



**UFSM**

**Dissertação de Mestrado**

**INGESTÃO DA TINTURA DE *VALERIANA OFFICINALIS* PROTEGE  
DA DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR RESERPINA EM  
RATOS**

---

**Romaiana Picada Pereira**

**PPGBT**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

**INGESTÃO DA TINTURA DE *VALERIANA OFFICINALIS* PROTEGE  
DA DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR RESERPINA EM  
RATOS**

**por**

**Romaiana Picada Pereira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Ciências  
Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do  
grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**Orientadora: Vera Maria Morsch**

**Co-orientador: João Batista Teixeira da Rocha**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2009**

Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Dissertação de Mestrado

**INGESTÃO DA TINTURA DE *VALERIANA OFFICINALIS* PROTEGE DA  
DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR RESERPINA EM RATOS**

elaborada por

Romaiana Picada Pereira

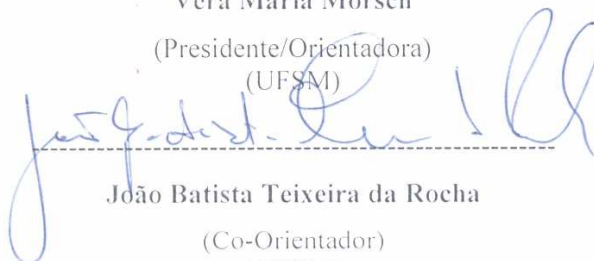
como requisito parcial para a obtenção de grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica.**

**COMISSÃO EXAMINADORA**



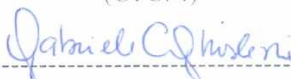
Vera Maria Morsch

(Presidente/Orientadora)  
(UFSM)

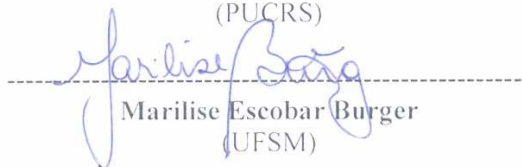


João Batista Teixeira da Rocha

(Co-Orientador)  
(UFSM)



Gabriele Cordenonzi Ghisleni  
(PUCRS)



Marilise Escobar Burger  
(UFSM)

Santa Maria, 15 de abril de 2009.

*"VENCER A SI PRÓPRIO É A MAIOR DAS VITÓRIAS"* (Platão)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus queridos pais, Alberto e Lizane, meus maiores exemplos de ética, honestidade, companheirismo, fidelidade, pelo carinho, apoio, compreensão, amor incondicional. Pai, mãe! Obrigada de coração por tudo, jamais esquecerei de tudo que sempre fizeram, sem medir esforços, para que eu estivesse hoje onde estou! Obrigada pela confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu querido e amado irmão que também sempre me apoiou incondicionalmente em tudo, acreditando no meu potencial e me incentivando sempre. Rômulo, obrigada! Você é e sempre será um grande exemplo para mim, tenho orgulho de ser tua irmã.

Ao meu orientador, Prof. João Batista Teixeira da Rocha, pelos inúmeros ensinamentos. São incontáveis as lições importantes que aprendi, e levarei para vida toda, dentro do laboratório do professor João, devido à maneira com que ele se preocupa com o crescimento profissional e pessoal dos alunos. Tenho muita sorte de ter sido orientada por esta pessoa, com uma mente tão brilhante, com quem venho aprendendo diariamente e crescendo em alta velocidade, devido aos desafios que ele nos lança, acreditando sempre que somos plenamente capazes de superá-los. Obrigada tio! Você é para mim um grande exemplo, admiro sua simplicidade e honestidade, serei eternamente grata por todas as oportunidades que você me proporcionou, pela amizade, paciência, compreensão, apoio, confiança. Enfim, obrigada, obrigada e, mais uma vez, obrigada por tudo!!!

À minha querida amiga Roselei Fachineto, um agradecimento muito especial: Rose, todas as palavras de agradecimento que eu dedicar a você serão ainda muito poucas, é impossível expressar em palavras toda a gratidão que tenho por você. Querida, você sempre foi para mim, além de uma amiga em quem confio de olhos fechados, o maior exemplo de profissional que atua com extrema competência e ética, em quem me inspiro sempre, tentando seguir seu exemplo, pois tenho profunda admiração pela maneira com que você está sempre disposta a ajudar todas as pessoas a sua volta. Muito, muito, muito obrigada pela orientação, pelos ensinamentos (pacientes explicações) e ajuda em tudo, pela sincera amizade e compreensão. Tua presença através do meu caminho foi essencial e serei eternamente grata. Espero poder fazer por muitas pessoas o que você sempre fez por mim.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Vera Maria Morsch, pela orientação, pela paciência, amizade, preocupação, confiança e pelos ensinamentos.

