duration (RID)). Uma redução no RID reflete uma diminuição no comportamento de investigação durante a segunda exposição, demonstrando a capacidade de reconhecimento do rato adulto. Esta transformação foi escolhida a fim de equalizar variações entre diferentes grupos (PREDIGER et al., 2004)

3.3.4 Teste De Natação Forçada Modificado

O teste de natação forçada que foi utilizado é o teste modificado por Porsolt e colaboradores (PORSOLT et al., 1978). Os mesmos animais foram utilizados para os testes de natação forçada, campo aberto e discriminação olfativa, totalizando 96 animais analisados (32 animais por mês), como está representado na figura 6. A lesão utilizada em todos esses testes foi bilateral. Quatorze dias após a cirurgia, os ratos foram colocados em um cilindro de plástico opaco (diâmetro de 20cm, altura de 50cm e contendo água até 30cm) durante 15 minutos (sessão treino) e seguido por uma sessão teste (24 horas após a sessão treino) durante 5 minutos. A sessão teste foi filmada e gravada por uma câmera posicionada acima do cilindro para posterior análise. Os seguintes comportamentos foram quantificados: imobilidade (tempo que o animal permanece parado de todas as suas atividades comportamentais e permanece flutuando na água com movimentos mínimos), natação (tempo que o animal permanece realizando movimentos de natação circular no cilindro) e escalada (tempo que o animal permanece realizando movimentos verticais das

patas dianteiras na parede do cilindro). Após a sessão treino e teste, os animais foram secos e colocados em um ambiente aquecido por 2 horas, antes de retornar a caixa moradia. A água do cilindro foi trocada entre cada animal.

Figura 6: Linha do tempo representando o esquema de realização dos testes de Natação Forçada, Campo Aberto e Discriminação Olfativa.



3.3.5 Campo Aberto

O principal objetivo do teste de campo aberto é verificar a função motora do animal, sendo que o mesmo também pode ser utilizado para avaliar ansiedade. Esse teste é importante para observar se existe alteração motora nos animais, decorrentes da injeção bilateral de 6-OHDA. Após realização do teste de natação forçada, no 21º dia após a cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto (Figura 6). Para tal, utiliza-se uma caixa feita de madeira e fórmica, com um chão de cor branca (100 x 100 cm), dividido em 25 quadrantes de 20 x 20 cm, com paredes de 40 cm de altura. Durante os experimentos, cada rato foi colocado no centro do campo aberto e mantido sob observação por 5 minutos. O número de quadrantes cruzados, atos de levantar e auto-limpezas foram registrados. O aparelho foi construído de acordo com o sugerido por BROADHURST (1960).

3.3.6 Discriminação Olfativa

Foi realizado o teste de discriminação olfativa, proposto por SOFFIÉ e LAMBERTY (1988) e, posteriormente, modificado por PREDIGER *et al.*, 2005a,b. Após os testes de natação forçada e campo aberto, foi realizado esse teste (Figura 6). Para tal, os animais foram isolados 72 horas antes do teste, para que seu cheiro ficasse impregnado no sepilho da caixa moradia. A caixa onde o teste é realizado se caracteriza por possuir 2 compartimentos idênticos (30 x 30 x 20 cm), separados por uma porta que possibilita o trânsito por ambos os compartimentos. O chão do compartimento direito foi forrado com sepilho retirado da caixa moradia do animal (sepilho familiar) e o chão do compartimento esquerdo foi forrado com sepilho não familiar. No 22º dia após a cirurgia, o rato foi solto no lado direito e durante 5 minutos, foi marcado o tempo que ele permaneceu explorando cada ambiente.

3.4 IMUNODETECÇÃO DE PROTEÍNAS (WESTERN BLOT).

Após eutanasiar os animais através da decapitação, seus cérebros foram removidos, lavados com solução salina (NaCl 0,9%) e dissecados sobre uma placa de Petri cercada de gelo, como uma maneira de reduzir possíveis perdas proteicas nas estruturas coletadas. Foram coletados os estriados que em seguida foram armazenados em freezer a -80°C até a sua análise.

No momento da análise, as amostras foram homogeneizadas em tampão (1/10 v/v), contendo: Tris-base 50 mM, ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) 1 mM, NaF 100 mM, ortovanadato de sódio (Na_3VO_4) 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% em pH 7 e um coquetel inibidor de proteases (PMSF, Leupeptina, Aprotinina, Pepstatina). Seguido de centrifugação a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado como extrato citosólico e diluído (2:1 v:v) em tampão Tris-100 mM, EDTA 4 mM, SDS 8%, glicerol 20 %, β -mercaptoetanol 8%, pH 6,8. A dosagem de proteínas totais foi realizada através do método de Lowry modificado (PETERSON, 1977).

As amostras (60 µg de proteína total por corrida) foram separadas por SDS-PAGE 10% e as proteínas transferidas para membranas de nitrocelulose. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%, pH 7,5) durante 1 h e incubadas com anticorpo primário monoclonal Anti-TH na diluição 1:2.000 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) diluído em TBS-T contendo BSA 2,5%.

Após esta etapa de incubação, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T e incubadas durante o período de 1 h em temperatura ambiente com o anticorpo secundário na diluição 1:4.000. As membranas foram mais uma vez lavadas com TBS-T (3 lavagens de 5 minutos) e duas vezes com TBS, para a detecção dos complexos imunes. A revelação das bandas correspondentes à TH foi realizada através de um kit ECL (quimiluminescência) conforme recomendações do fabricante. A densidade óptica das bandas foi quantificada utilizando o software QuantityOne® (BioRad Laboratories, EUA).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.). As comparações estatísticas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de duas vias, sendo avaliadas as variáveis pré-tratamento (tratamento com veículo ou *Hypericum perforatum* nas três doses), tratamento (após administração de soro fisiológico ou 6-OHDA no feixe prosencefálico medial) e a interação entre ambas. Esses dados foram analisados no intuito de observar possível influência do tratamento do *Hypericum perforatum* nos animais sem lesão, bem como analisar o comportamento após lesão dopaminérgica. Posteriormente, os grupos foram comparados entre si empregando-se o teste *post-hoc* de Newman-Keuls. A probabilidade aceita como indicativo da existência de diferença estatisticamente significativa foi $p \leq 0,05$. Todas as comparações estatísticas foram efetuadas utilizando-se o pacote estatístico *Statistic 5.0*.

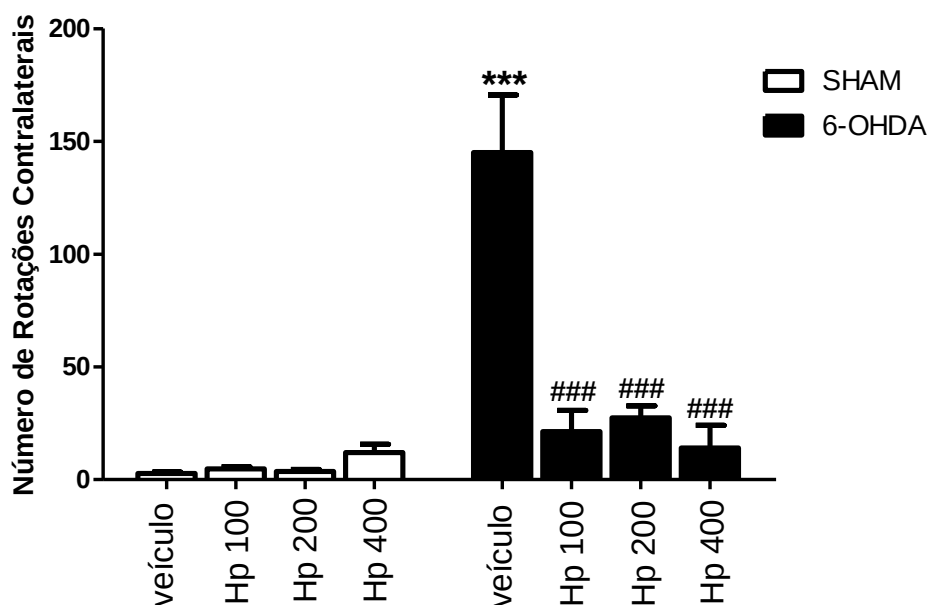
3. RESULTADOS

4.1 Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina

Os animais do grupo 6-OHDA tratados com *Hypericum perforatum* nas 3 concentrações testadas apresentaram um menor número de rotações contralaterais quando comparados aos animais tratados com veículo.

A Figura 7 mostra os dados do comportamento rotatório dos animais no 7º dia pós cirurgia. De acordo com o fator pré-tratamento houve diferença estatística entre o pré-tratamento com *Hypericum perforatum* ou veículo [$F(1,55)=17,86$, $p \leq 0,001$]. Com relação ao fator tratamento (6-OHDA ou salina), também foi observada diferença estatisticamente significativa [$F(3,55)=8,73$, $p \leq 0,001$]. Houve também uma diferença estatística na interação entre o pré-tratamento e o tratamento [$F(3,55)=10,35$, $p \leq 0,001$]. Na análise post-hoc, observamos que o grupo 6-OHDA+veículo apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo SHAM+veículo ($p \leq 0,001$). Os animais dos grupos 6-OHDA tratados com as diferentes concentrações de *Hypericum perforatum* apresentaram um número de rotações significativamente menor quando comparados ao grupo 6-OHDA+veículo ($p \leq 0,001$).

FIGURA 7 – Número de rotações contralaterais no 7º dia após cirurgia unilateral, induzidas por apomorfina (1mg/Kg s.c.) nos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400mg/kg). *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguida de test post hoc de Newman-Keuls).



Também foram avaliadas as rotações contralaterais no 14° e no 21° pós cirurgia, sendo que todos os resultados foram semelhantes aos resultados obtidos no 7° dia. A figura 8 representa a análise rotacional no 14° dia. Foram observadas diferenças no fator pré-tratamento [$F(3,55) = 32,26$, $p \leq 0,001$], no fator tratamento [$F(1,55) = 56,99$, $p \leq 0,001$] e na interação entre esses fatores [$F(3,55) = 36,37$, $p \leq 0,001$]. Os resultados no 21° dia após a cirurgia, demonstram diferenças estatísticas, da mesma maneira, nos três fatores: pré-tratamento [$F(3,55) = 26,47$, $p \leq 0,001$], tratamento [$F(1,55) = 45,41$, $p \leq 0,001$] e interação [$F(3,55) = 28,67$, $p \leq 0,001$].

FIGURA 8 – Número de rotações contralaterais no 14° dia após cirurgia unilateral, dia induzidas por apomorfina (1mg/Kg s.c.) nos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400mg/kg). *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

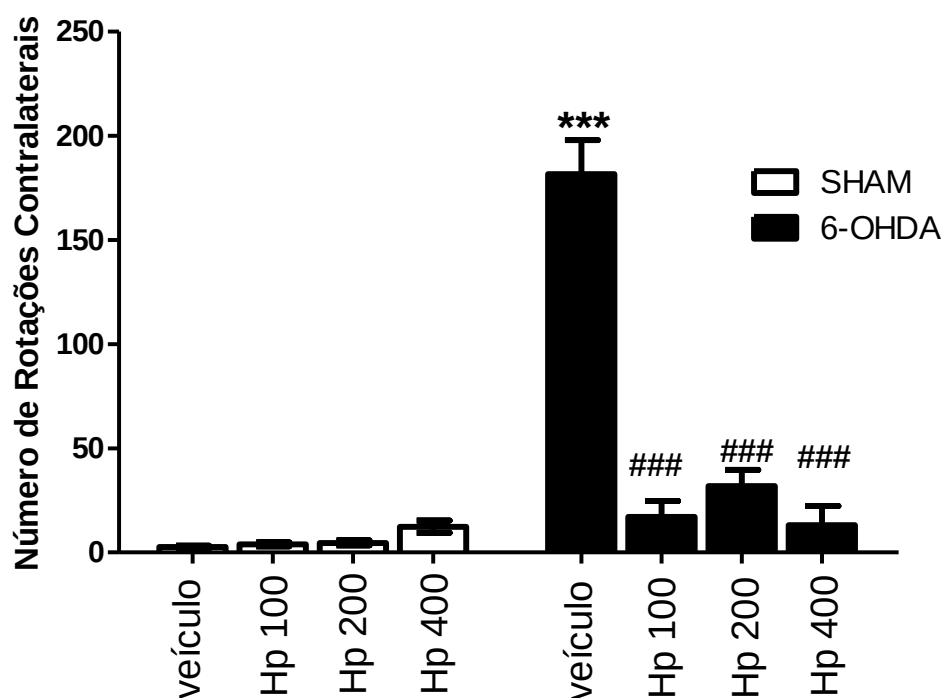
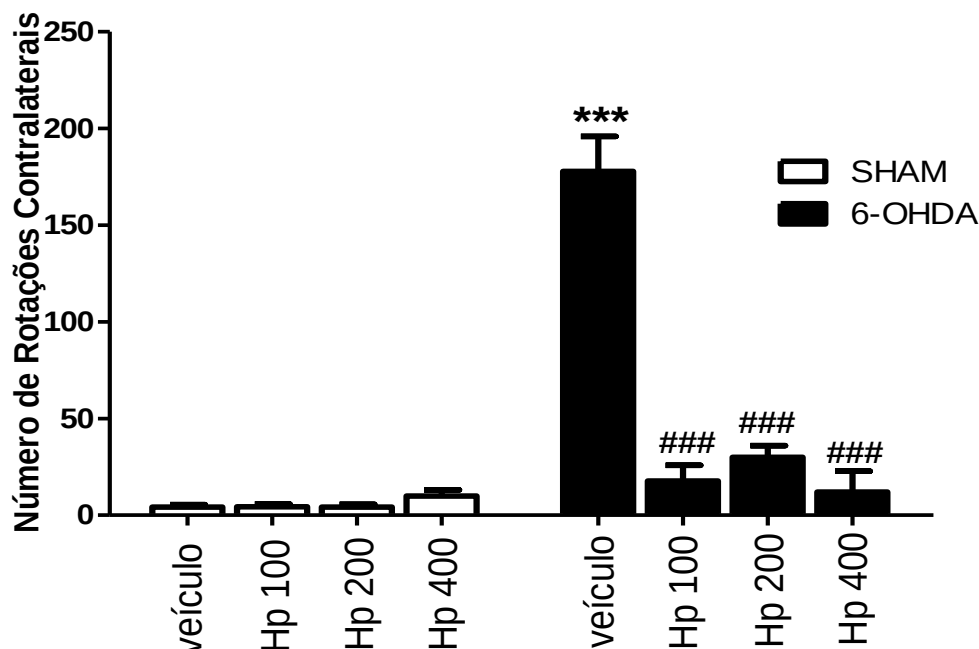


FIGURA 9– Número de rotações contralaterais no 21° dia após cirurgia unilateral, dia induzidas por apomorfina (1mg/Kg s.c.) nos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400mg/kg). *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p \leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).



