

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em
modelos experimentais da Doença de Parkinson**

Roberto de Barros Silva

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em
modelos experimentais da Doença de Parkinson**

**Tese de doutorado apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do
Título de Doutor em Ciências área de concentração:
Toxicologia.**

Orientado: Roberto de Barros Silva

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Roberto de Barros

Avaliação do efeito do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em modelos experimentais da Doença de Parkinson. Ribeirão Preto, 2014.

82 p.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Santos, Antonio Cardozo dos.

1. CAPE; 2. Doença de Parkinson (DP); 3. neuroproteção;
4. estresse oxidativo; 5. conexinas; 6. apoptose; 7. mitocôndrias

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Roberto de Barros Silva

Avaliação do efeito do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em modelos experimentais da Doença de Parkinson

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Doutor em Toxicologia

Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Devemos não somente nos defender, mas também nos afirmar, e nos afirmar não somente enquanto identidades, mas enquanto força criativa”.

(Michel Foucault)

Dedicatória

À minha família,

Dedico este trabalho a minha mãe que com seu exemplo de vida, sua luta, seu coração grandioso foi e é meu constante modelo de como ser, verdadeiramente, uma pessoa de princípios e valores. Dedico também por ela me apoiar em tudo, seja pelo forte elo de amor, seja pelos sábios conselhos, seja pela constante presença, conforto e força que me foi e é oferecido em todas as instâncias e fases de minha vida. Dedico a meu pai que, igualmente, mostrou-me com ser uma pessoa de fibra e princípios. Através de sua enorme sabedoria me ensinou e ensina-me a força da humildade, através de seu grande e bom humor ensinou-me e ensina-me, até hoje, a leveza e necessidade de sorrir. Através de seu amor me mostra a transcendência de afetos e oferece apoio e segurança incondicional. Dedico esta tese aos meus irmãos, Juliano de Barros e Marcos José de Barros Silva por me ensinarem como me manter sempre firme em minha estrada olhando-me, feliz, para dentro de mim. Dedico este trabalho as minhas cunhadas Camila e Rose e ao meu sobrinho Fernandinho. As primeiras pelo apoio afetivo que oferecem aos meus irmãos e pelas constantes demonstrações de carinhos, afetos e lembranças que oferecem a esta pessoa que vos escreve agora (risos). Ao segundo, meu sobrinho, eu dedico esta obra por fazer-me lembrar da grandeza e da inocência que a infância pode oferecer e; com isso me ensina que o mundo das categorizações são frias e limitadas e que o verdadeiro caminho é a felicidade de sorrir das pequenas coisas. Sei que este breve trabalho e essas poucas linhas não abarcarão a totalidade, mas tangenciarão a infinita admiração e amor que tenho por todos vocês.

Ao Dr. Daisaku Ikeda, amigos e membros da Soka Gakkai,

Dedico esta tese aos meus amigos da BSGI e SGI-UK que me permitiram, através da apresentação de uma filosofia humanista que eu conseguisse atingir minha revolução humana e; com isso edificasse um caminho de vitória, felicidade e paz, o qual eu concretizo

neste trabalho. Trilhando a estrada de verdadeiro humanismo dedico à vida por me proporcionar constante oportunidades para transformar dificuldades em vitórias e obstáculos em felicidade.

Aos meus estimados amigos/irmãos: Rodrigo Metzker Ribeiro, Willys Tristão, Kairo Ochoa, Renata Farche, Flávia Meziara, Claudio Yamaji, Mariana Aguiar, Célia Aguiar (mãe da Mariana), Leonardo Santos Ribeiro Pinto e João Zucculotto, Aline Neli,

Dedico este trabalho a vocês que me ajudaram e ajudam constantemente em minha estrada tortuosa, árdua, cansativa, mas, ao mesmo tempo, produtiva, convicta e feliz. Não fosse pela ajuda que vocês me ofereceram, pelo apoio que demandaram eu não teria terminado este trabalho e tão pouco teria conseguido fazer este doutorado. Costumo dizer que nossa racionalidade surge de nossa emoção e, assim sendo, devido a este axioma filosófico, não fosse pelo apoio emocional e conselhos oferecidos por vocês, à minha pessoa, eu não teria realizado decisões que foram e que continuam sendo cruciais à minha vida profissional e pessoal.

Aos meus amigos de laboratório: Nádia Maria Martins, Danilo Sampaio, Laís, Flávio Vasconcelos, Guilherme Emerick, Ana Paula, Ana Maria,

Dedico este trabalho a todos vocês que, além de ajudar-me através da amizade, da compreensão, das conversas científicas e não científicas, ajudaram-me a encontrar soluções onde eu me encontrava perdido. Costumo dizer que, normalmente, em nossas vidas aparecem pessoas que nos apontam um norte e nos ajudam neste caminho. Essas pessoas são manifestações da boa sorte que a vida nos apresenta e, agradeço enormemente a oportunidade de ter trabalhado e formado um elo de amizade e companheirismo com todos vocês.

À Neife Guinaim Ap. dos Santos,

Simplemente dedico este trabalho a ti por toda ajuda e amizade em todas as estâncias e fases deste trabalho e de meu doutorado. Costumo dizer que a gratidão é uma das maiores virtudes humanas. Portanto, muito obrigado e saiba que este trabalho só foi possível graças à sua esmera contribuição e disponibilidade.

Ao Dr. Antonio,

Dedico este trabalho por orientar-me com exímia sabedoria, sapiência, zelo, amizade e notória disponibilidade. Seus ensinamentos fizeram-me compreender, verdadeiramente, o universo científico e possibilitou-me percrustar por uma estrada não apenas científica, mas humana. Sem seu apoio, ajuda e oportunidade este trabalho jamais se realizaria.

A todos meus amigos de Ribeirão Preto,

Dedico este trabalho aos meus inúmeros amigos de Ribeirão Preto. São inúmeros e se eu fosse nomear todos não sobraria espaço e eu poderia cometer injustiças e equívocos ao esquecer de alguém. Neste sentido dedico à todos que direta ou indiretamente ajudaram-me na elaboração deste trabalho.

“Podemos facilmente perdoar uma criança que tem medo do escuro; a real tragédia da vida é quando os homens têm medo da luz.”

(Aristócles/Platão).

À minha família,

Pelo apoio, torcida, ajuda e por tudo que fizeram por mim, sem os quais não teria terminado este trabalho e tão pouco me formado como indivíduo. Pelas lições e laços de amor sem os quais não teria me consolidado, com humildade e princípios humanísticos, minha humanidade.

A todos os funcionários da FCFRP-USP: Seu Antonio, Clóvis, Alessandro (da portaria/segurança), Dona Elvira (Copa), Cidinha (faxina), Rosi, Ana, Rosana, (Secretaria de Pós Graduação),

Pela ajuda em informações, pela educação e gentileza e por promover um ambiente seguro e harmonioso para trabalhar.

Aos meus amigos da vida e de Faculdade: Flávia, Leandro Rosa, Luíza, Danilo Sampaio e sua esposa, Nádia Maria Martins, sua irmã e seu marido, Laís, Flávio Vasconcelos, Guilherme Emerick, Rodrigo Meztker, Willys Tristão, Carolina Marroni, Flávia Meziara, Kairo Ochoa, Aline Neli, Claudio Yamaji, André Paterlini, Renata Farche, Carolina Vanessa e seu esposo Renato, Caio Tatsumi, Pedro Paulo Senna, Mariana Aguiar, Rosileide Pereira, Cássio Prinholato, Aline Roveri, Joice Mendonça, Leonardo Santos Ribeiro Pinto e João Pedro Zucculotto, Maria Aparecida do Amaral (Cida).

Pelos conselhos, conversas profundas e enriquecedoras, compreensão, e por todo sentimento de amizade emanado e externado à minha pessoa, o qual a recíproca é, igualmente, verdadeira. Muito Obrigado amigos, vocês fazem parte integral da minha história de vida.

Aos meus estimados amigos/família: Dona Simone, Andrey, Adalberto, Adriel,

Pela grandiosa amizade e pelo inestimável apoio oferecido à minha pessoa referente ao andamento dessa importante fase de minha vida e referente a inúmeras etapas importantes de minha vida, desde minha chegada à Piracicaba no estado de São Paulo. Muito obrigado pela ajuda, apoio e carinho de vocês. É muito importante, para mim, saber que vocês são a minha segunda família ligadas por laços de afetos. Muito obrigado.

A todos os docentes da FCFRP/USP,

Por me permitirem perscrutar cada vez mais o saber científico e humano, por me proporcionarem diálogos extremamente proveitosos e profícuos, amizade e sábios conselhos. Muito obrigado pela inestimável ajuda, no que tange não apenas ao saber científico, mas aos saberes da subjetividade humana (espírito) oferecendo, dessa forma, um novo olhar, um novo prisma de apreensão e compreensão do mundo em que vivemos.

A todos os docentes e amigos da King's College London

Em especial ao Dr. Peter Jenner, Dra. Sarah Salvage, Dra. Cecilia Page, Dra. Atsuko Hikima, Dr. Bai Zeng, Msc Jae Won por ter-me ajudado a desenvolver uma etapa importantíssima de meu trabalho, por ter-me dado a oportunidade de expandir meus conhecimentos nesta prestigiosa instituição de ensino superior, por todo o apoio conferido a mim, pelos ensinamentos e sobretudo pela atenção disposta a minha pessoa. Muito, muito obrigado mesmo a todos.

A Neife Guinaim dos Santos,

Por ter oferecido uma grandiosa sabedoria, ajuda e amizade. Sem seu esmero em apoiar e ajudar no trabalho seja este na bancada, seja este na redação e sem seus sábios

conselhos em ajudar-nos a desenvolvermos como profissionais e como pessoas, este trabalho não teria saído. Muito Obrigado.

A todos técnicos da FCFRP-USP,

Pela grandiosa ajuda que fizeram para que este trabalho surgisse. Sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido concluir essa tese. Em especial a: Vanessa de Souza por ter-me ajudado nas dosagens de metais, a Angela Kinoshita por ter-me ajudado nas avaliações físicas do composto em estudo e a Célia da FORP-USP do departamento de Fisiologia que me ajudou de forma soberba no procedimento cirúrgico (estereotaxia) para elaboração deste trabalho.

Ao meu orientador,

Pela oportunidade, orientação, amizade, diálogo, incentivo em desenvolver-me cada vez mais e em permitir que eu conseguisse realizar e concluir um sonho o qual sempre tive. Muito obrigado.

RESUMO

RESUMO

Silva, RB. **Avaliação do efeito do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) em modelos experimentais da Doença de Parkinson.** 2014. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A doença de Parkinson (DP) caracteriza-se pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância nigra, o que acarreta diversas disfunções motoras. Não há ainda tratamentos capazes de deter ou retardar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, e os medicamentos hoje empregados na clínica apenas amenizam os sintomas, sem alterar a progressão da DP. No presente estudo foi avaliada a atividade neuroprotetora do éster fenetil do ácido cafeico (CAPE), um componente abundante do própolis de abelhas, com atividade anti-inflamatória, antiviral, antioxidante e imunomodulatória. Estudos têm sugerido seus efeitos benéficos contra as doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson, e alguns mecanismos têm sido propostos; porém muitos dos estudos com CAPE foram feitos apenas em culturas celulares. Este é o primeiro estudo a demonstrar que a administração intraperitoneal do CAPE protege contra a perda neuronal dopaminérgica e a disfunção motora induzidas pela neurotoxina 6-OHDA em ratos, confirmando a capacidade do CAPE de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer seus efeitos benéficos no sistema nervoso central (SNC). Adicionalmente foram empregados dois modelos *in vitro* para o delineamento de possíveis mecanismos de neuroproteção: (i) mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos não tratados e (ii) células SH-SY5Y tratadas com 6-OHDA. Os achados *in vivo* e *in vitro* sugerem o envolvimento dos seguintes mecanismos: (i) atividade antioxidante (sequestro de ERO, neutralização de radicais livres e quelação de metais); (ii) atividade anti-inflamatória (inibição da ativação do NF- κ B, TNF- α , I κ B α e I κ B β); (iii) aumento da expressão da conexina 43; (iv) inibição da Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM); (v) inibição da liberação de citocromo c e (vi) inibição da ativação da caspase-3, executora final da apoptose. Além disso, o estudo também demonstrou que, por si só, o CAPE não interfere nas funções mitocondriais, o que representa uma vantagem com relação a outros inibidores da TPM. Assim, de acordo com nossos achados, o CAPE é um agente neuroprotetor promissor e pode auxiliar em futuras estratégias terapêuticas para as doenças neurodegenerativas, bem como para o melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dessas doenças.

Palavras Chave: CAPE; Doença de Parkinson (DP); neuroproteção; estresse oxidativo; conexinas; apoptose; mitocôndrias

ABSTRACT

ABSTRACT

Silva, RB. **Evaluation of Caffeic Acid Phenethyl Ester effects on experimental of Parkinson's diseases models.** 2014. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Parkinson's disease (PD) is characterized by progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra, which causes various motor dysfunctions. There are no treatments able to delay or stop the degeneration of dopaminergic neurons and the therapy employed nowadays only alleviate the symptoms without altering the progression of PD. In the present study we evaluated the neuroprotective activity of caffeic acid phenethyl ester (CAPE), a compound abundant in honeybees' propolis, with anti-inflammatory, antiviral, antioxidant and immunomodulatory activities. Its beneficial effects against neurodegenerative diseases, including Parkinson's disease, have been suggested and some mechanisms have been proposed; however, many of the studies with CAPE have been performed only in cell cultures. This is the first study to demonstrate that the intraperitoneal administration of CAPE protects against the dopaminergic neuronal loss and the motor dysfunction induced by the neurotoxin 6-OHDA in rats, confirming the ability of CAPE to cross the blood brain barrier and exert its beneficial effects on the central nervous system (CNS). Additionally two *in vitro* models were used to delineate the possible mechanisms of neuroprotection: (i) mitochondria isolated from the brain of non-treated rats and (ii) cells SH-SY5Y treated with 6-OHDA. The *in vivo* and *in vitro* findings suggest the involvement of the following mechanisms: (i) antioxidant activity (scavenger of ROS, free radicals neutralization and metal chelation); (ii) anti-inflammatory activity (inhibition of activation of NF- κ B, TNF- α , I κ B α and I κ B β); (iii) increased expression of connexin-43; (iv) Inhibition of Mitochondrial Permeability Transition (MPT); (v) inhibition of cytochrome c release (vi) inhibition of the activation of caspase-3, the final executioner of apoptosis. Furthermore, the study also showed that CAPE alone does not interfere with mitochondrial functions, which represents an advantage in relation to other inhibitors of MPT. Therefore, according to our findings, CAPE is a promising neuroprotective agent and may be useful for future therapeutic strategies for neurodegenerative diseases, as well as to better understand the mechanisms responsible for the development of these diseases.

Keywords: CAPE; Parkinson's disease (PD); neuroprotection; oxidative stress; connexins; apoptosis; mitochondria

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação simplificada dos circuitos que envolvem os núcleos da base, suas principais projeções e as mudanças na atividade associadas à Doença de Parkinson (DP)	3
Figura 2 - Esquema simplificado ilustrando: Relação existente entre a microgliose reativa (processo neuroinflamatório) e a formação de espécies reativas de oxigênio na morte neuronal dopaminérgica e ação do MPTP na ativação da célula glial e seu efeito após ser oxidado via Monoamina Oxidase B	6
Figura 3 - Esquema ilustrando o desenho experimental do modelo <i>in-vivo</i> da doença de Parkinson induzida pela neurotoxina 6-OHDA em ratos, o tratamento com CAPE e o teste rotacional	18
Figura 4 - Esquema do ensaio de viabilidade celular realizado através da avaliação da atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH).....	22
Figura 5 - Inibição do Intumescimento Osmótico Mitocondrial pelo CAPE.....	31
Figura 6 - Efeito do CAPE na captação de cálcio mitocondrial.....	32
Figura 7 - Efeito do CAPE no Consumo de O ₂ Mitocondrial	33
Figura 8 - Neutralização do radical livre DPPH por diferentes concentrações do CAPE.....	34
Figura 9 - Avaliação Comportamental rotacional.	35
Figura 10 - Marcação imunohistoquímica para TH na substância nigra e no estriado	36
Figura 11 - Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na concentração de metais na substância nigra + estriado	37
Figura 12 - Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na produção de peróxido de hidrogênio no homogenato cerebral.....	38
Figura 13 - Efeitos do MPP ⁺ e 6-OHDA na viabilidade celular – Determinação da EC ₅₀ ...	39
Figura 14 - Efeitos do CAPE na viabilidade das células SH-SY5Y tratadas com as EC ₅₀ das neurotoxinas MPP ⁺ e 6OHDA.....	40
Figura 15 - Efeitos do CAPE contra o aumento do TNF- α induzido pela 6-OHDA em SH-SY5Y	41
Figura 16 - Efeito do CAPE sobre a ativação do NF- κ B, I κ K- α e I κ K β (Modelo de Parkinson in-vitro – SH-SY5Y)	42
Figura 17 - Efeito do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA na ativação da caspase-3 em células SH-SY5Y.....	43

Figura 18 - Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão da BAX e da caspase-3 em células SH-SY5Y. Análise por Western Blot.....	44
Figura 19 - Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão de conexina 43 em células SH-SY5Y	46
Figura 20 - Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Cx43 e da Tirosina hidroxilase em células SH-SY5Y: Dupla marcação de imunofluorescência	48
Figura 21 - Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Cx43 e do citocromo c em células SH-SY5Y. Dupla marcação de imunofluorescência	50
Figura 22 - Síntese, liberação e recaptção de dopamina.....	53
Figura 23 - Esquema simplificado do estresse oxidativo	55
Figura 24 - Esquema simplificado do mecanismo de transdução de sinal do TNF- α através da ligação em diferentes receptores (TNFR1 e TNFR2).....	58
Figura 25 - Esquema representando a localização da Cx43 na mitocôndria e sua função na inibição da TPM	60
Figura 26 - Esquema dos efeitos do CAPE observados nos modelos experimentais.....	63

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Preparação do Gel de Resolução	27
Tabela 2 Preparação do Gel de Empilhamento	27

**“Bem farias em te examinares e refletires
sobre a ti mesmo”.**

(Siddharta Gautama – Buda)

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	ix
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Doença de Parkinson (DP)	2
1.2 Apoptose na neurodegeneração	4
1.3 Modelos Experimentais de Doença de Parkinson	5
1.4 Sistema Ubiquitina Proteossoma e Corpos de Lewy na DP	6
1.5 Disfunção Mitocondrial na DP	7
1.6 Neuroinflamação na Doença de Parkinson.....	8
1.7 Conexinas e Neurodegeneração.....	9
1.8 Éster fenetil do ácido cafeico – CAPE	11
2 OBJETIVOS	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
Reagentes.....	16
Animais.....	16
Modelo Experimental A - mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos não tratados	16
Determinação do intumescimento osmótico mitocondrial	16
Determinação da captação mitocondrial de cálcio	17
Determinação da respiração mitocondrial	17
Modelo Experimental B - ratos tratados com 6-OHDA e CAPE.....	17
Tratamento dos animais e desenho experimental	17
Preparação do homogenato do estriado cerebral de rato	18
Determinação de proteína no homogenato cerebral de rato	19
Determinação de H ₂ O ₂ em homogenato cerebral de rato	19
Determinação de metais essenciais (Cu ⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ e Mn ²⁺) na Substância Nigra e Estriado por técnica de ICP-MS	19
Determinação imunohistoquímica de tirosina-hidroxilase.....	19
Avaliação comportamental rotacional.....	20

Modelo Experimental C- células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y).....	21
Cultura celular	21
Ensaio de Viabilidade Celular: Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH). Determinação da EC ₅₀ das neurotoxinas 6-OHDA e MPP ⁺ na linhagem celular de neuroblastoma (SH-SY5Y).....	21
Efeito de diferentes concentrações de CAPE na viabilidade das células SH-SY5Y tratadas com EC ₅₀ das neurotoxinas MPP e 6-OHDA: Ensaio de exclusão do corante “Trypan Blue”.....	22
Determinação da Ativação da via NF-kB no modelo celular de Parkinson (SH-SY5Y) induzido com 6-OHDA.	23
Determinação da conexina 43, citocromo c e Tirosina Hidroxilase (TH) no modelo celular de Parkinson (SH-SY5Y) induzido com 6-OHDA – Técnica de Imunofluorescência.....	23
Determinação de TNF- α no modelo celular de Parkinson (SH-SY5Y) induzido com 6-OHDA.....	24
Determinação da atividade da Caspase 3	24
Lisado celular para ensaios de Western Blotting.....	25
Determinação de Bax e Caspase 3 por Western Blotting.....	25
Incubação com os anticorpos primários e secundários e reação de quimiluminescência	28
Avaliação da atividade antioxidante do CAPE em solução	28
Técnica de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR, “ <i>Electron Spin Resonance</i> ”).	28
Análise Estatística	29
4 RESULTADOS	31
Modelo Experimental A - mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos não tratados	31
Efeito do CAPE no intumescimento osmótico mitocondrial ou “ <i>swelling</i> ”.....	31
Efeito do CAPE na captação de cálcio mitocondrial.....	31
Efeito do CAPE na respiração mitocondrial.....	32
Efeito do CAPE em solução na estabilização do radical livre DPPH – Técnica de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR)	33
Modelo Experimental B - ratos tratados com 6-OHDA e CAPE.....	35
Efeitos da 6-OHDA e do CAPE no comportamento rotacional	35
Efeitos da 6-OHDA e do CAPE na imunoreatividade da Tirosina-Hidroxilase na substância nigra e no estriado.....	36
Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na concentração de metais na substância nigra e estriado....	37
Efeitos CAPE e da 6-OHDA na produção de peróxido de hidrogênio no homogenato cerebral	38
Modelo Experimental C - células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) tratadas com neurotoxinas	39

Curva dose-resposta - Determinação da EC ₅₀ das neurotoxinas 6-OHDA e do MPP ⁺ nas células SH-SY5Y – Atividade da LDH.....	39
Efeitos do CAPE na viabilidade nos modelos celulares de Parkinson induzidos pelas EC ₅₀ das neurotoxinas (MPP ⁺ 10 mM e 6-OHDA 1mM).....	40
Efeitos do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA no TNF- α em células SH-SY5Y.....	41
Efeitos do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA na ativação do NF κ B, I κ K α e I κ K β em células SH-SY5Y.....	42
Efeito do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA na ativação da caspase-3 em células SH-SY5Y.....	43
Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Bax e da caspase-3 em células SH-SY5Y ...	44
Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão de conexina 43 em células SH-SY5Y – Técnica de Imunofluorescência por simples marcação.....	45
Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Tirosina hidroxilase (TH) em células SH-SY5Y– Técnica de imunofluorescência - dupla marcação para Cx43 e TH.....	47
Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão do citocromo c (cit c) de células SH-SY5Y– Técnica de imunofluorescência - dupla marcação para Cx43 e cit c.....	49
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS	67

“Devemos não somente nos defender, mas também nos afirmar, e nos afirmar não somente enquanto identidades, mas enquanto força criativa”.

(Michel Foucault)

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson (DP)

Na clássica monografia feita por James Parkinson em 1817, “*Essay on the Shaking Palsy*”, foram descritas as características clínicas centrais da Doença de Parkinson (DP), a doença neurodegenerativa de maior incidência depois da doença de Alzheimer (4).

A DP é uma doença degenerativa e progressiva do Sistema Nervoso Central (SNC), caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra, associada a manifestações motoras típicas, como: tremores, rigidez, movimentos lentos (bradicinesia) e dificuldade para caminhar. Também são encontradas alterações não motoras como: distúrbios do sono, constipação, perda de olfato, depressão, disfunção sexual e ansiedade e acredita-se que estas alterações estejam relacionadas ao envolvimento de outros neurotransmissores, além da dopamina, no desenvolvimento da DP (5, 6). Com o envelhecimento da população mundial a incidência da DP tem aumentado e estima-se em 6,3 milhões o número de pessoas com DP hoje no mundo, projetando-se um número duas vezes maior para 2030. A idade de início da DP é na maioria das vezes superior a 60 anos, mas estima-se que uma em cada dez pessoas seja diagnosticada antes dos 50 anos, com uma prevalência ligeiramente superior no sexo masculino (7, 8). Não há ainda um tratamento definitivo capaz de deter ou retardar a degeneração dos neurônios dopaminérgicos, sendo que os medicamentos hoje empregados na clínica apenas amenizam os sintomas, sem alterar a progressão da DP (9).

A etiologia da DP é desconhecida e tem sido associada a múltiplos fatores (fatores ambientais, genéticos, viroses, envelhecimento), mas os achados anatomopatológicos, principalmente a extensa degeneração da via nigroestriatal dopaminérgica, explicam os sintomas característicos da doença. Outro achado relevante é a presença de corpos de Lewy, inclusões eosinofílicas no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos sobreviventes e que constituem um sinal patognomônico da DP (4). A descoberta da neurodegeneração da substância nigra compacta (SNc) é decorrente das evidências da participação da SNc na atividade motora. Com a degeneração dos neurônios da SNc, não há estímulo excitatório do estriado, ocorrendo um desvio para estímulos inibitórios no globo pálido interno (GPi) e substância nigra reticulada (SNr), o que por sua vez, causa uma excitação do tálamo, levando a uma resposta significativa do córtex motor. Assim, embora já se conheçam várias estruturas do mesencéfalo envolvidas na doença de Parkinson, poder-se-ia dizer que o estriado, a SNc e o tálamo estão envolvidos na via direta destas alterações motoras (10), como esquematizado na **Figura 1**. Esta neurodegeneração tem sido associada a mutações genéticas importantes (11) que estão relacionadas à morte celular esporádica dos neurônios dopaminérgicos, além de estresse oxidativo, deficiência do complexo I mitocondrial, disfunção do sistema ubiquitina e proteossoma (SUP) (12), neurotoxinas,

inflamação e fatores neurotróficos (9). Estudos têm mostrado que a mitocôndria tem uma participação fundamental na perda neuronal da DP (11, 13).

Como na DP ocorre a degeneração dos neurônios da SNc, a via direta (libera o movimento pelo Tálamo) e a via indireta (interrompe o movimento pelo Tálamo) são alteradas levando aos sintomas típicos da DP. Isso ocorre porque a dopamina (DA) liga-se aos receptores D1 e D2 no estriado e, uma vez que o estriado sofre a ação da DA decorrente da ligação ao receptor D1, ocorre a liberação de neurotransmissores que irão inibir o estímulo excitatório do globo pálido interno (GPi) e da Substância nigra reticulada (SNr). Essa inibição é procedida da ação de neurotransmissores inibitórios que irão inibir o estímulo inibitório do tálamo levando à liberação do movimento pela ação destes neurotransmissores no córtex somestésico. Por isso, na DP o estímulo segue pela via indireta (ligação da dopamina ao receptor D2) e a ação do estriado, neste caso, estimula o globo pálido externo (GPe), liberando o estímulo excitatório do GPe e Substancia Nigra compacta (SNc) sobre os neurônios do tálamo. Nesse caso ocorre a inibição dos neurotransmissores excitatórios do tálamo e a sinalização do movimento cessa causando paralisia (14).