À Prof<sup>ª</sup> Marilise Escobar Burger por estar sempre disposta a me ajudar, pela amizade, pelo exemplo, pelos ensinamentos e por ter me proporcionado várias oportunidades de trabalho.

À Prof<sup>ª</sup> Margareth Linde Athayde, pela total receptividade de sempre, pelo apoio, pelo exemplo, pelos ensinamentos, pela amizade. E também à Aline, pela amizade e disposição de ajudar sempre, muito obrigada!

A todos os meus queridos amigos e colegas do Lab. do Prof. João: Jéssie, Alessandra, Cris, Carol, Alessandro, Andréia, Sally, Danúbia, Márcia, Daniel, Daia, Jose, Carlos, Tielle, Ruliana, Diéferson,... pelo carinho, amizade, companheirismo e por estarem sempre dispostos a me ajudar. Vocês tornam sempre meu dia-a-dia muito mais divertido, agradável e alto-astral. E também aos que não estão mais ali: Robson, Cássia, Jardel, Matheus, Diego, Néia, Verônica,... Obrigada pela amizade e toda ajuda de sempre, foi muito bom conviver com vocês!

Ao Prof. Félix, por seu exemplo, sua amizade, disposição para ajudar sempre, e também ao pessoal do seu laboratório (Daia, Rafa, Tiago, Nelson, Gustavo, Guilherme, Priscila, Luíza, Fernando,...) pela amizade.

Aos demais professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, que contribuíram de alguma forma para minha formação.

Em especial, à Angélica e ao Rinaldo pela sua dedicação, competência, por estarem sempre dispostos a ajudar em tudo e por sua preocupação sempre.

Ao CNPq e a CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica Toxicológica) pela possibilidade de realização deste curso.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
APRESENTAÇÃO.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>6</b>
3.1. Estresse oxidativo e desordens neurodegenerativas.....	6
3.2. Discinesia Tardia.....	7
3.2.1. Hipótese gabaérgica para explicar a patofisiologia da DT .....	9
3.2.2. Hipótese dos radicais livres para explicar a patofisiologia da DT.....	9
3.3. Doença de Parkinson.....	10
3.4. Reserpina e Discinesia Orofacial.....	11
3.5. Produtos Naturais e <i>Valeriana officinalis</i> .....	14
<b>4. MANUSCRITO.....</b>	<b>16</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

DA – dopamina

DCFH-DA – diacetato de diclorofluoresceína

DO – discinesia orofacial

DP – doença de Parkinson

DT – discinesia tardia

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

GABA – ácido  $\gamma$ -aminobutírico

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

MAO – enzima monoaminoxidase

MMV – movimentos de mascar no vazio

SOD – superóxido dismutase

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico



## LISTA DE FIGURAS

### Manuscrito

- Figura 1. A:** High performance liquid chromatography of *V. officinalis* tincture. 1 Represents an unknown peak; 2 corresponds to valeric acid peak. **B:** Represents a high performance liquid chromatography of valeric acid (peak 2) used as standard reference. Chromatographic conditions are described in the experimental section..... 47
- Figura 2. A:** High performance liquid chromatography of *V. officinalis* tincture. 1 corresponds to gallic acid peak 2 Represents an unknown peak. **B:** Represents a high performance liquid chromatography of gallic acid (peak 1) used as standard reference. Chromatographic conditions are described in the experimental section ..... 48
- Figura 3.** Effects of *V. officinalis* on reserpine-induced orofacial dyskinesia. Number of vacuous chewing movements (VCM) during 6 min. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M. (Control, n=5; *V. officinalis*, n=7; reserpine, n=7; reserpine + *V. officinalis*, n=6). One Way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests. \*Represents significant differences from control group..... 49
- Figure 4:** Effects of *V. officinalis* on open field test in rats. Number of (A) rearing, (B) crossings and (C) time of immobility during 2 min. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M. (Control, n=5; *V. officinalis*, n=7; reserpine, n=7; reserpine + *V. officinalis*, n=6)..... 50
- Figure 5:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on TBARS production in different brain regions of rats: cortex (A), hippocampus (B), striatum (C) and *substantia nigra* (D). C = Control; V = *V.officinalis*; R =

Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test..... 51

**Figure 6:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on DCF production in different brain regions of rats: cortex (**A**), hippocampus (**B**), striatum (**C**) and *substantia nigra* (**D**). C = Control; V = *V.officinalis*; R = Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test..... 52

**Figure 7:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on protein carbonyl levels in different brain regions of rats: cortex (**A**), hippocampus (**B**), striatum (**C**) and *substantia nigra* (**D**). C = Control; V = *V.officinalis*; R = Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test..... 53

**Figure 8:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in different brain regions of rats: cortex (**A**), hippocampus (**B**), striatum (**C**) and *substantia nigra* (**D**). C = Control; V = *V.officinalis*; R = Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test..... 54

**Figure 9. A:** Linear regression analysis between ROS production in cortex and number of VCMs developed by acute treatment with reserpine. Significance was considered when  $p < 0.05$ . **B :** Linear regression analysis between Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in *substantia nigra* and VCMs intensity developed by acute treatment with reserpine. Significance was considered when  $p < 0.05$ ..... 55

**Figure 10:** Effect of *V. officinalis* (0-32  $\mu$ g/mL) on iron sulfate (10  $\mu$ M) - induced a decrease in cell viability in slices from cortex of rats. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test. Different symbols represent statistically significant differences..... 56

## APRESENTAÇÃO

Nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, constam uma revisão sucinta da literatura sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

A metodologia realizada e os resultados obtidos que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, que se encontra no item **MANUSCRITO**. No mesmo constam as seções: Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontradas no final desta dissertação, apresentam descrições, interpretações e comentários gerais sobre os resultados do manuscrito presente neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**, **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** desta dissertação.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **INGESTÃO DA TINTURA DE *VALERIANA OFFICINALIS* PROTEGE DA DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR RESERPINA EM RATOS**

AUTORA: Romaiana Picada Pereira  
ORIENTADORA: Vera Maria Morsch  
CO-ORIENTADOR: João Batista Teixeira da Rocha  
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 15 de abril de 2009.

Considerando as hipóteses do papel da neurotransmissão gabaérgica e do estresse oxidativo no desenvolvimento de movimentos orais associados a neuropatologias importantes, o presente estudo investigou a possível habilidade da tintura de *V. officinalis* na prevenção dos movimentos de mascar no vazio (MMV) induzidos por reserpina em ratos. Os animais foram tratados com reserpina (1 mg/Kg, s.c.) e/ou com *V. officinalis* (na água de beber). MMV, atividade locomotora e medidas de estresse oxidativo foram avaliadas. O efeito neuroprotetor da *V. officinalis* contra a toxicidade celular induzida por ferro foi investigada em fatias de córtex cerebral. Além disso, fez-se a identificação do ácido valérico e do ácido gálico por HPLC na tintura de *V. officinalis*. Os resultados demonstram que a reserpina causou um aumento nos MMV quando comparado com o seu veículo e o co-tratamento com *V. officinalis* foi capaz de reduzir a intensidade dos MMV. A reserpina não alterou de forma significativa alguns parâmetros de estresse oxidativo analisados nas estruturas do cérebro (córtex, hipocampo, estriado e *substantia nigra*). Porém, uma correlação positiva entre os níveis de oxidação da DCF (uma estimativa do estresse oxidativo) no cortex e o número de MMV ( $p < 0.05$ ) foi observada. Além disso, foi observada uma tendência a haver uma correlação negativa entre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase na *substantia nigra* e o número de MMV ( $p = 0.055$ ). *In vitro*, *V. officinalis* protegeu as fatias de córtex cerebral contra a neurotoxicidade induzida por ferro. Desta forma, pode-se concluir que a *V. officinalis* apresentou efeitos neuroprotetores em ratos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, ou seja, reduziu a neurotoxicidade induzida por ferro e os MMV induzidos por reserpina, provavelmente via modulação do estresse oxidativo em núcleos específicos do cérebro e sua ação gabamimética. Porém, os mecanismos envolvidos nesta atividade protetora necessitam de mais investigações para melhor entender a ação da *V. officinalis*.