As rotações ipsilaterais também foram observadas no 7° dia, sendo que não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos fatores: pré-tratamento [$F(3,55) = 1,20$, $p=0,32$], tratamento [$F(1,55) = 0,15$, $p=0,69$] e interação [$F(3,55) = 0,30$, $p=0,83$]. No 14° dia: pré-tratamento [$F(3,55) = 0,88$, $p=0,45$], tratamento [$F(1,55)=0,91$, $p=0,34$] e 21° dia: pré-tratamento [$F(3,55)=0,91$, $p=0,44$]. Esses resultados estão representados na TABELA 1.

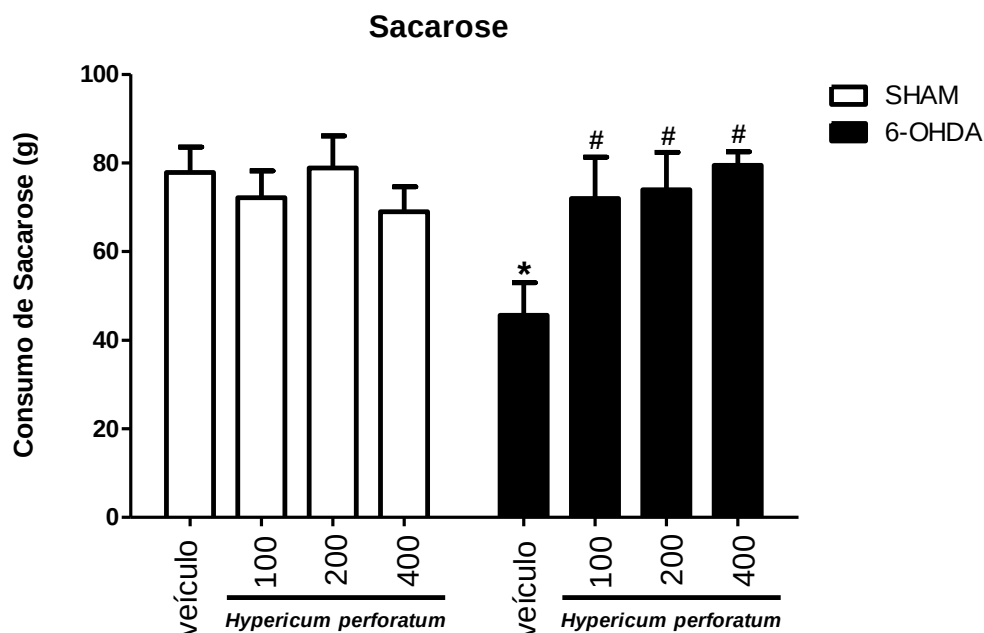
TABELA 1: NÚMERO DE ROTAÇÕES IPSILATERAIS

Grupo	Média±EPM Rotações 7° dia	Média±EPM Rotações 14° dia	Média ±EPM Rotações 21° dia
SHAM+Veic	0,28±0,3	0,14±0,1	0,14±0,1
SHAM+100mg	0,14±0,1	0±0	0±0
SHAM+200mg	0,14±0,1	0,14±0,1	0,28±0,3
SHAM+400mg	0,5±0,5	12,12±11,9	14,12±10,3
6-OHDA+Veic	0±0	0±0	0±0
6-OHDA+100mg	0,28±0,2	0±0	0±0
6-OHDA+200mg	0±0	0±0	0±0
6-OHDA+400mg	0,5±0,3	0±0	0,5±0,5

4.2 Teste de Preferência a Sacarose

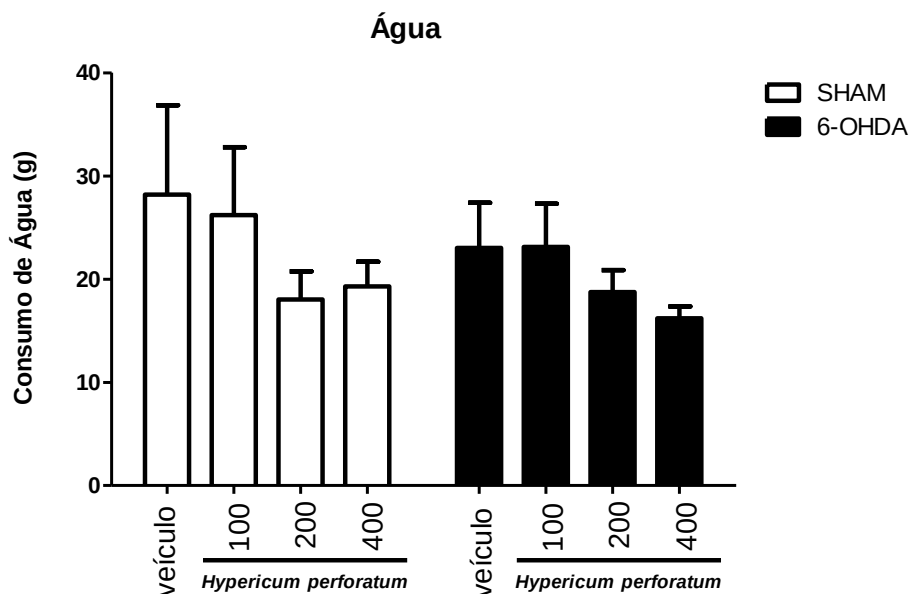
No teste de preferência a sacarose, de acordo com a ANOVA de duas vias, não foi observada diferença estatisticamente significativa no fator pré-tratamento [$F(3,73)=1,79$, $p=0,15$], nem no fator tratamento [$F(1,73)=1,91$, $p=0,17$], porém, foi observada diferença na interação desses fatores [$F(3,73)=3,22$, $p \leq 0,05$]. Na análise *post-hoc*, foi observado que os animais do grupo 6-OHDA+veículo apresentaram um consumo de solução de sacarose menor do que o grupo SHAM+veículo ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newmann Keuls) (Figura 10). Os animais dos grupos 6-OHDA tratados com *Hypericum perforatum* em todas as concentrações testadas (100, 200 e 400 mg/kg de *Hypericum perforatum*) apresentaram consumo de sacarose estatisticamente maior, quando comparados ao grupo 6-OHDA+veículo ($p \leq 0,05$, ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newmann Keuls).

FIGURA 10– Consumo de sacarose dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 10 dias após lesão bilateral. * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo SHAM+veículo, # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de test post hoc de Newman-Keuls)



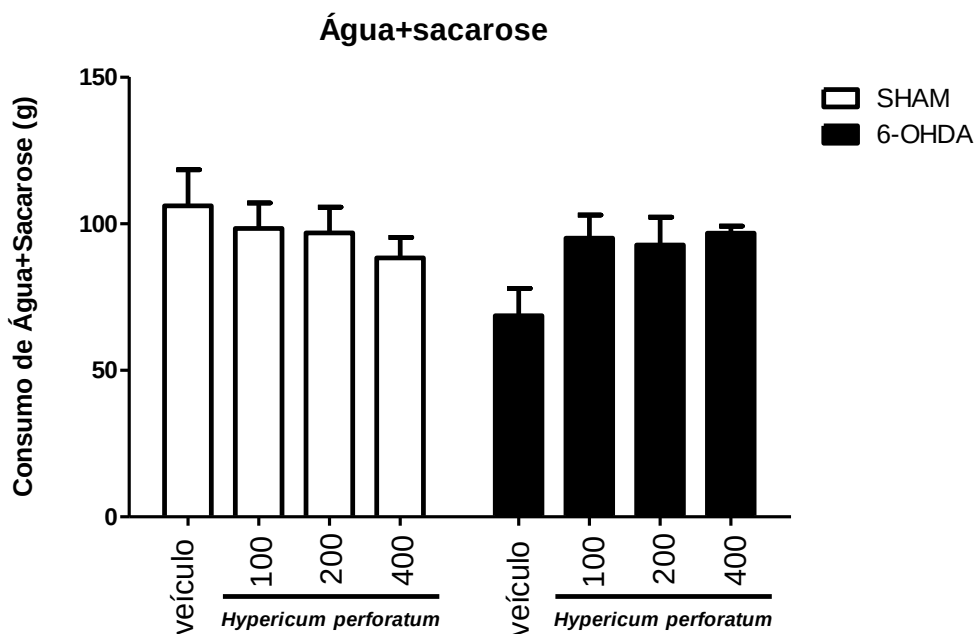
Com relação ao consumo de água, não foi encontrada diferença entre os fatores pré-tratamento [$F(3,73)=1,47$, $p=0,22$], tratamento [$F(1,73)=0,61$, $p=0,43$] e interação [$F(3,73)=0,13$, $p=0,93$] conforme está representado na figura 11.

FIGURA 11– Consumo de água dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg) 10 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p>0,05$ (ANOVA de duas vias).



Conforme observado na figura 12, não foi encontrada diferença significativa no consumo total de líquidos entre os fatores pré-tratamento [$F(3,73)=0,4$, $p=0,74$], tratamento [$F(1,73)=2,09$, $p=0,15$] e interação entre ambos [$F(3,73)=2,41$, $p=0,07$].

FIGURA 12– Consumo de água+sacarose dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg) 10 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p>0,05$ (ANOVA de duas vias).



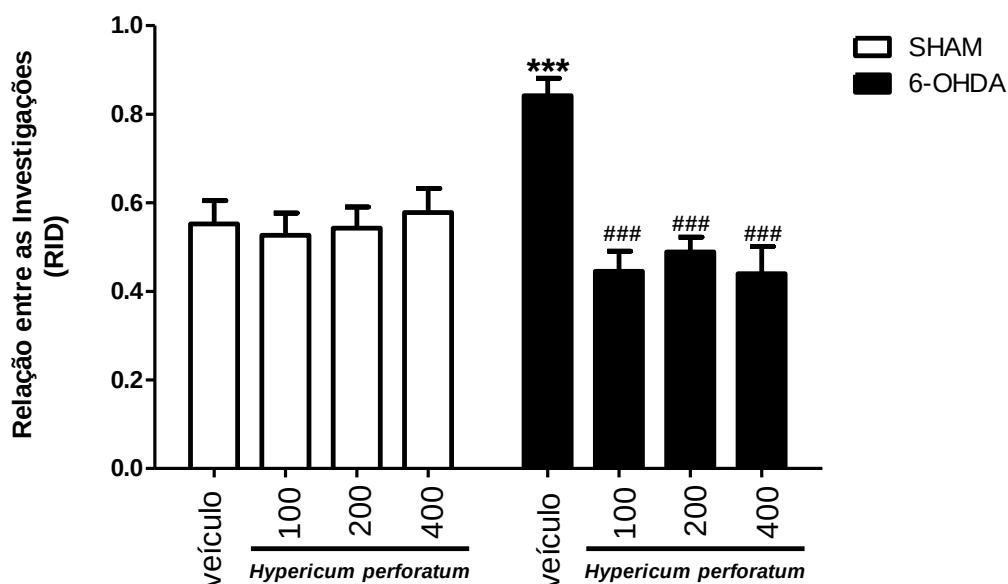
4.3 Teste de Reconhecimento Social

A Figura 13 ilustra os efeitos do pré-tratamento com *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg) e do tratamento intracerebral com 6-OHDA bilateralmente (4 μ em cada hemisfério) sobre o desempenho dos animais no teste do reconhecimento social, quando se apresentou o mesmo rato jovem em ambas as investigações

A ANOVA de duas vias revelou um efeito significativo [$F(3,73)=7,72$, $p\leq 0,001$] no pré-tratamento e na interação entre o pré-tratamento com o tratamento [$F(3,73)=7,63$ $p\leq 0,001$]. De acordo com os valores de RID, o grupo 6-OHDA+veículo apresentou uma maior relação entre os tempos de segunda e primeira investigação do que o grupo SHAM+veículo ($p\leq 0,001$ ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newmann Keuls). Os grupos 6-OHDA tratados com *Hypericum perforatum* (100, 200 e 400 mg/Kg) apresentaram diferenças na relação entre as investigações quando comparadas ao grupo 6-OHDA+veículo.