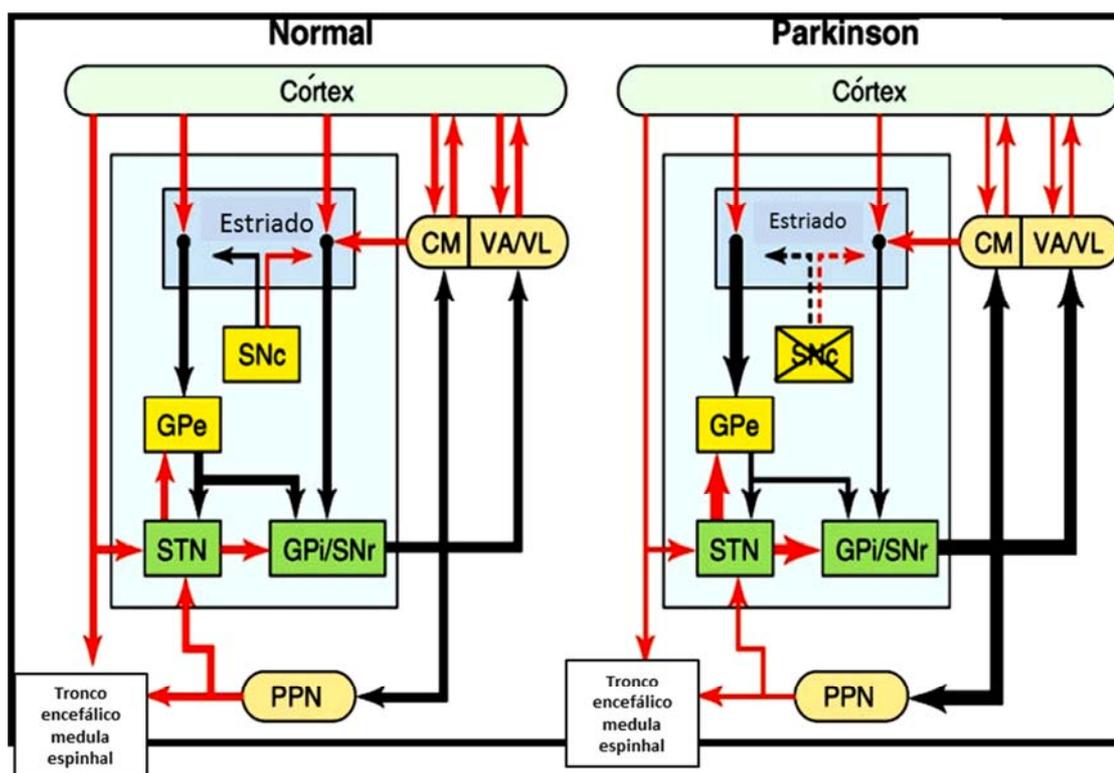


Figura 1 - Representação simplificada dos circuitos que envolvem os núcleos da base, suas principais projeções e as mudanças na atividade associadas à Doença de Parkinson (DP). As setas pretas indicam vias inibitórias (gabaérgicas) e as setas vermelhas indicam as vias excitatórias. As projeções glutaminérgicas do córtex motor, pré-motor e motor suplementar se direcionam ao estriado. Neurônios estriatais enviam suas projeções inibitórias gabaérgicas para o segmento interno do globo pálido (Gpi) em uma via direta e para o segmento externo do globo pálido (Gpe) que então se projeta para o núcleo subtalâmico glutaminérgico (STN) e a partir daí ao Gpi (via indireta). GPe, globo pálido externo; STN, núcleo subtalâmico; GPi, globo pálido interno; SNr, substância nigra parte reticulada; SNc, substância nigra pars compacta; PPN, núcleo pedúnculo pontino; CM, núcleo centro-mediano do tálamo; VA, núcleo ventro-anterior do tálamo; VL, núcleo ventrolateral do tálamo. Figura adaptada de (14).

No Gpi e na substância nigra reticulada funcional (SNr) estão os principais neurônios eferentes dos gânglios da base. As projeções neuronais inibitórias (gabaérgicas) no Gpi fazem sinapse no tálamo ventrolateral e áreas motoras do tronco cerebral. O núcleo pedúnculo pontino (PPN) parece ter um papel no controle de funções posturais e locomotoras. A **Figura 1** mostra que na DP, a depleção de dopamina está associada ao aumento da atividade das vias eferentes gabaérgicas dos núcleos da base, Gpi e SNr. Dois mecanismos contribuem para isto: (i) a inibição diminuída do estriado através de uma projeção direta, e o (ii) aumento do aporte dos núcleos subtalâmicos glutaminérgicos que são ativados como resultado da inibição diminuída do Gpe na via indireta. A consequência do aumento da atividade do Gpi e SNr pode ser uma “super” inibição das áreas motoras talâmicas e do tronco cerebral que resultam na interrupção e empobrecimento da função motora. Os procedimentos neurocirúrgicos atuais utilizam a lesão ou estimulação elétrica crônica para diminuir a atividade do Nst ou do Gpi e assim, liberar o sistema motor de sua excessiva inibição no Parkinsonismo (14).

1.2 Apoptose na neurodegeneração

A apoptose é importante para o desenvolvimento do SNC, promovendo um processo de eliminação celular natural, mas por outro lado, também está associada à perda excessiva de populações neuronais específicas nas doenças neurodegenerativas como: Doença de Alzheimer (DA), Doença de Parkinson (DP), Doença de Huntington (DH) e Doença de Batten's (DB) (15). Os cérebros de indivíduos acometidos por essas doenças apresentam uma elevada expressão de proteínas associadas à apoptose e à fragmentação específica do DNA (16). Estudos *in vivo* demonstram o envolvimento da apoptose na neurodegeneração através da indução experimental dessas doenças. No caso do Alzheimer esta indução é feita através da injeção intracraniana de proteína β -amilóide e no caso do Parkinson através da injeção intracraniana de 6-hidroxidopamina (6-OHDA); injeção intraperitoneal de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), cujo metabólito ativo é o 1-metil-4-fenilpiridini (MPP+) (15) ou ainda injeção intraperitoneal de rotenona (17). No modelo experimental da doença de Parkinson a morte dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância nigra aparentemente ocorre como resultado de três eventos intimamente relacionados: o aumento de estresse oxidativo, a neuroinflamação e a ativação da apoptose pelas vias Janus Quinase (JNK), Bax e Fas, induzidos pela ação de neurotoxinas como: 6-OHDA, MPTP, MPP+ e rotenona. Todas estas neurotoxinas lesam o sistema dopaminérgico nigro-estriatal e produzem um conjunto de sinais e sintomas similares aos observados na DP (15). A c-jun N-terminal quinase (JNK) é

um membro da família das MAP quinases (MAPKs) e assim como as demais MAPKs, as JNKs são ativadas por uma cascata de quinases. Esta cascata inclui: MAPK quinase quinase (MAPKKK), DLK, ASK1 e ASK2 e a MAP quinase (MAPK). A JNK é o maior ativador da c-jun, um fator de transcrição que regula a expressão de numerosos genes relacionados à morte celular. Além disso, a JNK pode fosforilar uma série de membros da família Bcl-2, levando à inibição de proteínas antiapoptóticas e induzindo a ativação de proteínas pró-apoptóticas como a Bad e Bim (18). O balanço existente entre proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2 é crucial para a sobrevivência neuronal. No caso das doenças neurodegenerativas este balanço encontra-se comprometido, com ativação de proteínas associadas à morte celular e consequentemente, aumento da apoptose neuronal (15).

1.3 Modelos Experimentais de Doença de Parkinson

A 6-OHDA foi o primeiro agente usado em modelo animal de DP (19, 20). Pelo fato da 6OHDA não atravessar a barreira hemato-encefálica, é realizada a injeção estereotáxica da 6OHDA na via nigroestriatal. A 6-OHDA acumula-se preferencialmente nos neurônios dopaminérgicos, lesando-os através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (19). A 6-OHDA pode ser usada para produzir uma lesão unilateral, sendo efetiva em ratos, camundongos, gatos e primatas (19, 20). O tempo de ação desta neurotoxina é rápido (1 a 3 dias) e os efeitos são similares aos efeitos agudos do MPTP (20). Estudos realizados com a injeção de 6 OHDA no estriado de ratos para avaliação da progressão da perda dopaminérgica demonstram depleção de 41% a 65% entre 2 a 4 semanas, respectivamente, e uma lesão similar a uma neurodegeneração retrógrada iniciando-se nos terminais dos axônios (19, 21). Em ratos, essa lesão pode ser avaliada através dos testes rotatórios realizados com a administração de anfetamina ou apomorfina. Entretanto não é possível observar o aparecimento de corpos de Lewy nesse modelo (20).

Os efeitos da neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) foram observados pela primeira vez em 1982 em um grupo de dependentes químicos da Califórnia que desenvolveram crises sub-agudas de Parkinsonismo. As investigações mostraram que os sintomas tinham sido causados pela administração de um análogo de heroína sintética, contaminada com o MPTP, um subproduto formado durante a síntese, e que por ser altamente lipofílico, atravessa a barreira hematoencefálica (19, 20). A monoamina oxidase B, presente nas células da glia, converte o MPTP em 1-metil-4-fenilpirimidina (MPP+), que possui alta afinidade pelos receptores de dopamina da membrana plasmática, sendo transportado para o

interior celular e posteriormente captado pelas mitocôndrias, onde inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Como consequência tem-se redução da síntese de ATP, produção de espécies reativas de oxigênio e apoptose dos neurônios dopaminérgicos (19, 20). Além disso, o MPTP pode ativar a microglia por um processo conhecido como microgliose reativa o que leva à exacerbação da morte neuronal dopaminérgica pelo aumento do processo inflamatório (**Figura 2**) (13, 22-28). Diferentemente do modelo com 6-OHDA, no modelo experimental com MPTP observa-se a formação dos corpos de Lewy (20)

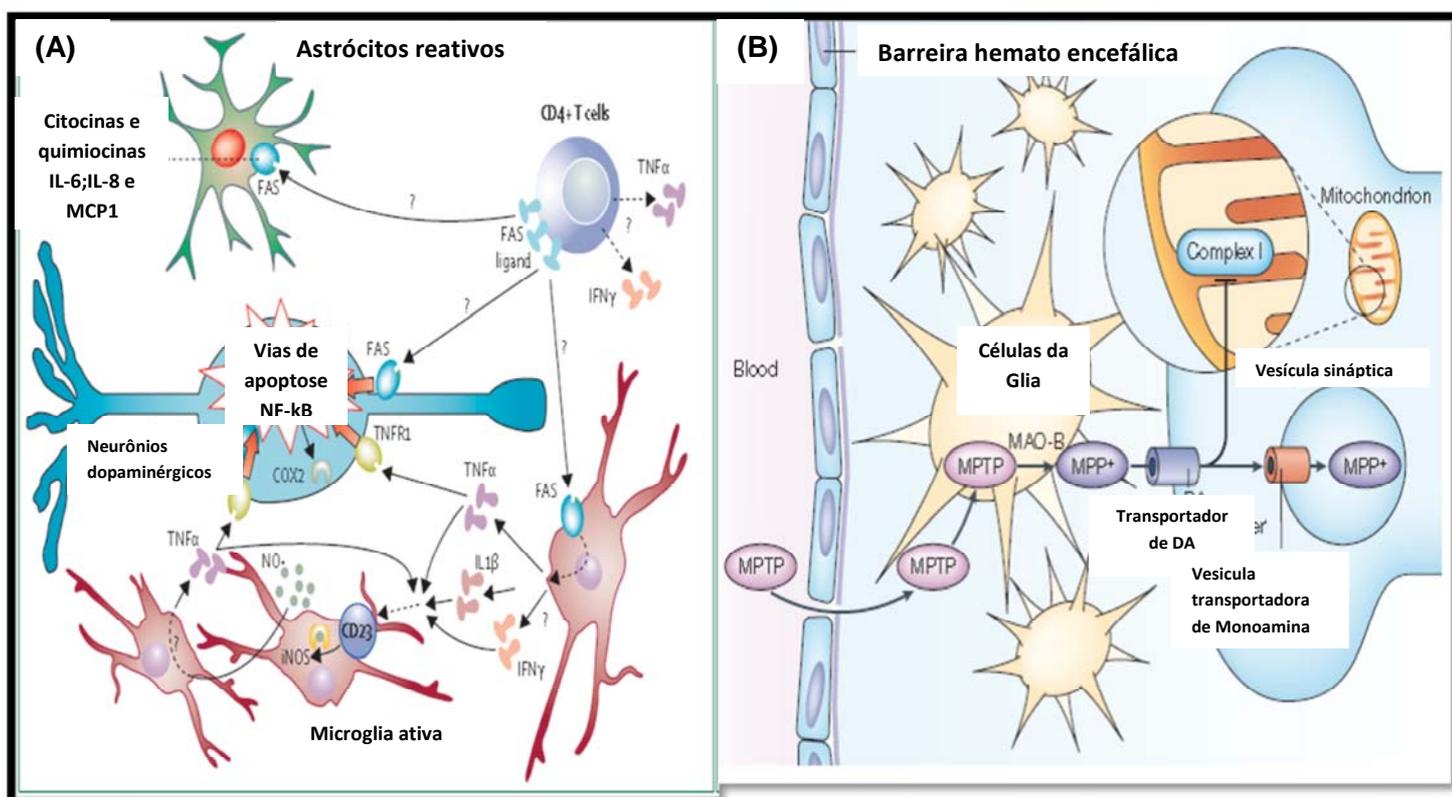


Figura 2 - Esquema simplificado ilustrando: (A) relação existente entre a microgliose reativa (processo neuroinflamatório) e a formação de espécies reativas de oxigênio na morte neuronal dopaminérgica e (B) ação do MPTP na ativação da célula glial e seu efeito após ser oxidado via Monoaminoxidase B (MAOB) (A) adaptada de (29) e (B) adaptada de (30).

1.4 Sistema Ubiquitina Proteossoma e Corpos de Lewy na DP

A morte das células dopaminérgicas está também relacionada a uma alteração do sistema ubiquitina-proteossoma, o qual é constituído de proteínas de degradação. Esta alteração ocorre devido a uma disfunção do proteossoma 26S levando a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo (31). O Sistema Ubiquitina

Proteossoma (SUP), é um amplo complexo de múltiplas proteínas que degradam proteínas-alvos, processo mediado por um conjunto enzimático denominado: E1; E2 e E3 ubiquitina ligases. A E1 e E2 são conjugadas à proteína devido à participação da E3 ubiquitina ligase (32). Uma série de estudos tem mostrado que na DP o SUP encontra-se comprometido, seja em decorrência do envelhecimento ou de mutações genéticas (12, 33). O maior achado associando a disfunção do SUP ao desenvolvimento da DP foi a identificação de mutações no gene PAK2 que codifica a proteína *parkin*, a qual faz parte do complexo E3 ubiquitina ligase. Perda de função da proteína *parkin* acarreta morte dos neurônios dopaminérgicos, possivelmente porque a *parkin* degrada proteínas que exerceriam efeitos tóxicos nos neurônios dopaminérgicos. Em estudos *in-vitro* foi identificada uma série de substratos para *parkin* incluindo a α – sinucleína (34). Esta relação explica a contribuição da inibição do SUP no acúmulo de α -sinucleína, formando inclusões e agregados citoplasmáticos, corpos de Lewi, e conduzindo à morte neuronal (35).

1.5 Disfunção Mitocondrial na DP

A mitocôndria é a organela responsável pela síntese de aproximadamente 95% do ATP necessário à manutenção da estrutura e função celular, processo que se dá através da fosforilação oxidativa (36). No entanto a mitocôndria exerce outros papéis, como o controle da morte celular. No caso das doenças neurodegenerativas, como a DP, existe uma disfunção mitocondrial. Os estudos têm mostrado que no Parkinsonismo induzido com MPTP, a mitocôndria e a monoamina oxidase B, enzima presente na membrana externa da mitocôndria, exercem papéis fundamentais (11). Uma série de estudos aponta para uma deficiência no complexo mitocondrial I na substância nigra do cérebro de indivíduos com DP e também em modelos experimentais (11, 37). Esta deficiência da cadeia transportadora de elétrons leva a uma redução do processo de fosforilação oxidativa com a consequente redução da formação de ATP e aumento da produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio (11, 38). Esse aumento das espécies reativas gera um dano oxidativo em proteínas, lipídeos e no DNA e reduz a proteção antioxidante como a glutathiona reduzida (GSH). Este processo foi detectado na autópsia dos tecidos encefálicos de pacientes com Parkinson. Esses achados tornam plausível a relação existente entre dano oxidativo e formação de corpos de Lewi (13). Este dano leva a agregação da α -sinucleína devido a uma modificação pós-translacional (38), disfunção do sistema ubiquitina-proteossoma e degradação de proteínas (13).

1.6 Neuroinflamação na Doença de Parkinson

O processo inflamatório é resultado de uma série de eventos complexos que envolvem interação intercelular, fatores parácrinos e moléculas de adesão. A inflamação tem como principal objetivo o combate a agentes patogênicos e a restauração tissular após uma lesão. Entretanto, alterações do processo inflamatório estão associadas a uma série de disfunções (39). Dentre os fatores que induzem o processo inflamatório, o NF kappa B (NF- κ B), uma proteína de transcrição que controla a expressão de genes envolvidos na inflamação, exerce papel fundamental (40). Este fator de transcrição pertence a uma família que inclui: NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), p65/RelA, cRel e RelB, os quais atuam em diferentes processos biológicos como apoptose, proliferação, desenvolvimento e resposta imune. O NF- κ B encontra-se no citoplasma da célula, ligado a alguns inibidores denominados de I κ B. Esses inibidores são pequenas proteínas classificadas em: I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ , que se ligam às porções p100 e p105 e inibem a liberação do NF- κ B. Na presença de estímulos, como citocinas pró-inflamatórias ou peptídeos antigênicos, ocorre uma rápida fosforilação e degradação dos I κ Bs. Esta fosforilação é realizada por um complexo enzimático denominado IKK, composto de subunidades catalíticas IKK β e IKK α e uma subunidade regulatória IKK γ também conhecida como NEMO. Após a fosforilação dos I κ Bs ocorre a exposição da lisina 48, alvo para a poli-ubiquitinação e assim as proteínas I κ Bs são degradadas pelo sistema de proteossoma (E3-ligase) (41). Consequentemente, o NF- κ B é liberado, e no núcleo, liga-se a uma sequência específica do DNA conhecida como κ B (40). Após a ligação desse fator de transcrição ao material genético ocorre a ativação de genes relacionados ao processo inflamatório, que codificam TNF- α , IL1, COX2, Moléculas de Adesão Intercelular (ICAM), Moléculas de Adesão Vasocelular (VCAM) (40). Os estudos têm mostrado a existência de uma fina relação entre processos inflamatórios e doenças neurodegenerativas como a DP (42).

Embora exista uma série de estudos que descrevem a patogenia do Parkinson como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, apoptose neuronal e modificação protéica, a sua etiologia continua pouco compreendida (43). Apesar de todas essas alterações celulares e moleculares, provavelmente a neuroinflamação também possa contribuir na cascata que leva à degeneração neuronal, por mecanismo que envolve: (i) ativação da microglia, células de defesa imune do sistema nervoso central (SNC) (44-46), (ii) astrogliose e (iii) infiltração leucocitária (43). Uma série de estudos tem mostrado que a inflamação no SNC não ocorre como uma resposta da necrose neuronal, mas ao contrário, está envolvida na progressão da degeneração neuronal (43, 44, 46). Em 1988 McGeer *et al.* observaram a presença de células

da microglia ativada na substância nigra do cérebro de pacientes com DP. Estas células foram identificadas através da marcação imunoreativa ao antígeno leucocitário humano (HLA-DR), um receptor de superfície celular que constitui o complexo principal de histocompatibilidade da classe II (MHC II). Um estudo feito em modelos experimentais de Parkinson induzido por 6-OHDA demonstrou a cinética das alterações imunofenotípicas da microglia ativada. Esse estudo mostrou que a ativação da microglia precede a perda dos neurônios dopaminérgicos (47).

A substância nigra é relativamente rica em microglia, quando comparada a outras regiões do cérebro. Adicionalmente, os neurônios dopaminérgicos presentes nessa região possuem um menor nível de glutathiona intracelular, o que lhes confere uma característica de maior susceptibilidade à lesões oxidativas e oriundas da microglia ativada. A ativação da microglia leva a um aumento da produção de TNF- α , IL- β e interferon- γ (INF- γ), que são citocinas pró-inflamatórias. O aumento do INF- γ leva a um aumento da população de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no SNC por um processo conhecido como quimiotaxia. Esse processo demonstra que na DP a função da barreira hematoencefálica está alterada. Adicionalmente todas essas citocinas pró-inflamatórias ativam a óxido-nítrico-sintase (iNOS), induzível nas células da glia por um mecanismo indireto. Estas citocinas se ligam a receptores de superfície celular de macrófagos Fc ϵ R11 (CD23) que, por sua vez, induzem a ativação da iNOS e levam ao aumento do óxido nítrico (NO). Este NO pode amplificar a liberação de TNF α das células da glia, o que cria uma alça amplificadora do sinal. Associado a esse processo, o TNF α liberado pela microglia pode se ligar a receptores das células dopaminérgicas denominados de TNF-RI levando a “*trimerização*” deste receptor. Após essa mudança de conformação intracitoplasmática do TNF-RI ocorre uma associação com uma molécula adaptadora do domínio de morte (TRADD) e uma proteína (FAS) associada ao domínio de morte (FADD). Este complexo TRADD e FADD ativa a pró-caspase 8, que por sua vez, cliva a caspase-3 que é uma caspase efetora, iniciando-se o processo de apoptose no neurônio dopaminérgico na DP.

1.7 Conexinas e Neurodegeneração

As mudanças na expressão e na função das conexinas parecem ter uma participação crucial nas doenças do SNC (48). As connexinas (Cxs) são uma família de proteínas que se associam em grupos de seis, formando canais de membrana (hemicanais ou conéxons) que podem ser homéricos (com subunidades idênticas) ou heteroméricos (com subunidades

diferentes) (49, 50). Os hemicanais funcionam como poros que permitem a difusão de íons e pequenas moléculas entre os compartimentos intracelulares e extracelulares, mudando a permeabilidade das células (51, 52). Dois hemicanais de células adjacentes podem combinar-se formando canais intercelulares (JC, junções comunicantes), que permitem a passagem de moléculas menores que 1kDa de uma célula à outra, promovendo uma comunicação intercelular eletrônica e bioquímica (30, 48, 53). As JC são abundantemente expressados em células do sistema nervoso central (SNC) e eles promovem a comunicação neurônio-neurônio, glia-neurônio e glia-glia. A conexina 43 (Cx43) é uma conexina com massa molecular de 43 kDa e é uma das proteínas das JC mais abundantes do SNC. Ela é particularmente expressa em astrócitos e em células precursoras de neurônios durante o desenvolvimento do SNC. Alterações na expressão e função das conexinas tem sido associadas ao desequilíbrio homeostático presente nas doenças do SNC (48), (54-56). Adicionalmente, a expressão da Cx43 tem sido associada com a proteção contra a apoptose em culturas de células gliais, o que parece ocorrer independentemente da formação dos hemicanais ou JC (18, 52, 56). A expressão alterada da Cx43 tem sido encontrada nas doença de Huntington e Alzheimer (16, 20, 55); entretanto, o envolvimento da modulação da Cx43 na etiologia da DP é controverso e os achados variam nos diferentes modelos estudados.

A maioria dos genes que codificam conexinas se localiza em uma sequência com no máximo 300 pares de base no sítio de iniciação transcricional. Esta região contém sítios de ligação para células independentes do fator de transcrição como: proteína de ligação TATA box, Sp1/Sp3 e proteína de ativação 1 (AP-1) (57). Muitos estudos têm demonstrado a regulação da transcrição de conexinas em resposta ao tratamento celular com uma variedade de agentes químicos ou biológicos como: Monofosfato Cíclico de Adenosina (cAMP), Ésteres de Forbol e retinóides; ou ainda em resposta à manipulação das vias de transdução de sinal como: Wnt/ β -catenina; fator de célula T (TCF)/fator de ligação e amplificação de linfócitos (LEF) (57, 58) A região promotora da Cx43 (o maior sítio iniciador transcricional) contém dois potenciais sítios de ligação TCF/LEF e um elemento responsável ao cAMP (59).

O “*turnover*” das conexinas ocorre através da participação dos lisossomos que degradam proteínas integrais de membrana e internalizam proteínas mediadas por receptores. Além disso, o proteossoma também promove a degradação da proteína ao degradar a maior porção citosólica e nuclear (60-63). Estudos têm mostrado que ambas vias (lisossomal e proteossômica) estão envolvidas na degradação da Cx43 (63, 64). Alguns estudos têm mostrado a participação proteossômica na degradação das conexinas através da inibição desta via e consequente aumento na formação das JCs (155). Este mecanismo sugere que a

comunicação intercelular pode ser regulada pelo grau de turnover das conexinas (65). Entretanto, mesmo que existam evidências de que ambas as vias (lisossomal e proteossômica) estejam relacionadas à degradação da Cx43, não está claro se esta degradação ocorre na superfície celular das JCs, nas Cx43 imaturas dentro do RE (retículo endoplasmático) em ou outros compartimentos da via secretora (65).

Independentemente de como ocorre o “*turnover*” da Cx43 estudos têm mostrado que as JC são indispensáveis para regulação homeostática dos níveis de K⁺ e glutamato no SNC (66, 67).

1.8 Éster fenetil do ácido cafeico – CAPE

O CAPE é um dos compostos bioativos do própolis (produto natural secretado pelas abelhas) e seu potencial terapêutico para o tratamento de diferentes doenças têm sido demonstrado. É um potente seqüestrador de espécies reativas de oxigênio (ERO) e inibidor do sistema xantina-xantina oxidase e lipoxigenase. Além disso, o CAPE inibe a ativação do fator de transcrição NF-kB, inibindo a produção da ciclo-oxigenase (COX), o que confere a este composto múltiplas atividades imunomodulatórias e anti-inflamatórias (68)

Estudos têm demonstrado o potencial protetor do CAPE em modelos de isquemia cerebral focal (69), isquemia e reperfusão cardíaca (70) e encefalomielite (71), processos estes associados ao estresse oxidativo. Estudos *in vitro* demonstraram que o CAPE protege contra a morte neuronal induzida por 6 hidroxidopamina na região Nigro-estriatal, por mecanismo envolvendo o sequestro de espécies reativas de oxigênio (ERO) (72, 73). Outros mecanismos de proteção também parecem estar envolvidos. Estudos mostram que o CAPE inibe a liberação do Cyt c induzido por Ca²⁺ em mitocôndrias isoladas de fígado e cérebro (68, 72, 73) e inibe a expressão do gene associado à enzima óxido nítrico sintase (iNOS), reduzindo sua atividade (74). O aumento da produção do NO tem sido associado a doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico e a processos inflamatórios clássicos, o que se explica pelo fato da enzima iNOS possuir sítios de ligação tanto para o NF-kB quanto para a proteína de ativação 1 (AP-1) (74). Estudos já haviam demonstrado a ação inibidora do CAPE na liberação do ácido araquidônico da membrana celular, com consequente na inibição da produção de COX2 e COX1 (75). A inibição da iNOS pelo CAPE ocorre devido ao bloqueio do NF-kB, e consequentemente da produção de NO induzida pelo INF- γ (76). Devido ao seu potencial inibidor destes agentes pró-inflamatórios, o CAPE é um agente promissor contra o processo de neuroinflamação associado à neurodegeneração. Além dos efeitos antioxidantes e

antiinflamatórios, o CAPE também apresenta atividade antitumoral, sendo capaz de restabelecer a comunicação entre células tumorais, possivelmente por mecanismos envolvendo as conexinas (77, 78)

Assim, considerando-se as propriedades do CAPE, os eventos envolvidos na degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra e a possível participação das conexinas nesse processo de neurodegeneração, é possível que o CAPE exerça um efeito neuroprotetor nestas células, sendo capaz de retardar a progressão da morte neuronal. No presente estudo propõe-se a investigação do potencial neuroprotetor do CAPE *in vivo*, e o delineamento de alguns mecanismos moleculares em modelo *in vitro* com células de neuroblastoma (SH-SY5Y) e em mitocôndrias isoladas do cérebro de ratos.

“Do rio que tudo arrasta, diz-se que é violento. Mas ninguém chama violentas às margens que o comprimem”.