Palavras-chave: *Valeriana officinalis*; Reserpina; Discinesia Tardia; Doença de Parkinson; Estresse Oxidativo; Movimentos de Mascar no Vazio; Discinesia Orofacial; Ácido Gálico; Ácido Valérico.

## ABSTRACT

Master Dissertation  
Graduate Course in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### INTAKE OF THE *VALERIANA OFFICINALIS* TINCTURE PROTECTS AGAINST OROFACIAL DYSKINESIA INDUCED BY RESERPINE IN RATS

AUTHOR: Romaiana Picada Pereira  
ADVISOR: Vera Maria Morsch  
CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha  
DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, April, 15<sup>th</sup>, 2009.

Considering the hypothesis that GABA and oxidative stress are involved in the development of oral movements associated with important neuropathologies, the present study investigated the possible ability of *V. officinalis* in the prevention of vacuous chewing movements (VCMs) induced by reserpine in rats. Adult male rats were treated with reserpine (1 mg/kg, s.c.) and/or with *V. officinalis* (in the drinking water). VCMs, locomotor activity and oxidative stress measurements were evaluated. The neuroprotective effect of *V. officinalis* against iron-induced cell toxicity was investigated in brain cortical slices. Furthermore, we carried out the identification of valeric acid and gallic acid by HPLC in the *V. officinalis* tincture. Our findings demonstrate that reserpine caused a marked increase on VCMs and the co-treatment with *V. officinalis* was able to reduce the intensity of VCM. Reserpine did not induce oxidative stress in cerebral structures (cortex, hippocampus, striatum and *substantia nigra*). However, a significant positive correlation between DCF-oxidation (an estimation of oxidative stress) in the cortex and VCMs ( $p < 0.05$ ) was observed. Moreover, a tendency for a negative correlation between  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity in *substantia nigra* and the number of VCMs was observed ( $p = 0.06$ ). *In vitro*, *V. officinalis* protected brain cortical slices viability against Fe(II)-induced neurotoxicity. In conclusion, *V. officinalis* had *in vitro* and *in vivo* neuroprotective effects in rats, i.e., reduced Fe(II) neurotoxicity and reserpine-induced VCMs, probably via modulation of oxidative stress in specific brain nucleus and its GABA-mimetic action. However, the mechanisms involved in this protective activity needs to further investigated to better understand the action of *V. officinalis*.

Keywords: *Valeriana officinalis*; Reserpine; Tardive Dyskinesia; Parkinson's disease; Oxidative stress; Vacuous chewing movements; Oral Dyskinesia; Gallic Acid; Valeric Acid.

## 1. INTRODUÇÃO

Movimentos orais são importantes sintomas associados a condições neuropatológicas e farmacológicas, tais como discinesia tardia (DT) (Llorca, 2002), doença de Parkinson (DP) (Paille, 2004; Jicha e Salomone, 1991), Doença de Huntington (Smythies, 1999) e doença de Alzheimer (Donaire e Gil-Saladie, 2001). Estas síndromes são particularmente importantes devido a sua alta prevalência em humanos (Llorca, 2002; Paille, 2004; Jicha e Salomone, 1991; Smythies, 1999; Donaire e Gil-Saladie, 2001). A DT, por exemplo, uma síndrome relacionada ao uso crônico de neurolépticos, aparece em 20-30% dos pacientes sob tratamento com neurolépticos (Kane e Smith, 1982; Woerner e cols., 1991; Yassa e Jeste, 1992; Andreassen e Jorgensen, 2000). A DP, dentre as desordens neurodegenerativas relacionadas com a idade, é a segunda de maior prevalência, com mais de um milhão de casos somente nos Estados Unidos (Bove e cols., 2005). Vários trabalhos têm focado no desenvolvimento destas síndromes. Porém, o mecanismo envolvido na sua patogênese permanece desconhecido.