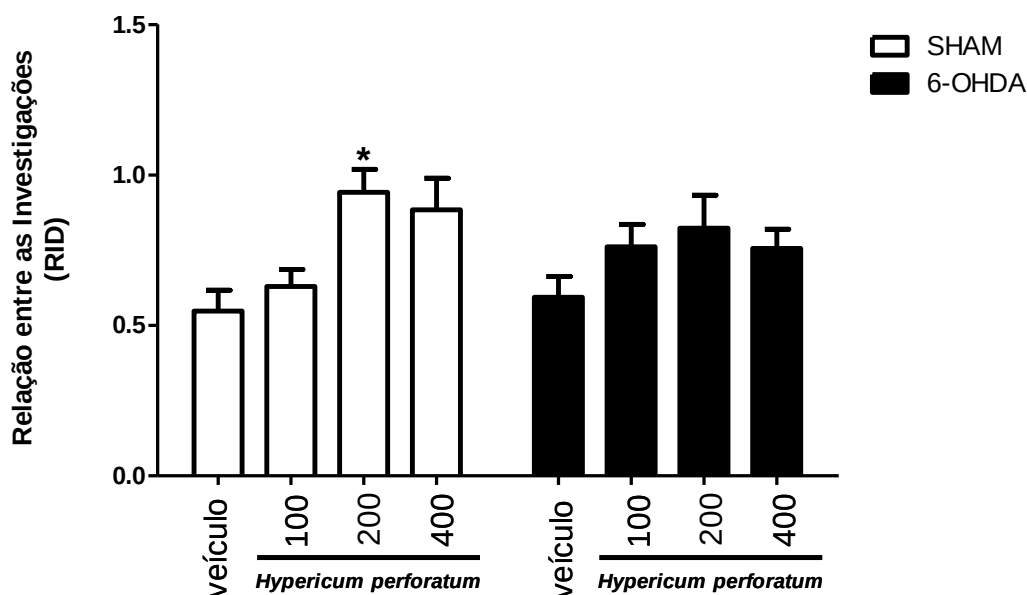
Entretanto o tratamento com 6-OHDA não apresenta diferença estatística entre os grupos [$F(1,73)=0,01$, $p=0,90$].

FIGURA 13 – Relação entre a primeira e segunda investigação dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), após cirurgia bilateral. *** $p\leq 0,001$ grupo 6-OHDA+veículo comparado com o grupo SHAM+veículo, ### $p\leq 0,001$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas, seguido de test post hoc de Newman-Keuls)



Quando um animal jovem diferente foi utilizado na segunda apresentação, como está representado na Figura 14, o fator pré-tratamento apresentou diferença estatística significativa [$F(3,72)=5,34$, $p\leq 0,01$]. Os animais do grupo SHAM+200mg/kg apresentaram relação entre as investigações estatisticamente maior que os animais do grupo SHAM+veículo ($p\leq 0,05$). Os fatores tratamento [$F(1,72)=0,08$, $p=0,76$] e a interação entre os fatores [$F(3,72)=1,17$, $p=0,33$] não apresentaram diferença entre os grupos.

FIGURA 14 – Relação entre a primeira e segunda investigação dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), após cirurgia bilateral. * $p\leq 0,05$ grupo SHAM+200mg/kg comparado com o grupo SHAM+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).

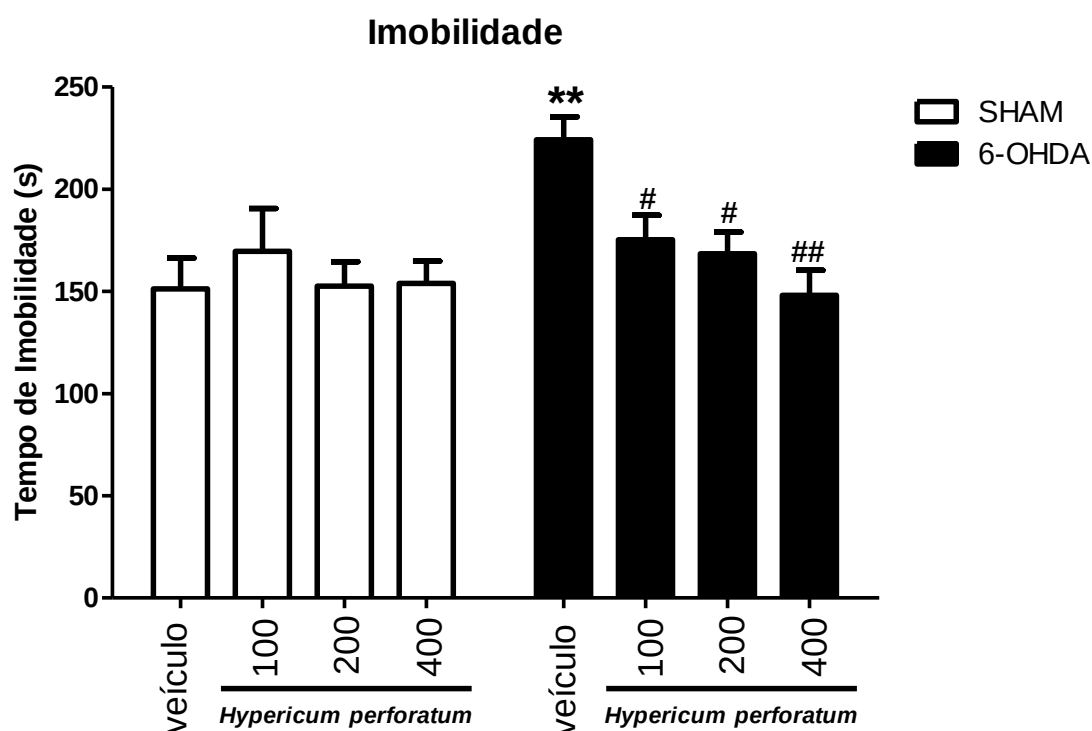


4.4 Teste de Natação Forçada

O tempo de imobilidade dos animais durante os 5 minutos da sessão de teste foi utilizado como parâmetro indicativo de um comportamento do tipo depressivo. A análise através de ANOVA de duas vias deste parâmetro revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais nos fatores pré-tratamento [$F(3,72)=2,87$, $p\leq 0,05$], tratamento [$F(1,72)=5,74$, $p\leq 0,05$] e interação [$F(3,72)=3,45$, $p\leq 0,05$].

Esses resultados indicam que os animais 6-OHDA tratados com veículo apresentaram um tempo de imobilidade maior quando comparado com o grupo SHAM tratado com veículo ($p \leq 0,01$, ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newmann Keuls). Mas, quando os animais do grupo 6-OHDA foram tratados com 100, 200 e 400 mg/kg de *Hypericum perforatum* houve uma redução no tempo de imobilidade quando comparados aos animais do grupo 6-OHDA tratados com veículo, sendo que nos animais tratados com 400mg/kg a diferença no tempo de imobilidade foi mais evidente ($p \leq 0,01$) (Figura 15).

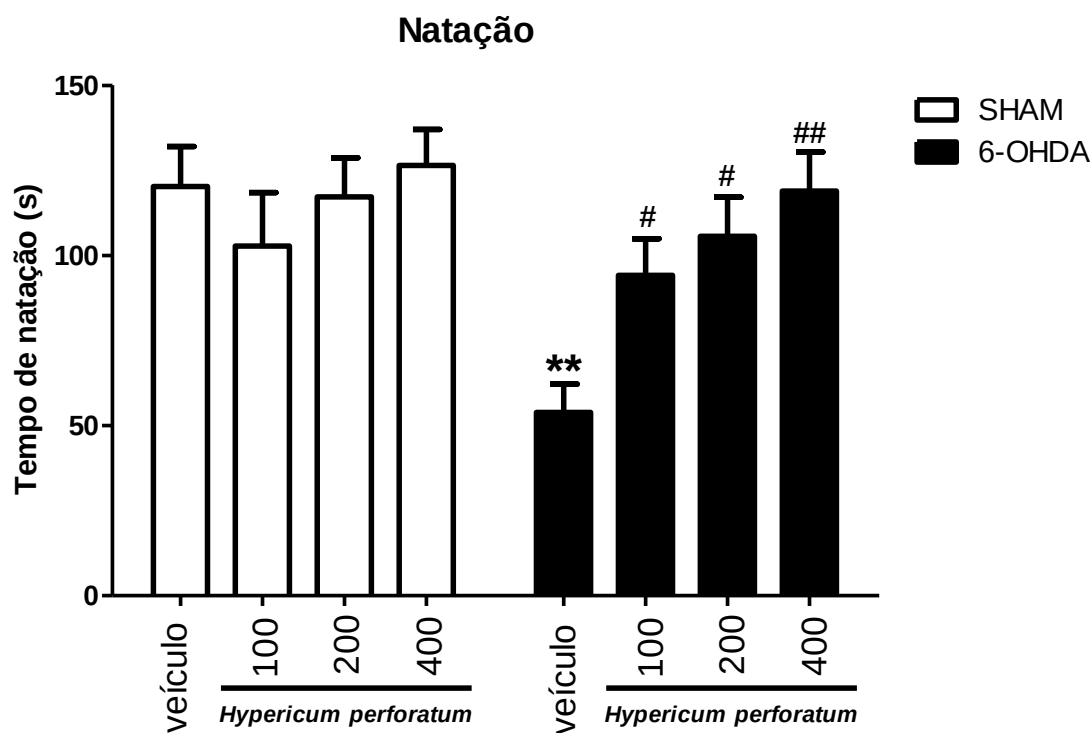
FIGURA 15- Avaliação do tempo de imobilidade dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 14 dias após cirurgia bilateral, ** $p \leq 0,01$ comparado com o grupo SHAM+veículo, # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, ## $p \leq 0,01$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).



Quanto ao tempo de natação, também foram encontradas diferenças significativas no pré-tratamento [$F(3,72)=3,56, p \leq 0,05$], tratamento [$F(1,72)=8,38, p \leq 0,01$] e interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(3,72)=2,99, p \leq 0,05$]. Os animais do grupo 6-OHDA tratados com veículo apresentaram uma redução no tempo de natação quando comparados com o grupo SHAM tratados com veículo ($p \leq 0,01$, ANOVA de duas vias seguido de teste post hoc de Newmann Keuls). Esta redução foi revertida com o

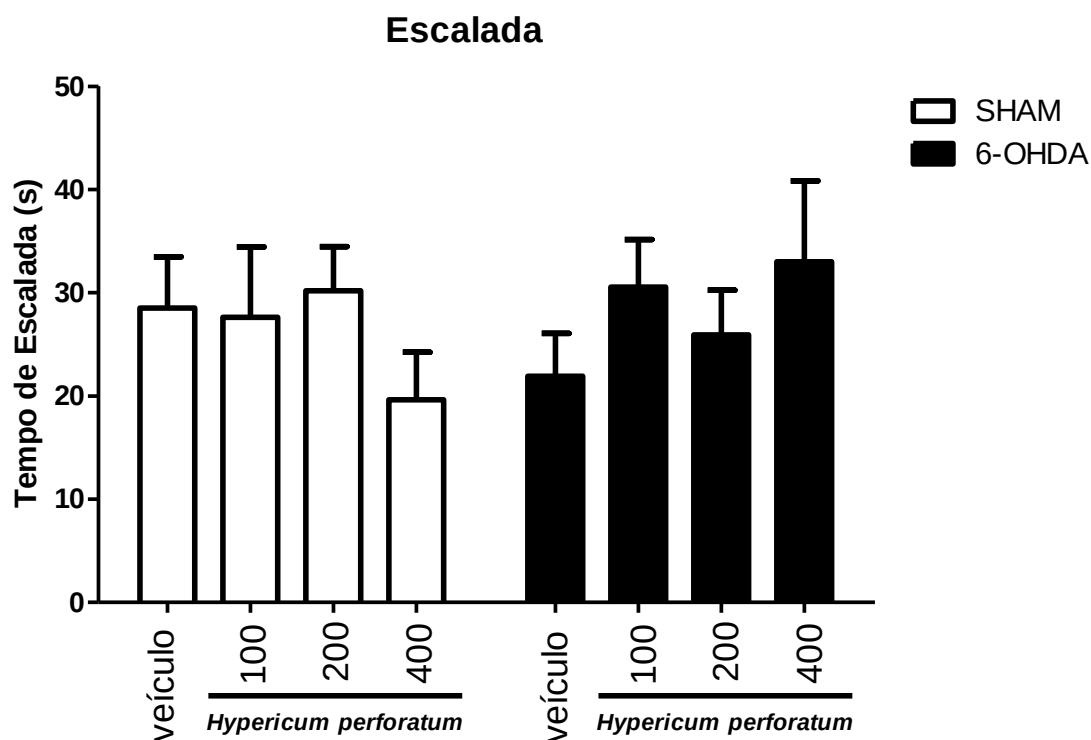
tratamento de *Hypericum perforatum* em todas as doses analisadas, sendo mais significativa com a dose de 400mg/kg. (Figura 16).

FIGURA 16 - Avaliação do tempo de natação dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 14 dias após cirurgia bilateral, ** $p \leq 0,01$ comparado com o grupo SHAM+veículo, # $p \leq 0,05$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo, ## $p \leq 0,01$ comparado com o grupo 6-OHDA+veículo (ANOVA de duas vias, seguido de test post hoc de Newman-Keuls).