(Bertolt Brecht)

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Investigar o possível efeito neuroprotetor do CAPE em modelo experimental de DP induzida por 6- hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos e delinear os mecanismos moleculares envolvidos, utilizando células SH-SY5Y tratadas com neurotoxinas (6-OHDA ou MPP⁺) e mitocôndrias isoladas de cérebro de rato não tratados.

“Quem possui a faculdade de ver
a beleza, não envelhece”

(Franz Kafka)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Chemical Co. (St. Louis MO, USA), exceto quando especificado de maneira diferente. Foi utilizada água tipo I, obtida em sistema de purificação de água gradiente Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA). O CAPE foi diluído em DMSO (solução estoque: 1 mM) e armazenado a 4°C por até 1 mês. A solução de 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 8 mg/mL) foi preparada diariamente em solução salina contendo 0,2% de ácido ascórbico.

Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, sob protocolo nº 10.1.972.53.5 e seguem as normas estabelecidas nos “Princípios Éticos na Experimentação Animal”.

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, com 200-230 g, obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em salas com temperatura ambiente controlada (22-24°C), com ciclos de 12 horas de claro e escuro. Água e ração padrão foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Modelo Experimental A - mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos não tratados

A função mitocondrial foi analisada através da avaliação da respiração e da captação de cálcio. Foi avaliada também a capacidade protetora do CAPE contra o intumescimento osmótico (“*swelling*”) induzido por cálcio e fosfato.

As mitocôndrias do córtex cerebral foram isoladas por centrifugação diferencial de gradiente de densidade do Percoll® (79) e a concentração de proteína mitocondrial foi dosada pelo método do Biureto. As mitocôndrias foram tratadas com diferentes concentrações de CAPE (1,0; 2,0; 5,0 e 10,0 µM) e foram analisados os parâmetros descritos a seguir.

- **Determinação do intumescimento osmótico mitocondrial**

A suspensão mitocondrial (1,0 mg/mL) foi incubada em 1,5 mL de meio de reação composto por manitol 210mM, sacarose 70mM, HEPES 5mM, pH= 7,2 acrescido de

succinato de potássio 7,5mM e rotenona 4 μ M, pH= 7,2. O intumescimento osmótico mitocondrial foi estimado pela diminuição da absorbância a 540 nm em espectrofotômetro com agitação constante e termostatizado a 30 °C (80).

Foi avaliada a capacidade do CAPE de induzir ou inibir o intumescimento osmótico mitocondrial na presença de (a) Ca⁺⁺ 20 μ M ou (b) Ca⁺⁺ 20 μ M + Fosfato inorgânico 1,5mM (controle positivo).

- **Determinação da captação mitocondrial de cálcio**

A captação mitocondrial de cálcio foi estimada pela variação na absorbância do arsenazo III (a 680 nm), um indicador do cálcio livre. A suspensão mitocondrial (1mg de proteína/mL) foi incubada em meio composto por manitol 300mM, KCl 10 mM, HEPES 5mM, MgCl 5mM, rotenona 4 μ M e cálcio 20 μ M, pH 7,4. A captação do cálcio foi iniciada após a adição de succinato de potássio 5mM.

- **Determinação da respiração mitocondrial**

O consumo de oxigênio foi analisado polarograficamente, a 30°C, em um oxígrafo equipado com um eletrodo de Clark (Gilson Medical Electronics, USA), em uma câmara de volume final de 1,6 ml. As mitocôndrias (1 mg de proteína mitocondrial) foram energizadas com succinato de potássio 10 mM (+ rotenona 5 μ M) em um meio de respiração contendo Manitol 300 mM, KH₂ PO₄ 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7, 2 e incubadas na presença ou ausência de diferentes concentrações de CAPE (0,5; 1; 2; 5 e 10 μ M). A respiração do estado 3 foi iniciada com 0,4 μ mol de ADP (81). A capacidade fosforilativa foi representada pela Razão de Controle Respiratório (RCR), calculada pela razão do consumo de O₂ no estado 3 pelo consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial, a qual foi determinada a partir do traçado polarográfico, de acordo com o método descrito na literatura (82).

Modelo Experimental B - ratos tratados com 6-OHDA e CAPE

- **Tratamento dos animais e desenho experimental**

Ratos Wistar machos pesando 200-240 g foram anestesiados com 0,15mL/ 100mg de peso de uma solução contendo ketamina a 10% e 0,07mL de xilazina a 2% e posicionados no

sistema estereotáxico em decúbito ventral. Os pontos de injeção intracraniana (ic) no estriado dorso-lateral foram determinados com o auxílio do atlas Paxinos & Watson (A: +1.2, L: -2.6; D: -5.0 e A: -0.4; L: -4.2; D: - 5.0, a partir do bregma) (83). Os animais foram divididos em três grupos (n=6 em cada grupo): (A) **Controle**: 3 μ L de salina por via ic; (B) **6-OHDA**: 3 μ L de 6-OHDA (8mg/mL, via ic, 1 vez) e (C) **6-OHDA + CAPE**: 3 μ L de uma solução de 6-OHDA (8mg/mL, via ic, 1 vez), e 200 μ L de CAPE (10 μ mol/kg) por via intraperitoneal (ip) por 5 dias consecutivos, sendo a primeira injeção de CAPE administrada logo após a injeção de 6- OHDA (ic) e as demais injeções após intervalos de 24h. No 28º dia foi realizado o teste comportamental rotacional após injeção subcutânea de 1mg/kg de apomorfina (agonista da dopamina). Após 48 horas (30º dia após a cirurgia) os animais foram sacrificados (**Figura 3**).

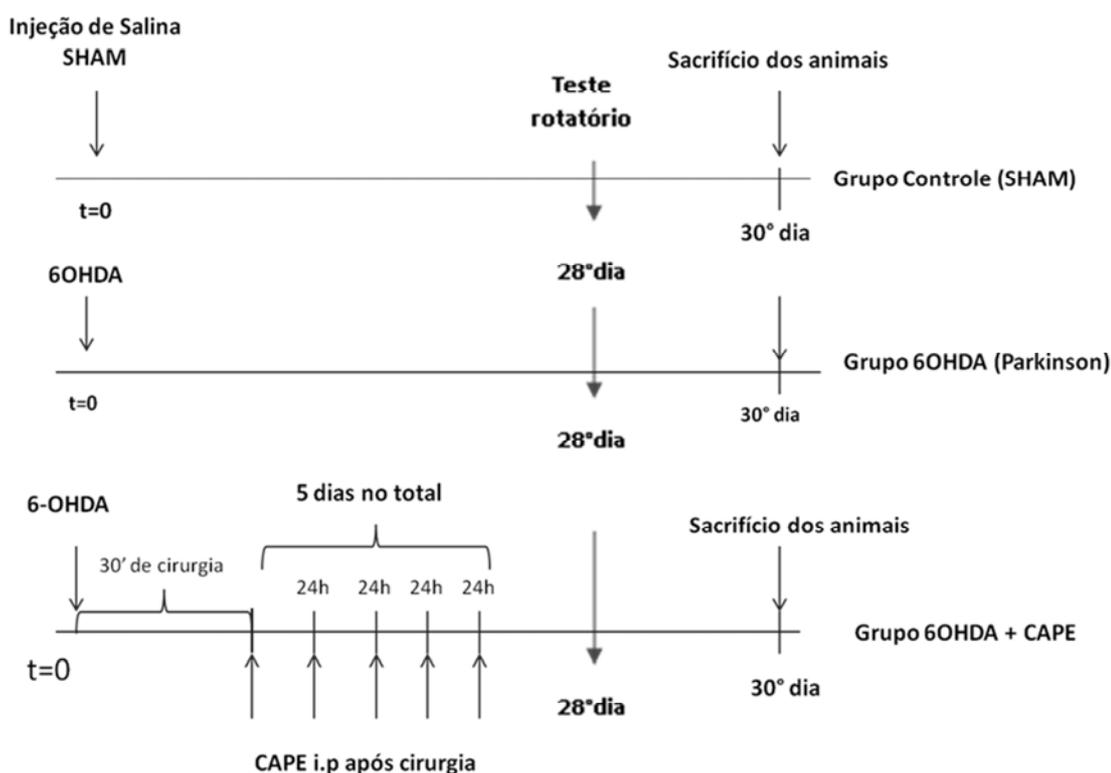


Figura 3 - Esquema ilustrando o desenho experimental do modelo *in-vivo* da doença de Parkinson induzida pela neurotoxina 6-OHDA em ratos, o tratamento com CAPE e o teste rotacional.

• Preparação do homogenato do estriado cerebral de rato

Os cérebros foram removidos e os estriados seccionados. As secções foram imersas em solução de homogeneização, composta por sacarose 0,32M, EGTA 1mM, HEPES 5mM, pH 7,2 (10% m/v), acrescido de PMSF 1mM e cocktail de inibidores de protease (Sigma)

(1:250). Os estriados foram separados, pesados e cortados em pequenos fragmentos e em seguida homogeneizados em Potter, 3 vezes, a 700 rpm com intervalo de 1 min. A concentração de proteínas do homogenato foi determinada e diferentes concentrações foram utilizadas, conforme a necessidade do experimento realizado.

- **Determinação de proteína no homogenato cerebral de rato**

Foi utilizado o método espectrofotométrico que emprega o reativo de biureto (CAIN e SKILLETER, 1987).

- **Determinação de H₂O₂ em homogenato cerebral de rato**

O homogenato foi diluído com tampão de homogeneização gelado para obter a concentração de 5mg de tecido por mL. O homogenato (2mL) foi incubado a 23°C por 5 minutos, e então 2µL de DCFH-DA (concentração final 10µM) foram adicionados, seguindo-se incubação por 30 minutos. O controle positivo foi realizado com adição de 20 µL de terc-butil hidroperóxido (concentração final 100µM). Após o período de incubação a fluorescência das amostras foi determinada a 430nm (excitação) e 540nm (emissão).

- **Determinação de metais essenciais (Cu⁺, Fe²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺) na Substância Nigra e Estriado por técnica de ICP-MS**

Uma porção de 75 mg da amostra do tecido cerebral (substância nigra ou estriado) foi diluída em 1ml de uma solução de hidróxido de tetrametilamonio (TMHA) 50% (v/v) e incubada por 12 horas a temperatura ambiente. O volume foi completado para 10ml com uma solução contendo 0,5% (v/v) de HNO₃ e 0,01% de Triton X-100. As análises foram realizadas no espectrômetro de massa acoplado a plasma (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, Perkin Elmer, SCIEX, Norwalk, CT, USA). Os resultados foram expressos em ng/g de tecido (84).

- **Determinação imunohistoquímica de tirosina-hidroxilase**

Foram feitas secções de 25 µm do cérebro em micrótomo semiautomático. As amostras foram processadas de modo “free-floating” (separando o CPU/estriado e a

substância nigra), as secções de interesse foram colocadas em uma placa de Petri e com o auxílio de um pincel, o tecido foi aberto na seguinte solução de montagem (200mL de água destilada; 0,5g de gelatina tipo A; 200mL de PBS 0,2M; 50 mL de etanol absoluto; 50 mL de PBS 0,1 M). As secções foram então transferidas para uma microplaca de 24 poços (1 secção/ poço) e lavadas 3 vezes com PBS 0,1M; em seguida foram submetidas à recuperação antigênica pelo tratamento enzimático com proteinase K 20µg/mL, solubilizada em tampão (composto por 0,05M Tris-HCl, 0,01M CaCl₂, pH 8,0, fornecido pela Millipore®) por 25 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação das amostras em H₂O₂ a 3% em PBS por 30 minutos. Após este período, foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com 2% de soro equino em PBS, por 50 minutos à temperatura ambiente e logo em seguida, foi feita a incubação com o anticorpo monoclonal anti-tirosina hidroxilase 0,49µg/mL (SIGMA) diluído em 1mg/mL de albumina bovina sérica por 12 horas em câmara úmida. Posteriormente, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário HRP (HRP - polymer conjugate broad spectrum - DAB INVITROGEN) de acordo com as especificações do fabricante. As secções foram lavadas e transferidas para as lâminas e deixadas à temperatura ambiente por 24 horas para melhor aderência. Após este período, as lâminas foram desidratadas em gradientes com concentrações crescentes de etanol (90%, 100%) e logo em seguida em xilol (absoluto). A montagem das lâminas permanentes foi realizada com lamínula de 24 x 60 mm e Entelan (Merck®).

As secções foram visualizadas em microscopia ótica com filtro de luz branca (Olympus, BX 51) e aumento de 400x. A quantificação das amostras foi realizada com auxílio do programa “Image J” (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014), de acesso público.

- **Avaliação comportamental rotacional**

No 28º dia após o início do tratamento foi realizada a análise de simetria rotacional com todos os animais após a injeção subcutânea do agonista dopaminérgico apomorfina (0,1mg de apomorfina/kg de animal), ou seja, um volume de aplicação de 0,2ml de uma solução (0,5mg/10ml) por 100 gramas de peso do animal. Foram feitas contagens distintas para movimentos ipsilaterais e contralaterais (85).

Modelo Experimental C- células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)

- **Cultura celular**

Foram utilizadas células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), adquiridas da “American Type Culture Collection” (ATCC) e mantidas em meio DMEM com alta concentração de glicose, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 5% de uma mistura de antibióticos composta por 5mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10mg de neomicina, em atmosfera umidificada composta de 95% de ar e 5% de CO₂, a 37%. Para realização dos experimentos foram utilizadas células após a 2^a ou 3^a passagem (quando havia cerca de 80% de confluência). Foi avaliado o efeito do CAPE em diferentes concentrações [100µM]; [50µM]; [10µM]; [1µM] na viabilidade das células no modelo Parkinson (induzido com 6-OHDA [1mM] e com MPP⁺ [10.5mM]) e o efeito do CAPE *per si* para avaliação de possível toxicidade deste composto nesse tipo de linhagem celular.

- **Ensaio de Viabilidade Celular: Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH). Determinação da EC₅₀ das neurotoxinas 6-OHDA e MPP⁺ na linhagem celular de neuroblastoma (SH-SY5Y)**

As células de neuroblastoma humano - SH-SY5Y (1x10⁶ céls/poço) foram incubadas em placas de 96 poços por 24 horas e mantidas em meio DMEM com alta concentração de glicose, acrescido de 10% de soro fetal bovino e 5% de uma mistura de antibióticos composta por 5mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10mg de neomicina, em atmosfera umidificada composta de 95% de ar e 5% de CO₂, a 37%. Após este tempo foram adicionadas diferentes concentrações do MPP⁺ e 6-OHDA (10⁻⁸ a 10⁻¹ M) e seguiu-se incubação por mais 24 horas. A viabilidade celular foi determinada utilizando-se kit de ensaio para atividade de LDH (Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit, Sigma Aldrich-UK), de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante e descrito a seguir: No controle positivo (controle de lise) foram adicionados 2µl do tampão de lise e incubou-se por 30 minutos à 37°C. Após este período foram adicionados 100 µl da mistura substrato/tampão, as microplacas foram cobertas com papel alumínio e incubadas a 37°C durante 20 minutos. Ao final deste tempo foram adicionados 50µl de solução de bloqueio em todos os poços e a absorbância foi determinada em leitor de microplaca operando em 450nm (**Figura 04**).

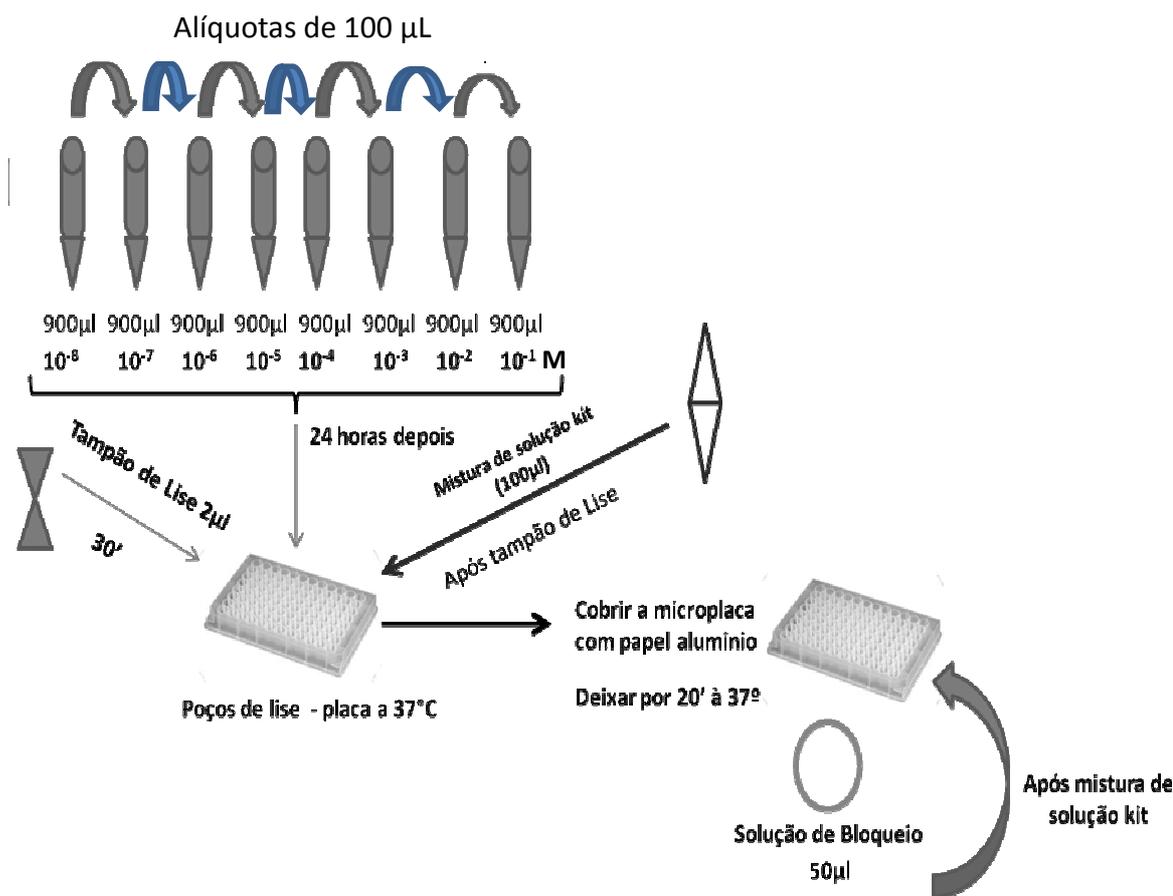


Figura 04. Esquema do ensaio de viabilidade celular realizado através da avaliação da atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH).

• **Efeito de diferentes concentrações de CAPE na viabilidade das células SH-SY5Y tratadas com EC_{50} das neurotoxinas MPP e 6-OHDA: Ensaio de exclusão do corante “Trypan Blue”**

Este ensaio baseia-se no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas que excluem determinados corantes, como o “*trypan blue*”, enquanto as células mortas não. Neste teste, uma suspensão de células é simplesmente misturada com o corante e depois examinada no microscópio ótico para determinar se as células absorveram ou excluíram o corante. Assim, as células viáveis apresentam citoplasmas claros ao passo que células não viáveis apresentam citoplasmas azuis (86).

As células SH-SY5Y (1×10^6 céls/poço) foram incubadas em placas de 24 poços durante 24 horas em meio DMEM completo. Após este período, as células foram incubadas da seguinte forma: a) controle (células); b) 6-OHDA (células+ 6-OHDA [1mM]), c) 6-OHDA + CAPE (células + 6-OHDA [1mM] + CAPE [100µM]; [50µM]; [10µM]; [1µM]), d) MPP⁺

(células + MPP⁺ [10,5mM]) MPP⁺ + CAPE (células + MPP⁺ [10.5mM] + CAPE [100μM]; [50μM]; [10μM]; [1μM]) durante 24h a 37^oC em DMEM incompleto (sem soro). Posteriormente, as células foram removidas com o auxílio de um “*scraper*” e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min. Desprezou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em DMEM incompleto sem soro. Alíquotas de 50μL das células e 50μl de trypan blue 0,4% foram homogeneizadas em tubos cônicos de 1,5 mL e transferidas para câmara de Newbauer para contagem de células vivas e mortas.

- **Determinação da Ativação da via NF-kB no modelo celular de Parkinson (SH-SY5Y) induzido com 6-OHDA.**

As células SH-SY5Y (2x10⁶ céls/poço) foram incubadas em microplacas de 96 poços por 24 horas em DMEM completo e posteriormente foram incubadas da seguinte forma: a) controle (células); b) 6-OHDA (células+ 6-OHDA 1mM), c) 6-OHDA + CAPE (células + 6-OHDA 1mM + CAPE [100μM]) e d) CAPE [100μM], por 24 horas à 37°C, em DMEM incompleto (sem soro). Após esse período foi realizada a determinação da ativação do NF-kB, IκKα e IκKβ com a utilização de kit comercial (NFκB Pathway activation InstantOne™ ELISA, Bioscience UK), seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante.

- **Determinação da conexina 43, citocromo c e Tirosina Hidroxilase (TH) no modelo celular de Parkinson (SH-SY5Y) induzido com 6-OHDA – Técnica de Imunofluorescência**

As células SH-SY5Y (2x10⁶ céls/poço) foram incubadas (24 horas em DMEM completo) em microplacas de 24 poços, nos quais foram colocadas lamínulas circulares previamente recobertas com poli-D lisina. Após este período as células foram incubadas da seguinte forma: a) controle (células); b) 6-OHDA (células+ 6-OHDA 1mM), c) 6-OHDA + CAPE (células + 6-OHDA 1mM + CAPE [100μM]; [50μM]; [10μM]; [1μM]) e d) CAPE [100μM], por 24 horas à 37°C em DMEM incompleto (sem soro). Posteriormente as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (por 30 minutos) e lavadas (3 vezes) com 0,1M PBS. A seguir as células foram incubadas com soro de cabra diluído (120μl de soro em 12ml de PBS 0,1M) por 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação (100rpm). Após o bloqueio as células foram incubadas (*overnight*, 4°C, 100 rpm) com os anticorpos primários: rabbit anti-connexin 43 (diluição 1:100), Mouse anti-Tyrosine Hydroxylase, (diluição 1:200) e mouse anti-cytocrome c (diluição 1:100), todos adquiridos da Invitrogen, UK. Os anticorpos

primários foram diluídos com uma solução contendo 0,05% Triton X-100 e de 1% de soro de cabra. Após a incubação com anticorpos primários as células foram lavadas (3 vezes) com solução de PBS 0,1M contendo 0,05% Triton X-100 e 1% de soro de cabra. Após a lavagem as células foram incubadas (T.A., 2h, 100rpm) com os anticorpos secundários (Invitrogen, UK) conjugados com dois fluoróforos: Alexa Fluor® 488 (marcação verde) e Alexa Fluor® 594 (marcação vermelha), os quais foram diluídos em solução de PBS 0,1M contendo 0,05% do TritonX-100. As lamínulas foram removidas da microplaca e colocadas sobre as lâminas contendo DAPI (marcação em azul), e as mesmas foram armazenadas em câmara escura, a 4°C, por 24 horas. As imagens foram capturadas em aumento de 200x e 400x, em 5 campos diferentes em 4 lâminas de cada grupo. A fluorescência das imagens digitalizadas foi analisada usando-se o software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.).

- **Determinação de TNF- α no modelo celular de Parkinson (SH-SY5Y) induzido com 6-OHDA**

As células SH-SY5Y (2×10^6 céls/poço) foram incubadas em microplacas de 96 poços por 24 horas em DMEM completo. Após este período as células foram incubadas (37°C, 24h; DMEM sem soro) da seguinte forma: a) controle (células); b) 6-OHDA (células+ 6-OHDA 1mM), c) 6-OHDA + CAPE (células + 6-OHDA 1mM + CAPE [100 μ M]; [10 μ M]; [1 μ M]) e d) CAPE [100 μ M]. Após esse período os sobrenadantes foram transferidos para outra microplaca e submetidos ao ensaio com o uso de kit comercial (Human TNF-alpha Instant ELISA – ebioscience, UK) seguindo-se as instruções do fabricante.

- **Determinação da atividade da Caspase 3**

As células SH-SY5Y (2×10^6 céls/poço) foram incubadas em microplacas de 96 poços por 24 horas em DMEM completo. Após este período as células foram incubadas (37°C, 24 h, DMEM sem soro) da seguinte forma: a) controle (células); b) 6-OHDA (células+ 6-OHDA 1mM), c) 6-OHDA + CAPE (células + 6-OHDA 1mM + CAPE [100 μ M]; [10 μ M]; [1 μ M]) e d) CAPE [100 μ M]. Após esse tempo foi utilizado o kit comercial Caspase-3 Cellular Activity Assay kit da (Calbiochem^R) seguindo-se as instruções do fabricante.

- **Lisado celular para ensaios de Western Blotting**

As células SH-SY5Y (2×10^6 céls/poço) foram incubadas em uma microplaca de 6 poços previamente recobertas com poli-D lisina, por 24 horas em DMEM completo. Após este período as células foram incubadas (37°C , 24 h, DMEM sem soro) da seguinte forma: a) controle (células); b) 6-OHDA (células+ 6-OHDA 1mM), c) 6-OHDA + CAPE (células + 6-OHDA 1mM + CAPE [$100\mu\text{M}$]; [$50\mu\text{M}$]; [$10\mu\text{M}$]; [$1\mu\text{M}$]) e d) CAPE [$100\mu\text{M}$]. Após esse período, o meio foi desprezado e as células foram lavadas (3 vezes) com PBS. Foram adicionados $600\mu\text{L}$ de tampão de lise (tampão Tris-HCl 50mM, dodecil sulfato de sódio, SDS 1%, 0,1% coquetel inibidor de proteases Sigma P8340). Após 10 minutos as células foram removidas dos poços com uso de “scrapers” e transferidas para tubos cônicos. Para complementar a lise celular as suspensões celulares foram submetidas à uma série de aspiração/descarga com seringas de 1ml acopladas a agulhas de 25G, 1,5”. Todos os procedimentos para lise celular foram realizados em banho de gelo para diminuir a atividade de proteases.

Os lisados foram transferidos para tubos tipo eppendorf e aquecidos a 94°C por 10 minutos, para desnaturação proteica e bloqueio por calor. Seguiu-se centrifugação ($75.590g$, 10 minutos, 4°C), os pellets foram desprezados e os sobrenadantes foram estocados à -70°C até o uso. A concentração de proteína do lisado celular foi determinada pelo método de Bradford.

- **Determinação de Bax e Caspase 3 por Western Blotting**

As placas de vidro (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) foram montadas de acordo com as instruções do fabricante. O gel de resolução foi preparado de acordo com a Tabela 1 abaixo. As soluções de APS e TEMED não foram colocadas até o final da montagem do gel, pois a polimerização ocorre com a adição destas soluções. A porcentagem de acrilamida do gel de resolução foi escolhida em função do peso molecular da proteína de interesse, o qual determina a separação eletroforética.

Ao final da montagem do gel, colocou-se o APS e o TEMED ao mesmo tempo e cobriu-se o aparato de vidro com água deionizada, aguardando-se a polimerização do gel por 45 minutos. O gel de empilhamento foi preparado como descrito na Tabela 2 sendo que o APS e o TEMED foram adicionados por último. Após a montagem desse gel, desprezou-se a água do aparato de vidro e colocou-se este segundo gel cuidadosamente evitando-se a

formação de bolhas. Um ‘pente’ de 10 poços foi colocado no gel e esperou-se por mais 45 minutos. Após a polimerização do gel de separação o pente foi retirado cuidadosamente.

As amostras (lisados celulares) foram diluídas (1:2, v:v) com tampão de carregamento e aquecidas por 3 - 5 minutos à 95°C. Após esse aquecimento, as amostras foram centrifugadas e armazenadas em banho de gelo.