A este respeito, diferentes modelos animais para o estudo de distúrbios envolvendo movimentos orais, em particular movimentos de mascar no vazio (MMV), têm sido propostos como modelos potenciais para o estudo da DT (Abílio e cols., 2002, 2003, 2004, Carvalho e cols., 2003; Faria e cols., 2005; Neisewander e cols., 1991; Neisewander, 1994; Raghavendra e cols., 2001) bem como da DP (Baskin e Salamone, 1993; Salamone e Baskin, 1996; Paille e cols., 2004). Em relação aos MMV, vários estudos têm dado atenção especial ao papel do estresse oxidativo e têm suportado seu envolvimento na discinesia orofacial (DO) (Abílio e cols., 2003; Burger e cols., 2003; Naidu e cols., 2004). Porém, mudanças no balanço entre a neurotransmissão dopaminérgica, glutamatérgica e gabaérgica podem ser consideradas fatores importantes na sua instalação que poderia ser seguida pelo estresse oxidativo em áreas específicas do cérebro (Coyle e Puttfarcken, 1993; Dekeyser, 1991; Fibiger e Lloyd, 1984; Burger e cols., 2005).

Um modelo que tem sido extensamente usado na literatura para induzir DO envolve o tratamento agudo com reserpina. Esta droga causa depleção das reservas de dopamina (DA) vesicular via bloqueio da recaptção de monoamina, o que pode aumentar os níveis de DA e, conseqüentemente, seu metabolismo via monoamina oxidase (MAO). Neste

cenário, a exacerbação do metabolismo da DA pode levar à superprodução de radicais livres, particularmente, nos gânglios da base (Abílio e cols., 2003; Bilaska e Dubiel, 2007; Burger e cols., 2003; Naidu e cols., 2004). A quantidade relativamente alta de ferro nos gânglios da base pode também contribuir para o aumento do estresse oxidativo nesta região rica em DA. De fato, tem sido postulado que a interação ferro e DA nos gânglios da base pode ser um fator importante para o desenvolvimento da DP e DT (Arreguin e cols., 2009; Aisen e cols., 1999; Qian e cols., 1997; Swaiman, 1991).

Outra hipótese importante tem discutido o envolvimento de rotas gabaérgicas no desenvolvimento de MMV em ratos. Esta hipótese é sustentada por estudos onde agonistas GABA inibiram o desenvolvimento de MMV induzidos por reserpina e neurolépticos. (Peixoto e cols., 2003; Kaneda e cols., 1992; Gao e cols., 1994). Há também alguns estudos em humanos onde agonistas GABA melhoraram a DT (Tamminga e cols., 1979; 1983; Morselli e cols., 1985). Assim, preparações que poderiam modular tanto o estresse oxidativo quanto a neurotransmissão gabaérgica, podem ser consideradas interessantes no tratamento de distúrbios do movimento.

Raízes de Valeriana (*Valeriana officinalis* L., Valerianaceae) têm sido usadas durante séculos como calmante e indutora de sono (McCabe, 2002; Morazzoni e Bombardelli, 1995), estando entre as ervas medicinais mais amplamente usadas (Fugh-Berman e Cott, 1999). Os mecanismos envolvidos nas atividades farmacológicas e terapêuticas da *V. officinalis* não estão ainda completamente esclarecidos. Dados da literatura têm indicado que um aumento na transmissão gabaérgica poderia ditar as propriedades terapêuticas do extrato desta planta (Abourashed e cols., 2004; Mennini e cols., 1993; Cavadas e cols., 1995; Houghton, 1999.). Recentemente, dados da literatura indicaram que a *V. officinalis* exibiu atividade antioxidante em diferentes modelos *in vitro* (Sudati e cols., 2009; Malva e cols., 2004) e apresentou efeito citoprotetor em um modelo experimental de DP *in vitro* (Oliveira e cols., 2009). Além disso, nenhum sinal de toxicidade do seu uso tem sido reportado (Fachinetto e cols., 2007; Tabach e cols., 2009).

Neste contexto, considerando que a *V. officinalis* tem atividade antioxidante e propriedades gabamiméticas e que o desenvolvimento de MMV envolve estresse oxidativo e participação da neurotransmissão do GABA, neste estudo, foi testado o efeito da tintura de *V. officinalis* em um modelo animal de MMV induzidos por reserpina em ratos. Além

disso, foi investigada a presença de um composto fenólico (ácido gálico) com propriedade antioxidante conhecida (Pereira e cols., 2009; Ban e cols., 2008; Wu e cols., 2009) e de ácido valérico, que pode ser um dos componentes responsáveis pela atividade farmacológica da *V. officinalis* , no extrato testado.



## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

Avaliar o possível efeito da tintura de *Valeriana officinalis* na discinesia orofacial induzida por reserpina em ratos.

