

CAROLINE SANTOS CAPITELLI

**EFEITO DA MELATONINA EM MODELO ANIMAL DE  
PARKINSONISMO INDUZIDO PELO MPTP**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia, Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dr. Maria Aparecida B. F. Vital

CURITIBA  
2007

*“ Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, ao ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.”*

(Efésios 13:2)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, ao Senhor, Autor da Vida, por Sua presença, amor e força, que me concedeu mais esta experiência e conquista.

A meus queridos pais, Ézio e Luiza Odete, e irmãos, Jaqueline e Ricardo, pelo amor incondicional que me ajudaram a perseverar e vencer as dificuldades.

Ao meu amado esposo, pelo amor, paciência e encorajamento em todos os momentos.

A minha orientadora e amiga, Prof<sup>ª</sup>.dr<sup>ª</sup>. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital, pelos ensinamentos, conhecimentos e amor pela pesquisa.

Aos meus companheiros de experimentos Adriana, Marcelo e Ângela pela amizade e colaboração na execução dos experimentos desenvolvidos.

As minhas amigas Mariza, Scheila, Aedra e Juliana, pelos ótimos momentos de risos e companheirismo.

A minha amiga e farmacêutica, Silvia Gennari, pela amizade, auxílio e paciência durante esses anos.

As colegas de departamento, Cristina, Alessandra, Nair e Linda, por toda ajuda e carinho.

Aos colegas de biotérios, por toda colaboração.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. HISTÓRICO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	1
1.2. SINAIS E SINTOMAS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	2
1.3. FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	5
1.4. ETIOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON.....	6
1.4.1. Componente genético.....	6
1.4.2. Fatores ambientais.....	7
1.4.3. Excitotoxicidade.....	9
1.4.4. Neuroinflamação.....	11
1.4.5. Estresse oxidativo.....	12
1.5. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON.....	14
1.5.1. Modelo do MPTP.....	15
1.6. MELATONINA (N-acetil-5-metoxitriptamina).....	18
1.6.1. Características gerais.....	18
1.6.2. Síntese e degradação.....	19
1.6.3. Mecanismo de ação.....	22
1.6.4. Melatonina na doença de Parkinson.....	25
1.6.5. Efeitos da melatonina em outros sistemas biológicos.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. ANIMAIS.....	31
3.2. DROGAS.....	31
3.3. TRATAMENTO.....	32
3.4. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA.....	32
3.5. AVALIAÇÃO MOTORA E COMPORTAMENTAL.....	33
3.5.1. Teste Campo Aberto.....	33
3.5.2. Teste Labirinto em Cruz Elevado.....	34
3.5.3. Teste Esquiva Ativa de Duas Vias.....	35
3.6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	36
3.6.1. Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase.....	36
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1. EFEITO DA MELATONINA (50 mg/kg) NA ATIVIDADE GERAL DE RATOS NO TESTE DO CAMPO ABERTO APÓS INFUSÃO BILATERAL DE MPTP.....	38
4.1.1. Resultados – 24 horas.....	39
4.1.2. Resultados – 7 dias.....	39
4.2. 4.2. EFEITO DA MELATONINA (50 mg/kg) NA ATIVIDADE GERAL DE RATOS NO TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO APÓS INFUSÃO BILATERAL DE MPTP.....	42
4.2.1. Resultados – 24 horas e 7 dias.....	43
4.3. 4.3. EFEITO DA MELATONINA (50 mg/kg) NA ATIVIDADE GERAL DE RATOS NO TESTE DA ESQUIVA ATIVA DE DUAS VIAS APÓS INFUSÃO BILATERAL DE MPTP.....	46
4.3.1. Resultados.....	47
4.4. 4.4. EFEITO DA MELATONINA (50 mg/kg) NA EXPRESSÃO DA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASE.....	48
4.4.1. Resultados – 24 horas.....	49
4.4.2. Resultados – 7 dias.....	49
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMK** – N-acetil-5-metoxiquinuramina
- AANAT** – serotonina-N-acetiltransferase
- COMT** - catecol-O-metiltransferase
- COX-2** – enzima cicloxigenase tipo 2
- DAT** – transportador de dopamina
- DP**- Doença de Parkinson
- GFAP** – proteína glial fibrilar ácida
- GPx** – glutationala peroxidase
- GSH**- glutationala
- HNE** – 4-hidroxi-2,3-nonenal
- HIOMT** – hidroxindol-O-metiltransferase
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio
- IDO** – indolamina-2,3-dioxigenase
- IL** – interleucina
- iNOS**- enzima óxido nítrico sintase induzida
- IP** - fosfoinositídeos
- LPS** - lipopolissacarídeo
- L-dopa** – L-3,4-diidroxifenilalanina
- MAO- B** - enzima monoamino oxidase-B
- MPP<sup>+</sup>** - íon 1-metil-4-fenilpiridínio
- MPTP** – 1-metil-4-fenil-,1,2,3,6-tetrahidropiridina
- MPO** – enzima mieloperoxidase
- NAS** – N-acetil-serotonina

**NMDA** –N-metil-D-aspartato

**NO** – óxido nítrico

**NOS**- enzima óxido nítrico sintase

**NOSn**- enzima óxido nítrico sintase neuronal

**OH** – radical hidroxila

**ONOO<sup>-</sup>** - íon peroxinitrito

**PKA** – proteína quinase A

**ROS** – espécies reativas de oxigênio

**RNS** – espécies reativas de nitrogênio

**SNC** - sistema nervoso central

**SOD** – superóxido dismutase

**SCN** – núcleo supraquiasmático

**TH** – enzima tirosina hidroxilase

**T5M** – triptofano-5-monooxigenase

**TNF- $\alpha$**  – fator de necrose tumoral- $\alpha$

**UCHL-1**- ubiquitina hidrolase carboxi terminal L1

**UPS** - sistema ubiquitina proteossoma

**VMAT<sub>2</sub>** – transportador vesicular de monoaminas -2

**5-HT** - 5-hidroxitriptamina

**6-OHDA** – 6-hidroxi-dopamina

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) consiste em uma síndrome progressiva caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra parte compacta. A causa da DP idiopática é ainda desconhecida, mas acredita-se envelhecimento, fatores ambientais, inflamação, excitotoxicidade, fatores genéticos e estresse oxidativo possam estar envolvidos na patogênese da doença. A melatonina é um poderoso agente antioxidante secretado pela glândula pineal, com variadas funções fisiológicas. Além de atuar regulando o ritmo circadiano, a melatonina parece desempenhar efeito neuroprotetor importante. Dentre vários modelos animais para estudo da DP, o modelo do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) é comumente utilizado na compreensão da patofisiologia da doença devido sua capacidade de produzir características bioquímicas e histológicas semelhantes à DP. Neste trabalho, investigou-se o efeito da administração de melatonina (50 mg/kg) em animais lesados com MPTP 24 horas e 7 dias após a infusão da neurotoxina nos teste do campo aberto, labirinto em cruz elevado e esQUIVA ativa de duas vias. Vinte e quatro horas após a lesão, os animais tratados com MPTP exibiam redução na atividade motora geral e perda significativa de células imunorreativas à tirosina hidroxilase (TH), sendo que os animais lesados tratados com melatonina não diferiam dos grupos controles em ambos os parâmetros citados. Sete dias após a cirurgia estereotáxica, o grupo lesado e o tratado com melatonina não demonstraram alterações motoras em relação aos controles, porém ainda exibiam significativa perda de neurônios dopaminérgicos. No teste da esQUIVA ativa, os animais tratados com MPTP exibiram déficit cognitivo em relação aos controles, sendo que a administração de melatonina não produziu alteração neste perfil. Em ambos os tempos, 24 horas e 7 dias após a lesão, os grupos de animais investigados não diferiam entre si nos parâmetros avaliados no modelo de ansiedade utilizando o labirinto em cruz elevado. Assim, estes resultados provêm evidências do efeito neuroprotetor da melatonina em modelo animal de parkinsonismo induzido por MPTP.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Histórico da Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) consiste na segunda desordem neurodegenerativa mais comum depois da doença de Alzheimer (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003) com elevada prevalência nas últimas décadas (YANAGISAWA, 2006). Conforme LANDRIGAN e colaboradores (2005) ela afeta mais de 500.000 americanos e 50.000 novos casos aparecem a cada ano.