O gel foi colocado na cuba eletroforética contendo 1,2 L de tampão de corrida e as amostras foram aplicadas nos 10 poços do gel.

Fechou-se a cuba e aplicou-se uma corrente de (30-35mA) até a marcação azul do tampão de carregamento (Laemli) atingir a parte inferior do gel. A voltagem foi de 200V e o tempo de corrida foi entre 1 a 3 horas. O gel foi checado a cada 30 minutos para determinar o final da corrida.

Para transferência foram usadas membranas de PVDF cortadas nas mesmas dimensões do gel e previamente mergulhadas em metanol por 2 minutos e em seguida, tampão de transferência por 10 minutos. Ao término deste tempo essas membranas foram colocadas em outro recipiente contendo tampão de transferência. Ao término da corrida eletroforética os géis foram removidos das placas de vidro, colocados sobre as membranas de PVDF e envolvidos por papel de filtro, formando assim, um “sanduíche”, o qual foi colocado em um aparato para transferência protéica, operando a 18-20V por 1-2 horas.

Terminada a transferência a membrana de PVDF foi colocada em um recipiente contendo tampão de lavagem TTBS (do inglês, Tween/Tris buffered saline). A membrana foi lavada 3 vezes e as proteínas transferidas foram marcadas com solução de Ponceau S. Após a confirmação da transferência proteica, o corante foi removido lavando-se a membrana com água.

A membrana foi então incubada (4°C, *overnight*, 100rpm), com uma solução contendo TTBS + 5% de leite desnatado (no caso da Bax) ou 5% de albumina bovina (no caso da caspase-3).

Tabela 1 - Preparação do gel de resolução

Gel de resolução	6%	7.5%	10%	12.5%	15%
30% de acrilamida	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
4xRGB	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10%SDS	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
H ₂ O	5.313	4.813	3.983	3.153	2.313
TEMED	12μl	12μl	12μl	12μl	12μl
10% APS	75μl	75μl	75μl	75μl	75μl



Maiores **Tamanho das proteínas** **Menores**

Tabela 2 - Preparação do gel de empilhamento

Gel de empilhamento	5%
30% acrilamida	660μl
4X SGB	1.25mL
10%SDS	50μl
H ₂ O	3.0mL
TEMED	6μl
10% APS	50μl

Incubação com os anticorpos primários e secundários e reação de quimiluminescência

Após o bloqueio com leite ou BSA, as membranas foram lavadas com TTBS (3 vezes, 5 minutos cada). As membranas foram incubadas (1 hora, 4°C) com os anticorpos primários anti-Bax (1:500) ou anti-caspase-3 (1:250), diluídos em TTBS + 1% de BSA (para caspase 3) e TTBS + 2.5% de leite desnatado (para Bax). Todos os anticorpos foram adquiridos da Sigma Aldrich, UK. As membranas foram então lavadas com TTBS (4 vezes, 5 minutos cada) e em seguida incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário conjugado com Horseradish peroxidase (HRP) diluído (1:1000) em TTBS + 1% de BSA ou 1% de leite desnatado. A membrana foi lavada com TTBS (3 vezes, 5 minutos cada), tratada com a mistura ECL (1:1) e colocada em caixa escura por 5 minutos. Por fim a membrana foi colocada entre dois filmes plásticos sobre uma placa cassete. A revelação foi feita em sala escura, sob luz infravermelha com a utilização de um filme de raio-x e uma máquina fotográfica. As membranas foram tratadas com tampão de *stripping* e submetidas à imunorreação com anticorpo primário para beta-actina (controle interno de carregamento) e os dados das demais proteínas foram normalizados pela beta-actina. A quantificação das bandas foi feita por densitometria ótica usando o Image J open source software (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014).

Avaliação da atividade antioxidante do CAPE em solução

Técnica de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR, “*Electron Spin Resonance*”).

A capacidade do CAPE de neutralizar o radical livre DPPH (difetil-picrilhidrazil) foi avaliada em uma série de soluções do CAPE (0-500µM) diluído em DMSO. As alíquotas da solução de DPPH (500µM, 40µL) foram adicionadas às soluções de CAPE (40µL) ou DMSO (40µL, referência) e foram transferidas para um tubo capilar, que foi selado e colocado dentro de um tubo de quartz padrão para ESR (com um diâmetro de 3mm). A ESR foi avaliada com um espectrômetro de Banda X (Jeol JES-FA200) operando com campo magnético central de 349mT, campo de varredura de 8MT, amplitude de 0.1mT, frequência 100kHz e potência 1mW.

Análise Estatística

Para determinação do nível de significância os grupos foram comparados da seguinte forma:

- OHDA x Controle ou MPP⁺ x Controle, para a validação dos modelos de Parkinson e comprovação dos efeitos neurotóxicos;
- OHDA+CAPE x OHDA ou MPP⁺+CAPE x MPP⁺, para avaliar a possível neuroproteção;
- CAPE x controle, para investigar um possível efeito intrínseco do CAPE, particularmente sobre a função mitocondrial.

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para análise estatística foi empregado teste Sminorff Komorov para determinar a normalidade e definir se os dados classificavam-se como paramétricos ou não paramétricos. Os dados não paramétricos foram tratados com o teste de Kruskal-Wallis e pós- teste de Dunn. Os dados paramétricos foram avaliados através do teste Student's T. Foram utilizados os programas "GraphPad Prism for Windows" (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA) e BioEstat versão 5.0. Foi adotado $p < 0,05$ como nível de significância.

“Não importa o que faremos de nós. O que importa é o que faremos daquilo que fizeram de nós”.

(Jean Paul Sartre)

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

Modelo Experimental A - mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos não tratados

Efeito do CAPE no intumescimento osmótico mitocondrial ou “swelling” (Figura 05)

Nas concentrações de $1\mu\text{M}$ ($0,0200 \pm 0,0017$) e $2\mu\text{M}$ ($0,0150 \pm 0,0020$), o CAPE reduziu de forma significativa o intumescimento osmótico mitocondrial quando comparado ao controle positivo ($0,0440 \pm 0,0030$).

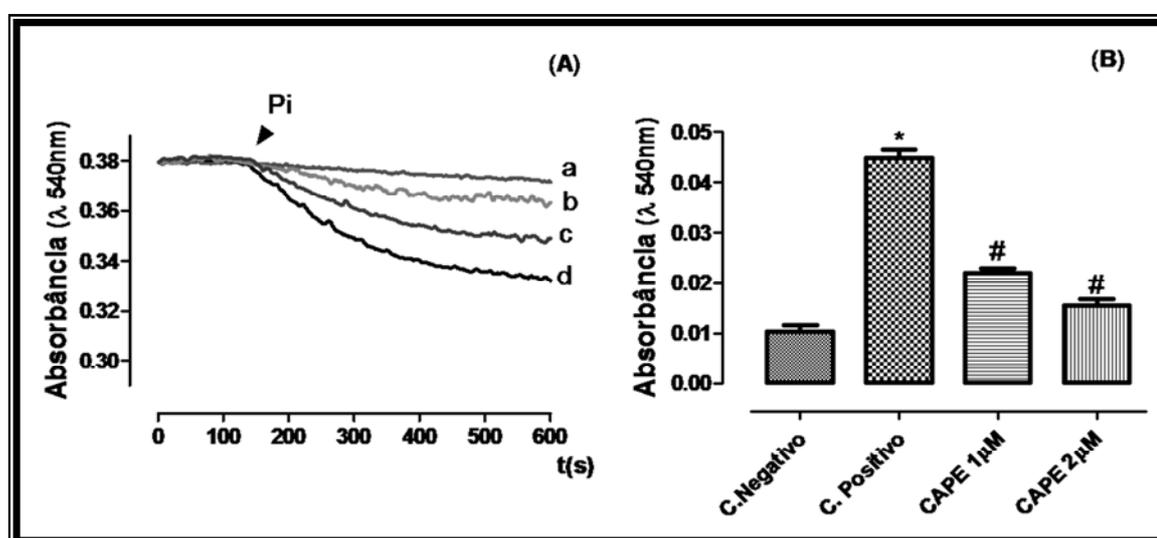


Figura 05. Inibição do Intumescimento Osmótico Mitocondrial pelo CAPE. O intumescimento osmótico mitocondrial foi induzido com fosfato inorgânico (exceto no controle negativo). Os ensaios foram realizados com mitocôndrias isoladas de cérebro de animais não tratados. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. **(A)** Monitoramento do decaimento da absorvância (540nm). Traçado representativo de três experimentos independentes realizados em triplicata. **(B)** Decaimento líquido da absorvância (t0s – t600s). Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao controle positivo. **a, controle negativo; b, CAPE $2\mu\text{M}$; c, CAPE $1\mu\text{M}$; d, controle positivo.** Pi, fosfato inorgânico. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao controle negativo; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao controle positivo.

Efeito do CAPE na captação de cálcio mitocondrial (Figura 06)

Nas concentrações de $1\mu\text{M}$ ($0,0169 \pm 0,0001$) e $2\mu\text{M}$ ($0,0175 \pm 0,0007$) o CAPE não alterou significativamente a homeostase mitocondrial do cálcio quando comparado ao controle ($0,0179 \pm 0,0014$).

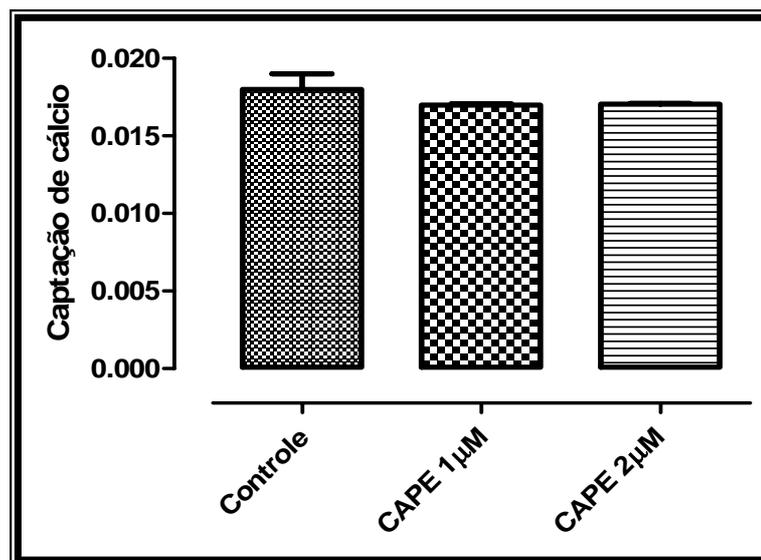


Figura 06. Efeito do CAPE na captação de cálcio mitocondrial. Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. Os ensaios foram realizados com mitocôndrias isoladas de cérebro de animais não tratados. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. Não houve diferença significativa em relação ao controle.

Efeito do CAPE na respiração mitocondrial (Figura 07)

O consumo de oxigênio mitocondrial foi afetado de maneira distinta por diferentes concentrações de CAPE. Em baixas concentrações (0,5 μ M, 1,0 μ M e 2 μ M) o CAPE não alterou o consumo de oxigênio no estado de 3 e no estado 4, e portanto o RCR manteve-se inalterado em comparação com o controle. Somente as maiores concentrações de CAPE (5 μ M e 10 μ M) causaram aumento no consumo de oxigênio no estado 4 em relação ao controle, provocando desacoplamento total da respiração, situação onde o consumo de oxigênio não tem correlação com a produção de ATP. O consumo de oxigênio no estado 3 foi significativamente reduzido somente pela maior concentração de CAPE (10 μ M). Apesar disso, devido ao aumento de consumo de oxigênio no estado 4, a razão RCR foi significativamente diminuída por ambas as concentrações de CAPE (5 e 10 μ M).

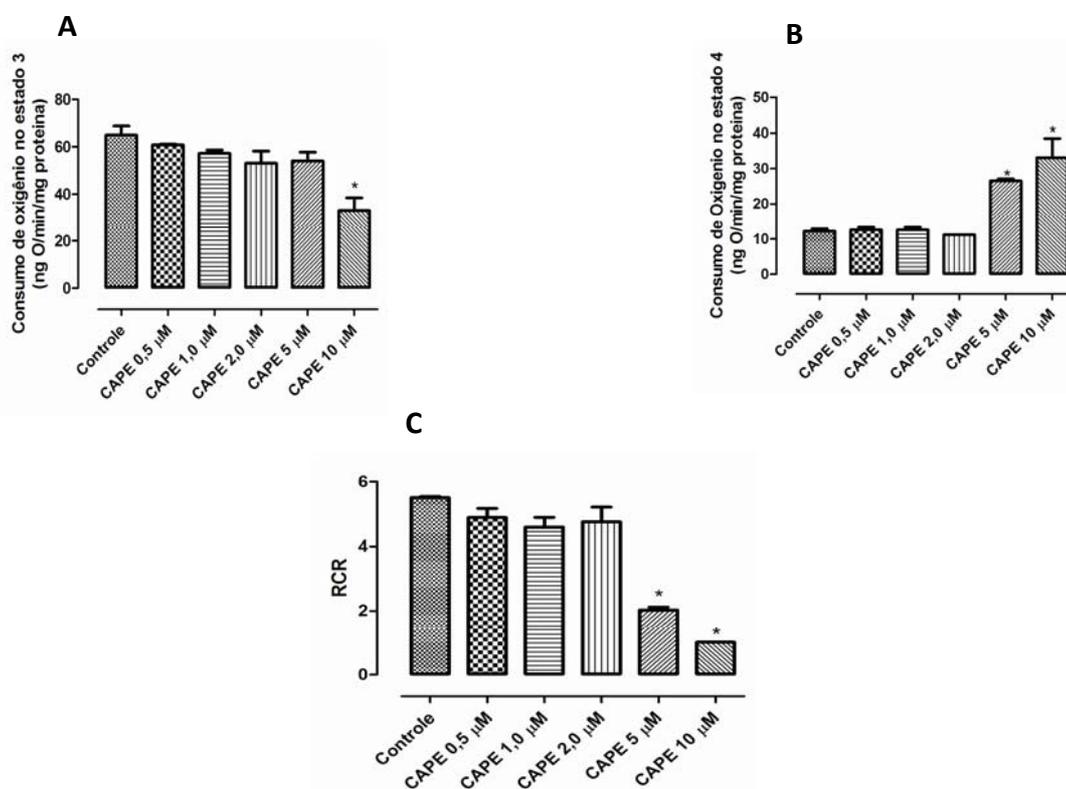


Figura 07. Efeito do CAPE no Consumo de O₂ Mitocondrial. (A) Estado III da respiração mitocondrial. (B) Estado IV da respiração mitocondrial. (C) Razão de Controle Respiratório (RCR). Dados apresentados como média ± SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. Os ensaios foram realizados com mitocôndrias isoladas de cérebro de animais não tratados. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Efeito do CAPE em solução na estabilização do radical livre DPPH – Técnica de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR) (Figura 08)

A ESR (Ressonância de Spin Eletrônica) mede spins eletrônicos desemparelhados presentes em líquidos ou sólidos (87). Esta técnica foi utilizada para monitorar o sinal produzido pelo radical livre DPPH na presença de concentrações crescentes de CAPE. A neutralização dos elétrons desemparelhados do DPPH pelo CAPE diminuiu a intensidade do sinal de ESR, demonstrando a ação antioxidante do CAPE. A avaliação do sinal de ESR gerado pelo DPPH mostrou o efeito exponencial da concentração do CAPE (0-500 μM) sobre a taxa de decaimento do sinal. A IC₅₀ do CAPE calculada utilizando os parâmetros encontrados por ajuste exponencial dos dados experimentais foi 111 μM.

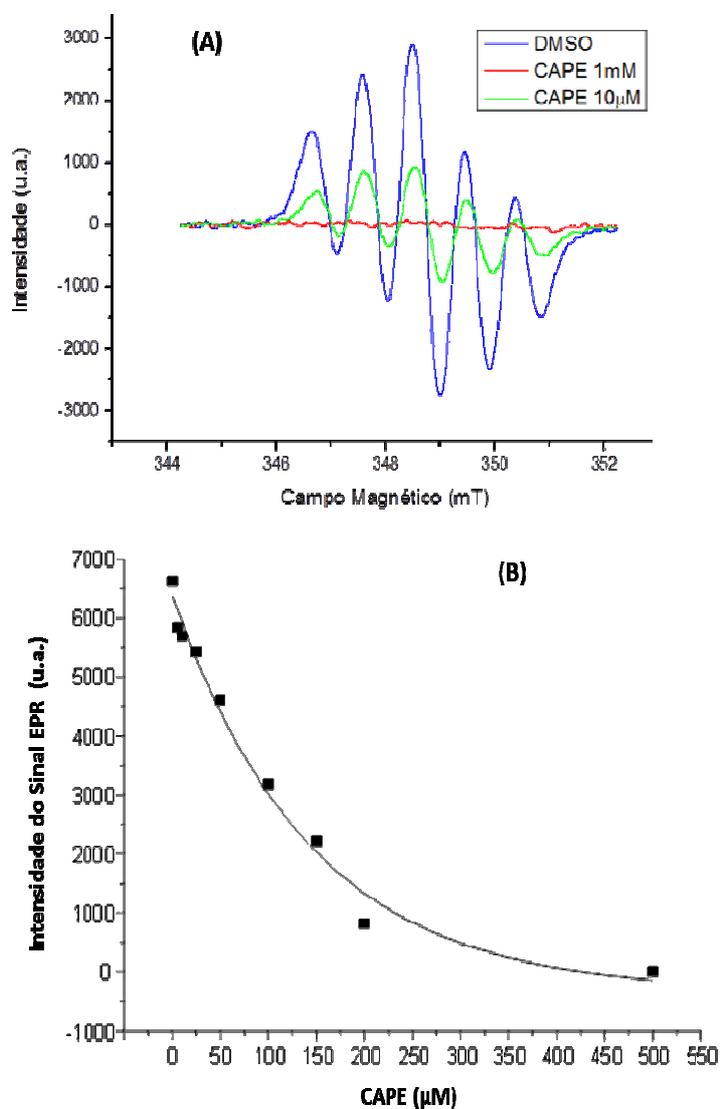


Figura 08. Neutralização do radical livre DPPH por diferentes concentrações do CAPE. (A) Intensidade do Sinal de ESR em diferentes campos magnéticos na presença de 10 μ M e de 1 mM de CAPE; (B) Efeitos de diferentes concentrações de CAPE (0-500 μ M) na intensidade do Sinal ESR em campo magnético de 349 mT (maior amplitude de sinal). ESR, Ressonância de Spin Eletrônico (do inglês, Electron Spin Resonance).

Modelo Experimental B - ratos tratados com 6-OHDA e CAPE

Efeitos da 6-OHDA e do CAPE no comportamento rotacional (Figura 09)

Os resultados mostram que a dose de 6-OHDA administrada causou uma redução dos movimentos contralaterais ($4,00 \pm 0,91$) e ipsilaterais ($14,00 \pm 1,91$) dos animais ao final de 60 minutos em relação ao grupo controle ($55,75 \pm 6,08$ e $56,25 \pm 6,06$, respectivamente). O grupo tratado com 6-OHDA \pm CAPE apresentou aumento significativo dos movimentos contralaterais ($55,75 \pm 2,66$) e ipsilaterais ($53,25 \pm 1,70$) em relação ao grupo 6-OHDA. Além disso, houve um aumento significativo da assimetria dos movimentos no grupo 6-OHDA ao final de 60 minutos, ou seja, aumento dos movimentos ipsilaterais ($14,00 \pm 1,91$) em relação aos movimentos contralaterais ($4,00 \pm 0,91$) do mesmo grupo. Esta assimetria não foi observada nos demais grupos.

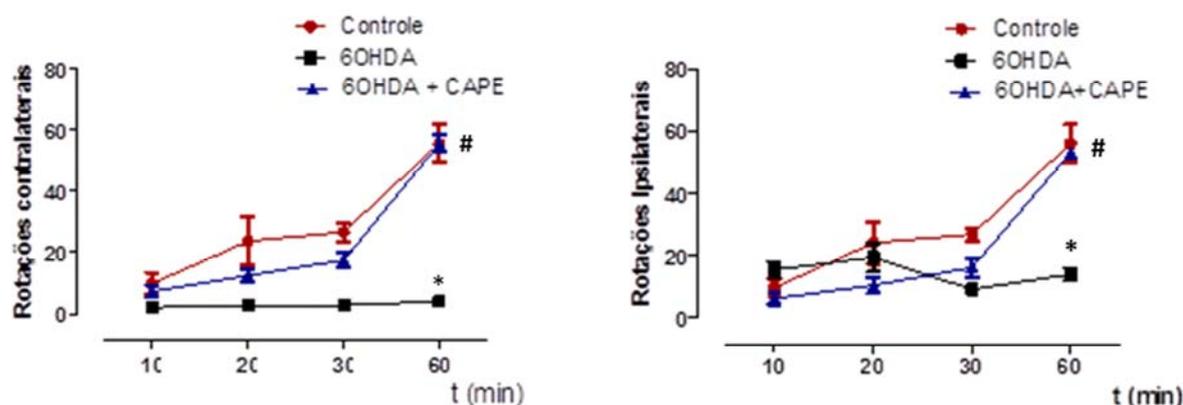


Figura 09. Avaliação Comportamental rotacional. (A) Número de movimentos contralaterais. **(B)** Número de movimentos ipsilaterais. Dados experimentais descritos em Materiais e Métodos. Dados apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA.

Efeitos da 6-OHDA e do CAPE na imunoreatividade da Tirosina-Hidroxilase na substância nigra e no estriado (Figura 10)

A injeção estereotóxica unilateral (lado direito) de 6OHDA induziu perda neuronal significativa na substância nigra e no estriado. As percentagens de células TH-positivas do grupo 6-OHDA foram $30,52 \pm 3,77\%$ na SNpc e $42,81 \pm 4,71\%$ no corpo estriado, ao passo que nos controles os percentuais foram respectivamente $91,51 \pm 4,58\%$ e $97,39 \pm 2,267\%$. O CAPE reduziu significativamente a perda neuronal em ambas as áreas; as porcentagens de células TH-positivas foram $72,76 \pm 4,30\%$ na SNpc e $73,75 \pm 6,25\%$ no estriado do grupo 6OHDA + CAPE.

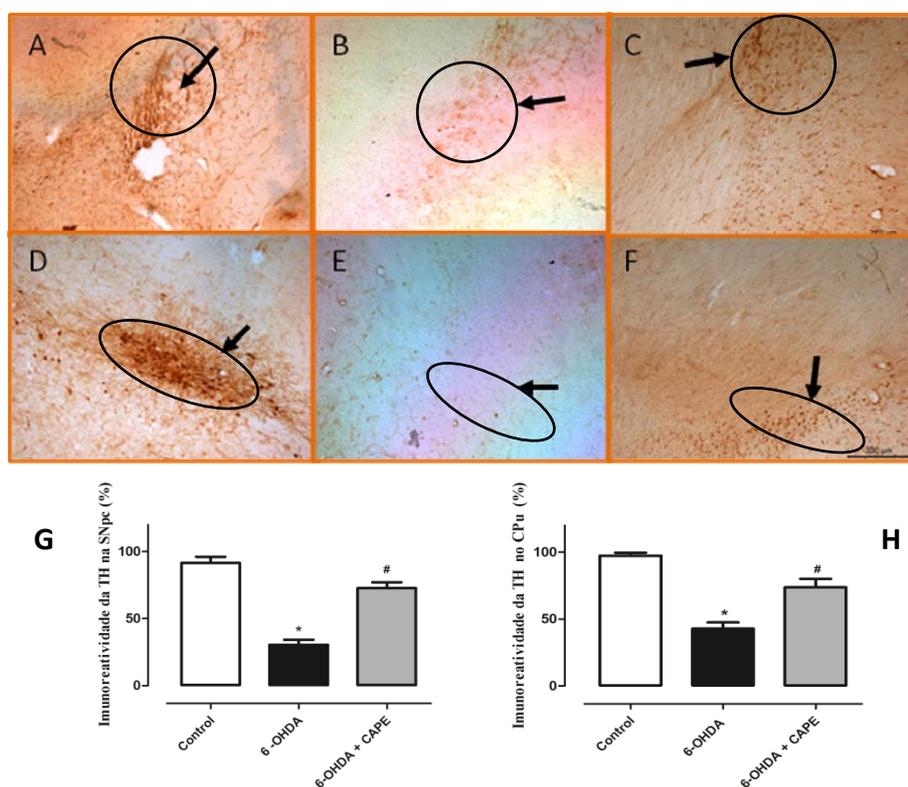


Figura 10. Marcação imunohistoquímica para TH na substância nigra e no estriado. Fotomicrografias (aumento 400x): (A) Controle (estriado), (B) 6-OHDA (estriado), (C) 6-OHDA+CAPE (estriado), (D) Controle (substância nigra) (E) 6-OHDA (substância nigra) (F) 6-OHDA+CAPE (substância nigra). (G) e (H) Percentual de marcação da TH na substância nigra e no estriado (CPu) respectivamente. Em (G) e (H) os dados foram apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA.

Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na concentração de metais na substância nigra e estriado (Figura 11)

As concentrações de Cu, Fe, Mn e Zn aumentaram significativamente no grupo 6-OHDA em comparação ao grupo controle. O Cu aumentou de 1.142 ng/g no controle para 1.705 ng/g no grupo 6-OHDA; o Fe aumentou de 9,253 ng/g para 15.132 ng/g; o Mn aumentou de 166 ng/g para 227 ng/g e o Zn aumentou de 9.705 ng/g para 14,177ng/g. As concentrações dos metais foram significativamente reduzidas no grupo 6OHDA+CAPE (Cu, 1.303 ng/g; Fe, 9.262 ng/g; Mn, 163 ng/g and Zn, 10.673 ng/g) em comparação ao grupo 6OHDA. A solução de 6-OHDA (8mg/mL) foi avaliada para presença de traços dos metais, e não foram detectados Cu, Zn, Mn ou Fe. Os limites de detecção do método são 0,02 µg/g para Cu, 0,5 µg/g para Fe, 0,0030 µg/g para Mn, e 0,1 µg/g para Zn.

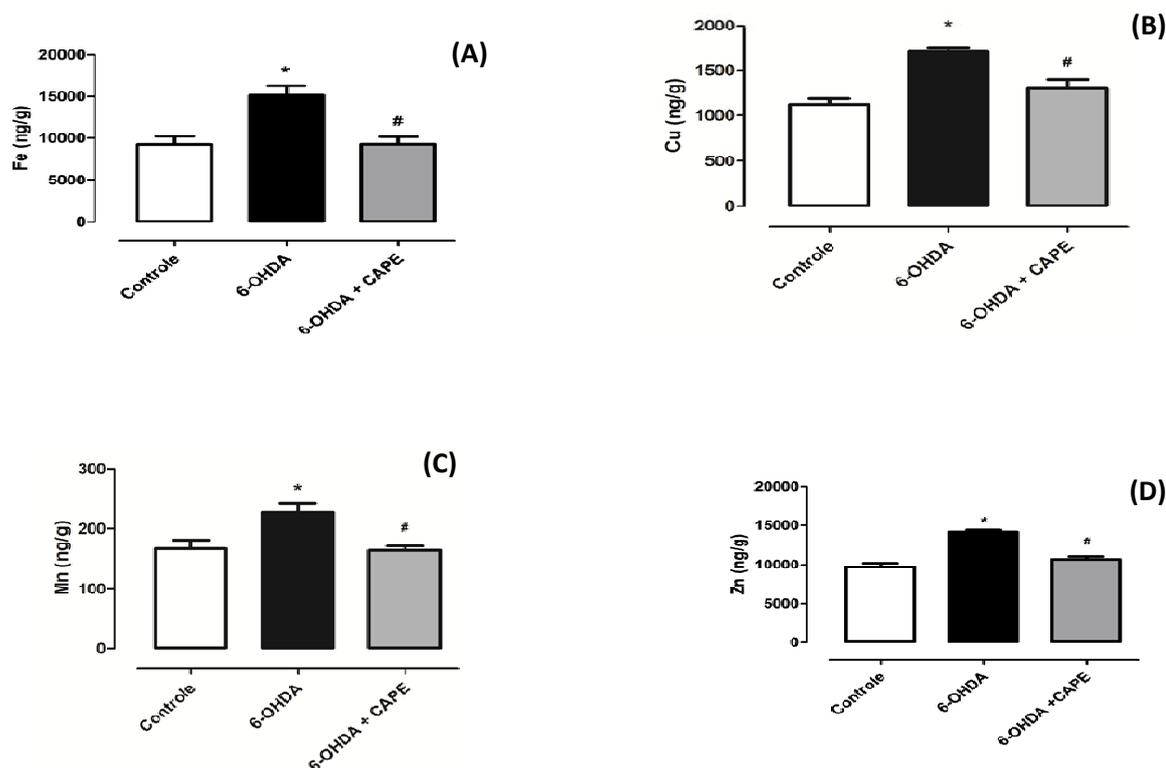


Figura 11. Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na concentração de metais na substância nigra + estriado (A) Concentração de ferro; **(B)** Concentração de cobre; **(C)** Concentração de manganês e **(D)** Concentração de zinco. Os dados foram apresentados como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA.