Em relação ao tempo de escalada, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados em nenhum dos fatores: pré-tratamento [$F(3,72)=0,22$, $p=0,88$], tratamento [$F(1,72)=0,13$, $p=0,71$] e na interação entre eles [$F(3,72)=1,47$, $p=0,23$], conforme está representado na figura 17.

FIGURA 17 - Avaliação do tempo de escalada dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 14 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p=0,59$ (ANOVA de duas vias).

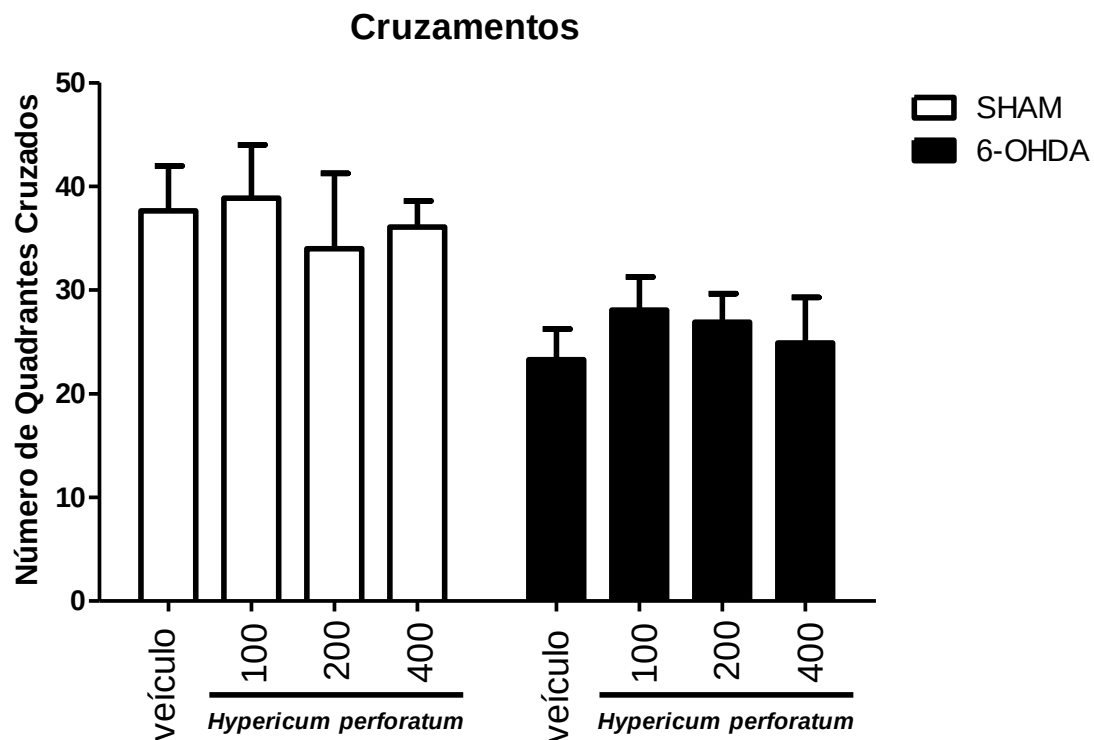


4.5 Teste de Campo Aberto

No teste do campo aberto, foram avaliados os números de quadrantes cruzados pelo animal, número de levantadas, número de auto-limpezas e número de bolos fecais.

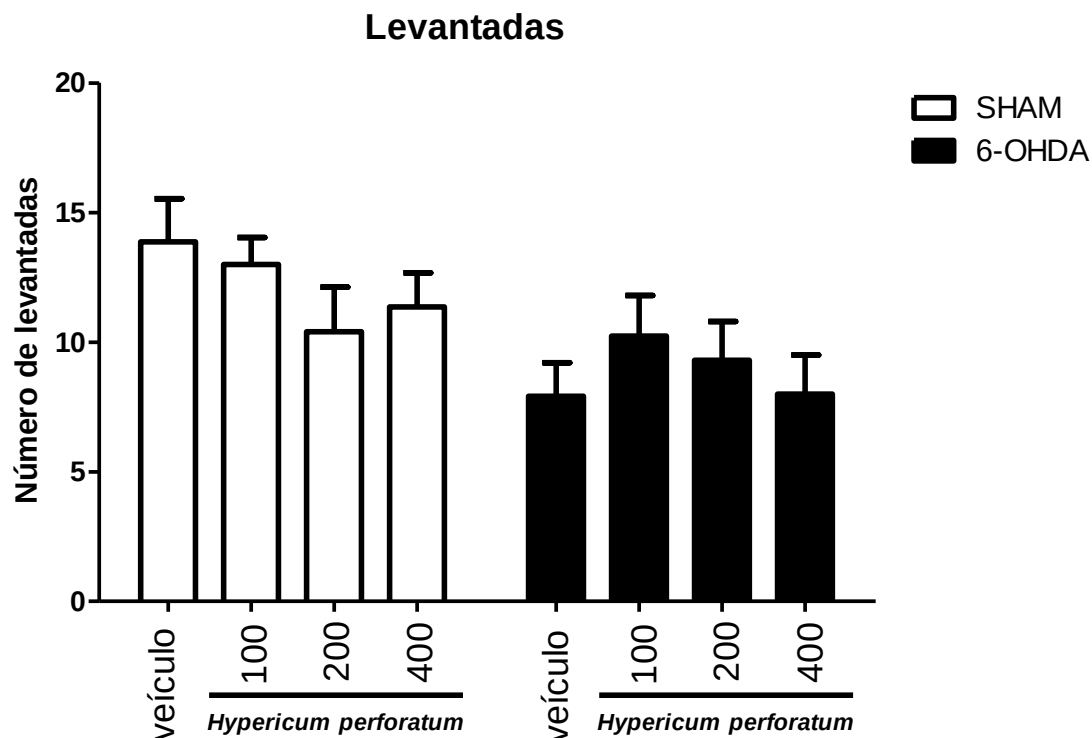
Com relação ao número de quadrantes cruzados, não foram observadas diferenças estatísticas significativas no fator pré-tratamento [$F(3,72)=1,47$, $p=0,23$], nem na interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(3,72)=0,24$, $p=0,86$]. Porém, o tratamento com 6-OHDA apresentou diferença entre os grupos [$F(1,72)=3,18$, $p\leq 0,001$] como demonstra a figura 18 (ANOVA de duas vias).

FIGURA 18 - Número de quadrantes cruzados dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 21 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p \geq 0,05$ (ANOVA de duas vias).



Resultados semelhantes ao número de quadrantes cruzados foram obtidos através da análise do número de levantadas, sendo que no pré-tratamento [$F(3,72)=0,74$, $p=0,53$] e na interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(3,72)=0,88$, $p=0,46$] não houve diferença significativa. Porém, o tratamento com 6-OHDA apresentou diferença entre os grupos [$F(1,72)=9,55$, $p \leq 0,001$] como demonstra a figura 19 (ANOVA de duas vias).

FIGURA 19 - Número de levantadas dos grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 21 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p \geq 0,05$ (ANOVA de uma via).



Os parâmetros auto-limpeza e número de bolos fecais também foram avaliados, porém não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos.

4.6 Teste de Discriminação Olfativa

No teste de discriminação olfativa, foi avaliado o tempo em segundos que os animais permaneciam no lado da caixa contendo o sepilho familiar (proveniente da caixa moradia) e o tempo em que permaneciam no sepilho não-familiar (limpo).

No sepilho familiar, não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos fatores analisados, sendo que: pré-tratamento [$F(3,72)=0,45$; $p=0,21$], tratamento [$F(1,72)=1,93$; $p=0,16$] e na interação [$F(3,72)=0,85$; $p=0,47$]. No sepilho não familiar, esses resultados foram semelhantes, não havendo diferenças estatísticas entre os fatores pré-tratamento [$F(3,72)=0,21$; $p=0,88$], tratamento [$F(1,72)=0,13$; $p=0,71$] e na interação entre ambos [$F(3,72)=1,46$; $p=0,23$]. Esses dados estão representados nas figuras 20 e 21.

Porém todos os animais em análise permaneceram mais tempo no sepilho não familiar ($249 \text{ segundos} \pm 2,5$) em relação ao tempo de permanência no sepilho familiar ($51 \text{ segundos} \pm 2,5$).

FIGURA 20 - Tempo de permanência no sepilho familiar dos animais SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 22 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p \geq 0,05$ (ANOVA de duas vias).

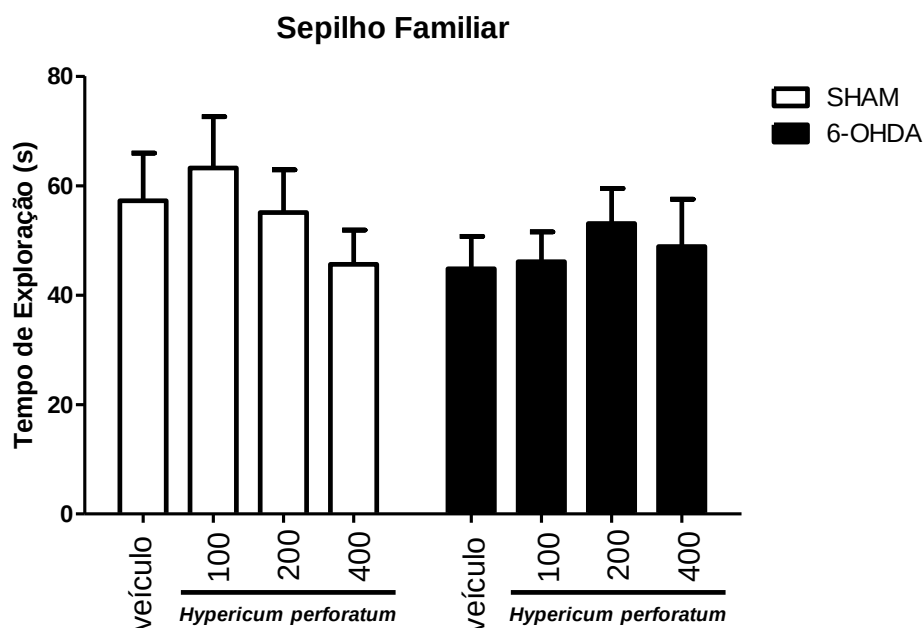
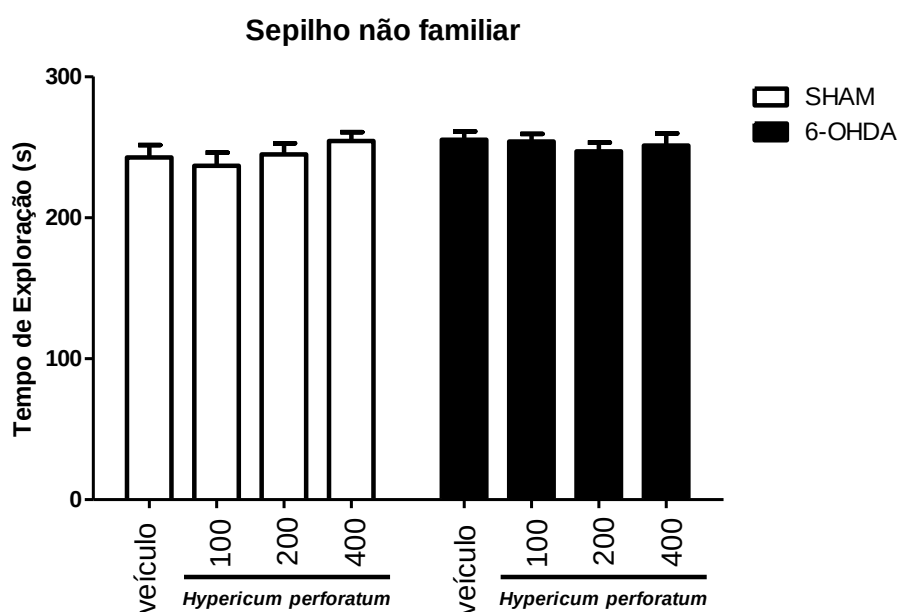


FIGURA 21 - Tempo de permanência no sepilho não familiar dos animais SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg), 21 dias após cirurgia bilateral. Não houve diferença estatística entre os grupos $p \geq 0,05$ (ANOVA de duas vias).