Em 1817, o médico inglês James Parkinson descreveu a DP em um ensaio que ele denominou de “Ensaio da paralisia agitante” que mais tarde recebeu seu nome (MENESES e TEIVE, 2003; LIM, 2005). Lewy, em 1912, observou inclusões citoplasmáticas hialinas em neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP, que até os dias de hoje têm seu nome (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2005). Em 1930, Hassler descreveu a perda de neurônios nos núcleos basais de Meynert (MORI, 2005) e ainda em 1938, observou que a substância negra e *locus coeruleus* encontravam-se lesados nesses pacientes (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2005).

Conforme LEE MOSLEY e colaboradores (2006) o início da doença manifesta-se em média aos 55 anos de idade e a sua incidência aumenta marcadamente com o envelhecimento (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003) e ainda, é aproximadamente 1.5 vezes maior no homem que nas mulheres em todas as idades (ELBAZ *et al.*, 2007).

Existem quatro formas de designação de parkinsonismo: 1) parkinsonismo primário (DP idiopática), que é a forma mais comum de parkinsonismo; 2) parkinsonismo secundário causado por drogas indutoras de

parkinsonismo, como por exemplo, antagonistas dopaminérgicos, e pós-encefalite; 3) parkinsonismo associado a outras desordens neurológicas como, por exemplo, paralisia supraventricular progressiva e atrofia de múltiplos sistemas; 4) desordens neurodegenerativas que apresentam o parkinsonismo como uma de suas características, por exemplo, doença de Huntington e doença de Wilson (FAHN e SULZER, 2004).

A causa da DP idiopática ainda é desconhecida, mas acredita-se que diversos fatores estejam envolvidos, tais como o estresse oxidativo, fatores genéticos, envelhecimento dentre outros (TAKAHASHI e WAKABAYASHI, 2005)..

## **1.2. Sinais e sintomas da Doença de Parkinson**

São observados na DP sintomas conhecidos como “sinais cardinais” da doença. Estes sinais resumem-se principalmente em tremores em repouso, instabilidade postural, bradicinesia e rigidez (PRZEDBORSKI, 2005).

O tremor parkinsoniano é o sintoma inicial em cerca de 60-70% dos pacientes, sendo a característica mais evidente da DP, embora não seja necessariamente incapacitante, uma vez que pode ser suprimido pela execução de movimentos voluntários (YANAGISAWA, 2006) e reduzido com o uso de anticolinérgicos.

Pacientes com DP também apresentam dificuldades na programação e execução de movimentos, e em estágio mais avançado exibem dificuldade em iniciar movimentos. Da mesma forma, o desempenho desses pacientes em tarefas que requerem a realização de movimentos seqüenciais e simultâneos é prejudicado (KLOCKGETHER, 2004).

A rigidez muscular pode ser definida como um aumento da resistência da articulação durante um movimento passivo (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003) e frequentemente é relatada pelos pacientes como “sensação de dureza” e capacidade reduzida de relaxar os músculos dos membros (KLOCKGETHER, 2004).

A instabilidade postural é um sintoma comum da DP e compromete a capacidade do paciente de manter o equilíbrio durante as tarefas diárias, tais como levantar, andar e curvar-se, aumentando o risco de quedas do paciente (MORRIS, 2000).

Além destes sintomas, pacientes com DP apresentam outros sintomas como ansiedade, depressão, distúrbios do sono, fadiga, constipação, distúrbio olfatório e declínio cognitivo (FAHN e SULZER, 2004; YANAGISAWA, 2006; ZIEMSEN e REICHMANN, 2007). Segundo alguns autores, estes sintomas precedem os sintomas motores em muitos pacientes com DP (SCHRAG, 2006). A hipótese de sintomas, incluindo distúrbio olfatório e constipação, serem sinais precoces da DP baseia-se primeiramente no achado de que a função olfatória encontra-se relacionada à função dopaminérgica estriatal e que alguns pacientes previamente saudáveis que apresentaram problemas olfatórios desenvolveram a doença, e ainda, segundo estudo epidemiológico, a diminuição dos movimentos intestinais aumenta o risco de desenvolvimento de DP (BRAAK *et al.*, 2003; KLOCKGETHER, 2004).

Desordem de ansiedade consiste em uma alteração do humor de elevada prevalência na DP entre 20 - 52% (MERCURY, 2007), e inclui ansiedade generalizada, pânico e fobia social. Acredita-se que danos no *locus coeruleus* possam contribuir para a prevalência da ansiedade na DP (RABINSTEIN e SHULMAN ; 2001).

A depressão é um dos maiores problemas na DP, visto ser causado por diferentes fatores biológicos e exógenos (KLOCKGETHER, 2004). A depressão na DP inclui anormalidades nas funções serotoninérgicas, dopaminérgicas e noradrenérgicas, e está associada à piora da qualidade de vida do paciente, além de constituir-se num fator de risco para prejuízo cognitivo e demência (SCHRAG, 2006).

Outro sintoma não motor da DP é a demência e segundo ZIEMSEN e REICHMANN (2007) pacientes com DP apresentam de 2-6 vezes mais probabilidade de desenvolverem este sintoma do que indivíduos de mesma idade. Segundo estes mesmos autores, na DP com demência é comum a ocorrência de corpos de *Lewy* no córtex e redução de 60-80% no número de neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert.

A prevalência de distúrbios do sono nos pacientes com DP é elevada e geralmente consiste em insônia noturna, fragmentação do sono e hipersonolência durante o dia, e frequentemente ocorrem no mesmo paciente, piorando a qualidade de vida do paciente (KORCZYN, 2006).

A psicose também consiste em uma freqüente complicação da DP, afetando 15-40% dos pacientes (MARSH *et al.*, 2004). Conforme MARSH e colaboradores (2004) este sintoma dificulta ainda mais o tratamento da DP, uma vez que a utilização de fármacos antiparkinsonianos contribui para as alucinações, ao passo que fármacos antipsicóticos podem agravar o prejuízo motor e cognitivo destes pacientes.