Efeitos CAPE e da 6-OHDA na produção de peróxido de hidrogênio no homogenato cerebral (Figura 12)

A intensidade de fluorescência do DCF, marcador de estresse oxidativo, diminuiu significativamente no grupo CAPE ($4,85 \pm 0,49$) em comparação ao grupo 6-OHDA ($11,89 \pm 0,53$), no qual houve aumento significativo quando comparado ao grupo controle ($4,93 \pm 0,56$).

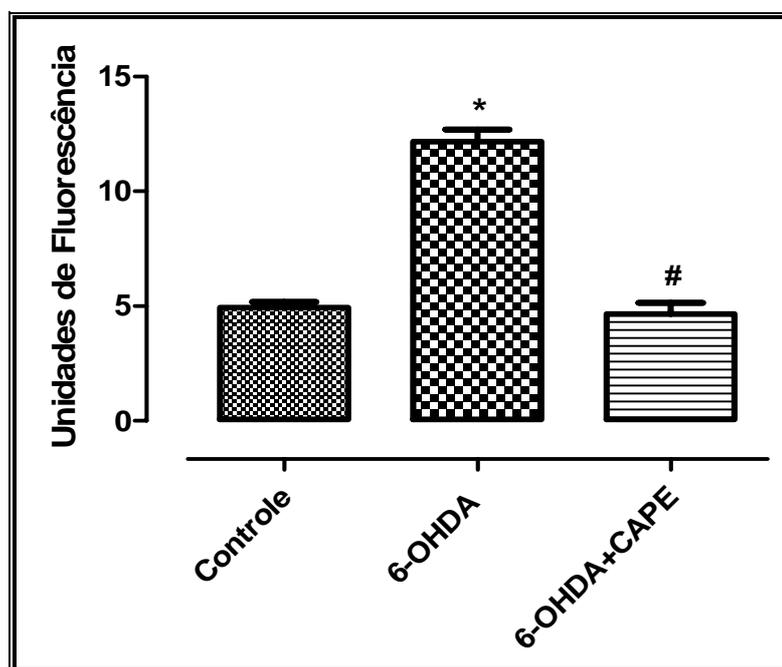


Figura 12. Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na produção de peróxido de hidrogênio no homogenato cerebral. Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA.

Modelo Experimental C - células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) tratadas com neurotoxinas

Curva dose-resposta - Determinação da EC₅₀ das neurotoxinas 6-OHDA e do MPP⁺ nas células SH-SY5Y – Atividade da LDH (Figura 13)

Os resultados das absorbâncias obtidas no ensaio de **viabilidade celular (atividade da LDH)** foram normalizados para o intervalo de 0-100% (morte celular) e as concentrações das neurotoxinas foram convertidas no respectivo logaritmo. Os valores de EC₅₀ (10,47 mM) foram calculados com base na equação: $Y=100/(1+10^{((\text{LogIC}_{50}-X)*\text{HillSlope})})$. Os valores de EC₅₀ encontrados foram: 10mM para o MPP⁺ e 1mM para a 6-OHDA. Com base nestes valores foram realizados os ensaios com células SH-SY5Y para estudo dos mecanismos envolvidos na neurotoxicidade e neuroproteção.

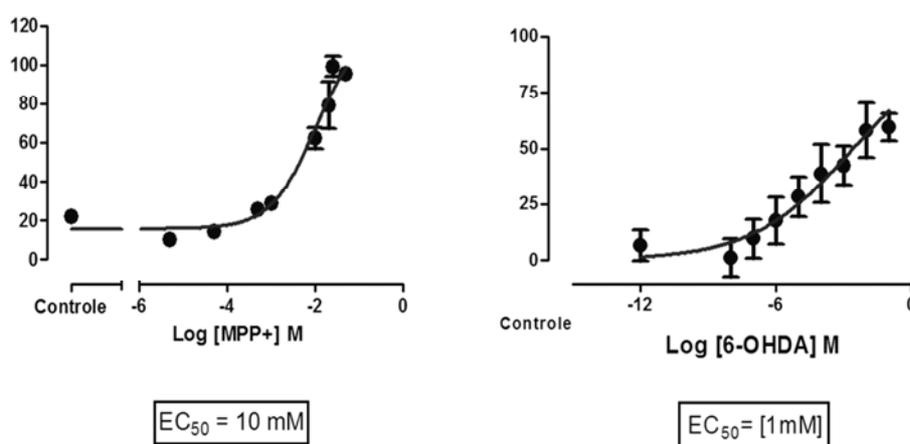


Figura 13 - Efeitos do MPP⁺ e 6-OHDA na viabilidade celular – Determinação da EC₅₀. Dados expressos como média ± SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos.

Efeitos do CAPE na viabilidade nos modelos celulares de Parkinson induzidos pelas EC50 das neurotoxinas (MPP⁺ 10 mM e 6-OHDA 1mM) (Figura 14)

Dentre as concentrações de CAPE avaliadas, somente as concentrações de 10 μ M e 100 μ M inibiram significativamente a morte celular quando comparadas aos respectivos modelos de neurotoxicidade. O CAPE aumentou significativamente a viabilidade celular para 73,39% \pm 3,851 (10 μ M) e 75,05% \pm 4,223 (100 μ M) quando comparado ao grupo MPP⁺ (47,04% \pm 1,368) e para 71,86% \pm 8,438 (10 μ M) e 75,46% \pm 3,037 (100 μ M) quando comparado ao grupo 6-OHDA (37,75% \pm 4,011).

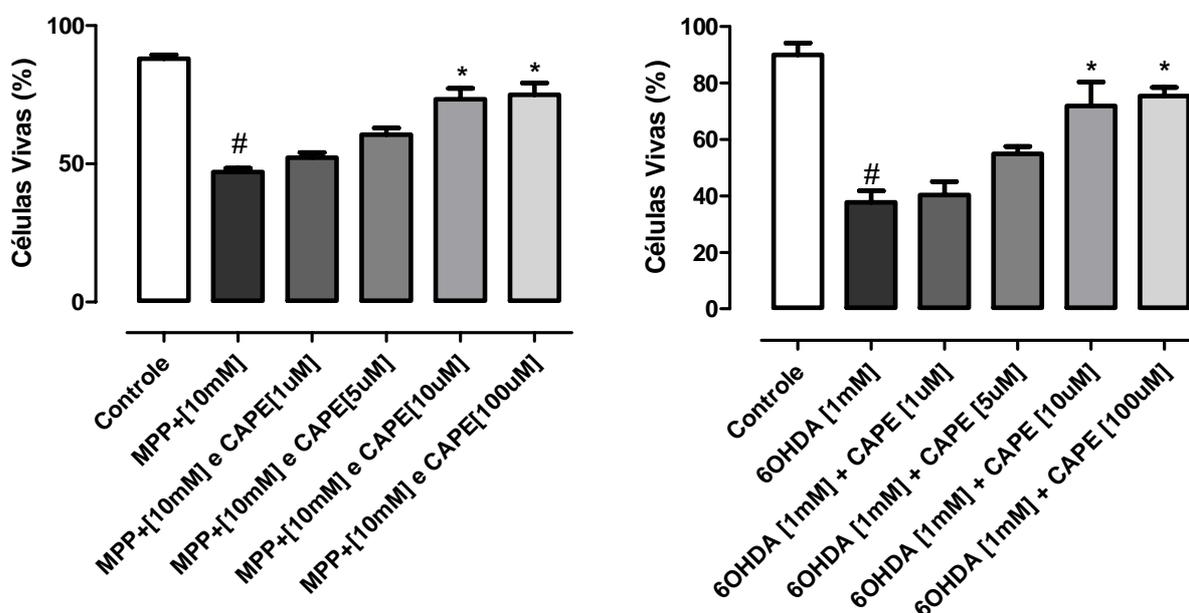


Figura 14 – Efeitos do CAPE na viabilidade das células SH-SY5Y tratadas com as EC50 das neurotoxinas MPP⁺ e 6OHDA. Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; *Significativo para $p < 0,05$ em relação aos grupos MPP⁺ ou 6-OHDA.

Efeitos do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA no TNF- α em células SH-SY5Y (Figura 15)

O grupo 6-OHDA apresentou concentrações significativamente aumentadas de TNF- α ($54,30 \pm 12,48$) em relação ao grupo controle ($11,89 \pm 0,70$). As concentrações de CAPE de $10\mu\text{M}$ e de $100\mu\text{M}$ reduziram significativamente a concentração de TNF- α ($14,12 \pm 3,146$ e $9,292 \pm 2,314$, respectivamente) em relação ao grupo 6-OHDA ($54,30 \pm 12,48$). Porém, a menor concentração de CAPE ($1\mu\text{M}$) não foi capaz de inibir significativamente o aumento do TNF- α ($45,25 \pm 3,29$) quando comparada ao grupo 6-OHDA ($54,30 \pm 12,48$).

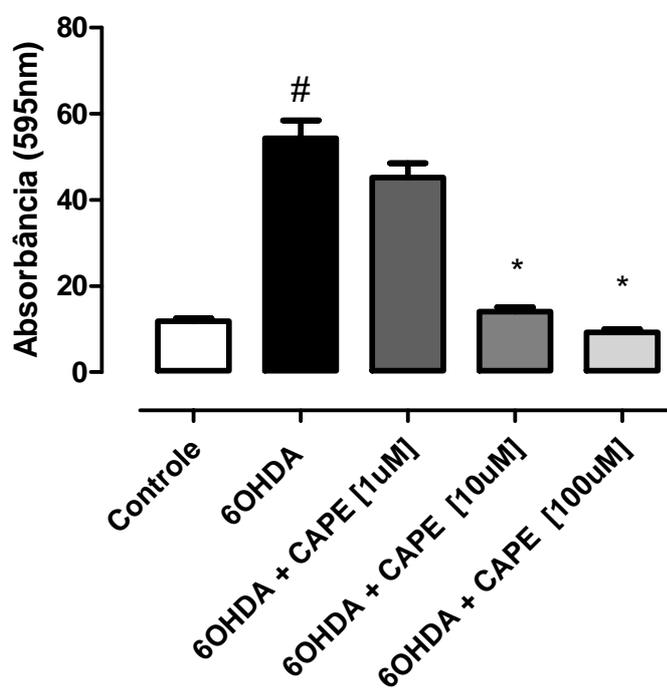


Figura 15. Efeitos do CAPE contra o aumento do TNF- α induzido pela 6-OHDA em SH-SY5Y. Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Efeitos do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA na ativação do NFkB, Ikk α e Ikk β em células SH-SY5Y (Figura 16)

O CAPE (10 μ M) inibiu significativamente a ativação das citocinas NF-kB, Ikk- α e Ikk- β induzidas pela neurotoxina 6-OHDA. Os valores encontrados no grupo CAPE (10 μ M) para NF-kB, Ikk- α e Ikk- β foram significativamente menores (**0,544 \pm 0,177**; **0,518 \pm 0,185** e **0,532 \pm 0,205**, respectivamente) do que no grupo 6-OHDA (**1,157 \pm 0,327**; **1,228 \pm 0,395** e **1,023 \pm 0,324**, respectivamente), que por sua vez foram significativamente maiores do que no grupo controle (**0,381 \pm 0,233**; **0,394 \pm 0,172** e **0,387 \pm 0,237** respectivamente). O CAPE por si só não alterou significativamente os valores de NF-kB, Ikk- α e Ikk- β em relação ao controle.

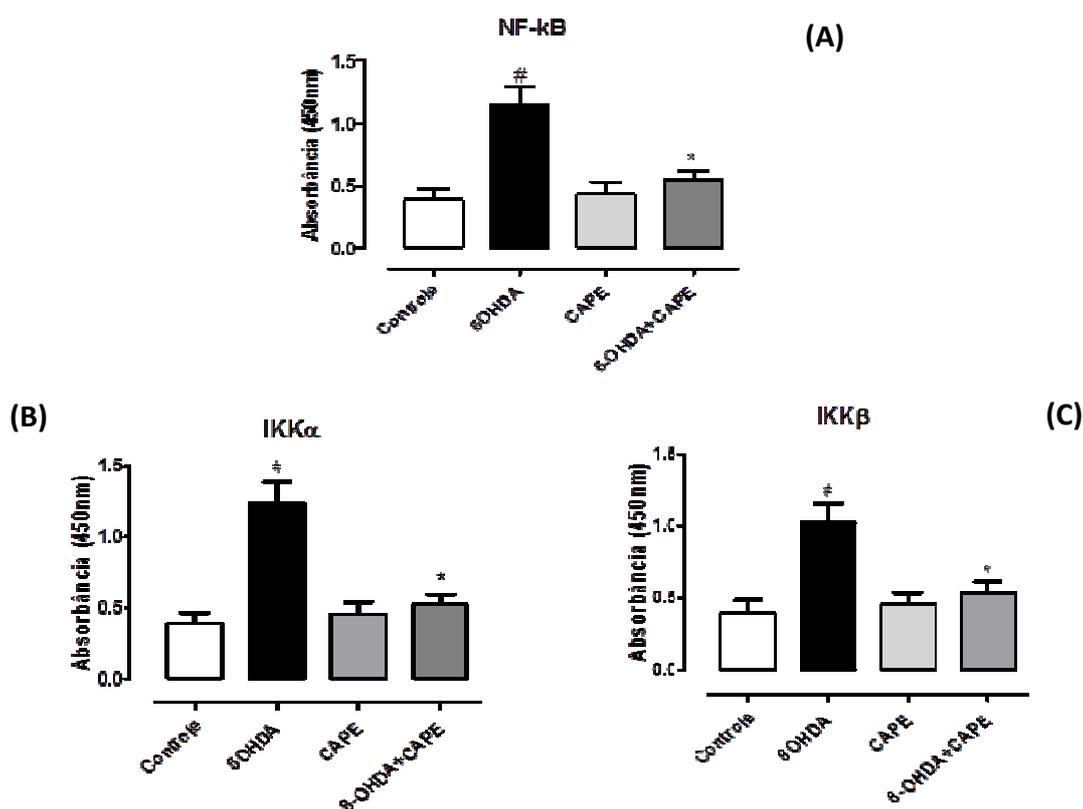


Figura 16 - Efeito do CAPE sobre a ativação do NF-kB, Ikk- α e Ikk β (Modelo de Parkinson *in-vitro* – SH-SY5Y). (A) NF-kB fosforilado. (B) Ikk- β fosforilado. (C) Ikk- α fosforilado. Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Efeito do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA na ativação da caspase-3 em células SH-SY5Y (Figura 17).

As concentrações de 10 μ M e 100 μ M de CAPE reduziram a ativação da caspase-3 ($7,42 \pm 0,42$ e $5,86 \pm 0,47$ respectivamente), em relação ao grupo 6-OHDA ($10,48 \pm 0,556$). A concentração de 1 μ M de CAPE não alterou significativamente a ativação da caspase-3 ($10,74 \pm 0,416$) em relação ao grupo 6-OHDA ($10,48 \pm 0,5562$). O CAPE por si só não alterou a ativação da caspase-3 quando comparado ao controle (Figura 17).

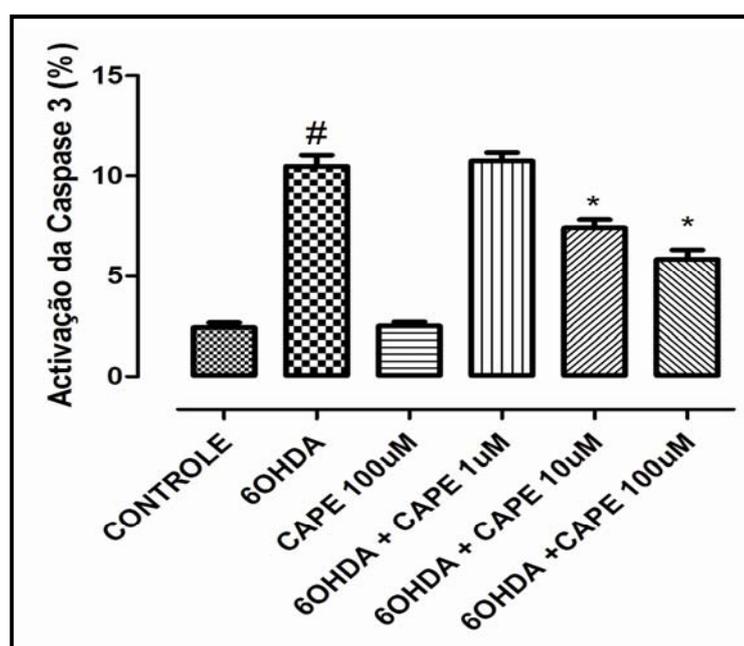


Figura 17 - Efeito do CAPE e da neurotoxina 6-OHDA na ativação da caspase-3 em células SH-SY5Y. Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA; # Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Bax e da caspase-3 em células SH-SY5Y (Figura 18)

O grupo 6-OHDA apresentou expressão significativamente aumentada de Bax ($35,09 \pm 2,28$) e caspase-3 ($44,70 \pm 4,15$) em relação ao grupo controle ($16,84 \pm 1,287$ e $8,234 \pm 1,790$, respectivamente). As concentrações de $10\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ de CAPE reduziram significativamente a expressão da Bax ($20,80 \pm 2,820$ e $18,53 \pm 2,577$ respectivamente) em relação ao grupo 6-OHDA ($35,09 \pm 2,277$). Da mesma forma, essas mesmas concentrações de CAPE reduziram a expressão da Caspase-3 ($24,14 \pm 2,696$ e $20,47 \pm 1,526$, respectivamente) em relação ao grupo 6-OHDA ($44,70 \pm 4,148$). Não houve diferenças significativas na expressão destas proteínas no grupo tratado com 6-OHDA + $1\mu\text{M}$ de CAPE em relação ao grupo 6-OHDA.

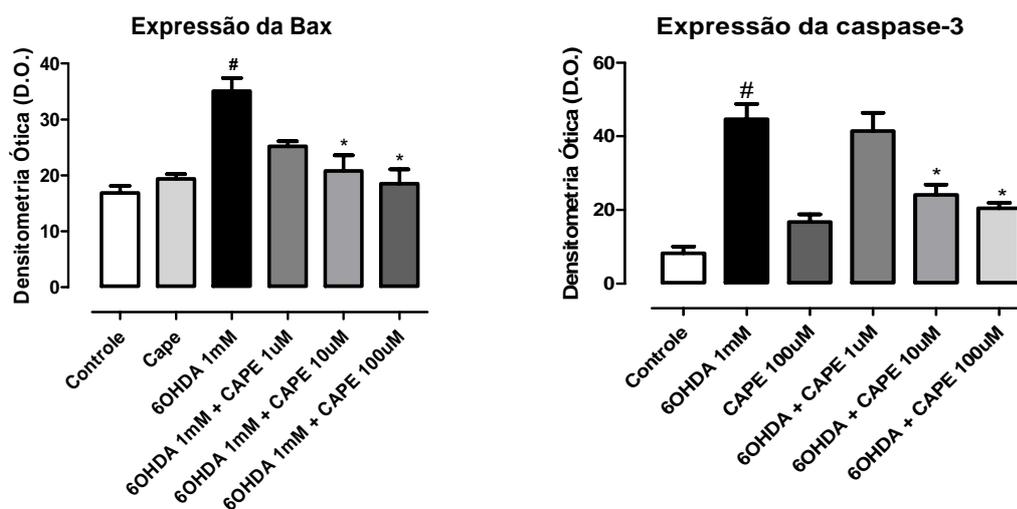


Figura 18 - Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão da BAX e da caspase-3 em células SH-SY5Y. Análise por Western Blot. Valores normalizados pela D.O. da β -actina. Dados expressos como média \pm SEM de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA; # Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão de conexina 43 em células SH-SY5Y – Técnica de Imunofluorescência por simples marcação

A neurotoxina 6-OHDA reduziu significativamente a expressão da Cx 43 (**34,98 ± 7,43**) em relação ao grupo controle (**60,05 ± 3,27**). As concentrações de CAPE de 10µM; 50µM e 100µM aumentaram significativamente a expressão de Conexina 43 (**63,34 ± 5,614**; **64,95 ± 10,44** e **62,98 ± 6,02**, respectivamente) em relação ao grupo 6OHDA (**34,98 ± 7,43**). Não foi observada correlação entre a concentração do CAPE e o efeito protetor (Figura 19 A,B).

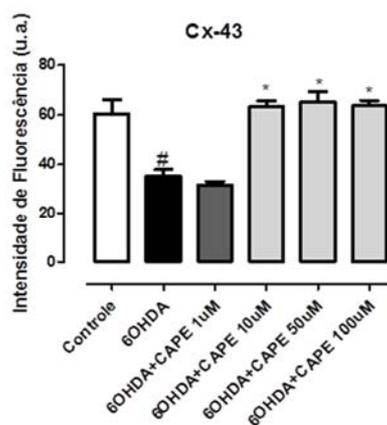
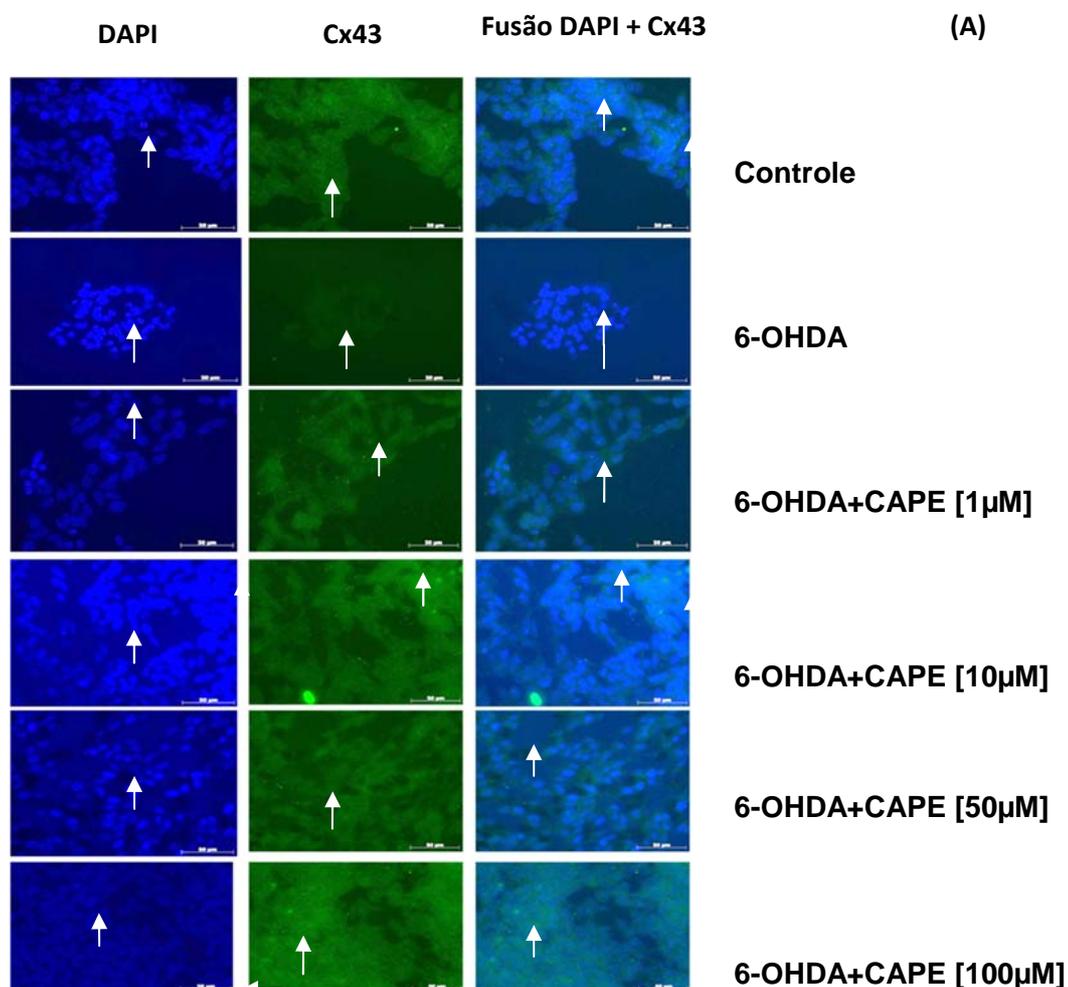
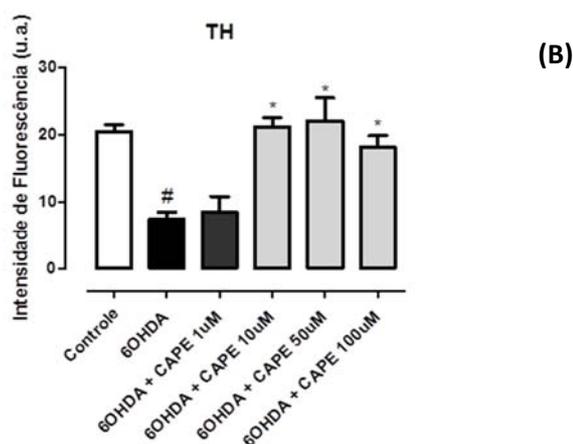
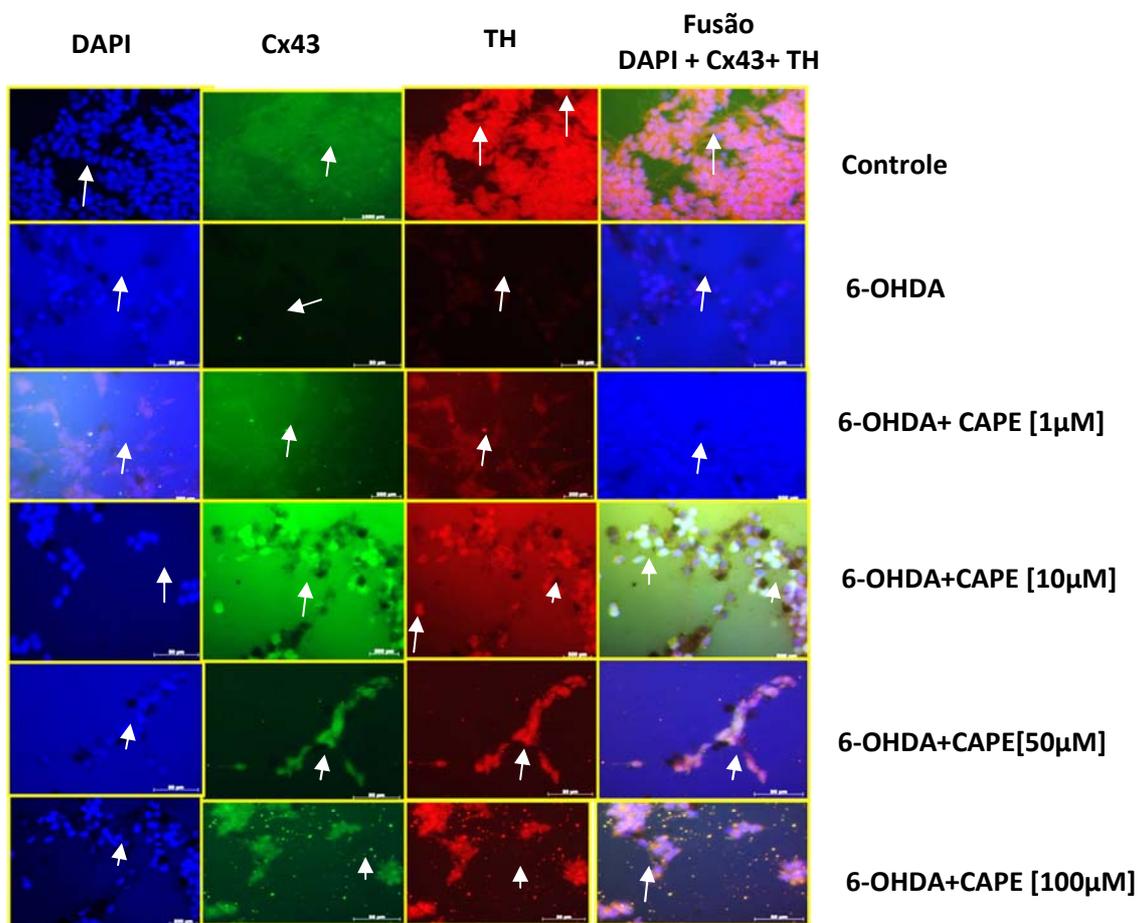


Figura 19 - Efeito do CAPE e da 6-OHDA na expressão de conexina 43 em células SH-SY5Y - (A) Fotomicrografias de simples marcação da conexina 43 por imunofluorescência. Em verde têm-se a Cx43 e em azul os núcleos celulares (marcação DAPI). As fotos foram obtidas em microscópio confocal Zeiss e analisadas no software ImageJ. **(B)** tem-se os dados expressos como média \pm SEM da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Tirosina hidroxilase (TH) em células SH-SY5Y– Técnica de imunofluorescência - dupla marcação para Cx43 e TH

A neurotoxina 6-OHDA reduziu significativamente a expressão da TH ($7,39 \pm 1,19$) em relação ao grupo controle ($20,42 \pm 1,08$). As concentrações de CAPE de $10\mu\text{M}$; $50\mu\text{M}$ e $100\mu\text{M}$ aumentaram significativamente a expressão da TH ($21,19 \pm 1,397$; $22,09 \pm 3,39$ e $18,16 \pm 1,71$, respectivamente) em relação ao grupo 6OHDA ($7,39 \pm 1,19$). Não foi observada correlação entre a concentração do CAPE e o efeito protetor (Figura 20 A, B).