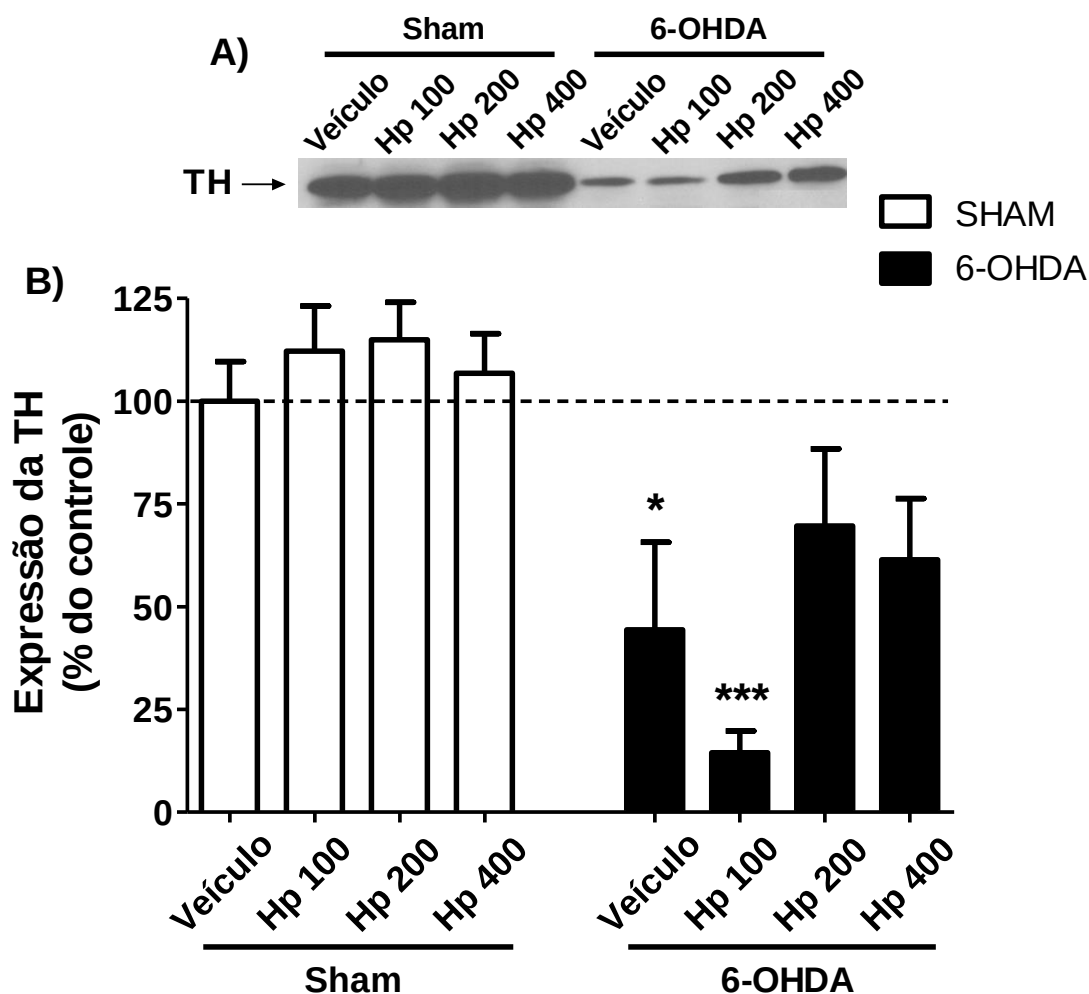


4.7 Imunodeteção de Proteínas (Western Blot).

No teste de Western Blot, foi quantificado a Tirosina Hidroxilase (TH) no estriado dos animais com lesão bilateral. Conforme observado na figura 22, houve diferença estatística na expressão da TH nos grupos 6-OHDA tratado com veículo e com 100 mg/Kg de *Hypericum perforatum* quando comparado ao grupo SHAM tratado com veículo ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$, respectivamente).

Os grupos lesados com 6-OHDA tratados com 200 e 400 mg/kg de *Hypericum perforatum* não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao grupo SHAM tratado com veículo ($p \geq 0,05$).

Figura 22 – A) Western Blot demonstrando a expressão da TH em cada grupo. B) Imunodeteção de proteínas (Western Blot) grupos SHAM e 6-OHDA tratados com diferentes doses de extrato de *Hypericum perforatum* (veículo, 100, 200 ou 400 mg/kg). * $p \leq 0,05$ comparado com o grupo SHAM+veículo, *** $p \leq 0,001$ comparado com o grupo SHAM+veículo (ANOVA de uma via, seguido de test post hoc de Newman-Keuls)



4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a administração intracerebral de 6-OHDA unilateralmente no feixe prosencefálico medial promove um comportamento rotatório contralateral a lesão no animal, quando os mesmos são desafiados com apomorfina, evidenciando a morte dos neurônios dopaminérgicos. O pré-tratamento com doses diferentes do *Hypericum perforatum* parece ser útil na reversão do comportamento rotatório, possivelmente impedindo/reduzindo a morte desses neurônios, induzida pelo tratamento com 6-OHDA.

O comportamento rotatório induzido por apomorfina é proposto na literatura com um modelo preditivo do grau de lesão unilateral do sistema nigroestriatal.

No modelo animal de lesão unilateral da SNc induzida por 6-OHDA, os animais geralmente apresentam comportamento rotatório contralateral quando desafiados com agonistas dopaminérgicos. Essas respostas são associadas ao nível de lesão no sistema nigroestriatal (SCHWARTING; HOUSTON, 1996).

O teste rotacional é uma forma de comprovar que a lesão induzida pela 6-OHDA foi significativa, de modo que os animais lesionados tratados com veículo devem apresentar grande número de rotações contralaterais por hora, caracterizando a ligação da apomorfina (agonista dopaminérgico) aos receptores de dopamina do lado lesado do cérebro (desequilíbrio entre lado lesado e não lesado). Quanto maior a lesão, maior o número de rotações esperado.

Este comportamento rotatório ocorre devido a uma hiperexpressão dos receptores dopaminérgicos, sendo que o efeito da apomorfina é potencializado por esse motivo (supersensibilização). Quanto maior o número de rotações, maior a intensidade da lesão, caracterizando um modelo animal da doença de Parkinson em estágio avançado (BETARBET et al., 2002).

Em outras palavras, a explicação para este fato é que fibras eferentes do estriado inibem a atividade motora ipsilateral e esta influência inibitória é diminuída pela ativação dos receptores dopaminérgicos do estriado, ou seja, a

estimulação destes receptores aumenta a atividade motora (GERLACH; RIEDERER, 1996).

A apomorfina é um agonista dopaminérgico direto que age sobre receptores dopaminérgicos D₁ e D₂. Em animais lesionados unilateralmente, a apomorfina vai ser mais efetiva no hemisfério lesionado devido a sensibilização dos receptores, promovendo rotações contralaterais a lesão (HUDSON et al, 1993).

Quando um agonista indireto é utilizado no teste de rotação irá produzir seu efeito principalmente do lado não lesado, onde há mais terminações nervosas para liberar DA, induzindo assim rotações ipsilaterais (GERLACH; RIEDERER, 1996).

Os dados observados no presente estudo mostraram que o grande número de rotações apresentado pelo grupo 6-OHDA tratado com veículo foi significativamente maior do que os animais lesados com 6-OHDA e tratados com *Hypericum perforatum*, que tiveram um menor número de rotações contralaterais. Esse resultado sugere que a lesão unilateral de 8µg de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial gerou uma lesão considerável nos neurônios dopaminérgicos, induzindo comportamento rotatório quando desafiados com apomorfina. Esse número reduzido de rotações contralaterais dos animais lesionados com 6-OHDA tratados com *Hypericum perforatum* pode sugerir uma menor perda neuronal quando comparados ao grupo 6-OHDA tratado com veículo.

Os animais dos grupos SHAM tratados com *Hypericum perforatum* não apresentaram rotações contralaterais quando desafiados com apomorfina, o que indica que por si só, o extrato de *Hypericum perforatum* não induz um comportamento rotatório.

De acordo com estudos prévios, a 6-OHDA provoca uma perda neuronal mais intensa quando comparada a modelos animais da DP utilizando outras toxinas, como por exemplo o MPTP. Ferro e colaboradores demonstraram que a intensidade da lesão contribui com o número de rotações em ratos observados de forma direta. Em outras palavras, quanto maior o tamanho da lesão induzido pela toxina, maior o número de rotações contralaterais observadas (FERRO et al, 2005; DA CUNHA et. al., 2008).

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Shim e colaboradores, que observaram o número de rotações no sétimo e décimo terceiro dia após cirurgia de animais tratados com *Uncaria rhynchophylla*. Nesse estudo, o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina foi significativamente menor nos animais lesados com 6-OHDA e tratados com a planta quando comparados com os animais 6-OHDA tratados com veículo. Esses dados foram confirmados pela imunohistoquímica, sendo que os animais 6-OHDA tratados com a *Uncaria rhynchophylla* apresentaram maior número de fibras positivas para tirosina hidroxilase, quando comparadas ao grupo lesado tratado com veículo (SHIM et al., 2009).

Também foi possível observar que a lesão induzida por 6-OHDA injetada bilateralmente nos cérebros dos animais leva ao aparecimento de sintomas cognitivos, principalmente instalando um quadro tipo depressivo no animal e uma perda de memória procedural de curta duração. Esses sintomas podem aparecer antes mesmo do aparecimento dos sintomas motores e de acordo com o presente estudo, podem ser revertidos através do pré-tratamento com a planta. Aparentemente, o tratamento bilateral com 6-OHDA (4µg de cada lado) não gera comprometimento motor nem prejuízo olfatório nos animais (HAWKES et al., 1999).

A lesão bilateral induzida por 6-OHDA promove comportamento tipo depressivo nos animais, conforme proposto em estudos prévios (TADAIESKY et al., 2008b, SANTIAGO et al., 2010). Para avaliar esse sintoma, são utilizados testes comportamentais como a preferência a sacarose e natação forçada.

O teste do consumo de sacarose tem sido amplamente utilizado como modelo animal de depressão, sugerindo um estado de anedonia nesses animais. Nesse teste pode-se comparar o consumo de água e sacarose entre os grupos, bem como o consumo total de líquidos dos animais.

Uma vantagem da utilização desse teste é que o efeito da 6-OHDA é avaliado tanto no consumo de sacarose quanto no consumo de água pelos animais e no consumo total de líquidos. Este aspecto é importante, pois exclui a ideia de possíveis prejuízos motores dos animais, considerando a degeneração causada por 6-OHDA na via nigroestriatal e seu conhecido efeito motor (SLATTERY et al., 2007).

No presente estudo, o pré-tratamento com *Hypericum perforatum* não influenciou no consumo de sacarose. Porém na interação entre o pré-tratamento e a injeção de 6-OHDA observou-se diferença significativa. O grupo 6-OHDA pré-tratado com veículo apresentou consumo de solução de sacarose estatisticamente menor quando comparado ao grupo SHAM pré-tratado com veículo. Pode ser então proposto que a injeção de 6-OHDA causa uma diminuição da preferência à sacarose (anedonia). Os grupos 6-OHDA pré-tratados com 100, 200 e 400mg/kg de *Hypericum perforatum* apresentaram consumo estatisticamente maior do que o grupo 6-OHDA pré-tratado com veículo.

Não foi observado efeito da 6-OHDA no consumo total de líquidos, tanto na fase de adaptação quanto na fase de teste. Esses resultados indicam que o efeito dessa neurotoxina no teste do consumo de sacarose foi devido à indução de anedonia, e não a uma alteração motora dos animais. (SKALISZ et al., 2002).

Outra forma validada pela literatura de se avaliar o comportamento “tipo depressão” em animais lesados com 6-OHDA se dá através do teste de natação forçada. Este teste de desespero comportamental caracteriza-se por um aumento no tempo de imobilidade do animal quando colocado na água, o que indica um estado emocional negativo. Os animais são forçados a nadar em um espaço no qual não há possibilidade de fuga. Após um período de intensa natação (tentativa de fuga, agitação, inquietação), os animais tendem a ficar imóveis, flutuando na água.

De acordo com estudos prévios, essa imobilidade é decorrente de um estado “depressivo” onde existe desespero e incapacidade de se adaptar ao estresse, muito semelhante ao que ocorre no transtorno depressivo em humanos (STERU; CHERNAT; THIEERY, 1985; PAPP; WILLNER, 1991).

Esse teste é alvo de questionamentos devido a possibilidade de resultados falso positivos que apresenta. Como exemplo, a utilização de drogas que melhoram a atividade motora (nomifensina e amineptina) podem mascarar a imobilidade dos animais, nos levando a crer que o comportamento “tipo depressão” está ausente (BORSINI; MELI, 1998).

Além disso, a natação forçada é uma forma de confirmar o resultado encontrado no teste de preferência a sacarose, que também avalia o

comportamento “tipo depressão” dos animais, porém sem levar em consideração danos motores.

Pode-se observar no presente estudo que o tempo de imobilidade foi significativamente maior nos animais lesados com 6-OHDA e pré-tratados com veículo. Esse dado caracteriza comportamento animal semelhante a depressão que acomete os humanos com DP. Os animais lesados com 6-OHDA, pré-tratados com as diferentes doses de *Hypericum perforatum* apresentaram redução no tempo de imobilidade, mantendo-se mais tempo em movimento (nadando, escalando). Esse resultado indica uma possível reversão do estado tipo depressivo, quando comparado com os animais que não foram pré-tratados com o extrato.

Nesses testes, o pré-tratamento com um fármaco antidepressivo não teve influência nos animais controle (SHAM), pois não foi encontrada diferença estatística entre os grupos tratados com *Hypericum perforatum* e veículo.

A reversão do comportamento tipo depressivo em ambos os testes pode ser interpretada de duas maneiras. Primeiramente, de acordo com estudos prévios, a planta *Hypericum perforatum* apresenta potencial antidepressivo, sendo utilizada na clínica em casos de depressão leve a moderada. Seu mecanismo de ação consiste na inibição da recaptação de catecolaminas, principalmente noradrenalina e serotonina além de apresentar fraca inibição da enzima MAO-A (BIFFIGNANDI; BILIA, 2000; LINDE; KNUPPEL, 2005; MENNINI; GOBBI, 2004).

