

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

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

“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).

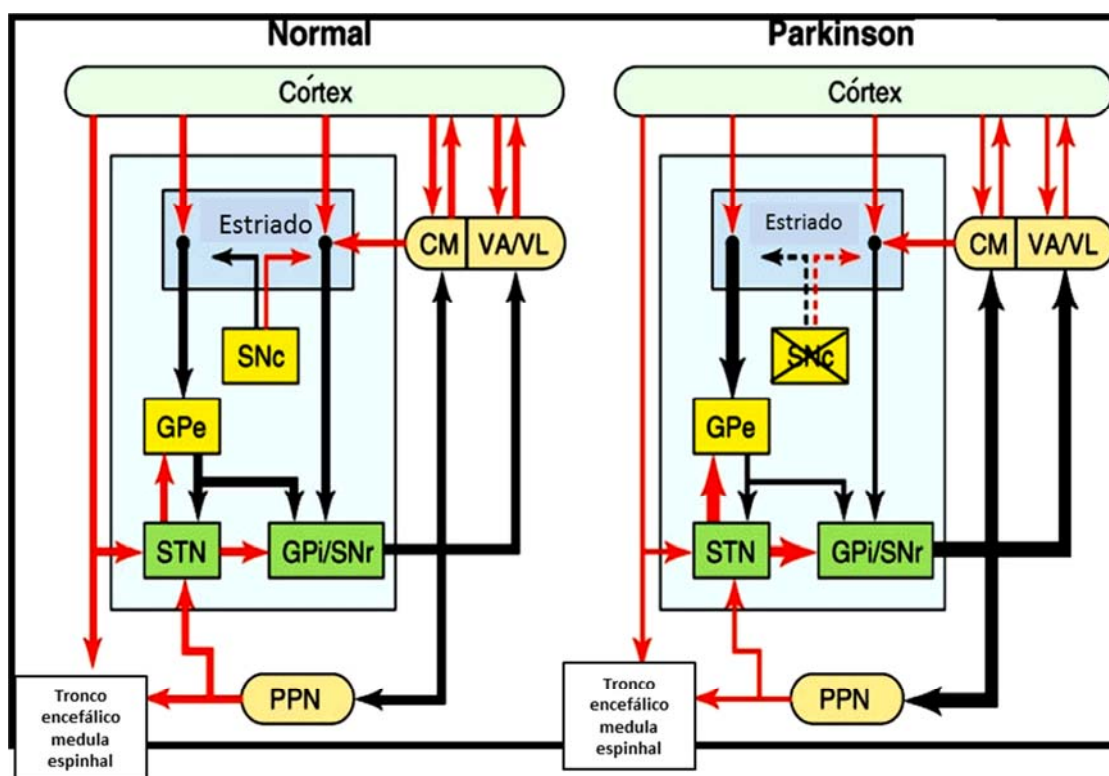


Figura 1 - Representação simplificada dos circuitos que envolvem os núcleos da base, suas principais projeções e as mudanças na atividade associadas à Doença de Parkinson (DP). As setas pretas indicam vias inibitórias (gabaérgicas) e as setas vermelhas indicam as vias excitatórias. As projeções glutamínérgicas 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 glutamínérgico (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)

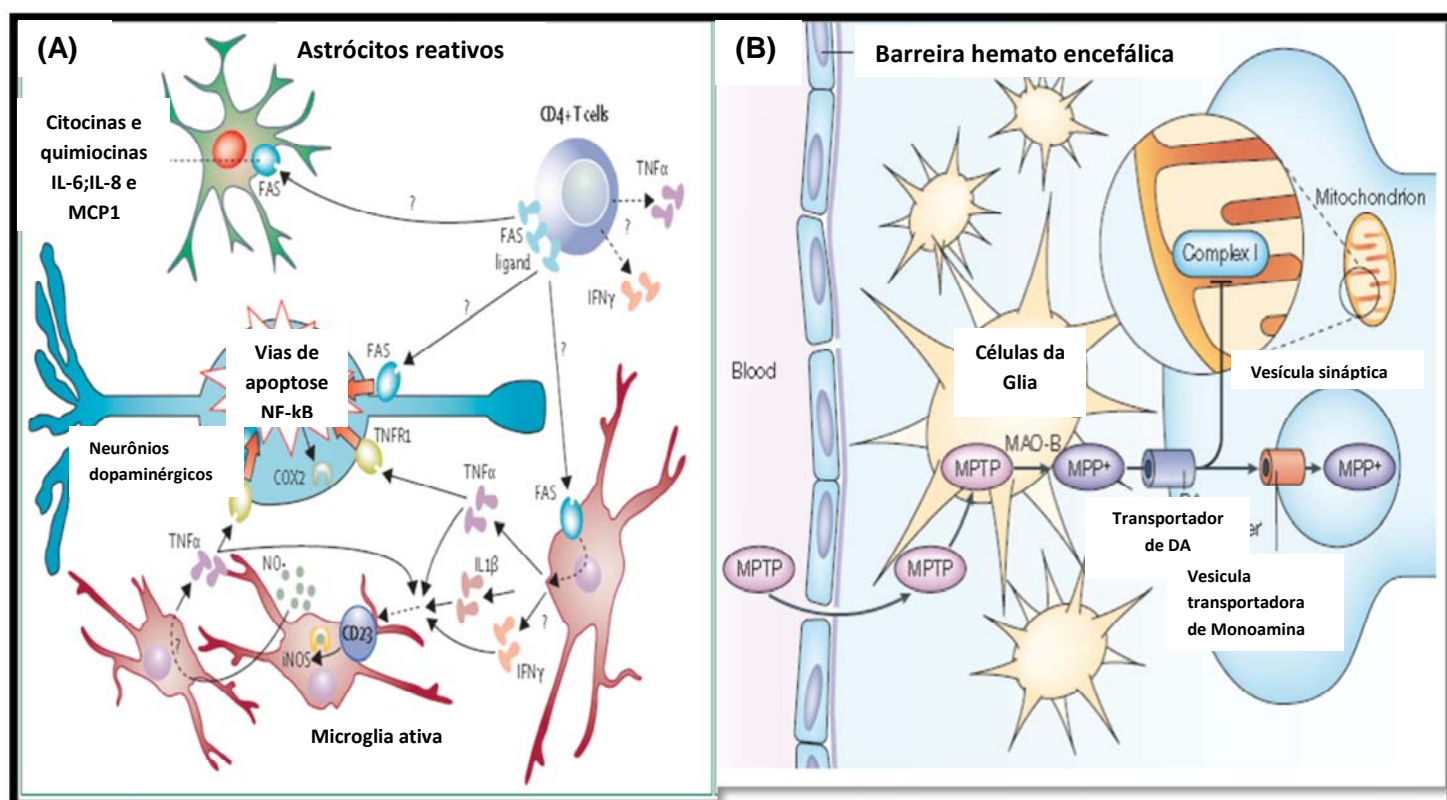


Figura 2 - Esquema simplificado ilustrando: (A) relação existente entre a microgliose reativa (processo neuroinflamatório) e a formação de espécies reativas de oxigênio na morte neuronal dopaminérgica e (B) ação do MPTP na ativação da célula glial e seu efeito após ser oxidado via Monoamina Oxidase B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

“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, Dudez 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-Wetzler 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, İraz M, Öztas 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.