(A)



(B)

Figura 20 - Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Cx43 e da Tirosina hidroxilase em células SH-SY5Y: Dupla marcação de imunofluorescência. (A) A Figura mostra a relação existente entre aumento da Cx43 (marcação em verde) e aumento da TH (marcação em vermelho). A co-localização das duas proteínas pode ser visualizada na fusão das imagens. Em (B) tem-se os dados expressos como média \pm SEM da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão do citocromo c (cit c) de células SH-SY5Y – Técnica de imunofluorescência - dupla marcação para Cx43 e cit c

A neurotoxina 6-OHDA aumentou significativamente a expressão do cit c (**26,63±1,196**) em relação ao grupo controle (**14,40 ± 2,47**). As concentrações de CAPE de 10µM; 50µM e 100µM reduziram significativamente a expressão do cit c (**10,68 ± 0,7749; 6,282 ± 0,5686; 4,149 ± 1,257**, respectivamente) em relação ao grupo 6OHDA (**26,63±1,196**). Foi observada correlação positiva entre a concentração do CAPE e o efeito protetor. O grupo tratado com 6-OHDA + 1µM de CAPE não apresentou diferença significativa em relação ao grupo induzido por 6-OHDA para nenhuma das proteínas analisadas (Figura 21 A, B).

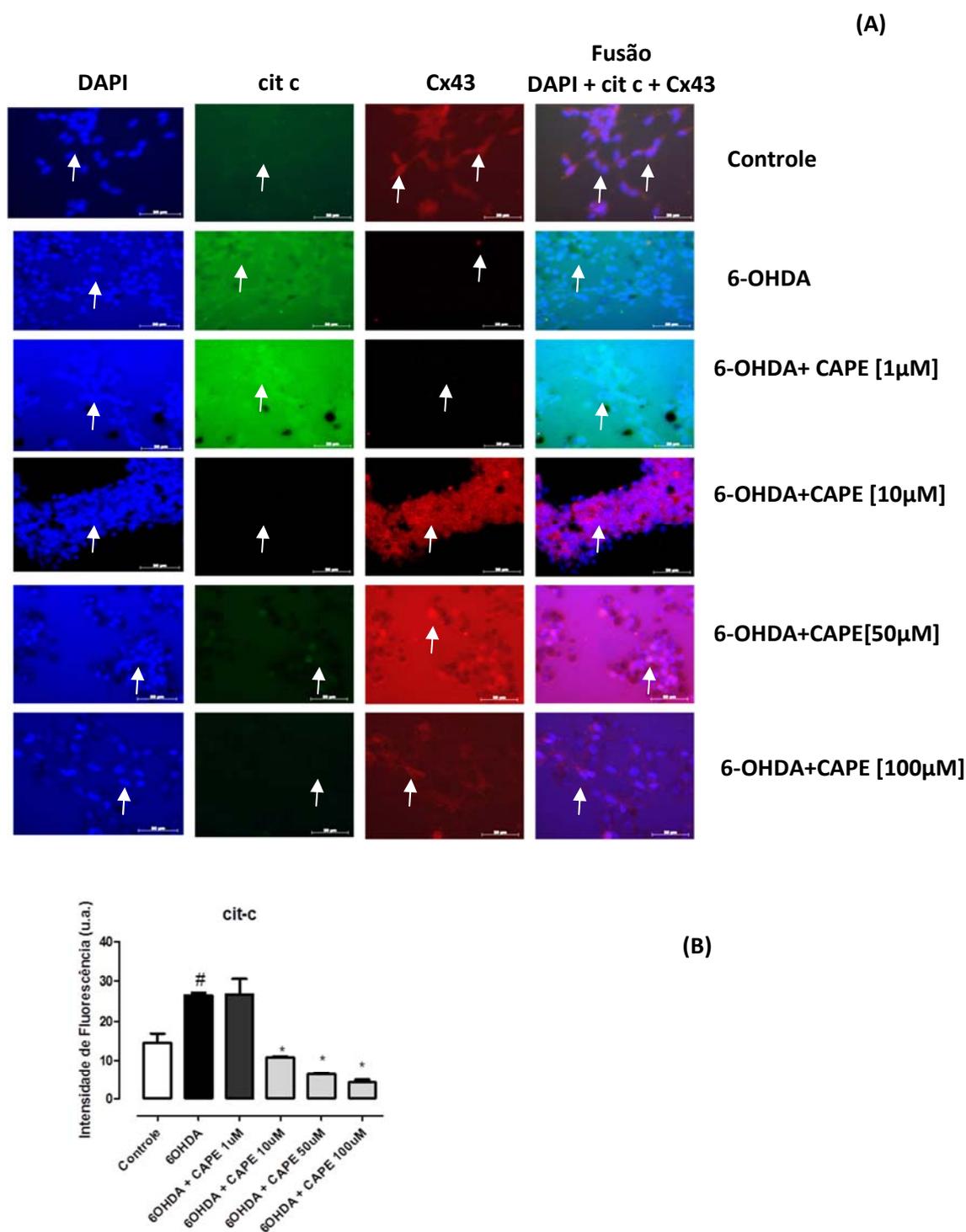


Figura 21 – Efeitos do CAPE e da 6-OHDA na expressão da Cx43 e do citocromo c em células SH-SY5Y. Dupla marcação de imunofluorescência: (A) A Figura mostra a relação existente entre aumento da Cx43 (marcação em vermelho) e redução da liberação do cit c (marcação em verde). A co-localização das duas proteínas pode ser visualizada na fusão das imagens. Em (B) tem-se os dados expressos como média \pm SEM da intensidade de fluorescência de três experimentos independentes feitos em triplicata. As condições experimentais foram descritas em Materiais e Métodos. *Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo 6-OHDA; #Significativo para $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

“É uma alegria estar escondido,
mas um desastre não ser
achado”

D. Winnicott

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo a avaliação do potencial neuroprotetor e dos mecanismos de neuroproteção do CAPE em modelos experimentais da doença de Parkinson. Foram realizados ensaios (i) *in vivo*, em ratos tratados com 6-OHDA; (ii) em mitocôndrias isoladas de cérebro de ratos não tratados e (iii) em células (SH-SY5Y) tratados com 6-OHDA ou MPP⁺. Adicionalmente foi empregada técnica de Ressonância de Spin Eletrônico ou ESR (do inglês, “*Electron Spin Resonance*”) para avaliação do potencial neutralizador de radicais livres do CAPE em solução. Sabe-se que injeções de 6-OHDA na substância nigra induzem lesões na via nigroestriatal que resultam na morte dos neurônios dopaminérgicos e que isso ocorre por mecanismo envolvendo estresse oxidativo (88). Estudos anteriores demonstraram que o CAPE é capaz de inibir a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA em modelos *in vitro* (72, 89); e, mais recentemente, um estudo mostrou que o CAPE também é capaz de proteger contra a perda neuronal dopaminérgica induzida pelo MPTP em camundongos (90). No presente estudo demonstramos que o CAPE protegeu contra a perda neuronal induzida pela 6-OHDA em ratos, achado inédito na literatura e recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa (91). Para validação do modelo de Parkinson *in vivo* foi realizada a avaliação comportamental rotatória dos animais. Embora não haja nenhuma ocorrência espontânea de Parkinsonismo em animais, vários modelos animais experimentais da DP simulam as mesmas características clínicas em animais. As técnicas que empregam neurotoxinas para lesão do sistema dopaminérgico (DA) nigroestriatal tem uma grande seletividade e reprodutibilidade. As neurotoxinas mais frequentemente utilizadas são o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), porém os ratos parecem ser refratários ao MPTP. Por essa razão, a 6-OHDA é utilizada para danificar a substância nigra em modelos com roedores, enquanto o MPTP é utilizado em modelos com macacos. Testes comportamentais de animais com lesão nigroestriatal representam métodos não invasivos valiosos para avaliar a influência do sistema dopaminérgico danificado na atividade locomotora, permitindo avaliar comparativamente os desequilíbrios de dopamina em ambos os hemisférios do modelo hemi-parkinsoniano em ratos (92, 93). A rotação é um dos testes mais utilizados na neurociência comportamental e tem por objetivo detectar alterações locomotoras e polarizações laterais principalmente em animais com lesões e depleções unilaterais de dopamina do feixe nigroestriatal, causadas pela 6-OHDA. Este modelo produz déficits comportamentais bem definidos e estáveis. Quando tratados com drogas estimulantes ou agonistas da dopamina, como por exemplo, a apomorfina (usada no presente estudo), ratos e camundongos giram vigorosamente em círculos, e alterações desses movimentos estão relacionadas à extensão da lesão e ao mecanismo de ação da droga no sistema dopaminérgico no cérebro do animal (85, 94). No presente estudo, o CAPE causou redução do déficit locomotor e da assimetria rotacional, ambos induzidos pela lesão unilateral no

grupo 6-OHDA. Estes resultados validam o modelo de Parkinson *in vivo* usado neste estudo e estão em linha com estudos anteriores que indicam que o CAPE é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer seus efeitos neuroprotetores no cérebro (45, 95). Além da avaliação comportamental, a validação do modelo *in vivo* também foi feita pela determinação imunohistoquímica de tirosina-hidroxilase (TH) no estriado e na substância nigra do tecido cerebral dos animais tratados. Foi observada maior marcação imunohistoquímica da TH não apenas na SNc mas, também no estriado. A neurodegeneração da via nigro-estriatal característica da DP resulta na perda dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra, na depleção de TH no estriado e SNc, na diminuição da produção de dopamina e, conseqüentemente, no déficit motor (96). A TH é a enzima inicial que promove uma reação limitante para a via de síntese das catecolaminas. Ela é considerada o principal regulador da biossíntese de dopamina no sistema nervoso central (1), pois cataliza a conversão do aminoácido tirosina em dihidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor da dopamina (1, 97). A L-DOPA, por sua vez, é convertida em dopamina pela ação da enzima aminoácido descarboxilase (AADC) (1), como esquematizado na **Figura 22**.

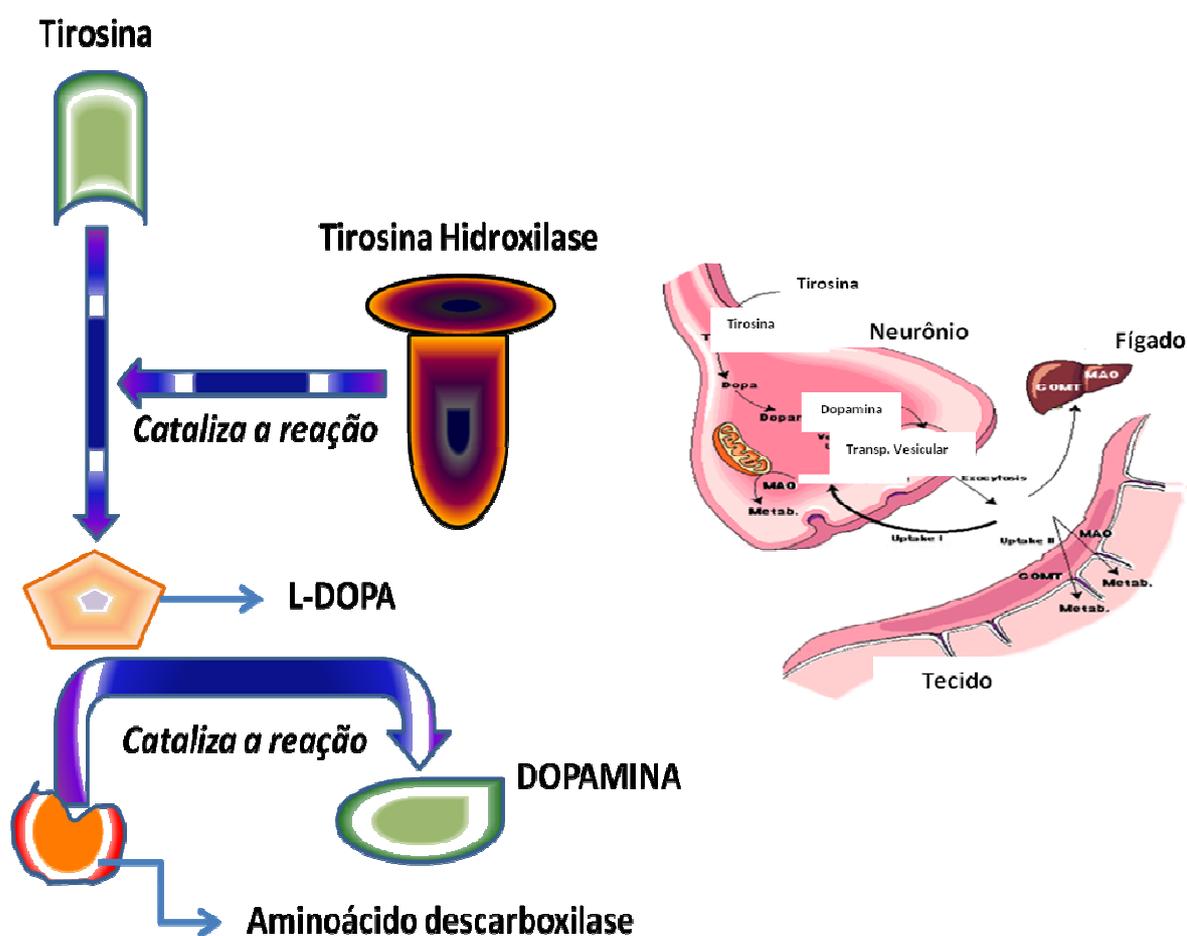


Figura 22. Síntese, liberação e recaptação de dopamina. (A) Síntese de dopamina através das reações catalizadas pela TH e pela aminoácido descarboxilase. (B) Liberação e recaptação de dopamina da fenda sináptica e processamento da dopamina no fígado. Adaptado de (1).

Estudos mostram que alterações na atividade da TH estão implicadas no desenvolvimento das formas idiopáticas de doenças como Esquizofrenia e Parkinson (1, 98). Assim, a marcação imunohistoquímica da TH é crucial para validar o modelo experimental e avaliar a proteção contra a perda neuronal dopaminérgica. Observamos em nosso modelo de Parkinson induzido por 6-OHDA, a diminuição significativa de TH em relação ao controle não tratado, sendo que a proteção exercida pelo CAPE ficou bem caracterizada na marcação histoquímica significativamente maior no tecido cerebral do grupo 6-OHDA+CAPE, o que dá suporte aos resultados dos testes comportamentais rotacionais. Essa proteção provavelmente está associada à menor perda dopaminérgica e consequentemente, manutenção dos níveis de dopamina, a qual atua no controle motor exercido pelo SNC. Esta proteção pode estar associada à ação antioxidante do CAPE, avaliada em nosso estudo pela determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no homogenato da substância nigra. Foi observado, neste teste, um aumento significativo dessa ERO no modelo de Parkinson induzido por 6-OHDA e uma significativa redução pela ação do CAPE. O aumento de ERO neste modelo é sustentado por estudos que mostram a produção de peróxido de hidrogênio através da degradação da dopamina pela monoaminoxidase (MAO) (99, 100). A oxidação enzimática da dopamina com formação de H_2O_2 leva a um aumento da glutatona oxidada (GSSG), estresse oxidativo e depleção do sistema antioxidante celular (100). Devido às altas concentrações de ferro na substância nigra, o H_2O_2 é convertido, pela reação de Fenton, no radical hidroxil (OH^\bullet), espécie altamente reativa que promove peroxidação lipídica (68, 100). Ao reduzir o peróxido de hidrogênio o CAPE reduz a formação do radical hidroxil e protege os neurônios dopaminérgicos da lesão oxidativa. O mecanismo pelo qual o CAPE promove a redução do H_2O_2 pode estar associado ao sequestro de outras espécies de oxigênio, como o radical superóxido, espécie precursora que é convertida em H_2O_2 pela ação da superóxido dismutase (68). Em linha com a redução do H_2O_2 , o potencial do CAPE para neutralizar radicais livres também foi demonstrado no ensaio de ressonância de spin eletrônico (ESR, Electron Spin Resonance), com o emprego do radical livre DPPH. Este ensaio avalia a habilidade do antioxidante de transferir elétron e/ou radical H e consequentemente estabilizar a espécie radicalar (DPPH) (101). Estudos anteriores demonstraram a atividade sequestradora de radicais livres do CAPE em solução etanólica por método colorimétrico (102, 103). A técnica de ESR permite a medição direta da concentração de radicais livres, com elevada sensibilidade, diferente do ensaio espectrofotométrico, que detecta a mudança de cor do DPPH, do violeta para amarelo escuro, quando reage com uma substância doadora de um átomo de hidrogênio. Esta transição de cores pode ser difícil de detectar por causa das amplas bandas de absorção óptica (102). Diferente dos estudos anteriores, realizamos o ensaio de ESR em DMSO

em vez de etanol, para simular a solução injetada in vivo. A IC₅₀ obtida em nosso estudo (111µM) foi diferente do valor encontrado em outro estudo (IC₅₀ = 13.2µM) que também empregou ESR (104). O maior valor de IC₅₀ obtido no nosso estudo pode ser devido ao solvente usado (DMSO) no ensaio. Solventes são fatores importantes nas reações antioxidantes, particularmente no caso de compostos fenólicos, como CAPE. A neutralização do radical livre DPPH ocorre mais facilmente em solventes que sejam bons aceptores de ligações de hidrogênio, tal como o etanol, que favorecem a perda de prótons do antioxidante, e, portanto, a transferência de elétrons a partir do antioxidante para o DPPH (81). Ainda com relação à atividade antioxidante do CAPE, também demonstramos o efeito do CAPE na quelação dos metais Fe²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ e Cu⁺. Alguns estudos mostram que o acúmulo de metais, como o ferro está associado a diferentes doenças neurodegenerativas, como: Parkinson (105-108), Esclerose Múltipla (109) e Alzheimer (105). Outro estudo também demonstrou a capacidade do CAPE de quelar metais como o Fe²⁺ (103), o que resulta na redução da formação do radical hidroxil (Hsiao et al., 2007) (110) e consequentemente reduz a ativação do NF-κB induzida pelo ferro (111, 112). O mecanismo de acúmulo de ferro na DP ainda não está claro, mas alterações na barreira hematoencefálica decorrente do processo inflamatório e aumento das proteínas transportadoras de ferro, como a transferrina, parecem estar envolvidos. O aumento da concentração de ferro na substância nigra leva à formação excessiva de ERO, pela reação de Fenton (Figura 23), contribuindo para a perda neuronal e sua diminuição está relacionada à proteção e sobrevivência neuronal (113).

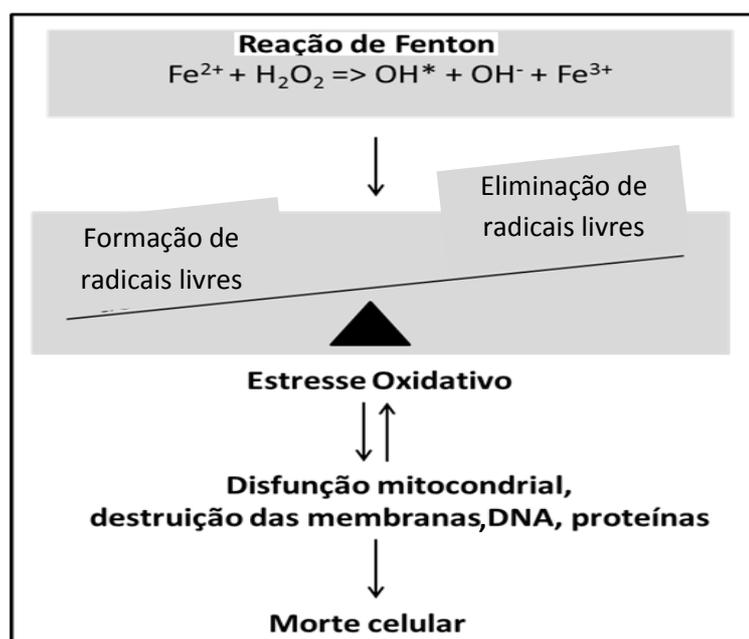


Figura 23 - Esquema simplificado do estresse oxidativo. Adaptado de (113).

Também já foi demonstrado que ocorre aumento na concentração de Zn^{2+} e redução na concentração de Cu^+ na substância nigra em modelos experimental de DP, enquanto o Mn^{2+} permanece inalterado (114). Entretanto, um estudo mostrou aumento da concentração de Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^+ e Fe^{2+} em todas as regiões da via dopaminérgica do cérebro de ratos tratados com 6-OHDA (115). Nosso estudo converge para esses últimos achados, ao mostrar que a concentração destes metais encontra-se significativamente aumentada tanto no estriado quanto na SNc dos animais tratados com 6-OHDA. Além disso, mostramos que a administração do CAPE reduziu significativamente a concentração desses quatro metais. Embora a habilidade quelante de metal do CAPE tenha sido demonstrada *in vitro* (103), nosso estudo é o primeiro a confirmar este evento *in-vivo*.

O mecanismo de neuroproteção do CAPE também está associado à inibição das vias mitocondriais de indução de morte celular. A redução da atividade da caspase 3, executor final da apoptose, que ocorre pela clivagem proteolítica resultante da liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, tem sido associada aos efeitos do CAPE (72, 89). Em nosso estudo, os ensaios com mitocôndrias isoladas tiveram por objetivo avaliar uma possível interferência do CAPE *per se* na função mitocondrial (captação de cálcio e respiração), bem como o seu potencial protetor contra o intumescimento osmótico, fenômeno relacionado à Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) que precede a ativação das vias apoptóticas (liberação do cit-c e ativação da caspase 3) da neurodegeneração (11). O CAPE inibiu o intumescimento mitocondrial induzido por cálcio/fosfato em mitocôndrias isoladas de cérebro de rato. O monitoramento do intumescimento mitocondrial dependente de cálcio é um ensaio clássico para avaliar a TPM (116-120). A CsA é um conhecido inibidor da TPM e foi usado em nosso ensaio para caracterizar este fenômeno (dados não mostrados). Estudos mostram que o intumescimento mitocondrial resulta de um processo de abertura de poros na membrana mitocondrial interna, o qual pode ser provocada pela ação das ERO ou pela elevação da concentração citosólica de Ca^{2+} . Esta abertura promove a entrada de íons e solutos com um peso molecular menor do que 1.500 Da (120, 121). Este fenômeno de formação da TPM tem sido associado a condições neurodegenerativas crônicas como DA, DP, DH e Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (122). Por esta razão a inibição da TPM tem sido sugerida como estratégia de neuroproteção (123). Neste contexto o CAPE é um agente neuroprotetor promissor por ser eficaz na inibição da TPM e, adicionalmente ser capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Além do estresse oxidativo, a TPM pode ser induzida por elevados níveis citoplasmáticos de cálcio (80, 124). Assim, um inibidor da TPM poderia atuar inibindo a captação do Ca^{2+} ou reduzindo os processos oxidativos. De acordo com nossos achados, o

CAPE não alterou a captação de cálcio pela mitocôndria, o que sugere que a inibição da TPM esteja relacionada apenas à sua capacidade antioxidante. Outro importante aspecto sobre os inibidores da TPM é que este efeito, em alguns casos está associado à redução das funções mitocondriais e, conseqüentemente, ao dano mitocondrial. O inibidor clássico da TPM, a CsA, por exemplo, causa uma disfunção mitocondrial neuronal e inibe a produção celular de energia (125). Em função disso, avaliamos os efeitos diretos do CAPE sobre a principal função mitocondrial, a respiração. As concentrações de CAPE que foram efetivas contra a TPM [1 μ M] e [2 μ M], não alteraram o consumo de oxigênio nos estados 3 e 4 da respiração mitocondrial e nem o RCR (Razão do Controle Respiratório). Apenas altas concentrações de CAPE [5 μ M] e [10 μ M] foram capazes de aumentar o consumo de oxigênio no estado 4 e reduzir no estado 3; reduzindo o RCR. O estado 4 caracteriza a respiração mitocondrial após o substrato ADP ter sido consumido e o consumo de oxigênio aumentado nesta fase caracteriza o desacoplamento mitocondrial, com comprometimento da produção de ATP. A concentração de 10 μ M provocou desacoplamento completo (RCR=1). Outro estudo relatou o desacoplamento completo em mitocôndrias de fígado de rato causado por 50 μ M de CAPE (126). Entretanto, é importante ressaltar que o desacoplamento mitocondrial foi observado apenas no ensaio com mitocôndrias isoladas e com altas concentrações de CAPE.