### **1.3. Fisiopatologia da Doença de Parkinson**

A DP consiste em uma síndrome progressiva caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos que apresentam seus corpos

celulares na substância negra parte compacta (SNpc) e projetam seus axônios em direção ao estriado (LANG e LOZANO, 1998; DUNNET & BJORKLUND, 1999; PRZEDBORSKI, 2005; LANDRIGAN *et al.*, 2005). Acredita-se que a redução nos níveis de dopamina estriatais seja a principal responsável pelos sintomas da DP (VALKO *et al.*, 2007). A perda destes neurônios que normalmente são ricos em neuromelanina, resulta em despigmentação da SN (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

Microscopicamente, além da degeneração dopaminérgica e conseqüente redução nos níveis de dopamina, paciente com DP apresentam inclusões eosinofílicas no citoplasma dos neurônios da SN (substância negra) denominadas de corpos de *Lewy*, em homenagem ao seu descobridor Fredrich Lewy (CALNE, 2005).

Os corpos de *Lewy* são estruturas esféricas organizadas em um núcleo denso de hialina e circundadas por um halo claro, medindo aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, compostas de numerosas proteínas, incluindo  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina e neurofilamentos (SCHULZ e FALKENBURGER, 2004).

Estas estruturas não são exclusivas da DP, pelo contrário, também são encontradas na doença de Alzheimer, na demência com corpos de *Lewy* e como um achado acidental patológico em pessoas saudáveis de idade avançada (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; SCHULZ e FALKENBURGER, 2004)

O papel dos copos de *Lewy* na morte neuronal ainda é controverso, mas sabe-se que sua presença no cérebro perturba o funcionamento normal do cérebro, interrompendo a ação de importantes

mensageiros químicos como, por exemplo, acetilcolina e dopamina (VALKO *et al.*, 2007).

#### **1.4. Etiologia da doença de Parkinson**

A causa da DP ainda é desconhecida, mas postula-se que diversos fatores estejam relacionados à gênese da doença, incluindo alterações genéticas, fatores ambientais, excitotoxicidade, neuroinflamação e estresse oxidativo (PRZEDBORSKI, 2005).

##### **1.4.1. Componente genético**

Alguns estudos têm mostrado que algumas famílias as desordens neurodegenerativas são devidas às mutações em genes que resultam então, numa agregação protéica anormal (ELBAZ *et al.*, 2007).

Embora a maioria dos casos de DP seja esporádica, a identificação de algumas formas de DP familiar, tanto autossômica dominante como recessiva (SUTHERLAND *et al.*, 2007) despertou o interesse para o envolvimento genético na patogênese da DP (THOMAS *et al.*, 2007). Cerca de aproximadamente 10-15% dos casos de DP apresentam história familiar positiva para a doença (TANNER *et al.*, 1999; ELBAZ *et al.*, 2007).

Até o presente tempo, já foram identificados 13 loci e mutações em 7 genes, dentre eles,  $\alpha$ -sinucleína, parkina, ubiquitina hidrolase carboxi terminal L1 (UCH-L1), PINK1, DJ1, LRRK2 e Omi (ELBAZ *et al.*, 2007).

A partir da descoberta que alguns casos de DP familiar encontram-se relacionados à mutação no gene codificador da  $\alpha$ -sinucleína, uma proteína pré-sináptica formada de 140 aminoácidos, numerosos estudos demonstram que esta proteína pode desempenhar papel importante na

patogênese da DP, já que esta é o principal constituinte dos corpos de *Lewy* (MOORE *et al.*, 2005; NAKAI *et al.*, 2007).

De acordo com SCHULZ e FALKENBURGER (2004) mutações no gene da  $\alpha$ -sinucleína favorecem a agregação de  $\alpha$ -sinucleína e podem promover a formação de corpos de *Lewy*. Conforme citado por VALKO e colaboradores (2007), recentemente foram identificados mutações no gene  $\alpha$ -sinucleína que podem levar à DP genética.

Mutações no *locus* PARK1 levam à identificação de agregações de  $\alpha$ -sinucleína na DP, enquanto mutações no *locus* PARK2 causam deficiência na proteína parkina e degeneração nigroestriatal predominante sem corpos de *Lewy* (CALNE, 2005).

A forma mais comum de DP autossômica recessiva é devida a mutações no gene PARK2, que codifica a proteína parkina, uma proteína ubiquitina ligase E3 (SUTHERLAND *et al.*, 2007). Mutações neste gene resultam em degeneração ao passo que a superexpressão impede a neurodegeneração associada à disfunção do sistema ubiquitina-proteossoma (KALIA *et al.*, 2004). Além disso, mutações neste gene podem ser responsáveis por aproximadamente 70% de parkinsonismo juvenil (com início antes dos 20 anos) e 50% dos casos de DP familiar de início precoce (antes dos 45 anos) (SUTHERLAND *et al.*, 2007).

De acordo com alguns autores, fatores não-genéticos, como por exemplo, exposição a agentes tóxicos ambientais (pesticidas e metais), estariam envolvidos tanto quanto fatores genéticos na gênese da DP e que até mesmo esses fatores ambientais seriam antecedentes à hereditariedade na etiologia DP (COLLINS e NEAFSEY, 2002).

### 1.5.1. Fatores ambientais

Após a descoberta de que pessoas intoxicadas por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), desenvolviam uma síndrome idêntica à DP, numerosos estudos foram conduzidos buscando confirmar a hipótese de que a neurodegeneração na DP resulta da exposição crônica a neurotoxinas dopaminérgicas (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Assim numerosas evidências surgiram indicando que fatores ambientais estariam envolvidos na patogênese da DP (GUILARTE *et al.*, 2006).

O paraquat (1-1'-dimetil-4,4'-biperidínio) é estruturalmente muito semelhante ao MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridínio), metabólito ativo do MPTP, e importante herbicida (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; LANDRIGAN *et al.*, 2005). Conforme KUTER e colaboradores (2007) a administração sub-crônica de paraquat produziu degeneração de neurônios dopaminérgicos e ativou mecanismos compensatórios envolvendo as transmissões dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica e GABAérgica.

Várias outras toxinas ambientais de uso na agricultura podem ser fatores de risco na DP, como é o caso do pesticida rotenona. Sabe-se que a exposição crônica, contínua e sistêmica a este agente tóxico seletivamente inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, causando seletiva degeneração dopaminérgica com acúmulo de inclusões citoplasmáticas ricas em ubiquitina e  $\alpha$ -sinucleína (LOGROSCINO, 2005). Além desta disso, a rotenona foi capaz de induzir sinais de parkinsonismo em ratos de laboratório (LANDRIGAN *et al.*, 2005).

Além dessas toxinas, sabe-se que a exposição crônica a elevados níveis de manganês podem levar ao acúmulo deste metal nos

gânglios da base, resultando no chamado manganismo, que produz sintomas como tremores, rigidez e psicose (LANDRIGAN *et al.*, 2005).

Segundo alguns autores, certos pesticidas e metais induzem alterações conformacionais na  $\alpha$ -sinucleína (UVERSKY *et al.*, 2002), aumentando as agregações de  $\alpha$ -sinucleína (GOLTS *et al.*, 2002). Isto pode ser de grande importância ao considerar que alguns estudos têm sugerido que  $\alpha$ -sinucleína pode ser uma proteína chave na fisiopatologia da DP, uma vez que mutações nesta proteína podem levar ao início precoce da doença (PANKRATZ e FOROUND, 2004).