Essa característica antidepressiva da planta, por si só, pode melhorar o comportamento “tipo depressão” em modelos animais da doença de Parkinson, devido ao tratamento prévio com as três doses empregadas, antes da lesão com 6-OHDA. A administração do fármaco durante 28 dias antes da cirurgia foi escolhida para que o mesmo pudesse desempenhar seu efeito antidepressivo, que se instala gradativamente.

O uso do *Hypericum perforatum* pode ser importante quando utilizado em associação com outros fármacos utilizados no tratamento da DP. A levodopa e os antimuscarínicos são os fármacos mais utilizados, mas visam apenas a melhora dos sintomas motores, sem influenciar nos sintomas cognitivos.

Outro aspecto a ser considerado diz respeito a possível neuroproteção causada pelo *Hypericum perforatum*, reduzindo a morte de neurônios dopaminérgicos causada pela 6-OHDA, mantendo assim uma maior produção de dopamina quando comparada aos animais tratados com veículo.

É importante ressaltar que o teste de preferência a sacarose foi realizado 7 dias após a cirurgia e o teste de nado forçado foi realizado 14 dias após o procedimento cirúrgico. Sendo assim, os animais ainda estavam em tratamento com o extrato da planta no teste de preferência a sacarose e não estavam mais em tratamento no momento da realização do teste de natação forçada. Esse aspecto reforça a ideia de que a atividade do *Hypericum perforatum* na reversão do comportamento tipo depressivo pode ter sido decorrente ou influenciada por redução da morte neuronal e, conseqüentemente, uma depleção menor de dopamina na via nigroestriatal e não somente as propriedades terapêuticas antidepressivas da planta.

Para avaliar a memória social dos ratos, o teste de reconhecimento social foi utilizado. Esse teste é utilizado para evidenciar possíveis danos na memória olfativa de curta duração. Diversos estudos demonstraram que redução de neurotransmissores, tais como a noradrenalina, serotonina e dopamina causam prejuízos de memórias (GRIFFING; TAYLOR, 1995; LETTY et al, 1997; SEAMANS et al, 1998).

Mais especificamente, as vias dopaminérgicas inervam diversas regiões do cérebro responsáveis por aprendizado e memória, como hipocampo, estriado e córtex pré-frontal (SEAMANS et al, 1998). O bulbo olfatório de ratos e humanos também apresenta grande inervação dopaminérgica, auxiliando na distinção e reconhecimento de odores. Uma redução na quantidade de dopamina no estriado leva principalmente a perda de memória de procedimento. A redução da atividade dopaminérgica no estriado e no lobo frontal na DP pode provocar prejuízo na memória operacional (DAVILA et al, 2003; STEBBINS et al., 1999).

Nos resultados do presente estudo, optou-se por utilizar o RID, que avalia a relação entre a segunda com a primeira exposição. Observou-se que os animais tratados com 6-OHDA e pré-tratados com veículo apresentaram relação entre os tempos de exploração estatisticamente maior do grupo SHAM pré-tratado com veículo. Este resultado sugere que os animais com lesão dos

neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal apresentam um prejuízo na memória de curta duração.

Também houve diferença significativa quando comparados os tempos de exploração da segunda exposição dos animais do grupo tratado com 6-OHDA e pré-tratados com veículo e os 6-OHDA pré-tratados com as três doses de *Hypericum perforatum*. Isto indica que os animais se lembravam do rato jovem na segunda exposição e, por isso, passavam menos tempo investigando-o.

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Prediger e colaboradores, onde pode se observar que a administração de etanol em diferentes doses causa uma redução significativa no tempo de investigação quando o mesmo rato jovem foi apresentando duas vezes, num intervalo de 30 minutos, enquanto que quando ratos diferentes foram apresentados na segunda exposição, o tempo de investigação foi maior e semelhante ao tempo da primeira apresentação (PREDIGER et al., 2003).

Quando um rato diferente foi apresentado o RID foi semelhante para todos os grupos. Porém, a relação entre os tempos de exploração foi significativamente maior no grupo SHAM pré-tratado com 200 mg/kg do extrato, quando comparado com o grupo SHAM pré-tratado com veículo. Esse fato é de difícil interpretação, sendo que o esperado seriam RIDS semelhantes nos grupos SHAM, visto que esses animais não são submetidos a lesão, nem deveriam ter a memória olfativa de curta duração prejudicada.

Os demais grupos lesados com 6-OHDA pré-tratados com *Hypericum perforatum* nas três doses, não apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos das duas apresentações.

De acordo com o observado nesse teste, no presente estudo, propõe-se que o pré-tratamento com *Hypericum perforatum* promove menor prejuízo de memória olfativa de curta duração no modelo animal de doença de Parkinson. Este efeito pode ter relação com a possível potencial neuroprotetor ou pode ocorrer devido ao efeito nootrópico do *Hypericum perforatum*, melhorando a memória dos animais.

Outro sintoma comum em pacientes com DP é o distúrbio olfativo. Vários trabalhos relatam déficits de função olfatória na DP em humanos e estes foram descritos na identificação, detecção, reconhecimento e discriminação de

odores (DOTY et al., 1988; MESHOLAM et al., 1998; TISSINGH et al., 2001; DOTY, 2007).

Para avaliar essa possível perda da capacidade olfativa em modelos animais, utiliza-se o teste de discriminação olfativa. Esse teste apresenta como finalidade observar possíveis alterações olfatórias nos animais lesados com diferentes toxinas, sendo que os mesmos podem apresentar dificuldade na distinção de odores. No presente trabalho, a toxina em análise foi a 6-OHDA injetada bilateralmente. Para testar os animais após a cirurgia, foram utilizados sepilho familiar, proveniente da caixa moradia e sepilho não familiar (inodoro), onde foram comparados os tempos em que o animal permaneceu em contato com cada sepilho. Ratos saudáveis tendem a reconhecer seu cheiro e permanecer mais tempo no lado da caixa que contém o sepilho familiar.

Em estudos prévios, a administração de toxinas como a reserpina e o MPTP intranasal causaram perda de neurônios dopaminérgicos no bulbo olfatório, levando o animal a perder a sensibilidade olfativa. Assim, ele não consegue distinguir odores e passa a investigar os dois compartimentos da caixa de discriminação de maneira semelhante (CARR, et al, 1976; PREDIGER et al, 2005a, b).

De acordo com os resultados observados utilizando o tratamento com 6-OHDA, não houve diferença estatística entre os grupos no tempo de permanência no sepilho não familiar, nem no tempo de permanência no sepilho familiar. Porém de acordo com os tempos médios de permanência nos sepilhos, os animais apresentaram uma tendência a permanecer no sepilho não familiar. Como esse comportamento foi observado em todos os grupos, provavelmente essa preferência pelo sepilho não familiar não está relacionada com a perda de neurônios dopaminérgicos nem com o pré-tratamento com *Hypericum perforatum*.

Aparentemente, a 6-OHDA não gera danos no bulbo olfatório dos animais e eles permanecem com a capacidade de distinguir odores, diferindo de modelos animais da DP induzidos por outras toxinas. De acordo com outros estudos utilizando a 6-OHDA como toxina lesiva a neurônios dopaminérgicos de ratos, não foram detectados prejuízos na discriminação olfatória (FERNANDEZ-RUIZ et al., 1993; TADAIESKY et al., 2008).

Essas diferenças entre os modelos animais de DP utilizando toxinas diferentes podem ocorrer pelos distintos níveis de lesão ou depleção dopaminérgica, promovidos por cada modelo.

Para avaliar o comportamento motor dos animais foi realizado o teste de campo aberto. Esse teste leva em consideração o número de quadrantes cruzados, o número de levantadas, o número de auto-limpezas e o número de bolos fecais liberados pelos animais durante os 5 minutos de permanência dentro da caixa. Esse teste também é frequentemente utilizado como uma forma de avaliar ansiedade nos animais, de modo que animais ansiosos tendem a permanecer parados, preferindo os cantos da caixa, com menor número de levantadas, maior número de auto-limpezas e bolos fecais (indicativos de ansiedade). No presente estudo, somente o comportamento motor dos animais foi observado através desse teste.

A literatura evidencia que o aparecimento e a intensidade dos déficits motores, em modelos animais, é 6-OHDA dose dependente (DÍAZ et al., 2001). Truong e colaboradores realizaram infusão de 6-OHDA unilateralmente no FPM nas doses de 4, 8 e 16 µg, evidenciando nas maiores doses administradas existe maior probabilidade de desenvolvimento de problemas motores.

De acordo com estudos prévios, sabe-se que modelos animais de doença de Parkinson induzidos por toxinas mimetizam a DP em vários estágios, de acordo com a toxina utilizada. O MPTP é mais utilizado quando se deseja representar um modelo inicial da doença, pois é menos lesivo. Já os modelos utilizando 6-OHDA são semelhantes a um quadro avançado da doença de Parkinson em humanos, com grande perda neuronal em ambos os hemisférios cerebrais, podendo causar depleção total de neurônios dopaminérgicos e causando os sintomas característicos da doença (FERRO et al, 2005).

No presente estudo, o pré-tratamento com as três doses de *Hypericum perforatum* não causa problemas motores nos animais. Porém o tratamento com 6-OHDA leva a um comprometimento motor, sem que o mesmo seja revertido com o pré-tratamento. Isso pode ser observado através do número de quadrantes cruzados e número de levantas do rato.

Esses resultados sugerem que o extrato *Hypericum perforatum* não parece reverter, nem melhorar os sintomas motores decorrentes da injeção

intracerebral de 6-OHDA. Por esse motivo, seria interessante utilizar o *Hypericum perforatum* como adjuvante no tratamento da DP, associado a fármacos que melhoram os sintomas motores, associando assim uma melhora cognitiva e motora do paciente.

Finalmente, para fundamentar os resultados obtidos nos testes comportamentais, foi realizada a imunodeteção de proteínas, através da técnica do Wester Blot, no intuito de avaliar a expressão da enzima Tirosina Hidroxilase (TH) nos estriados dos animais que sofreram lesão bilateral com 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. A TH é a enzima limitante na síntese de catecolaminas e, por esta razão, utilizada como um marcador de neurônios dopaminérgicos.

O modelo de injeção bilateral da 6-OHDA no cérebro do animal é extremamente utilizado para mimetizar o que ocorre no cérebro humano com Doença de Parkinson, sendo que a doença acomete ambos os lados do cérebro, causando a morte neuronal. Além disso, na administração bilateral não ocorre compensação do lado intacto em relação ao lado afetado. Vários estudos demonstram que a administração de 6-OHDA no cérebro de animais leva a morte neuronal e consequente redução da expressão da TH em estriado e substância negra, gerando sintomas semelhantes aos sintomas que acometem humanos, como os clássicos sintomas motores (VAN OOSTEN & COOLS, 1999, ILIJIC; GUZMAN; SURMEIER, 2011).

Outra vantagem do uso da administração bilateral está na possibilidade de avaliar a função cognitiva dos animais, através de testes comportamentais que avaliam depressão, perda de memória e função olfativa.

A administração de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial, sem tratamento com a planta, reduziu para em torno de 40% a quantidade da expressão de TH no estriado quando comparados ao grupo SHAM tratado com veículo.

Os animais lesados com 6-OHDA e tratados com 200 e 400mg/kg de *Hypericum perforatum* apresentaram em torno de 70% e 60% de reatividade dos neurônios a TH, respectivamente, em relação ao controle. Esses resultados demonstram que houve menor perda neuronal nesses animais. Já a dose de 100mg/Kg não conseguiu promover este efeito neuroprotetor.

Outros estudos avaliando diversos fármacos como neuroprotetores em modelos da DP obtiveram resultados semelhantes no Western Blot. Lee e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento de ratos lesados com 6-OHDA e tratados com Rosiglitazona aumentaram a expressão da TH em neurônios quando comparados ao controle. Zang e colaboradores (2012) observaram que a administração de albumina humana em ratos com lesão por 6-OHDA protege os neurônios dopaminérgicos, aumentando a reatividade de TH quando comparados ao grupo controle.

Com base nesses resultados, pode-se dizer que o *Hypericum perforatum* pode apresentar potencial neuroprotetor nas concentrações de 200 e 400mg/kg em animais com lesão por 6-OHDA. Esse dado precisa ser mais estudado, uma vez que não foram realizadas análises para quantificar os mediadores inflamatórios e as espécies reativas de oxigênio, envolvidas no processo de neurodegeneração. A dosagem de dopamina e seus metabólitos no estriado também pode ser útil para evidenciar a possível proteção dos neurônios dopaminérgicos.

Além disso, foi observado que o *Hypericum perforatum* na dose de 100 mg/Kg foi efetivo na reversão do comportamento rotatório, teste de preferência à sacarose e teste de natação forçada, mas não aumentou a expressão de TH no estriado.

5. CONCLUSÕES

Em conclusão, todos esses resultados associados sugerem que o principal efeito do *Hypericum perforatum* é impedir/reduzir os sintomas cognitivos, principalmente a depressão, que é bastante comum na DP. Esse efeito antidepressivo se deve tanto à ação de inibição da recaptação de catecolaminas característica da planta, assim como pode ter relação com uma possível neuroproteção, observada pela redução do número de rotações contralaterais a lesão unilateral de 6-OHDA, bem como pelo aumento na expressão da enzima TH com doses mais elevadas do extrato.

REFERÊNCIAS

BARRIO, J.R.; HUANG, S.C.; PHELPS, M.E. Biological imaging and molecular basis of dopaminergic disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 341–348, 1997.