Nosso estudo também mostrou que o CAPE melhorou a viabilidade das células SH-SY5Y tratadas com as neurotoxinas MPP⁺ ou 6-OHDA. Um estudo demonstrou o aumento de viabilidade celular na presença de 10 μ M de CAPE em neurônios mesencefálicos rostrais de rato (RMN) e em neurônios granulares cerebelares (CGN) tratados com 6OHDA (72). Nosso estudo demonstrou efeito similar nas células de neuroblastoma humano (SHSY5Y). Outro estudo demonstrou que o CAPE induziu o NGF e o receptor de neurotrofina p75 (p75NRT) e foi observada uma relação diretamente proporcional ao tempo e à concentração (127). O receptor p75 interage com diferentes ligantes, participa em múltiplas vias de sinalização e regula diferentes funções. A interação do NGF com o p75NRT tem sido associada à morte e sobrevivência neuronal, sendo que o balanço desses efeitos opostos é importante no desenvolvimento, manutenção e regeneração do SNC (128). O mecanismo protetor do CAPE também tem sido associado à ação imunomodulatória e anti-inflamatória. O CAPE inibe os sistemas xantina/xantina oxidase e lipoxigenase, além de inibir a atividade da cicloxigenase, bem como o fator NF-kB (68). O CAPE é sabidamente um inibidor do NF-kB (129) e também demonstramos este efeito em nosso modelo celular. Porém, também observamos que o CAPE inibiu a fosforilação dos inibidores desse fator de transcrição nuclear (Ik κ e o IkK β), possivelmente bloqueando a degradação dos mesmos via sistema ubiquitina-

proteossoma. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar o efeito do CAPE nos mecanismos de fosforilação destes inibidores endógenos do NF- κ B. Não se sabe qual o mecanismo molecular do CAPE para promover essa inibição da fosforilação do I κ B α e I κ B β . Entretanto, uma possível hipótese é a redução de ERO (que leva à redução da fosforilação), além da redução da liberação do TNF- α pela inibição específica do NF- κ B. Independentemente de como ocorrem esses bloqueios, essas inibições favoreceram a não ativação e não translocação do NF- κ B do citosol ao núcleo, inibindo o processo inflamatório. Esse resultado de nosso estudo (inibição da ativação do NF- κ B) condiz com vários outros estudos (129-132); entretanto, este é o primeiro trabalho que aborda este efeito neste modelo celular (SH-SY5Y tratadas com a neurotoxina dopaminérgica 6-OHDA). Adicionalmente, o CAPE também reduziu a produção do TNF- α induzida pela 6-OHDA. Estudos mostram que o NF- κ B é capaz de levar ao aumento na produção de TNF- α e esta citocina pode levar, através das vias de transdução de sinais, ao aumento da ativação do NF- κ B, formando uma alça amplificadora do sinal (133-135). Concomitantemente a isto o TNF- α pode-se ligar a dois receptores, o TNFR1 e o TNFR2 e; com isso desencadear respostas distintas (3), como ilustrado na Figura 24.

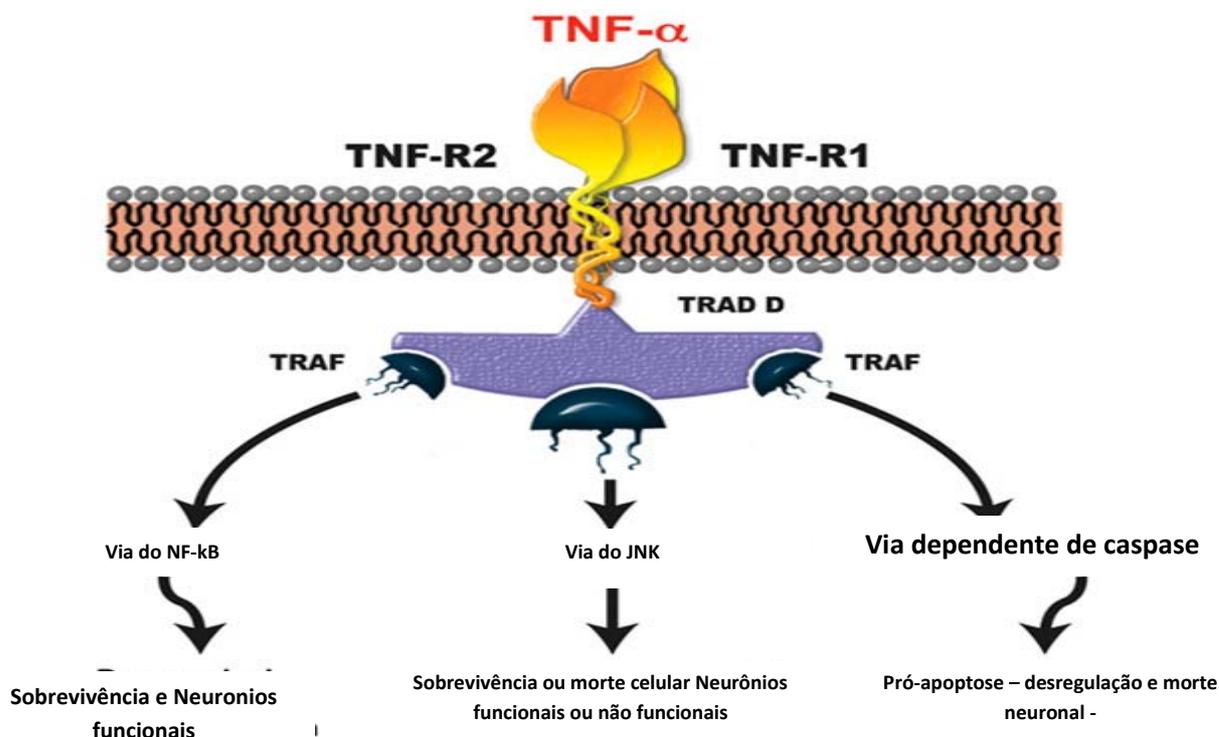


Figura 24– Esquema simplificado do mecanismo de transdução de sinal do TNF- α através da ligação em diferentes receptores (TNFR1 e TNFR2). A ativação do NF- κ B pode levar a efeitos benéficos; a ativação da via JNK pode levar a efeitos benéficos ou danosos, enquanto a ativação das caspases via TRADD leva à morte celular (apoptose). Adaptado de (3). TRADD, do inglês: “TNF- α receptor-associated death domain”; TRAF, do inglês: “TNF Receptor Associated family of proteins”.

O TNF- α é sintetizado como uma proteína de membrana monomérica do tipo 2 (tm TNF- α) inserida dentro da membrana como um homotrímero, o qual é clivado por uma metaloprotease conversora de TNF- α (ADAM-17). Esta clivagem leva à formação de um trímero solúvel de 51kDa (3). Ambas as formas de TNF- α (solúvel e ligada à membrana) são sintetizadas no SNC, na microglia, astrócitos e em algumas populações neuronais (136, 137). Estudos mostram que altos níveis de TNF- α podem ligar-se ao receptor de TNF- α do tipo 1 (TNFR1 ou p55TNFR), associado à morte celular programada através das vias dependentes de caspase 1 e 3, receptor este que tem sido encontrado em neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP (3, 138, 139). Por outro lado, a ligação preferencial desta proteína ao receptor de TNF- α do tipo 2 pode levar à sobrevivência celular (por uma ativação moderada do NF-kB) ou ao aumento da morte celular via ativação da Janus Quinase (JNK), existindo um ajuste fino entre estas duas vias (3). Dessa forma existem duas vias preferenciais de morte e uma de sobrevivência. Nosso estudo mostrou que o CAPE levou concomitantemente à inibição do NF-kB, e à redução do TNF- α , o que resultaria na redução do processo inflamatório e da possibilidade de ligação desta proteína ao receptor do tipo 1. As células dopaminérgicas são ricas no receptor de TNF- α do tipo 1 (3), e supostamente, mais susceptíveis a morte por apoptose em decorrência da elevação do TNF- α , considerando-se a alta afinidade do TNF- α ao receptor do tipo 1. Independentemente do mecanismo pelo qual o CAPE reduz a produção de TNF- α , nosso estudo mostrou, pela primeira vez, este efeito nesse modelo celular, associando-o à inibição da caspase 8 (via apoptótica extrínseca) e da executora final (ativação da procaspase 3 em caspase 3). A redução da ativação destas caspases foi acompanhada da redução na liberação do citocromo c. A associação destes mecanismos apoptóticos ao TNF- α e à neuroinflamação presente nas doenças neurodegenerativas é sustentada por outro estudo (3). As caspases são proteases que levam à proteólise extensiva e irreversível. Essas proteases existem na forma de zimógenos (pró-caspase) na maioria das células animais e sua ativação depende de uma resposta intracelular que leva à sua clivagem, resultando em dano ao DNA, proteínas, e membranas celulares (53). O CAPE reduz a ativação da pró-caspase 3 por mecanismo que provavelmente envolve a inibição do NF-kB redução da síntese e liberação do TNF- α . A caspase-3 é a executora final de ambas as vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca (3), e cuja não ativação está associada à sobrevivência celular e, no caso, proteção contra a perda celular induzida por 6-OHDA. Outra forma de ativação da cascata de caspases e, conseqüentemente da morte celular por apoptose, é a liberação do citocromo c (140-142). Nosso estudo mostrou que o CAPE foi capaz de inibir significativamente a liberação do cit-c. O mecanismo responsável por este efeito provavelmente envolve sua atividade antioxidante e

inibição da formação da TPM, evento que precede a liberação do citocromo c (11). Também observamos que o CAPE promoveu aumento significativo da expressão da conexina 43. Não há na literatura dados relativos aos mecanismos pelos quais o CAPE altera a expressão de conexina 43 e se esta alteração estaria associada à liberação do citocromo c. No entanto, a atividade anti-inflamatória do CAPE (90, 132, 143) poderia estar associada ao aumento da expressão das conexinas. Alguns estudos corroboram esta hipótese ao mostrar que a inflamação pode reduzir a expressão e/ou função das conexinas (144-146). Adicionalmente, outro estudo demonstrou a localização da Cx-43 na membrana mitocondrial interna (Figura 25), associada à bomba de K^+ ATPase mitocondrial (mitoK ATP) (2). Quando este canal de K^+ ATPase está ativo, ocorre inibição da TPM, inibição da liberação do cit-c e, conseqüentemente, inibição da apoptose (2). A ativação desse canal se dá pela atividade da Proteína Quinase Cε (PKCε), que atua diretamente nos Canais Aniônicos Dependentes de Voltagem (VDAC), promovendo a homeostase iônica e o transporte dos ANT (Adenosina Nucleotídeo Translocase) no interior da mitocôndria (2).

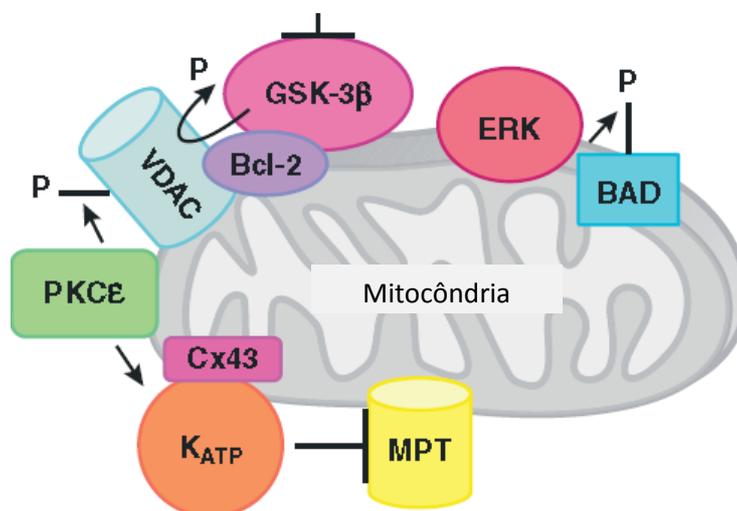


Figura 25 - Esquema representando a localização da Cx43 na mitocôndria e sua função na inibição da TPM. A redução da Cx43 poderia levar a uma alteração na homeostase iônica, mudança no potencial de membrana mitocondrial e liberação do cit c. Adaptado de (2).

Um complexo mitocondrial que compreende o VDAC (membrana externa), a ANT (membrana interna) e ciclofilina-D (matriz) se forma nos sítios de contato entre as membranas mitocondriais interna e externa. Em condições patológicas, este complexo mitocondrial sofre alterações conformacionais, formando poros de transição, que se abrem de forma transiente, permitindo a permeação livre de solutos de baixo PM através da membrana interna, fenômeno

conhecido como TPM. Além disso, as mitocôndrias são os principais locais de ação da Bax, proteína pró-apoptótica pertencente à família Bcl-2 (proteínas pró- e anti-apoptóticas). Estas proteínas controlam um circuito de amplificação mitocondrial na via de sinalização de apoptose, em que o citocromo c e outras proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar mitocondrial são liberadas para o citosol. As mitocôndrias podem ser recrutadas para a via de sinalização apoptótica, pela Bax, que se transloca do citoplasma para a membrana mitocondrial externa. A Bax induz a liberação do fator de indução de apoptose (AIF), procaspase-9, citocromo c (cit c) e outras proteínas do espaço intermembranas para o citosol. O citocromo c liga-se à proteína adaptadora Apaf-1, a qual é capaz de se ligar às procaspases-9 e -8, que são assim clivadas em suas formas ativas (147). Foi demonstrado que o silenciamento de genes para Bax, bem como a administração de inibidores farmacológicos da Bax conferem neuroproteção em modelos de isquemia cerebral em ratos (140). Nosso estudo demonstrou que o CAPE diminuiu a expressão da Bax e aumentou a expressão da Cx43, inibindo a liberação do cit c e conseqüentemente a apoptose (caspase-3) induzida pela neurotoxina 6-OHDA nas células SH-SY5Y. Além disso, observamos que o aumento da Cx43 foi acompanhado pelo aumento na produção da TH por estas células. Esse achado corrobora outros estudos que mostram um potencial neuroprotetor do CAPE em modelos *in-vitro* e *in-vivo* do Parkinson induzido por 6-OHDA e MPTP (72, 90). Além disso, essa estreita relação existente entre aumento da Cx43 e neuroproteção (avaliada pelo concomitante aumento da TH), pode contribuir para esclarecer algumas divergências existentes na literatura, ou seja, ambos, aumento e redução da Cx43 foram associados à neurodegeneração em modelos de Parkinson e, ainda, as alterações nas conexinas foram sugeridas não como causa, mas como resposta neuroplástica ao processo degenerativo (146, 148). A relação entre TH e Cx43 não havia ainda sido demonstrada. Além disso, o papel de Cx43 na doença de Parkinson não foi esclarecido e os resultados são controversos. Já foi demonstrado que a rotenona atenua o aumento da expressão de Cx43 induzido em células musculares lisas vasculares submetidas à hipoxia (149). Por outro lado, foi relatado aumento da expressão de Cx43 e da comunicação intercelular (Junções Comunicantes, JC) de astrócitos em modelos *in vitro* e *in vivo* de DP induzidos por rotenona (146). Também foi sugerido recentemente que a redução da expressão de Cx43 e a inibição da fosforilação de Cx43 são eventos benéficos num modelo de rato de DP induzida por rotenona (150, 151). No entanto, as alterações da Cx43 em modelo de doença de Parkinson induzida por MPTP podem estar associadas a uma resposta restauradora à neurodegeneração, sem qualquer indução de acoplamento funcional (JC) entre os astrócitos e as outras células da glia (148). Estas discrepâncias poderiam ser explicadas pelos diferentes

mecanismos de ação induzidos pelas diferentes neurotoxinas utilizadas nestes estudos. Estudos sugerem que as neurotoxinas dopaminérgicas rotenona, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e o seu metabolito ativo: 1-metil-4-phenylpyridinium (MPP⁺) induzem a morte celular por mecanismos distintos e exercem efeitos diferentes sobre a bioenergética celular (152). Ao contrário da rotenona e do MPP⁺, a 6-OHDA age principalmente através da indução da geração de ERO, sem alterar a bioenergética; portanto, a via de sinalização da morte celular mediada por ERO parece desempenhar um papel essencial na apoptose induzida por 6-OHDA (109, 152).

No presente estudo, a diminuição dos níveis de conexina 43 também foi associada à indução de apoptose, como demonstrado pelo aumento nos níveis de cit c e caspase-3. De fato, alguns estudos demonstraram que as funções de Cx43 não estão restritas à comunicação intercelular. Funções das Cx-43 independentes da formação de JC incluem a translocação intracelular da Cx43 entre organelas celulares como uma resposta a estímulos fisiológicos e fisiopatológicos (153, 154). Além disso, um estudo demonstrou: (i) a presença de Cx-43 na membrana mitocondrial interna; (ii) a existência, na Cx-43, de domínios BH3 comuns à família Bcl-2 antiapoptótica e (iii) que a translocação específica da Cx43 para as mitocôndrias diminui a liberação de cit c (153), o que está em linha com nosso estudo. Outros estudos também têm relatado a função antiapoptótica de Cx43 (154, 155). A inibição da liberação do cit-c pelo CAPE, observada em nosso estudo, foi associada ao sequestro de ERO e aumento da expressão da Cx43, ambos associados à inibição da formação da TPM, demonstrada no ensaio do “*swelling*”. Esses mecanismos antiapoptóticos são sustentados por outros estudos (2, 153).

Assim, de acordo com nossos achados, o CAPE é um agente neuroprotetor muito promissor, pois atua em várias vias de sinalização que irão culminar na inibição da apoptose, na redução do estresse oxidativo, na melhoria da homeostase celular e na redução da neuroinflamação em modelos experimentais da DP (**Figura 26**).

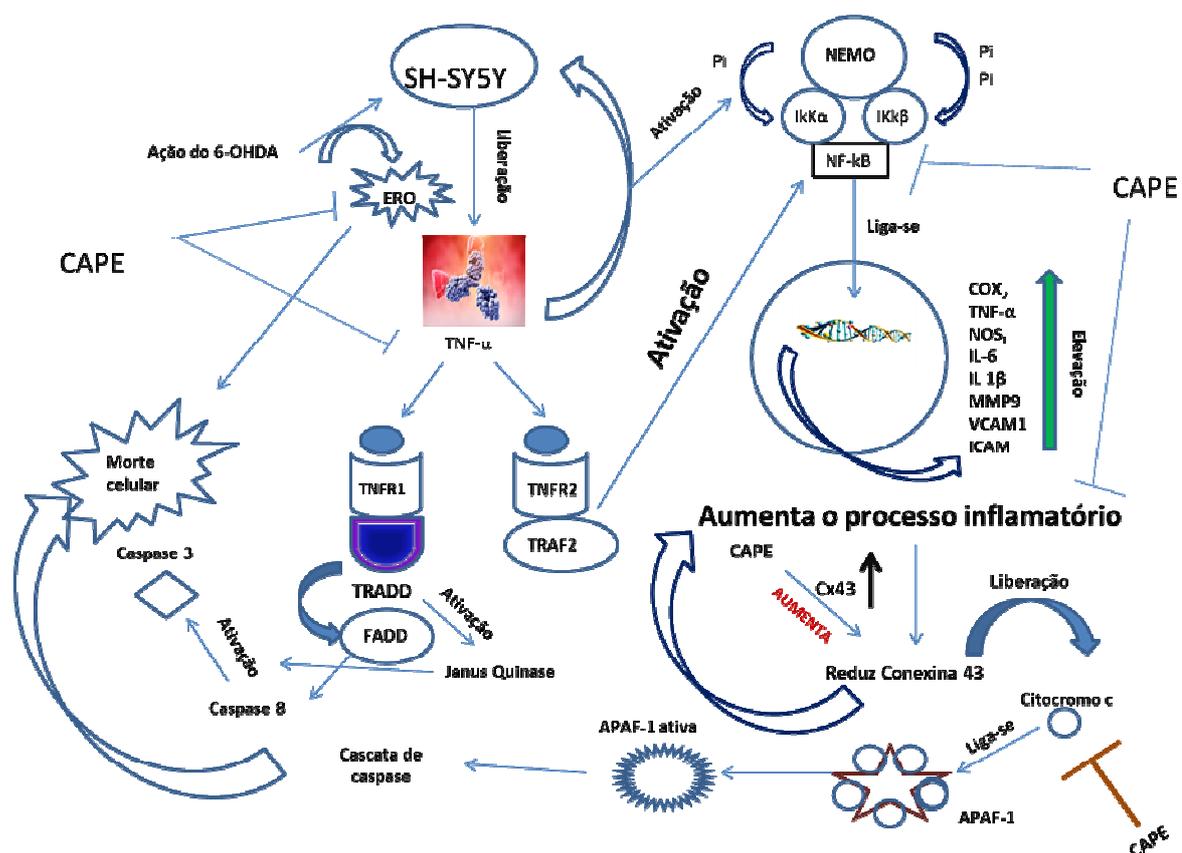


Figura 26 – Esquema dos efeitos do CAPE observados nos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* e das prováveis vias de atuação do CAPE.

“Não há impasse quando se está imbuído de desafio. Não se anda porque existe um caminho; por andar é que se abre o caminho”.

(Daisaku Ikeda)

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A administração intraperitoneal do CAPE protege contra a perda neuronal dopaminérgica induzida pela neurotoxina 6-OHDA em ratos, como demonstrado pela determinação da TH. Tal achado confirma a capacidade do CAPE de atravessar a barreira hematoencefálica, o que representa uma vantagem em relação a outros agentes neuroprotetores. O mecanismo de neuroproteção do CAPE foi avaliado *in vivo* e *in vitro* e sugere o envolvimento dos seguintes eventos: (i) atividade antioxidante (sequestro de ERO, neutralização de radicais livres e quelação de metais); (ii) atividade anti-inflamatória (inibição da ativação do NF- κ B, TNF- α , I κ K α e I κ k β); (iii) aumento da expressão da Cx-43; (iv) inibição da TPM; (v) inibição da liberação de citocromo c e (vi) inibição da ativação da caspase-3, executora final da apoptose. Adicionalmente, quando avaliado nas mesmas concentrações capazes de inibir a TPM, o CAPE não alterou as principais funções mitocondriais, como captação de cálcio e respiração mitocondrial, o que o coloca em posição de vantagem com relação a outros inibidores da TPM.

Assim, de acordo com nossos achados, o CAPE é um agente neuroprotetor promissor e pode auxiliar em futuras estratégias terapêuticas para as doenças neurodegenerativas, bem como para o melhor entendimento dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento dessas doenças.

“Que seja doce a dúvida a quem a verdade pode fazer mal”.

(Michelangelo Buonarroti)

7 REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Kaushik P, Gorin F, Vali S. Dynamics of tyrosine hydroxylase mediated regulation of dopamine synthesis. *J Comput Neurosci*. 2007 Apr;22(2):147-60. PubMed PMID: 17053993. Epub 2006/10/21. eng.
2. Murphy E, Steenbergen C. Preconditioning: the mitochondrial connection. *Annu Rev Physiol*. 2007;69:51-67. PubMed PMID: 17007587. Epub 2006/09/30. eng.
3. Frankola KA, Greig NH, Luo W, Tweedie D. Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2011 May;10(3):391-403. PubMed PMID: 21288189. Epub 2011/02/04. eng.
4. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003 Sep 11;39(6):889-909. PubMed PMID: 12971891. Epub 2003/09/16. eng.
5. Shetty P, Ravindran G, Sarang S, Thakur AM, Rao HS, Viswanathan C. Clinical grade mesenchymal stem cells transdifferentiated under xenofree conditions alleviates motor deficiencies in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Biol Int*. 2009 Aug;33(8):830-8. PubMed PMID: 19465139. Epub 2009/05/26. eng.
6. Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2001 May;2(5):325-34. PubMed PMID: 11331916. Epub 2001/05/02. eng.
7. Morris ME. Movement disorders in people with Parkinson disease: a model for physical therapy. *Phys Ther*. 2000 Jun;80(6):578-97. PubMed PMID: 10842411. Epub 2000/06/08. eng.
8. European Parkinson's Disease Association 2014.
9. Bogaerts V, Theuns J, van Broeckhoven C. Genetic findings in Parkinson's disease and translation into treatment: a leading role for mitochondria? *Genes Brain Behav*. 2008 Mar;7(2):129-51. PubMed PMID: 17680806. Pubmed Central PMCID: 2268956. Epub 2007/08/08. eng.
10. Koller W, Vetere-Overfield B, Gray C, Alexander C, Chin T, Dolezal J, et al. Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Neurology*. 1990 Aug;40(8):1218-21. PubMed PMID: 2381528. Epub 1990/08/01. eng.
11. Naoi M, Maruyama W, Yi H, Inaba K, Akao Y, Shamoto-Nagai M. Mitochondria in neurodegenerative disorders: regulation of the redox state and death signaling leading to neuronal death and survival. *J Neural Transm*. 2009 Nov;116(11):1371-81. PubMed PMID: 19763773. Epub 2009/09/19. eng.

12. McNaught KS, Jenner P. Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2001 Jan 19;297(3):191-4. PubMed PMID: 11137760. Epub 2001/01/04. eng.
13. Henchcliffe C, Beal MF. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008 Nov;4(11):600-9. PubMed PMID: 18978800. Epub 2008/11/04. eng.
14. Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 1989 Oct;12(10):366-75. PubMed PMID: 2479133. Epub 1989/10/01. eng.
15. Kajta M. Apoptosis in the central nervous system: Mechanisms and protective strategies. *Pol J Pharmacol*. 2004 Nov-Dec;56(6):689-700. PubMed PMID: 15662081. Epub 2005/01/22. eng.
16. Jellinger KA, Stadelmann C. Problems of cell death in neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 2001 Feb;3(1):31-40. PubMed PMID: 12214070. Epub 2002/09/06. Eng.
17. Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2009 May;34(2):279-90. PubMed PMID: 19385059. Pubmed Central PMCID: 2757935. Epub 2009/04/23. eng.
18. Rappley I, Gitler AD, Selvy PE, LaVoie MJ, Levy BD, Brown HA, et al. Evidence that alpha-synuclein does not inhibit phospholipase D. *Biochemistry*. 2009 Feb 10;48(5):1077-83. PubMed PMID: 19146388. Pubmed Central PMCID: 2683767. Epub 2009/01/17. eng.
19. Sano I, Gamo T, Kakimoto Y, Taniguchi K, Takesada M, Nishinuma K. Distribution of catechol compounds in human brain. *Biochim Biophys Acta*. 1959 Apr;32:586-7. PubMed PMID: 14441532. Epub 1959/04/01. eng.
20. Shimohama S, Sawada H, Kitamura Y, Taniguchi T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med*. 2003 Aug;9(8):360-5. PubMed PMID: 12928038. Epub 2003/08/21. eng.
21. Sauer H, Oertel WH. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience*. 1994 Mar;59(2):401-15. PubMed PMID: 7516500.

22. Peterson LJ, Flood PM. Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:401264. PubMed PMID: 22544998. Pubmed Central PMCID: 3321615. Epub 2012/05/01. eng.
23. Czlonkowska A, Kohutnicka M, Kurkowska-Jastrzebska I, Czlonkowski A. Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. *Neurodegeneration.* 1996 Jun;5(2):137-43. PubMed PMID: 8819134. Epub 1996/06/01. eng.
24. Cicchetti F, Brownell AL, Williams K, Chen YI, Livni E, Isacson O. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. *Eur J Neurosci.* 2002 Mar;15(6):991-8. PubMed PMID: 11918659. Epub 2002/03/29. eng.
25. Itzhak Y, Martin JL, Ali SF. Methamphetamine- and 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3, 6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurotoxicity in inducible nitric oxide synthase-deficient mice. *Synapse.* 1999 Dec 15;34(4):305-12. PubMed PMID: 10529724. Epub 1999/10/26. eng.
26. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, et al. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med.* 1999 Dec;5(12):1403-9. PubMed PMID: 10581083. Epub 1999/12/02. eng.
27. Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgans J, Schulz JB. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem.* 2000 May;74(5):2213-6. PubMed PMID: 10800968. Epub 2000/05/09. eng.
28. Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR, et al. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Dec 4;98(25):14669-74. PubMed PMID: 11724929. Pubmed Central PMCID: 64739. Epub 2001/11/29. eng.
29. Hirsch EC, Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 2009 Apr;8(4):382-97. PubMed PMID: 19296921. Epub 2009/03/20. eng.
30. Petit A, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, et al. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem.* 2005 Oct 7;280(40):34025-32. PubMed PMID: 16079129. Epub 2005/08/05. eng.