### **1.5.2. Excitotoxicidade**

O termo "excitotoxicidade" surgiu com Olney em 1978, quando documentou que a toxicidade do glutamato era devida sua interação com receptores que mediavam o efeito excitatório nos neurônios (DOBLE, 1999). Atualmente, tem-se estimado que a excitotoxicidade neuronal possa ser um importante processo na morte celular progressiva na DP (DICKIE *et al.*, 1996).

Conforme EMERIT *et al.* (2004), a excitotoxicidade e apoptose são as duas principais causas de morte celular, e em ambos os processos encontram-se envolvidas espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS).

Os níveis de cálcio na célula são regulados por canais de cálcio voltagem-dependente e receptores ionotrópicos (NMDA) (MICHALUK, 2002), mantendo o gradiente diferencial entre a superfície interna e externa.

O cálcio intracelular desempenha diversas e importantes funções fisiológicas, contudo, quando em grande quantidade, este íon causa

hiperestimulação das atividades normais e morte neuronal (EMERIT *et al.*, 2004).

O excesso de cálcio intracelular pode ocasionar a ativação de diversas proteínas, como proteases (ex.: protease citosólica- calpaína - ativada por cálcio que leva à destruição do citoesqueleto) (DOBLE, 1999), proteína quinase C, fosfatases, fosfolipases (ex.: fosfolipase A<sub>2</sub> que ataca a membrana celular e organelas), óxido nítrico sintase neuronal (NOSn), xantina oxidase, e produção de radicais livres (EMERIT *et al.*, 2004).

Os radicais livres produzidos como conseqüência da ativação de enzimas cálcio dependentes, como a fosfolipase A<sub>2</sub>, óxido nítrico sintase (NOS), xantina peroxidase e disfunção mitocondrial cooperam em muito para a morte celular (DOBLE, 1999). Conforme este autor, a hipóxia pode estimular a liberação de ácido glutâmico que, através de receptores NMDA, mata a célula por excitotoxicidade, uma vez que dados obtidos *in vitro* demonstram que a morte celular das culturas celulares submetidas à hipóxia pode ser bloqueada pelo aumento das concentrações de magnésio no meio extracelular, antagonistas de receptores NMDA ou drogas que inibem a liberação de glutamato (riluzol).

Diversas evidências sugerem que a excitotoxicidade mediada por glutamato, neurotransmissor excitatório, pode ser um importante fator na patogênese da DP, uma vez que antagonistas de glutamato, como por exemplo, a amantadina parecem ser antiparkinsonianos (KOLLER, 1997).

Sabe-se que em condições normais, a neurotransmissão glutamatérgica é delicadamente controlada como um mecanismo de proteção contra a excitotoxicidade, uma vez que a excessiva ativação de receptores de glutamato em várias desordens neurodegenerativas pode levar à injúria e

morte neuronal por excessivo influxo de cálcio (EMERIT *et al.*, 2004). Segundo estes mesmos autores, a concentração de glutamato nos neurônios glutamatérgicos é menor no meio extracelular (aproximadamente 0,6 mmol/l) em comparação com o intracelular (aproximadamente 10 mmol/l). Quando os níveis de glutamato extracelular aumentam ocorre dano neuronal.

### 1.5.3. Neuroinflamação

Numerosos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, defeito no sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) e inflamação são importantes processos envolvidos no desenvolvimento e progressão da DP (ASANUMA *et al.*, 2004).

A resposta imune local no cérebro não envolve o sistema imune periférico, ocorrendo desta forma, sem a participação de anticorpos e células. Ao invés disso, depende da síntese de componente inflamatório pelos neurônios, glia e micróglia (McGEER e McGEER, 2004).

Conforme citado por FAHN e SULZER (2004) células da glia e micróglia, a partir de um insulto tóxico, poderiam produzir substâncias nocivas à célula, tais como citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e espécies reativas ao oxigênio (ROS) e ao nitrogênio (RNS).

De acordo com McGEER e McGEER (2004) a ativação microglial pode resultar em aumento da produção de ânions superóxidos e outras neurotoxinas e, como já demonstrado *in vitro*, tal efeito pode contribuir para processos neurotóxicos, incluindo dano às células dopaminérgicas (HIRSCH *et al.*, 2005). Ainda, a ativação microglial induzida por lipopolissacarídeo (LPS) pode causar *upregulation* da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) e desta forma, aumentar a síntese de prostaglandinas que podem ativar diretamente caspase-

3 ou indiretamente liberar glutamato levando a excitotoxicidade (HALD e LOTHARIUS, 2005). Corroborando tais evidências, foram relatadas na DP aumento no número de células microgliais ativadas (HIRSCH *et al.*, 2005).

Sabe-se que a injeção intracerebral de LPS pode induzir a expressão de citocinas inflamatórias e suas respectivas moléculas, por exemplo, interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS). Mais ainda, a injeção intranigral de LPS pode induzir a degeneração dopaminérgica em ratos (ASANUMA *et al.*, 2004).

Conforme HALD e LOTHARIUS (2005), citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 podem desencadear toxicidade neuronal e ainda, podem potencializar a resposta inflamatória inicial pelo aumento da produção de NO microglial.

O envolvimento de processos inflamatórios na DP foi reforçado por alguns achados, como a descoberta de macrófagos derivado de micróglia na substância negra de pacientes com DP e que a inibição (ou atenuação) da resposta imune microglial aumentava a sobrevivência neuronal em modelos animais da 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e MPTP (CROISIER *et al.*, 2005).

Corroborando com a hipótese do envolvimento do processo inflamatório na DP, vários investigadores encontraram níveis elevados e citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, dentre outras no fluído cerebrospinal de pacientes com DP (HIRSCH *et al.*, 2005).

#### **1.5.4. Estresse oxidativo**

Atualmente, acredita-se que a produção de ROS e RNS no cérebro desempenhe um importante papel na defesa inespecífica deste órgão. Contudo, quando ativado inadequadamente, este processo pode levar à perda

de neurônios devido à alta susceptibilidade destas células ao dano oxidativo (ISCHIOPOULOS e BECKMAN, 2003).

As ROS e RNS são normalmente produzidos pelo metabolismo celular e acredita-se que ambas desempenhem um papel dual no organismo, ora como espécies benéficas e ora como espécies nocivas ao organismo. Em concentrações baixas e moderadas, essas espécies defenderiam o organismo contra agentes infecciosos e estariam envolvidas em diversos sistemas de sinalização celular. Já em níveis elevados, essas espécies produziriam dano celular conhecido como estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2007).

A partir do momento em que a produção de espécies reativas excede a capacidade de remoção pelos antioxidantes endógenos, componentes biológicos como DNA, lipídeos, proteínas e outras moléculas sofrem alterações oxidativas por esses oxidantes resultando em alteração celular e muitas vezes, morte da célula (ISCHIOPOULOS e BECKMAN, 2003).