BECKER, G.; MULLER, A.; BRAUNE, S.; BUTTNER, T.; BENECKE, R.; GREULICH, W.; KLEIN, W.; MARK, G.; RIEKE, J.; THUMLER, R. Early diagnosis of Parkinson's disease. **Journal of Neurology** v. 249, p. 40-48, 2002.

BEERHUES L. Hyperforin. **Phytochemistry**, 2006.

BENEDI, J.; ARROYO R.; ROMERO C.; MARTÍN-ARAGÓN S.; VILLAR A. M. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. **Life Sciences** v.75, n.10, p.1263-76. 2004.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays** v. 24, p. 308-318, 2002.

BEZARD, E; DOVERO, S; PRUNIER, C; RAVENSCROFT, P; CHALON, S; GUILLOTEAU, D; CROSSMAN, AR; BIOULAC, B; BROTCHE, JM; GROSS, CE. Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1- methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience** v. 21, p. 6853. 6861, 2001.

BIFFIGNANDI, P.M.; BILIA, A.R. The growing knowledge of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) drug interactions and their clinical significance. **Current Therapeutic Research**, v. 61, n 7, p. 389-394, 2000.

BILIA, A.R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. St. John`s wort and depression. Efficacy, safety and tolerability-an update. **Life Sciences**, v. 70, p. 3077-3096, 2002.

BIRT, D. F.; WIDRLECHNER M. P.; HAMMER K. D.; HILLWIG M. L.; WEI J.; KRAUS G. A.; MURPHY P. A.; MCCOY J.; WURTELE E. S.; NEIGHBORS J. D.; WIEMER D. F.; MAURY W. J.; PRICE J. P. Hypericum in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. **Pharmaceutical Biology** v.47, n.8, p.774-782. 2009.

BLANDINI, F.; NAPPI G.; TASSORELLI C.; MARTIGNONI E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology** v.62, n.1, p.63-88. 2000.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M. F.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson´s disease. **Progress in Neurobiology** v. 65, p. 135-172, 2001.

BOKA, G.; ANGLADE P.; WALLACH D.; JAVOY-AGID F.; AGID Y.; HIRSCH E.C. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** v.172, n.1-2, p.151-4. 1994.

BOVE, J.; SERRATS J.; MENGOD G.; CORTÉS R.; TOLOSA E.; MARIN C. Neuroprotection induced by the adenosine A2A antagonist CSC in the 6-OHDA rat model of parkinsonism: effect on the activity of striatal output pathways. **Experimental Brain Research**, v.165, n.3, p.362-74. 2005.

BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RUB U, BRATZEK H, DEL TREDICI K. Stages in the development of Parkinson´s disease-related pathology. **Cell and Tissue Research** v. 318, p.121-134, 2004.

BORSINI, F; MELI, A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v. 94, p. 147-61.

BURCH D., SHEERIN F. Parkinson's disease. **Lancet** v. 365, p. 622-627, 2005.

CAMARGO A. C. R.; CÓPIO F. C. Q.; SOUSA T. R. R.; GOULART F. O impacto da Doença de Parkinson na qualidade de vida: uma revisão de literatura. *Revista Brasileira de Fisioterapia*. v. 8, p. 267-272, 2004.

CARBON, M.; MARIE, R.M. Functional imaging of cognition in Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology** v.16, p. 475-480, 2003.

CARR, W.J.; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **Journal of Comparative & Physiological Psychology** v. 90, p. 821–828, 1976.

CASS, H. St. John's wort as an herbal treatment for depression and general considerations for the use of herbs in mental health. **Seminars in Integrative Medicine**, v. 1, n. 4, p. 191-198, 2003.

ÇIRAK, C.; SAGLAM, B.; AYAN, A.K.; KEVSEROGLU, K. Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 1-13, 2006.

COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A.; KOZAI, T. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. **Plant Science**, v. 170, p. 128-134, 2006.

CRAFT, T. K.; DEVRIES A.C. Role of IL-1 in poststroke depressive-like behavior in mice. **Biological Psychiatry** v.60, n.8, p.812-8. 2006.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI S.; FERRO M. M.; MARTINEZ G. R.; VITAL M. A. B. F.; HIPÓLIDE D.; TUFIK S.; CANTERAS N. S. Hemiparkinsonian rats

rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioural Brain Research** v.189, n.2, p.364-72. 2008.

DA CUNHA, C.; GEVAERD M. S.; VITAL M. A. B. F.; MIYOSHI E.; ANDREATINI R.; SILVEIRA R.; TAKAHASHI R. N.; CANTERAS N. S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. **Behavioural Brain Research** v.124, n.1, p.9-18. 2001.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI E. C.; DOMBROWSK P.; BORTOLANZA M.; SANTOSA L. M.; BOSCHENA S. L.; MIYOSHI E. Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. **Behavioural Brain Research** v.199, n.1, p.157-70. 2009.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI S.; WIETZIKOSKI E.; SILVA M.H.C.; CHANDLER J.; FERRO M. M.; ANDREATINA R.; CANTERAS N. S. Pre-training to find a hidden platform in the Morris water maze can compensate for a deficit to find a cued platform in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Learning and Memory** v.87, n.4, p.451-63, 2007.

DANTZER, R.; BLUTHE R. M.; KOOB G. F.; MOAL M. Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)** v.91, n.3, p.363-8. 1987.

DAUDT, R. *et al.* Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from south Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 344-346, 2000.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron** v. 39, p. 889-909, 2003.

DAVILA, N.G.; BLAKEMORE, L.J.; TROMBLEY, P.Q. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. **Journal of Neurophysiology**, v. 90, p. 395–404, 2003.

DEUMENS, R; BLOKLAND, A; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway **Experimental Neurology**, v.175, p. 303–317, 2002.

DÍAZ, M.R.; ABDALA, P.; BARROSO-CHINEA, P.; OBESO, J.; GONZÁLEZHERNÁNDEZ, T. Motor behavioural changes after intracerebro ventricular injection of 6- hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 122, p. 79-92, 2001.

DOTY, R. L.; DEEMS, D. A. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1237-44, 1988.

DOTY, R.L.; STERN, M.B.; PFEIFFER, C.; GOLLOMP, S.M.; HURTIG, H.I. Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. **The Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 55, p. 138-142, 1992.

DOTY, R.L.; BROMLEY, S.M.; STERN, M. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. **Neurodegeneration**, v. 4, p. 93–97, 1995.

DOTY, R. L. Olfaction in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 13 Suppl 3, p. S225-8, 2007.

DUBOIS, B.; PILLON B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of Neurology** v.244, n.1, p.2-8. 1997.

DUVOISIN, R.C. (ed). **Parkinson's disease**. Third Edition. Raven Press, New York, 1991.

EL-SHERBINY, D. A.; KHALIFA A. E.; ATTIA A.S.; ELDENSHARY E. D. Hypericum perforatum extract demonstrates antioxidant properties against

elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. **Pharmacology, Biochemistry, Behavior** v.76, n.3-4, Dec, p.525-33. 2003.

EMBORG, M.E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods** v. 139, p. 121-143, 2004.

EMERIT J., EDEAS M., BRICAIRE F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 58, p. 39-46, 2003.

FERRO, M. M.; BELLISSIMO M. Y.; ANSELMO-FRANCI J. A.; ANGELLUCCI M. E. M.; CANTERAS N. S.; DA CUNHA C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of Neuroscience Methods** v.148, n.1, p.78-87. 2005.

FERNANDEZ-RUIZ, J.; MIRANDA, M. I. et al. Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. **Behavioral and Neural Biology**, v. 60, n. 3, p. 189-91, 1993.

FUKAE, J.; MIZUNO Y.; HATTORI N. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Mitochondrion** v.7, n.1-2, p.58-62. 2007.

FUKUZAKI, K.; KAMENOSONO T.; NAGATA R. Effects of ropinirole on various parkinsonian models in mice, rats, and cynomolgus monkeys. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** v.65, n.3, p.503-8. 2000.

GAMBARANA, C. et al. Efficacy of na *Hypericum perforatum* (St. John`s wort) extract in preventing and reverting a condition of escape deficit in rats. **Neuropsychopharmacology**, v. 21, p. 247-257, 1999.

GELB D.J., OLIVER E., GILMAN S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. **Archives of Neurology** v. 56, p. 33-39, 1999.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission** v. 103, p. 987–1041, 1996.

GRAHN, J. A.; PARKINSON J. A.; OWEN O. M. The role of the basal ganglia in learning and memory: neuropsychological studies. **Behavioural Brain Research** v.199, n.1, p.53-60. 2009.

GREGORIO, M. L., E. C. WIETZIKOSKI, FERRO M. M.; SILVEIRA J. L.; VITAL M. A.; DA CUNHA C. Nicotine induces sensitization of turning behavior in 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Neurotoxicity Research** v.15, n.4, p.359-66. 2009.

GREESON, J.M.; SANFORD, B.; MONTI, D.A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 402-414, 2001.

GRIFFING, M.G.; TAYLOR, G.T. Norepinephrine modulation of social memory: evidence for a time-dependent functional recovery of behavior. **Behavioral Neuroscience** v. 109, p. 466–473, 1995.

HALD, A.; LOTHARIUS J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? **Experimental Neurology** v.193, n.2, p.279-90, 2005.

HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; DANIEL, S.E. Is Parkinson's disease a primary olfactory disorder? **Quarterly Journal of Medicine** v.92, p. 473-480, 1999.

HEIKKILA, R. E.; SHAPIRO B. S.; DUVOISIN R. C. The relationship between loss of dopamine nerve terminals, striatal [3H]spiroperidol binding and rotational behavior in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Brain Research** v.211, n.2, p.285-92. 1981.

HIRSCH, E. C.; HUNOT S.; HARTMANN. A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders** v. 11, p.S9-S15. 2005.

HUANG N.; RIZSHSKY L.; HAUCK C.; NIKOLAU B. J.; MURPHY P. A.; BIRT D. F Identification of anti-inflammatory constituents in *Hypericum perforatum* and *Hypericum gentianoides* extracts using RAW 264.7 mouse macrophages, **Phytochemistry** v. 72, p. 2015–2023, 2011.

HUDSON JL, VAN HORNE CG, STRÖMBERG I, BROCK S, CLAYTON J, MASSERANO J, HOFFER BJ, GERHARDT GA. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Research** v. 626, p. 167-74, 1993.

HUNOT, S.; DUGAS N.; FAUCHEUX B.; HARTMANN A.; TARDIEU M.; DEBRÉ P.; AGID Y.; DUGAS B.; HIRSCH E.C. FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. **The Journal of Neuroscience** v.19, n.9, p.3440-7. 1999.

HUNTER, R. L.; DRAGICEVIC N.; SEIFERT K.; CHOI D. Y.; LIU M.; KIM K. C.; CASS W. A.; SULLIVAN P. G.; BING G. Inflammation induces mitochondrial dysfunction and dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal system. **Journal of Neurochemistry** v.100, n.5, p.1375-86. 2007.

ILIJIC E.; GUZMAN J. N.; SURMEIER D. J. The L-type channel antagonist isradipine is neuroprotective in a mouse model of Parkinson's disease *Neurobiology of Disease*, v. 43, p. 364–371, 2011.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Editora Artmed, Porto Alegre, 2002.

JENNER, P; OLANOW, CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, n. 3, p. S161-S170, 1996.

KOO H-J., LEE H-J., IM H. Sequence determinants regulating fibrillation of human α -synuclein. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 368, p. 772-778, 2008.

KOKOSZKA, J. E., COSKUN P., ESPOSITO L.A., WALLACE D.C. Increased mitochondrial oxidative stress in the SOD2 (+/-) mouse results in the age related mitochondrial function. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America** v. 98, p. 2278-2283, 2001.

KRAUS, B.; WOLFF H.; HEILMANN J.; ELSTNER E. F. Influence of Hypericum perforatum extract and its single compounds on amyloid-beta mediated toxicity in microglial cells. **Life Sciences** v.81, n.11, p.884-94. 2007.

KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I.; WRONSKA A.; KOHUTNICKA M.; CZŁONKOWSKI A.; CZŁONKOWSKA A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. **Experimental Neurology** v.156, n.1, p.50-61, 1999.

LANG, A.; LOZANO M. A. Parkinson's disease. First of two parts. **New England Journal of Medicine** v.339, n.15, p.1044-53. 1998.

LANGSTON, J.W. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. **Neurology**, suppl 3, v. 47, p. S153-S160, 1996.

LEE E. Y.; LEE J. E.; PARK J. K.; SHIN I. C.; KOH H. C. Rosiglitazone, a PPAR- agonist, protects against striatal dopaminergic neurodegeneration induced by 6-OHDA lesions in the substantia nigra of rats. **Toxicology Letters** v. 213 p. 332–344, 2012.

LETTY, S.; CHILD, R.; DUMUIS, A.; PANTALONI, A.; BOCKAERT, J.; RONDOUIN, G. 5-HT₄ receptors improve social olfactory memory in the rat. **Neuropharmacology** v.36, p. 681–687, 1997.

LEVY, A. & FERREIRA, J. **Doença de Parkinson - Manual Prático**. Lisboa: Lidel, 2003.

LIEBERMAN, A. Depression In Parkinson's Disease -- a Review. **Acta Neurologica Scandinavica** v.113, n.1, p.1-8. 2006.

LIMA M. M. S.; ANDERSEN M. L.; REKSIDLER A.B.; VITAL M. A. B. F.; TUFIK S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats, **Plos One**, Issue 6 e.513, 2007.