31. Jenner P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. *Neurology*. 2003 Dec 9;61(11 Suppl 6):S32-8. PubMed PMID: 14663007. Epub 2003/12/10. eng.
32. Levy F, Muehlethaler K, Salvi S, Peitrequin AL, Lindholm CK, Cerottini JC, et al. Ubiquitylation of a melanosomal protein by HECT-E3 ligases serves as sorting signal for lysosomal degradation. *Mol Biol Cell*. 2005 Apr;16(4):1777-87. PubMed PMID: 15703212. Pubmed Central PMCID: 1073660. Epub 2005/02/11. eng.
33. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. 1998 Apr 9;392(6676):605-8. PubMed PMID: 9560156. Epub 1998/04/29. eng.
34. von Coelln R, Dawson VL, Dawson TM. Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*. 2004 Oct;318(1):175-84. PubMed PMID: 15503153. Epub 2004/10/27. eng.
35. Levy R. Alzheimer's disease and Lewy body dementia. *Br J Psychiatry*. 1994 Feb;164(2):268. PubMed PMID: 8173836. Epub 1994/02/01. eng.
36. Hatefi Y. Energy conservation and uncoupling in mitochondria. *J Supramol Struct*. 1975;3(3):201-13. PubMed PMID: 1102805. Epub 1975/01/01. eng.
37. Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990 Mar;54(3):823-7. PubMed PMID: 2154550. Epub 1990/03/01. eng.
38. Levy OA, Malagelada C, Greene LA. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*. 2009 Apr;14(4):478-500. PubMed PMID: 19165601. Pubmed Central PMCID: 2754154. Epub 2009/01/24. eng.
39. Chanson M, Berclaz PY, Scerri I, Dudev T, Wernke-Dollries K, Pizurki L, et al. Regulation of gap junctional communication by a pro-inflammatory cytokine in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-expressing but not cystic fibrosis airway cells. *Am J Pathol*. 2001 May;158(5):1775-84. PubMed PMID: 11337375. Pubmed Central PMCID: 1891964. Epub 2001/05/05. eng.
40. Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab*. 2011 Jan 5;13(1):11-22. PubMed PMID: 21195345. Pubmed Central PMCID: 3040418. Epub 2011/01/05. eng.
41. Murray KN, Buggey HF, Denes A, Allan SM. Systemic immune activation shapes stroke outcome. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Mar;53:14-25. PubMed PMID: 23026562. Epub 2012/10/03. eng.

42. Blann AD, Tse W, Maxwell SJ, Waite MA. Increased levels of the soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. *J Hypertens*. 1994 Aug;12(8):925-8. PubMed PMID: 7529277. Epub 1994/08/01. eng.
43. Hirsch MA, Dulin M, Iyer SS, Hammond FM. Exercise for management and treatment of Parkinson disease. *Am Fam Physician*. 2009 Jun 15;79(12):1043. PubMed PMID: 19552011. Epub 2009/06/26. eng.
44. McGeer PL, Schwab C, Parent A, Doudet D. Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Ann Neurol*. 2003 Nov;54(5):599-604. PubMed PMID: 14595649. Epub 2003/11/05. eng.
45. Chen H, O'Reilly EJ, Schwarzschild MA, Ascherio A. Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol*. 2008 Jan 1;167(1):90-5. PubMed PMID: 17890755. Epub 2007/09/25. eng.
46. Muller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W. Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 1998 Aug;98(2):142-4. PubMed PMID: 9724016. Epub 1998/09/02. eng.
47. Marinova-Mutafchieva L, Sadeghian M, Broom L, Davis JB, Medhurst AD, Dexter DT. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2009 Aug;110(3):966-75. PubMed PMID: 19549006. Epub 2009/06/25. eng.
48. Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E. Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jul;9(7):505-18. PubMed PMID: 18568013. Pubmed Central PMCID: 2711514. Epub 2008/06/24. eng.
49. Silvestri L, Caputo V, Bellacchio E, Atorino L, Dallapiccola B, Valente EM, et al. Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet*. 2005 Nov 15;14(22):3477-92. PubMed PMID: 16207731. Epub 2005/10/07. eng.
50. Pridgeon JW, Olzmann JA, Chin LS, Li L. PINK1 protects against oxidative stress by phosphorylating mitochondrial chaperone TRAP1. *PLoS Biol*. 2007 Jul;5(7):e172. PubMed PMID: 17579517. Pubmed Central PMCID: 1892574. Epub 2007/06/21. eng.
51. Clark IE, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, et al. *Drosophila pink1* is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1162-6. PubMed PMID: 16672981. Epub 2006/05/05. eng.

-
52. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. 2008 Dec 1;183(5):795-803. PubMed PMID: 19029340. Pubmed Central PMCID: 2592826. Epub 2008/11/26. eng.
53. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. 2003 May;4(5):365-75. PubMed PMID: 12728264. Epub 2003/05/03. eng.
54. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999 Aug 1;13(15):1899-911. PubMed PMID: 10444588. Epub 1999/08/13. eng.
55. Letai A. BH3 domains as BCL-2 inhibitors: prototype cancer therapeutics. *Expert Opin Biol Ther*. 2003 Apr;3(2):293-304. PubMed PMID: 12662143. Epub 2003/03/29. eng.
56. Morishima N, Nakanishi K, Takenouchi H, Shibata T, Yasuhiko Y. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):34287-94. PubMed PMID: 12097332. Epub 2002/07/05. eng.
57. Piersanti M, Lye SJ. Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. *Endocrinology*. 1995 Aug;136(8):3571-8. PubMed PMID: 7628395. Epub 1995/08/01. eng.
58. Revilla A, Castro C, Barrio LC. Molecular dissection of transjunctional voltage dependence in the connexin-32 and connexin-43 junctions. *Biophys J*. 1999 Sep;77(3):1374-83. PubMed PMID: 10465749. Pubmed Central PMCID: 1300426. Epub 1999/08/31. eng.
59. Sullivan R, Ruangvoravat C, Joo D, Morgan J, Wang BL, Wang XK, et al. Structure, sequence and expression of the mouse Cx43 gene encoding connexin 43. *Gene*. 1993 Aug 25;130(2):191-9. PubMed PMID: 8395450. Epub 1993/08/25. eng.
60. Hunziker W, Geuze HJ. Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *Bioessays*. 1996 May;18(5):379-89. PubMed PMID: 8639161. Epub 1996/05/01. eng.
61. Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*. 1996;30:405-39. PubMed PMID: 8982460. Epub 1996/01/01. eng.
62. Rubin DM, Finley D. Proteolysis. The proteasome: a protein-degrading organelle? *Curr Biol*. 1995 Aug 1;5(8):854-8. PubMed PMID: 7583140. Epub 1995/08/01. eng.

63. Laing JG, Beyer EC. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1995 Nov 3;270(44):26399-403. PubMed PMID: 7592854. Epub 1995/11/03. eng.
64. Laing JG, Tadros PN, Westphale EM, Beyer EC. Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome. *Experimental cell research.* 1997 Nov 1;236(2):482-92. PubMed PMID: 9367633. Epub 1997/11/21. eng.
65. Qin H, Shao Q, Igdoura SA, Alaoui-Jamali MA, Laird DW. Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem.* 2003 Aug 8;278(32):30005-14. PubMed PMID: 12767974. Epub 2003/05/28. eng.
66. Anderson CM, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci.* 2003 Jul;26(7):340-4; author reply 4-5. PubMed PMID: 12850427. Epub 2003/07/10. eng.
67. Ransom B, Behar T, Nedergaard M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci.* 2003 Oct;26(10):520-2. PubMed PMID: 14522143. Epub 2003/10/03. eng.
68. Feng Y, Lu YW, Xu PH, Long Y, Wu WM, Li W, et al. Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation: relationship to their antioxidant activities. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Apr;1780(4):659-72. PubMed PMID: 18230365. Epub 2008/01/31. eng.
69. Tsai SK, Lin MJ, Liao PH, Yang CY, Lin SM, Liu SM, et al. Caffeic acid phenethyl ester ameliorates cerebral infarction in rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci.* 2006 May 1;78(23):2758-62. PubMed PMID: 16303144. Epub 2005/11/24. eng.
70. Ozer MK, Parlakpınar H, Acet A. Reduction of ischemia--reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Clin Biochem.* 2004 Aug;37(8):702-5. PubMed PMID: 15302615. Epub 2004/08/11. eng.
71. İlhan A, Akyol O, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med.* 2004 Aug 1;37(3):386-94. PubMed PMID: 15223072. Epub 2004/06/30. eng.
72. Noelker C, Bacher M, Gocke P, Wei X, Klockgether T, Du Y, et al. The flavanoid caffeic acid phenethyl ester blocks 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett.* 2005 Jul 22-29;383(1-2):39-43. PubMed PMID: 15894425. Epub 2005/05/17. eng.

73. Wei X, Zhao L, Ma Z, Holtzman DM, Yan C, Dodel RC, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents neonatal hypoxic-ischaemic brain injury. *Brain*. 2004 Dec;127(Pt 12):2629-35. PubMed PMID: 15469948. Epub 2004/10/08. eng.
74. Song YS, Park EH, Hur GM, Ryu YS, Lee YS, Lee JY, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. *Cancer Lett*. 2002 Jan 10;175(1):53-61. PubMed PMID: 11734336. Epub 2001/12/06. eng.
75. Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res*. 1999 May 15;59(10):2347-52. PubMed PMID: 10344742. Epub 1999/05/27. eng.
76. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res*. 1997 Sep;152(3):239-46. PubMed PMID: 9352659. Epub 1997/11/14. eng.
77. Kumar NM, Gilula NB. Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *The Journal of cell biology*. 1986 Sep;103(3):767-76. PubMed PMID: 2875078. Pubmed Central PMCID: 2114303. Epub 1986/09/01. eng.
78. Zhang JT, Nicholson BJ. Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, Cx26, as deduced from its cDNA. *The Journal of cell biology*. 1989 Dec;109(6 Pt 2):3391-401. PubMed PMID: 2557354. Pubmed Central PMCID: 2115897. Epub 1989/12/01. eng.
79. Anderson MF, Sims NR. Improved recovery of highly enriched mitochondrial fractions from small brain tissue samples. *Brain Res Brain Res Protoc*. 2000 Feb;5(1):95-101. PubMed PMID: 10719270. Epub 2000/03/17. eng.
80. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca²⁺ is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. *FEBS Lett*. 1996 Jan 8;378(2):150-2. PubMed PMID: 8549822. Epub 1996/01/08. eng.
81. Santos AC, Uyemura SA, Santos NA, Mingatto FE, Curti C. Hg(II)-induced renal cytotoxicity: in vitro and in vivo implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria. *Mol Cell Biochem*. 1997 Dec;177(1-2):53-9. PubMed PMID: 9450645. Epub 1998/02/05. eng.
82. Chance B, Williams GR. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*. 1956;17:65-134. PubMed PMID: 13313307. Epub 1956/01/01. eng.

83. Paxinos G, Watson, C. . Compact third edition The rat brain in stereotaxic coordinates. 1997:1-25.
84. Batista BL, Grotto D, Rodrigues JL, Souza VC, Barbosa F, Jr. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Anal Chim Acta*. 2009 Jul 30;646(1-2):23-9. PubMed PMID: 19523552. Epub 2009/06/16. eng.
85. Hefti F, Melamed E, Sahakian BJ, Wurtman RJ. Circling behavior in rats with partial, unilateral nigro-striatal lesions: effect of amphetamine, apomorphine, and DOPA. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 1980 Feb;12(2):185-8. PubMed PMID: 7189592.
86. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology / edited by John E Coligan [et al]*. 2001 May;Appendix 3:Appendix 3B. PubMed PMID: 18432654.
87. Takahashi S, Brunel LC, Edwards DT, van Tol J, Ramian G, Han S, et al. Pulsed electron paramagnetic resonance spectroscopy powered by a free-electron laser. *Nature*. 2012 Sep 20;489(7416):409-13. PubMed PMID: 22996555.
88. Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem*. 1995 Apr;64(4):1703-7. PubMed PMID: 7891098. Epub 1995/04/01. eng.
89. Ma Z, Wei X, Fontanilla C, Noelker C, Dodel R, Hampel H, et al. Caffeic acid phenethyl ester blocks free radical generation and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Life Sci*. 2006 Aug 22;79(13):1307-11. PubMed PMID: 16707141. Epub 2006/05/19. eng.
90. Fontanilla CV, Ma Z, Wei X, Klotsche J, Zhao L, Wisniewski P, et al. Caffeic acid phenethyl ester prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration. *Neuroscience*. 2011 Aug 11;188:135-41. PubMed PMID: 21571045. Epub 2011/05/17. eng.
91. Barros Silva R, Santos NAG, Martins NM, Ferreira DAS, Barbosa Jr F, Oliveira Souza VC, et al. Caffeic acid phenethyl ester protects against the dopaminergic neuronal loss induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience*. 2013 3/13;233(0):86-94.
92. Mokry J. Experimental models and behavioural tests used in the study of Parkinson's disease. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 1995;44(3):143-50. PubMed PMID: 8869270.

93. Schwarting RK, Huston JP. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol.* 1996 Oct;50(2-3):275-331. PubMed PMID: 8971983.
94. Deumens R, Blokland A, Prickaerts J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol.* 2002 Jun;175(2):303-17. PubMed PMID: 12061862.
95. Khan M, Elango C, Ansari MA, Singh I, Singh AK. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2007 Jul;102(2):365-77. PubMed PMID: 17437550. Epub 2007/04/18. eng.
96. Pardridge WM. Tyrosine hydroxylase replacement in experimental Parkinson's disease with transvascular gene therapy. *NeuroRx.* 2005 Jan;2(1):129-38. PubMed PMID: 15717064. Pubmed Central PMCID: 539333. Epub 2005/02/18. eng.
97. Haavik J, Toska K. Tyrosine hydroxylase and Parkinson's disease. *Mol Neurobiol.* 1998 Jun;16(3):285-309. PubMed PMID: 9626667. Epub 1998/06/17. eng.
98. de Rijk-Van Andel JF, Gabreels FJ, Geurtz B, Steenbergen-Spanjers GC, van Den Heuvel LP, Smeitink JA, et al. L-dopa-responsive infantile hypokinetic rigid parkinsonism due to tyrosine hydroxylase deficiency. *Neurology.* 2000 Dec 26;55(12):1926-8. PubMed PMID: 11134401. Epub 2001/01/03. eng.
99. Adams RN, Murrill E, McCreery R, Blank L, Karolczak M. 6-Hydroxydopamine, a new oxidation mechanism. *Eur J Pharmacol.* 1972 Feb;17(2):287-92. PubMed PMID: 4337349. Epub 1972/02/01. eng.
100. Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 2003;53 Suppl 3:S26-36; discussion S-8. PubMed PMID: 12666096. Epub 2003/04/01. eng.
101. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry.* 2004 May;85(4):633-40. PubMed PMID: ISI:000189094700021. English.
102. Wu WM, Lu L, Long Y, Wang T, Liu L, Chen Q, et al. Free radical scavenging and antioxidative activities of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and its related compounds in solution and membranes: A structure-activity insight. *Food Chemistry.* 2007;105(1):107-15. PubMed PMID: ISI:000248900500015. English.

103. Gocer H, Gulcin I. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): correlation of structure and antioxidant properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2011 Dec;62(8):821-5. PubMed PMID: 21631390. Epub 2011/06/03. eng.
104. Izuta H, Narahara Y, Shimazawa M, Mishima S, Kondo S, Hara H. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. *Biol Pharm Bull*. 2009 Dec;32(12):1947-51. PubMed PMID: 19952409. Epub 2009/12/03. eng.
105. Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Jun;6(6):449-62. PubMed PMID: 15891778. Epub 2005/05/14. eng.
106. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*. 2009 Mar;7(1):65-74. PubMed PMID: 19721819. Pubmed Central PMCID: 2724665. Epub 2009/09/02. eng.
107. Esposito G, Scuderi C, Valenza M, Togna GI, Latina V, De Filippis D, et al. Cannabidiol reduces Abeta-induced neuroinflammation and promotes hippocampal neurogenesis through PPARgamma involvement. *PLoS One*. 2011;6(12):e28668. PubMed PMID: 22163051. Pubmed Central PMCID: 3230631. Epub 2011/12/14. eng.
108. Moldzio R, Pacher T, Krewenka C, Kranner B, Novak J, Duvigneau JC, et al. Effects of cannabinoids Delta(9)-tetrahydrocannabinol, Delta(9)-tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiol in MPP+ affected murine mesencephalic cultures. *Phytomedicine*. 2012 Jun 15;19(8-9):819-24. PubMed PMID: 22571976. Epub 2012/05/11. eng.
109. Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci*. 1998;21:347-75. PubMed PMID: 9530500. Epub 1998/04/08. eng.
110. Hsiao G, Lee JJ, Lin KH, Shen CH, Fong TH, Chou DS, et al. Characterization of a novel and potent collagen antagonist, caffeic acid phenethyl ester, in human platelets: in vitro and in vivo studies. *Cardiovascular research*. 2007 Sep 1;75(4):782-92. PubMed PMID: 17560560. Epub 2007/06/15. eng.
111. Grunblatt E, Mandel S, Youdim MB. MPTP and 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration as models for Parkinson's disease: neuroprotective strategies. *Journal of neurology*. 2000 Apr;247 Suppl 2:II95-102. PubMed PMID: 10991672. Epub 2000/09/19. eng.
112. Grunblatt E, Mandel S, Youdim MB. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;899:262-73. PubMed PMID: 10863545. Epub 2000/06/23. eng.

113. Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MB. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem.* 1994 Sep;63(3):793-807. PubMed PMID: 7519659. Epub 1994/09/01. eng.
114. Dexter DT, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, et al. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989 Jun;52(6):1830-6. PubMed PMID: 2723638. Epub 1989/06/01. eng.
115. Tarohda T, Ishida Y, Kawai K, Yamamoto M, Amano R. Regional distributions of manganese, iron, copper, and zinc in the brains of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2005 Sep;383(2):224-34. PubMed PMID: 16132122.
116. Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys.* 1979 Jul;195(2):460-7. PubMed PMID: 38751. Epub 1979/07/01. eng.
117. Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 1979 Jul;195(2):453-9. PubMed PMID: 383019. Epub 1979/07/01. eng.
118. Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys.* 1979 Jul;195(2):468-77. PubMed PMID: 112926. Epub 1979/07/01. eng.
119. Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J.* 1990 May 15;268(1):153-60. PubMed PMID: 2160810. Pubmed Central PMCID: 1131405. Epub 1990/05/15. eng.
120. Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie.* 2002 Feb-Mar;84(2-3):153-66. PubMed PMID: 12022946. Epub 2002/05/23. eng.
121. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):99-163. PubMed PMID: 17237344. Epub 2007/01/24. eng.
122. Norenberg MD, Rao KV. The mitochondrial permeability transition in neurologic disease. *Neurochem Int.* 2007 Jun;50(7-8):983-97. PubMed PMID: 17397969. Epub 2007/04/03. eng.

123. Morota S, Mansson R, Hansson MJ, Kasuya K, Shimazu M, Hasegawa E, et al. Evaluation of putative inhibitors of mitochondrial permeability transition for brain disorders--specificity vs. toxicity. *Exp Neurol*. 2009 Aug;218(2):353-62. PubMed PMID: 19348797. Epub 2009/04/08. eng.
124. Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett*. 2001 Apr 20;495(1-2):12-5. PubMed PMID: 11322939. Epub 2001/04/27. eng.
125. Serkova N, Donohoe P, Gottschalk S, Hainz C, Niemann CU, Bickler PE, et al. Comparison of the effects of cyclosporin a on the metabolism of perfused rat brain slices during normoxia and hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002 Mar;22(3):342-52. PubMed PMID: 11891440. Epub 2002/03/14. eng.
126. Eid HM, Vallerand D, Muhammad A, Durst T, Haddad PS, Martineau LC. Structural constraints and the importance of lipophilicity for the mitochondrial uncoupling activity of naturally occurring caffeic acid esters with potential for the treatment of insulin resistance. *Biochem Pharmacol*. 2010 Feb 1;79(3):444-54. PubMed PMID: 19732755. Epub 2009/09/08. eng.
127. Lin WL, Liang WH, Lee YJ, Chuang SK, Tseng TH. Antitumor progression potential of caffeic acid phenethyl ester involving p75(NTR) in C6 glioma cells. *Chem Biol Interact*. 2010 Dec 5;188(3):607-15. PubMed PMID: 20836997. Epub 2010/09/15. eng.
128. Yamashita T, Fujitani M, Hata K, Mimura F, Yamagishi S. Diverse functions of the p75 neurotrophin receptor. *Anat Sci Int*. 2005 Mar;80(1):37-41. PubMed PMID: 15794129.
129. Natarajan K, Singh S, Burke TR, Jr., Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 20;93(17):9090-5. PubMed PMID: 8799159. Pubmed Central PMCID: 38600. Epub 1996/08/20. eng.
130. Marquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Munoz E. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Mar;308(3):993-1001. PubMed PMID: 14617683. Epub 2003/11/18. eng.
131. Berger N, Ben Bassat H, Klein BY, Laskov R. Cytotoxicity of NF-kappaB inhibitors Bay 11-7085 and caffeic acid phenethyl ester to Ramos and other human B-lymphoma cell lines. *Experimental Hematology*. 2007 Oct;35(10):1495-509. PubMed PMID: 17889719. Epub 2007/09/25. eng.
132. Ang ES, Pavlos NJ, Chai LY, Qi M, Cheng TS, Steer JH, et al. Caffeic acid phenethyl ester, an active component of honeybee propolis attenuates osteoclastogenesis and bone resorption via the suppression of RANKL-induced NF-kappaB and NFAT activity. *Journal of cellular physiology*. 2009 Dec;221(3):642-9. PubMed PMID: 19681045. Epub 2009/08/15. eng.

133. Krappmann D, Scheidereit C. A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of I κ B kinase pathways. *EMBO Rep.* 2005 Apr;6(4):321-6. PubMed PMID: 15809659. Pubmed Central PMCID: 1299290. Epub 2005/04/06. eng.
134. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):49-62. PubMed PMID: 17183360. Epub 2006/12/22. eng.
135. Ivashkiv LB. A signal-switch hypothesis for cross-regulation of cytokine and TLR signalling pathways. *Nat Rev Immunol.* 2008 Oct;8(10):816-22. PubMed PMID: 18787561. Pubmed Central PMCID: 2581615. Epub 2008/09/13. eng.
136. Lieberman AP, Pitha PM, Shin HS, Shin ML. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Aug;86(16):6348-52. PubMed PMID: 2474832. Pubmed Central PMCID: 297836. Epub 1989/08/01. eng.
137. Clark IA. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine Growth F R.* 2007 Jul-Aug;18(3-4):335-43. PubMed PMID: ISI:000248074700013. English.
138. Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, et al. Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 2000;107(3):335-41. PubMed PMID: 10821442. Epub 2000/05/23. eng.
139. Nagatsu T, Mogi M, Ichinose H, Togari A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000 (60):277-90. PubMed PMID: 11205147. Epub 2001/02/24. eng.
140. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci.* 2009 Jul;10(7):481-94. PubMed PMID: 19543220. Epub 2009/06/23. eng.
141. Crawford ED, Wells JA. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem.* 2011;80:1055-87. PubMed PMID: 21456965. Epub 2011/04/05. eng.
142. Crawford ED, Seaman JE, Barber AE, 2nd, David DC, Babbitt PC, Burlingame AL, et al. Conservation of caspase substrates across metazoans suggests hierarchical importance of signaling pathways over specific targets and cleavage site motifs in apoptosis. *Cell Death Differ.* 2012 Dec;19(12):2040-8. PubMed PMID: 22918439. Pubmed Central PMCID: 3504717. Epub 2012/08/25. eng.

143. Cui K, Lu W, Zhu L, Shen X, Huang J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE), an active component of propolis, inhibits *Helicobacter pylori* peptide deformylase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 31;435(2):289-94. PubMed PMID: 23611786. Epub 2013/04/25. eng.
144. Meme W, Calvo CF, Froger N, Ezan P, Amigou E, Koulakoff A, et al. Proinflammatory cytokines released from microglia inhibit gap junctions in astrocytes: potentiation by beta-amyloid. *Faseb J*. 2006 Mar;20(3):494-6. PubMed PMID: 16423877. Epub 2006/01/21. eng.
145. Retamal MA, Froger N, Palacios-Prado N, Ezan P, Saez PJ, Saez JC, et al. Cx43 hemichannels and gap junction channels in astrocytes are regulated oppositely by proinflammatory cytokines released from activated microglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007 Dec 12;27(50):13781-92. PubMed PMID: 18077690. Epub 2007/12/14. eng.
146. Kawasaki A, Hayashi T, Nakachi K, Trosko JE, Sugihara K, Kotake Y, et al. Modulation of connexin 43 in rotenone-induced model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 2009 Apr 21;160(1):61-8. PubMed PMID: 19232380. Epub 2009/02/24. eng.
147. Crompton M. Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Aug;12(4):414-9. PubMed PMID: 10873816. Epub 2000/06/30. eng.
148. Rufer M, Wirth SB, Hofer A, Dermietzel R, Pastor A, Kettenmann H, et al. Regulation of connexin-43, GFAP, and FGF-2 is not accompanied by changes in astroglial coupling in MPTP-lesioned, FGF-2-treated parkinsonian mice. *J Neurosci Res*. 1996 Dec 1;46(5):606-17. PubMed PMID: 8951672. Epub 1996/12/01. eng.
149. Cowan DB, Jones M, Garcia LM, Noria S, del Nido PJ, McGowan FX, Jr. Hypoxia and stretch regulate intercellular communication in vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003 Oct 1;23(10):1754-60. PubMed PMID: 12958040. Epub 2003/09/06. eng.
150. Wang XJ, Zhang S, Yan ZQ, Zhao YX, Zhou HY, Wang Y, et al. Impaired CD200-CD200R-mediated microglia silencing enhances midbrain dopaminergic neurodegeneration: roles of aging, superoxide, NADPH oxidase, and p38 MAPK. *Free Radic Biol Med*. 2011 May 1;50(9):1094-106. PubMed PMID: 21295135. Epub 2011/02/08. eng.
151. Wang X, Ma A, Zhu W, Zhu L, Zhao Y, Xi J, et al. The role of connexin 43 and hemichannels correlated with the astrocytic death following ischemia/reperfusion insult. *Cell Mol Neurobiol*. 2013 Apr;33(3):401-10. PubMed PMID: 23328809. Epub 2013/01/19. eng.

152. Giordano S, Lee J, Darley-USmar VM, Zhang J. Distinct effects of rotenone, 1-methyl-4-phenylpyridinium and 6-hydroxydopamine on cellular bioenergetics and cell death. *PLoS One*. 2012;7(9):e44610. PubMed PMID: 22970265. Pubmed Central PMCID: 3435291.
153. Lu G, Haider H, Porollo A, Ashraf M. Mitochondria-specific transgenic overexpression of connexin-43 simulates preconditioning-induced cytoprotection of stem cells. *Cardiovascular research*. 2010 Nov 1;88(2):277-86. PubMed PMID: 20833648. Pubmed Central PMCID: 2952537. Epub 2010/09/14. eng.
154. Rodriguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz-Meana M, et al. Translocation of connexin 43 to the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance for cardioprotection. *Circ Res*. 2006 Jul 7;99(1):93-101. PubMed PMID: 16741159. Epub 2006/06/03. eng.
155. Li X, Heinzl FR, Boengler K, Schulz R, Heusch G. Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Jan;36(1):161-3. PubMed PMID: 14734058. Epub 2004/01/22. eng.