SCHAPIRA e colaboradores (1989) relataram pela primeira vez que pacientes com doença de Parkinson apresentavam a atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial reduzida na substância negra. O possível envolvimento do complexo I mitocondrial na patogênese da DP foi intensificado com a comprovação de que a neurotoxina MPTP é capaz de produzir sinais característicos da doença em animais. Quando administrada é convertida ao íon  $MPP^+$  que se acumula no interior das mitocôndrias e inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, resultando na menor produção de ATP, aumento da concentração de cálcio e produção aumentada de radicais livres (WATANABE *et al.*, 2005). Conforme citado por WEISSMAN e colaboradores (2007), animais tratados com inibidores

do complexo I mitocondrial, que como dito anteriormente reduzem a produção de ATP e aumentam a produção de ROS, desenvolvem parkinsonismo.

Sabe-se que a degradação espontânea do neurotransmissor dopamina resulta na produção de radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e quinonas reativas, que são potencialmente tóxicos para os neurônios (ASANUMA *et al.*, 2004; MICHALUK, 2002). Essas espécies reativas poderiam atacar facilmente o DNA mitocondrial, por ser este desprovido de histonas protetoras, resultando em alteração desta estrutura (ZHANG *et al.*, 1999).

### **1.6. Modelos animais da doença de Parkinson**

Existem diversos modelos animais para o estudo da DP, dentre eles estão o modelo da 6-OHDA, MPTP, rotenona, paraquat, LPS e reserpina (LEE MOSLEY *et al.*, 2006). Esses modelos animais são bastante importantes para o desenvolvimento de novos agentes antiparkinsonianos, mas também como ferramenta na elucidação da patogênese da DP (JENNER, 2003).

O modelo animal da reserpina é bastante útil no estudo da DP por causar depleção de monoaminas, entretanto, a principal desvantagem deste modelo é que o déficit motor produzido é temporário e não resulta em dano do trato nigroestriatal como ocorre na DP idiopática. Já a injeção unilateral de 6-OHDA resulta em perda de neurônios dopaminérgicos como na DP, entretanto a principal limitação deste modelo é que o comportamento rotacional produzido não é observado na DP (JENNER, 2003).

Animais expostos à rotenona, potente membro dos rotenóides (SARAVANAN *et al.*, 2005), apresentam características clínicas e patológicas muito semelhantes àsquelas da DP (NEWHOUSE *et al.*, 2004), como

degeneração dopaminérgica nigroestriatal, inclusões positivas para  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina e déficit motor (SHERER *et al.*, 2003).

### 1.6.1. Modelo do MPTP

O MPTP é uma neurotoxina que foi descoberta depois da indução de síndrome parkinsoniana irreversível em dependentes após a injeção desta neurotoxina como um contaminante da síntese ilícita de 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), um análogo do narcótico meperidina (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; LEE MOSLEY *et al.*, 2006).

O MPTP é capaz de produzir mudanças clínicas, bioquímicas e neuropatológicas semelhantes a que ocorre na DP idiopática (SCHULZ e FALKENBURGER, 2004), embora raramente ocasione a formação de corpos de *Lewy* (NEWHOUSE *et al.*, 2004). Devido esta similaridade bioquímica e histológica com a DP o modelo do MPTP tem sido muito importante para a compreensão da fisiopatologia da DP (JENNER, 2003).

Essa neurotoxina é bem conhecida por produzir morte relativamente seletiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra, com conseqüente diminuição nos níveis de dopamina no estriado, como ocorre na DP (WATANABE *et al.*, 2005), entretanto, o MPTP também causa perda dos neurotransmissores noradrenalina e serotonina no *locus coeruleus* e no núcleo da Rafe, respectivamente (MARIEN, *et al.*, 2004).

O MPTP é altamente lipofílico e uma vez administrado ao animal, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, sendo convertido rapidamente nas células gliais à  $MPP^+$ , radical livre altamente neurotóxico (JENNER, 2003). O efeito neurotóxico do MPTP baseia-se na produção de seu

metabólito, o íon 1-metil-4-fenilpiridínio ( $MPP^+$ ) pela enzima monoaminoxidase-B (MAO-B) nas células gliais. Esse íon devido à elevada afinidade pelos transportadores de dopamina (DAT) acumula-se no interior das mitocôndrias dos neurônios dopaminérgicos. Dentro destas estruturas, o íon  $MPP^+$  inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, que consome aproximadamente 100% do oxigênio molecular (SCHULZ e FALKENBURGER, 2004), resultando na menor produção de ATP, aumento da concentração de cálcio intracelular e produção aumentada de radicais livres (WATANABE *et al.*, 2005).

A inibição do complexo I e a produção de superóxido são responsáveis pela toxicidade do MPTP. Tal fato pode ser evidenciado em camundongos transgênicos, que por superexpressarem a enzima superóxido dismutase (SOD Cu/Zn), a principal enzima inativadora de superóxido, mostraram-se resistentes à toxicidade pelo MPTP. Enquanto que animais portadores de uma deficiência parcial na enzima SOD manganês ou animais “Knock-out” para enzima glutathione peroxidase, são mais suscetíveis à referida toxina (SCHULZ e FALKENBURGER, 2004).

Além do estresse oxidativo mitocondrial e deficiência energética causada pelo  $MPP^+$ , esta substância ainda liga-se ao transportador vesicular de monoaminas ( $VMAT_2$ ) e é transportado para dentro da vesícula, expulsando desta o neurotransmissor dopamina. O acúmulo de dopamina no citosol da célula pode predominantemente sofrer autooxidação e produzir ainda mais espécies reativas ao oxigênio (ROS), como radicais superóxidos (PRZEDBORSKI, 2005).

Ainda, o excesso de dopamina citosólica pode sofrer ação de enzimas, como a COX-2, presente nos neurônios dopaminérgicos da substância negra, e gerar a formação de dopamina – quinona. Também, esse aumento de dopamina no citosol neuronal pode aumentar a formação de neuromelanina, implicando em um importante aumento na susceptibilidade à morte neuronal. Essa hipótese da neuromelanina contribuir para a morte neuronal é creditada pela possibilidade destes pigmentos atuarem como reservatórios tóxicos intraneuronais, pela ligação transitória com metais, como ferro e vários radicais livres como MPP<sup>+</sup> (PRZEDBORSKI, 2005; DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

Segundo PRZEDBORSKI (2005), a morte dopaminérgica neuronal pela administração de MPTP é precedida pelo estresse oxidativo e déficit de energia, e que estes processos não são os principais responsáveis pela morte neuronal, apesar de causarem a injúria inicial. Na verdade, esses processos atuam provocando a injúria inicial e ativando vias moleculares que levam à morte da célula, que executarão a morte da célula. Entre estes estão quinases dependentes de ciclina e vários componentes da maquinaria apoptótica. Desta forma, embora esses fatores não se encontrem capazes de iniciar a lesão, atuariam amplificando a neurodegeneração e auxiliando na progressão crônica da doença.

O DAT é uma proteína transportadora de dopamina dependente de sódio e cloreto responsável pela recaptação e liberação de dopamina das terminações nervosas pré-sinápticas dos axônios terminais no estriado e dendritos na substância negra. Essa proteína consiste em um ótimo marcador de neurônios dopaminérgicos (WATANABE *et al.*, 2005). Devido à neurotoxicidade do MPTP e 6-hidroxidopamina serem dependentes de sua

elevada afinidade por este transportador (ALAM e SCHMIDT, 2004), pode-se supor que esta proteína tenha um papel chave na doença de Parkinson (WATANABE *et al.*, 2005). Estes autores propõem que bloqueadores específicos da ativação glial e inibidores da afinidade elevada ao DAT podem ser novas estratégias terapêuticas na DP.