LIMONGI, J.C.P. Neuroproteção. In: MENESES, M.S.; TEIVE, H.A.G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 176-181, 2003.

LINDE, K.; BERNER M. M.; KRISTON L. St John's wort for major depression. **Cochrane Database Systematic Reviews** n.4, p.CD000448. 2008.

LINDE, K.; KNUPPEL, L. Large-scale observational studies of *hypericum* extracts in patients with depressive disorders-a systematic review. **Phytomedicine**, v. 12, p. 148-157, 2005.

LINDE, K.; MULROW C. D.; BERNER M.; EGGER M. St John's wort for depression. **Cochrane Database Systematic Reviews** n.2, p.CD000448. 2005.

LINDE, K.; RAMIREZ G.; MULROW C.D.; PAULS A.; WEIDENHAMMER W.; MELCHART D. St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. **BMJ** v.313, n.7052, p.253-8. 1996.

LINDNER, M.D.; CAIN, C.K.; PLONE, M.A.; FRYDEL, B.R.; BLANEY, T.J.; EMERICH, D.F.; HOANE, M.R. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. **Behavior Brain Research** v. 102, p. 1-16, 1999.

MARIÉ, R.M.; BARRÉ, L.; DUPUY, B.; VIADER, F.; DEFER, G.; BARON, J.C. Relationships between striatal dopamine denervation and frontal executive tests in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** v. 260, p. 77-80, 1999.

MCGEER, P. L.; MCGEER E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders** v.10, p.S3-7. 2004.

MENEZES, M. S.; TEIVE, H. A. G. **Doença de Parkinson**. Rio de Janeiro: ed. Guanabara Koogan, 2003.

MENNINI, T.; GOBBI, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. **Life Sciences**, v. 75, p. 1021-1027, 2004.

MESHOLAM, R.I.; MOBERG, P.J.; MAHR, R.N.; DOTY, R.L. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Archives of Neurology** v. 55 p. 84-90, 1998.

MIYASAKI JM, SHANNON K, VOON V, RAVINA B, KLEINER-FISMAN G, ANDERSON K, et al. Practice Parameter: Evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson disease (an evidence-based review): Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**. v.66, p. 996-1002, 2006.

MILLER, R. L.; JAMES-KRACKE M.; SUN G. Y; SUN A. Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochemical Research** v.34, n.1, p.55-65. 2009.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI S.; CAMPLESSEI M.; SILVEIRA R.; TAKAHASHI R. N; DA CUNHA C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin** v.58, n.1, p.41-7. 2002.

MOCHIZUKI, H; GOTO, K; MORI, H; MIZUNO, Y. Histochemical detection of

apoptosis in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Science** v. 137, n. 2, p. 120-123, 1996.

MOSLEY, R. L.; BENNER E. J.; KADIU I.; TOMAS M.; BOSKA M. D.; HASAN K.; LAURIE C.; GENDELMAN H. E. Neuroinflammation, Oxidative Stress and the Pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical Neuroscience Research** v.6, n.5, p.261-281. 2006.

NORMAN S, TROSTER AI, FIELDS JA, BROOKS R. Effects of depression and Parkinson's disease on cognitive functioning. **Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences** v. 12, p. 31-36, 2002.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; RODRÍGUEZ, M.; LANCIEGO, J. L.; ARTIEDA, J.; GONZALO, N.; OLANOW, C. W. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences** v. 23, p. s8-s19, 2000.

OKUN M. S.; WATTS R. L. Depression associated with Parkinson's disease: clinical features and treatment. **Neurology**. v. 58, p. S63-70, 2002.

ONU - Organização das Nações Unidas, 2012.

PAPP, M; WILLNER, P. Rapid onset of antidepressant action in an animal model of depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 6, p. S4. 1996.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2005.

PETERSON, G.L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. **Analytical Biochemistry** v. 83, p. 346-356, 1977.

POPOVICH, P.G.; GUAN, Z.; WEI, P.; HUITINGA, I.; VAN ROOIJEN, N.; STOKES, B. T. Depletion of Hematogenous Macrophages Promotes Partial

Hindlimb Recovery and Neuroanatomical Repair after Experimental Spinal Cord Injury. **Experimental Neurology** v. 158, p. 351-365, 1999.

POPOVICH, P.G; GUAN, Z.; MCGAUGHY, V.; FISHER, L.; HICKEY, W.F.; BASSO, D.M. The Neuropathological and Behavioral Consequences of Intraspinal Microglia/Macrophage Activation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* v. 61, p. 623-633, 2001.

POPOVSKA A, PETROVA V, TANOSKA N, VASKOV T. Depressive symptoms in patients with parkinson's disease. **Journal of Neurological Sciences** v. 150, p. s113-114, 1997.

PORSOLT, R. D.; ANTON G. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology** v.47, n.4, p.379-91. 1978.

PREDIGER, R. D.; BATISTA L. C.; MEDEIROS R.; PANDOLFO P.; FLORIO J.; TAKAHASHI R. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology** v.202, n.2, p.391-403. 2006.

PREDIGER, R. D.; TAKAHASHI R. N. Ethanol improves short-term social memory in rats. Involvement of opioid and muscarinic receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.462, n.1-3, p.115-23. 2003.

PREDIGER, R.D., BATISTA, L.C., MIYOSHI, E., TAKAHASHI, R.N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behaviour Brain Research**, v. 153, p. 149-57, 2004.

PREDIGER, R. D.; DA CUNHA C.; TAKAHASHI R. N. Antagonistic interaction between adenosine A2A and dopamine D2 receptors modulates the social recognition memory in reserpine-treated rats. **Behavioural Pharmacology**, v.16, n.4, p.209-18. 2005.

PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; TAKAHASHI, R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiology of Aging** v. 26, p. 957-964, 2005a.

PREDIGER, R.D.S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behavioural Brain Research** v. 159, p.197-205, 2005b.

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

RASCOL O, BROOKS DJ, KORCZYN AD, et al. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. **The New England Journal of Medicine**. v. 342, p. 1484-1491, 2000.

REKSIDLER A. B.; LIMA M. M. S.; DOMBROWSKI P.; BARNABÉ G. F.; ANDERSEN M. L.; TUFIK S.; *et al.* Distinct effects of intranigral L-DOPA Infusion in the MPTP rat model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission-Supplement** v. 73, p. 259–68, 2009.

REIJNDERS, J. S.; EHRT U.; WIM E.J.; AARSLAND D.; LEENTJENS A. F. G. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. **Movement Disorders** v.23, n.2, p.183-9, 2008.

RODRÍGUEZ, M.; BARROSO-CHINEA, P.; ABDALA, P.; OBESO, J.; GONZÁLES-HERNÁNDEZ, T. Dopamine cell degeneration induced by intraventricular administration of 6-hidroxydopamine in rat: similarities with cell loss in Parkinson's Disease. **Expimental Neurology** v. 169, p. 163-181, 2001.

RODRÍGUEZ-LANDA, J.F.; CONTRERAS, C.M. A review of clinical and experimental observations about antidepressant actions and effects produced by *Hypericum perforatum*. **Phytomedicine** v. 10, p. 68-699, 2003.

SANTIAGO R. M.; BARBIEIRO J.; LIMA M. M. S.; DOMBROWSKI P. A.; ANDREATINI R.; VITAL M. A. B. S. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v.34, p. 1104–1114, 2010.

SCHNEIDER, M. B.; MURRIN L. C.; PFEIFFER R. F.; DEUPREE J. D. Dopamine receptors: effects of chronic L-dopa and bromocriptine treatment in an animal model of Parkinson's disease. **Clinical Neuropharmacology** v.7, n.3, p.247-57. 1984.

SCHÖBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and Tissue Research** v.318, n.1, p.215-24. 2004.

SCHRAG A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease: an update. **Journal of Neurology** v.251, p.795–804, 2004.

SHAPIRA, A.H.V.; BEZARD, E.; BROTHIE, J.; CALON, F.; COLLINGRIDGE, G.L.; FERGER, B.; HENGERER, B.; HIRSCH, E.; JENNER, P.; Le NOVÈRE, N.; OBESO, J.A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; SPAMPINATO, U.; DAVIDAI, G. Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. **Nature Reviews** v. 5, p. 845-854, 2006.

SHIM J.S, KIM H. G, JU M. S, CHOI J. C, JEONG S. Y, OH M. S. Effects of the herb of *Uncaria rhynchophylla* on neurotoxicity in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology** v. 126, p. 361–365, 2009.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, p. 360-365, 2003.

SHULMAN L.M.; TABACK R.L.; RABINSTEIN A.A.; WEINER W.J. Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinson & Related Disorders** v.8, p. 193-197, 2002.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Progress In Neurobiology** v.49, n.3, p.215-66. 1996.

SILBERMAN C. D.; LAKS J.; RODRIGUES C. S.; ENGELHARDT E. Uma revisão sobre depressão como fator de risco na Doença de Parkinson e seu impacto na cognição. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**. v. 26, p. 52-60, 2004.

SINGH, N.; PILLAY V.; CHOONARA Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress In Neurobiology** v.81, n.1, p.29-44. 2007.

SKALISZ, LL; BEIJAMINI, V; JOCA, SL; VITAL, MABF; DA CUNHA, C; ANDREATINI, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as na animal model of depression-Parkinson.s disease association. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v. 26, p. 879-883, 2002.

SKALISZ, L. L.; BEIJAMINI V.; ANDREATINI R. Effect of Hypericum perforatum on marble-burying by mice. **Phytotherapy Research** v.18, n.5, p.399-402. 2004.

SLATTERY, D. A.; MARKOU A.; CRYAN J. F. Evaluation of reward processes in an animal model of depression. **Psychopharmacology** v.190, n.4, p.555-68. 2007.

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behavioural Processes** v. 17, p. 181-90, 1988.

SPILLANTINI, MG; SCHMIDT, ML; LEE, VM; TROJANOWSKI, JQ; JAKES, R; GOEDERT, M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, p. 839-840, 1997

STEBBINS, G.T.; GABRIELI, J.D.E.; MASCHIARI, F.; MONTI, L.; GOETZ, C.G. Delayed recognition memory in Parkinson's disease: a role for working memory? **Neuropsychology** v. 37, p. 503-510, 1999.

STERU, L; CHERNAT, R; THIEERY, B *et al.* **Psychopharmacology**, v. 85, p. 367- 370. 1985.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences** v.30, n.5, p.244-50. 2007.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI P. A.; FIGUEIREDO C. P.; CARGNIN-FERREIRA E.; DA CUNHA C.; TAKAHASHI R. N. Emotional, Cognitive and Neurochemical Alterations in a Premotor Stage Model of Parkinson's Disease. **Neuroscience** v.156, n.4, p.830-840. 2008a.

TISSINGH, G.; BERENDSE, H.W.; BERGMANS, P.; DEWAARD, R.; DRUKARCH, B.; STOOF, J.C; WOLTERS, E.CH. Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. **Movement Disorders** v. 16 , p. 41-46, 2001.

TOLOSA, E.; GAIG C.; SANTAMARÍA J.; COMPTA Y. Diagnosis and the premotor phase of Parkinson disease. **Neurology** v.72, n.7, p. S12-20. 2009.

TROFIMIUK, E.; BRASZKO J. J. Alleviation by Hypericum perforatum of the stress-induced impairment of spatial working memory in rats. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology** v.376, n.6, p.463-71. 2008.

TROFIMIUK, E.; WALESIUKE A.; BRASZKO J. J. St John's wort (*Hypericum perforatum*) diminishes cognitive impairment caused by the chronic restraint stress in rats. **Pharmacological Research** v.51, n.3, p.239-46. 2005.

TROSTER A, STALP L, PAOLO A, FIELDS J, WILLIAM K. Neuropsychological Impairment in Parkinson's Disease With and Without Depression. **Archives of Neurology** v. 52, p. 1164-1169, 1995.

TRUONG, L.; ALLBUTT, H.; KASSIOU, M.; HENDERSON, J.M. A study of behaviour in rats with graded 6-OHDA lesions. **Behavioural Brain Research**, v.169, p. 1-9, 2006.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Research** v. 24, p. 485-493, 1970.

VAN OOSTEN, R.V; COOLS, A.R. Functional updating of the bilateral 6-OHDA rat model for Parkinson's disease. **Society for Neuroscience** v. 25, p. 1599, 1999.

WEINER W. J. Initial Treatment of Parkinson Disease: levodopa or dopamine agonists. **Archives of Neurology** v. 61: 1966-9, 2004.

WERSINGER, C.; SIDHU E. A. An inflammatory pathomechanism for Parkinson's disease? **Current Medicinal Chemistry** v.13, n.5, p.591-602. 2006.

YOUDIM, MB; RIEDERER, P. Understanding Parkinson's disease. **Scientific American** v. 276, p. 52-59, 1997.

YUAN, H.; SARRE S.; EBINGER G.; MICHOTTE Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods** v.144, n.1, p.35-45. 2005.

ZHANG L. J; XUE Y. Q.; YANG C.; YANG W. H.; CHEN L.; ZHANG Q. J.; QU T. Y.; HUANG S.; ZHAO L. R.; WANG X. M.; DUAN W. M. Human Albumin Prevents 6-Hydroxydopamine-Induced Loss of Tyrosine Hydroxylase in In Vitro and In Vivo. **PLoS ONE** v. 7, p. 1-13, 2012.