## **1.7. Melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina)**

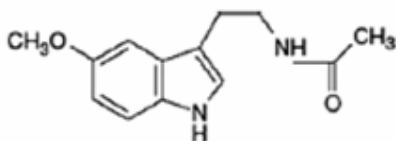
### **1.7.1. Características gerais**

A melatonina é um neurohormônio pertencente ao grupo das indolaminas. Os grupos funcionais presentes são demasiadamente importantes na ligação ao receptor e para sua oxidação química (HARDELAND *et al.*, 2006). Esta substância atravessa facilmente a barreira hematoencefálica (BHE), sendo detectado no fluído cérebro-espinhal, saliva e leite (KENNAWAY, 2000).

É sintetizada principalmente na glândula pineal, mas pequena quantidade de melatonina é produzida na retina, osso, pele, intestino, plaquetas e bile (CLAUSTRAT *et al.*, 2005). Este neurohormônio encontra-se presente em todos os vertebrados e também em tecidos vegetais (PUERTA *et al.*, 2007). Conforme CLAUSTRAT e colaboradores (2005) os níveis desta substância nas folhas, sementes e frutos são baixos, entretanto consistem em uma importante fonte de suplemento de melatonina.

Em indivíduos adultos, os níveis circulantes de melatonina são extremamente baixos (< 20 pmol/L). Esses níveis aumentam aproximadamente às 21:00 h, com pico máximo às 03:00 h e retornam a níveis menores aproximadamente às 09:00h (KENNAWAY, 2000). Como não ocorre

armazenamento de melatonina na glândula pineal, o perfil deste hormônio no plasma reflete confiavelmente a atividade da glândula pineal (CLAUSTRAT *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estrutura química da melatonina. Retirado de AKKAS *et al.* (2007).

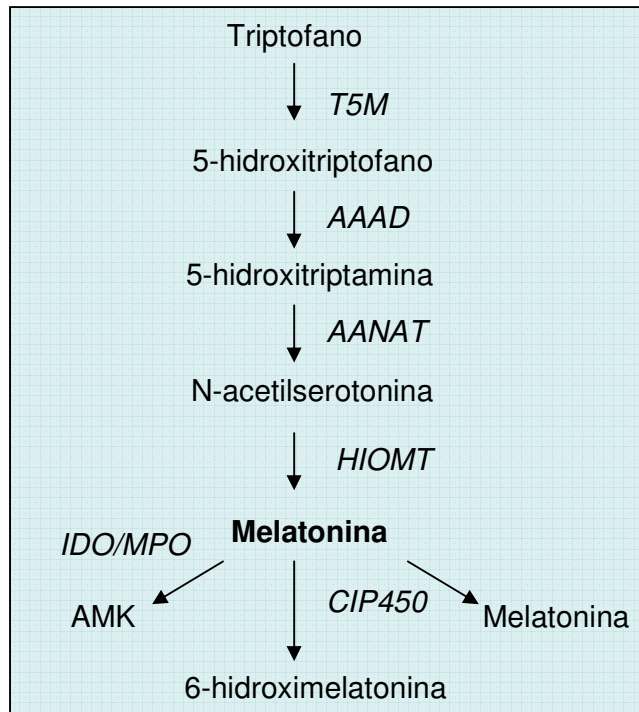
### 1.7.2. Síntese e Degradação

A melatonina é ritmicamente secretada pela glândula pineal e produzida a partir do aminoácido triptofano (SUMAYA *et al.*, 2004). A estrutura cerebral envolvida no controle da produção e secreção de melatonina é o núcleo supraquiasmático (SCN), localizado no hipotálamo anterior. Esta estrutura é naturalmente rítmica, com um período que encerra às 24 horas. A ritmicidade do SCN é garantida pela sincronia com o ciclo solar através de projeções oriundas da retina (fibras retino-hipotalâmica), informando a ausência ou presença de luz (KENNAWAY, 2000). Na presença de luz, a síntese de melatonina é inibida, entretanto durante a noite sua produção é estimulada (HARDELAND *et al.*, 2006).

A síntese de melatonina inicia-se com a ligação do neurotransmissor noradrenalina em receptores  $\beta_1$  e  $\alpha_1$  - adrenérgicos, resultando na ativação de adenilato ciclase e conseqüentemente no aumento de AMPc (CLAUSTRAT *et al.*, 2005). Este segundo mensageiro por sua vez,

pode mediar a fosforilação da enzima serotonina-N-acetiltransferase (AANAT), aumentando a atividade da enzima e ainda, ativar um repressor da transcrição de gene induzido por AMPc, que é um elemento modulador responsivo a este segundo mensageiro que tem por finalidade limitar a produção de melatonina durante a noite (CLAUSTRAT *et al.*, 2005; HARDELAND *et al.*, 2006).

O aminoácido triptofano, pela ação da enzima triptofano 5 monooxigenase (T5M), é convertido em 5-hidroxitriptofano. A partir do 5-hidroxitriptofano pela ação da enzima aromática aminoácido descarboxilase (AAD), ocorre a síntese de 5-hidroxitriptamina (5-HT), que em seguida é convertida em N-acetilserotonina pela enzima serotonina-N-acetiltransferase (AANAT), que é a enzima passo limitante da síntese de melatonina na glândula pineal, local onde esta enzima é expressa. O passo final do processo de síntese da melatonina ocorre pela ação da enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) resultando na formação de melatonina (BOUTIN *et al.*, 2005; HARDEAND *et al.*, 2006) (ver Fig. 2). Certa quantidade de melatonina produzida é excretada de forma inalterada, outra parte é eliminada através de uma via clássica de hidroxilação envolvendo enzimas do citocromo P450 1A2, que catalisa a formação de 6-hidroxi melatonina que então sofre conjugação com ácido glicurônico ou sulfato, gerando um composto mais habilitado a excreção. Uma via alternativa a estes processos consiste na abertura do núcleo indol durante o processo de oxidação pela enzima indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e/ou pela mieloperoxidase (MPO) levando a produção de N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (BOUTIN *et al.*, 2005). A importância deste metabólito ativo da melatonina é ainda pouco conhecida, mas acredita-se que ele possa estar envolvido em muitos dos efeitos desse hormônio (BOUTIN *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Via de síntese e metabolismo da melatonina. A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano pela ação da enzima triptofano 5 monooxigenase (T5M) gerando 5-hidroxitriptofano. Este pela ação das enzimas aromática aminoácido descarboxilase (AAAD), serotonina-N-acetiltransferase (AANAT) e hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), sequencialmente, resulta na produção de melatonina. O catabolismo da melatonina pode ocorrer via enzimas do citocromo P450 1A2 ou alternativamente, pela ação das enzimas indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) e/ou pela mieloperoxidase (MPO) levando a produção de N-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK). Ainda, uma porção de melatonina é excretada na forma inalterada. Adaptado de BOUTIN *et al.* (2005).

### 1.7.3. Mecanismo de ação

Uma vez liberada a melatonina transmite informação sobre o fotoperíodo para os tecidos centrais e periféricos que expressam sítios para a ligação da melatonina e parece exercer importantes funções no organismo (BOUTIN *et al.*, 2005).

Alguns sítios para a ligação da melatonina já foram identificados: receptores acoplados à proteína G (MT1 e MT2) e a enzima quinona redutase 2 (QR2/MT3), que está envolvida nos processos de toxificação e detoxificação (BOUTIN *et al.*, 2005; WITT-ENDERLY *et al.*, 2003). Além desses alvos, a melatonina pode regular a expressão de genes atuando em receptores nucleares, interagir com proteínas celulares, tais como calmodulina ou proteínas associadas à tubulina, e ainda pode, diretamente, seqüestrar espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (HORSTMAN *et al.*, 2002; CLAUSTRAT *et al.*, 2005).

O receptor MT1 (MT1R) é encontrado em vários tecidos, como núcleo supraquiasmático (SCN) e vasos cardíacos, além de outras regiões cerebrais e tecidos periféricos, e está envolvido na modulação do ritmo circadiano e constrição de vasos cardíacos. Essa vasta distribuição deste receptor pode ser um fator que contribua para a diversidade de respostas geradas pela melatonina (WITT-ENDERLY *et al.*, 2003). Além disso, MT1R é formado de 350 aminoácidos (ALARMA-ESTRANY e PINTOR, 2007) e se liga à diversas proteínas G (CLAUSTRAT *et al.*, 2005), incluindo  $G_{i\alpha 2}$ ,  $G_{i\alpha 3}$ ,  $G_{\alpha q}$ ,  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha 16}$  (WITT-ENDERLY *et al.*, 2003) que mediam a ativação de fosfolipase C $\beta$  (PLC- $\beta$ ) e inibição da enzima adenilato ciclase, resultando em resposta inibitória sobre a cascata de sinalização mediada pelo AMPc, diminuindo a atividade de

proteína quinase A (PKA) e a fosforilação de CREB (elemento de ligação responsivo ao AMPc) (CLAUSTRAT *et al.*, 2005; WITT-ENDERLY *et al.*, 2003).

O receptor MT2 (MT2R) é constituído de 362 aminoácidos (ALARMA-ESTRANY e PINTOR, 2007) e está presente no cerebelo, SCN, retina, rim, ovário, vasos cardíacos e várias células cancerosas, e encontra-se envolvido na fisiologia da retina, modulação do ritmo circadiano, dilatação de vasos cardíacos e resposta inflamatória na microcirculação (WITT-ENDERLY *et al.*, 2003). Este receptor está relacionado à inibição da enzima adenilato ciclase e guanilato ciclase, inibindo a formação de AMPc e GMPc, respectivamente, e à hidrólise de fosfoinosítídeos (IP) (BOUTIN *et al.*, 2005).

De acordo com HARDELAND e colaboradores (2006) ambos receptores (MT1R e MT2R) estão envolvidos no feedback do SCN, sendo que o MT1R causa supressão da estimulação neuronal, enquanto MT2R mostra-se necessário para o ritmo circadiano. Polimorfismo dos receptores MT1 e MT2 foi detectado em humanos e pode estar relacionado a distúrbios do sono (CLAUSTRAT *et al.*, 2005).

Estes dois receptores MT1R e MT2R apresentam aproximadamente 60% de homologia e localizações cromossômicas diferentes, sendo que o gene do MT1R encontra-se na posição 4q35-1 e o do MT2R posiciona-se em 11q21-22 (ALARMA-ESTRANY e PINTOR, 2007).

O receptor MT3 (quinona redutase 2 - QR2) foi identificado em vários órgãos, como cérebro, rim, fígado, coração, tecido adiposo marrom, músculo esquelético, pulmão e baço (WITT-ENDERLY *et al.*, 2003). Este receptor não pertence à família dos receptores acoplados a proteína G (IUVONE *et al.*, 2005). QR2 é uma enzima pertencente ao grupo das quinonas redutases e está envolvida no processo de detoxificação do organismo

(BOUTIN *et al.*, 2005; ALARMA-ESTRANY e PINTOR, 2007). Acredita-se que estes receptores também estejam envolvidos no efeito antioxidante da melatonina (HARDELAND *et al.*, 2006). Conforme citado por BONDY e SHARMAN (2007) a inibição de QR2 mediada pela melatonina em altas doses poderia resultar na inibição da atividade (possivelmente tóxica), similarmente ao resveratrol, de MT3R e assim num fator protetor para o organismo.

De acordo ALARMA-ESTRANY e PINTOR (2007) dependendo do tecido, órgão e espécie, a melatonina pode ativar diferentes cascatas de segundos mensageiros e em alguns casos, pode regular positiva ou negativamente a mesma via de transdução de sinal.

Muitos dos efeitos produzidos pela melatonina ainda não têm seu mecanismo farmacológico elucidado. Assim, devido às características estruturais deste neurohormônio acredita-se que a melatonina, da mesma forma que outros hormônios endógenos, seja um ligante natural de receptores nucleares, como RZR/ROR, e que esta interação resulte nos efeitos imunomodulatórios da melatonina (CLAUSTRAT *et al.*, 2005).

Além dos mecanismos citados acima, a melatonina também exibe um efeito antioxidante direto e indireto (CLAUSTRAT *et al.*, 2005). Diretamente, a melatonina interage com várias espécies reativas ao oxigênio e nitrogênio, bem como radicais orgânicos, prevenindo dano ao DNA, proteínas e lipídios de membrana por radicais livres (CUI *et al.*, 2004). Indiretamente, este neurohormônio produz ação antioxidante por atenuar a produção de radicais livres através de efeitos antiinflamatórios, antiexcitatórios e por causar *downregulation* de enzimas pró-oxidantes (NO sintase e lipoxigenase), além de aumentar as defesas antioxidantes por *upregulation* de enzimas antioxidantes (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, glucose 6-fosfato desidrogenase e

algumas vezes, catalase e Cu-, Zn-,Mn-superóxido dismutase) (HARDELAND *et al.*, 2006; CLAUSTRAT *et al.*, 2005).

Ainda, acredita-se que as ações antiinflamatórias da melatonina são decorrentes da formação do metabólito AMK, capaz de causar inibição e *downregulation* da ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2) (HARDELAND *et al.*, 2006).

#### **1.7.4. Melatonina na doença de Parkinson**

Na DP, processos como a neuroinflamação e estresse oxidativo parecem estar significativamente envolvidos na patogênese desta doença. A ativação microglial, disfunção mitocondrial e a produção aumentada de espécies reativas contribuem para a disfunção neuronal por dano oxidativo à molécula de DNA, proteínas e lipídeos, ocasionando injúria neuronal e conseqüente morte celular (LEE MOSLEY *et al.*, 2006).

Algumas toxinas úteis no desenvolvimento de modelos animais para o estudo da DP, como MPTP, rotenona ou 6-OHDA, produzem dano neuronal através de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo que por sua vez, pode ser inibido por agentes antioxidantes e restauradores da cadeia transportadora de elétrons (AGUIAR *et al.*, 2005; LEON *et al.*, 2004; SHARMA *et al.*, 2006).

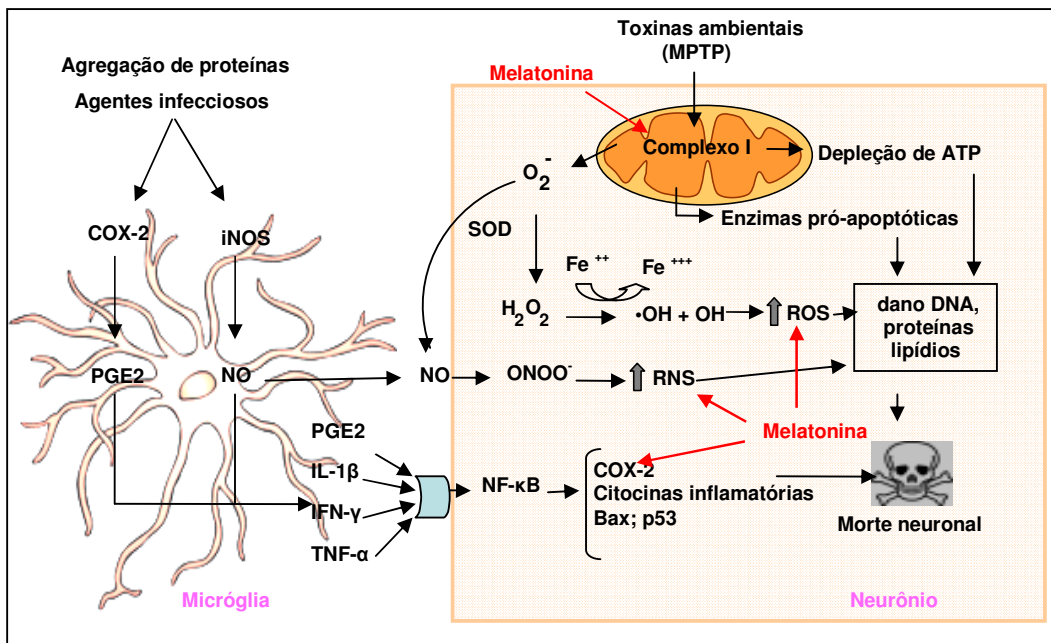
Conforme CUI e colaboradores (2004) mutações no DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) resultam em disfunção desta estrutura, com conseqüente aumento na liberação de ROS pela mitocôndria e falha energética (diminuição de ATP) que então pode ocasionar diminuição das defesas antioxidantes, deterioração do potencial de membrana nos neurônios e desequilíbrio na homeostasia do cálcio, o que pode contribuir para a morte neuronal por excitotoxicidade. Desta forma, essas evidências acabam por suportar a

hipótese do envolvimento do estresse oxidativo, excitotoxicidade e disfunção mitocondrial na patogênese da DP.

Baseado nessas evidências, a melatonina parece exercer efeito neuroprotetor por aumentar a atividade do complexo I mitocondrial (LEON *et al*, 2004; KHALDY *et al*, 2003), restaurando os níveis energéticos da célula, bem como diretamente seqüestrar espécies reativas como radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}\bullet$ ) e peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), impedindo o dano celular induzido por essas substâncias (LEON *et al*, 2004). Além disso, o efeito neuroprotetor deste neurohormônio pode resultar da atenuação do processo inflamatório por inibição e *downregulation* da enzima cicloxigenase tipo 2 (COX-2) (HARDEAND *et al*, 2006) e mais, por diminuir a indução de fosforilação da via c-Jun-N-terminal quinase (JNK), importante via apoptótica (CHETSAWANG *et al.*, 2004) (ver Fig. 3).

A importância da melatonina na função neuronal é reforçada por alguns autores que relatam que com o envelhecimento ocorrem alterações como aumento na calcificação da glândula pineal e diminuição na secreção de melatonina e que tais fatos estariam relacionados a várias desordens psiquiátricas (WILLIS, 2005; CUI *et al.*, 2004).

Desta forma, têm-se sugerido que a melatonina apresente um possível efeito protetor contra a degeneração neuronal (CHETSAWANG *et al.*, 2004).



**Figura 3.** A figura ilustra o envolvimento da neuroinflamação e estresse oxidativo na patogênese da doença de Parkinson e aponta os possíveis alvos de ação da melatonina, como o seqüestro de espécies reativas, efeitos antiinflamatórios e ainda, efeito restaurador da atividade mitocondrial. Adaptado de LEE MOSLEY *et al*, 2006.

### 1.7.5. Efeitos da Melatonina em outros sistemas biológicos

Este neurohormônio exibe diversas propriedades, como imunomodulatória (controlando a ativação de células T, B, NK, liberação de citocinas) e propriedade antiinflamatória que está relacionada à inibição de PGE<sub>2</sub> e *downregulation* da enzima COX-2 (HARDELAND *et al.*, 2006).

Além destes efeitos a melatonina possui atividade anticonvulsivante (YILDIRIM e MARANGOZ, 2006) e parece estar envolvida na modulação das funções cerebrais, melhorando o prejuízo cognitivo evidenciado em ratos tornados diabéticos pela injeção de estreptozotocina (TUZCU e BAYDAS, 2006).

Ainda, MENDELSON (2002) demonstrou que a administração de melatonina na área pré-óptica medial (MPA) do hipotálamo anterior de ratos resultou em aumento dose-dependente do tempo total de sono nos animais, principalmente do sono não REM (NREM) e, segundo este autor, baseado em estudos prévios, tal efeito pode ser mediado pela ação da melatonina na transmissão GABAérgica.

O sistema cardiovascular também parece sofrer influência deste neurohormônio secretado pela glândula pineal. Conforme MACCHI e BRUCE (2004) existe maior risco de derrame e infarto do miocárdio no período da manhã coincidentemente com a queda dos níveis de melatonina e ainda, pacientes com doença coronariana, quando comparados a indivíduos normais, apresentam níveis diminuídos de melatonina noturna e níveis aumentados de noradrenalina. GUVEN e colaboradores (2007) verificaram que a melatonina produziu certo efeito cardioprotetor frente à cardiotoxicidade induzida por epirrubicina, um agente quimioterápico de amplo espectro do grupo dos antraciclina, em ratos.

Além desses e de outros efeitos, a melatonina ainda parece estar envolvida na modulação imune. Segundo MACCHI e colaboradores (2004) vários trabalhos têm mostrado que esse hormônio possui propriedades oncostáticas que podem reduzir a promoção ou progressão do tumor e que a extração da pineal em ratos resulta em acelerado crescimento de carcinoma de Walker 265, sarcoma Yoshida e tumores mamários, dentre outros. Um estudo investigando a capacidade da melatonina de limitar a frequência de início de câncer mamário, bem como inibir a progressão do tumor induzido por dimetilbenzantraceno (DMBA) determinou que a melatonina apresenta efeito preventivo e curativo neste tipo de tumor (LENOIR *et al.*, 2005), sugerindo que

esta substância poderia reduzir o risco de câncer de mama induzido por fatores ambientais não identificados.

Uma vez que os tratamentos atualmente disponíveis para a DP e outras desordens neurodegenerativas baseiam-se apenas no alívio dos sintomas não alterando a evolução da doença (KITAMURA *et al*, 2002), a procura por novos agentes capazes de retardar ou impedir a progressão da doença é de fundamental importância no tratamento da DP.

Assim, embora a melatonina já tenha sido estudada em alguns modelos animais da DP, muitos aspectos ainda não foram respondidos. Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos farmacológicos da administração exógena de melatonina no modelo animal de parkinsonismo induzido pelo MPTP.