### Objetivos específicos

→ Verificar a presença de ácido gálico (um composto fenólico) e de ácido valérico na tintura de *V. officinalis*;

→ Investigar o efeito da tintura de *V. officinalis* sobre os movimentos de mascar no vazio induzidos por reserpina em ratos;

→ Avaliar a atividade locomotora dos animais tratados com reserpina e /ou *V. officinalis*;

→ Investigar o efeito dos tratamentos com reserpina e/ou *V. officinalis* sobre a peroxidação lipídica em diferentes estruturas cerebrais (córtex, hipocampo, estriado e *substantia nigra*) de ratos;

→ Investigar o efeito dos tratamentos com reserpina e/ou *V. officinalis* sobre a produção de EROs nas diferentes estruturas cerebrais de ratos;

→ Investigar o efeito dos tratamentos sobre os níveis de carbolilação de proteínas nas diferentes estruturas cerebrais de ratos;

→ Analisar a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  nas diferentes estruturas cerebrais dos ratos após os tratamentos acima citados;

→ Avaliar o efeito da tintura de *V. officinalis* sobre a viabilidade celular em fatias de córtex cerebral de ratos expostas ao ferro *in vitro*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1) ESTRESSE OXIDATIVO E DESORDENS NEURODEGENERATIVAS:

Sabe-se que todos os organismos aeróbicos necessitam de oxigênio para sua sobrevivência, porém a hiperóxia (excesso de O<sub>2</sub>) causa toxicidade aos mesmos, incluindo neurotoxicidade (Chavko e cols., 2003). Estes organismos produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) constantemente em condições fisiológicas normais. Dentre estas espécies estão os radicais livres (RLs), que são definidos como moléculas ou fragmentos moleculares com um ou mais elétrons desemparelhados. Em condições normais, tais espécies não causam nenhuma toxicidade aos organismos devido à presença de mecanismos antioxidantes nas células.

A capacidade antioxidante endógena é composta por várias vitaminas e enzimas como, por exemplo, as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx). Desta forma, o estresse oxidativo só se origina na ocorrência de um desequilíbrio entre a capacidade antioxidante do organismo e EROs ou ERNs, em favor das últimas. Este desequilíbrio, definido como estresse oxidativo, está entre os fatores que predispõe a ocorrência de desordens neurológicas (Hayashi, 2009).

O dano oxidativo pode ocorrer em todas as células aeróbicas, porém o cérebro é um órgão particularmente susceptível. Uma das razões para isso é o seu alto consumo de O<sub>2</sub> (aproximadamente 20% do consumo de O<sub>2</sub> de todo corpo) (Halliwell, 2006), além disso, o cérebro apresenta um nível relativamente baixo de enzimas antioxidantes, níveis elevados de metais de transição e, ainda, é rico em ácidos graxos poliinsaturados, propiciando a ocorrência da peroxidação lipídica (Reiter, 1995; Lohr e cols., 2003). Existem muitas desordens neurodegenerativas nas quais diferentes regiões cerebrais estão envolvidas, apresentando os mais variados sintomas e tendo diferentes causas, cuja patogênese se correlaciona com o estresse oxidativo (Halliwell, 2006). Dentre elas, podemos citar como exemplo, as doenças de Parkinson, Alzheimer, Huntington e a DT (Halliwell, 1992;

Simonian e Coyle, 1996; Gilgun-Sherki e cols., 2001; Lohr e cols., 2003; Honda e cols., 2004; Todorich e Connor, 2004; Onodera e cols., 2003; Cohen, 2000; Liu e cols., 1996; Casey, 1995; Lohr, 1991).

Neste contexto, vários trabalhos são feitos atualmente na busca de novos compostos com atividade antioxidante que tenham potencial para reverter o estresse oxidativo e assim atuar na cura e prevenção de uma série de doenças desencadeadas por estes eventos (Pereira e cols., 2009; Sudatti e cols. 2009; Bastianetto e Quirion, 2002; Ávila e cols., 2008; Wagner e cols., 2006; Williams e cols., 2004; Patel e cols., 2007). Dentre os compostos amplamente estudados por seu potencial promissor na busca de substâncias antioxidantes, destacam-se os produtos naturais, tais como as plantas medicinais, devido à presença de uma série de compostos com propriedades antioxidantes fazendo parte de sua constituição. Neste grupo de constituintes, destacam-se os compostos fenólicos, como por exemplo, o ácido gálico, por possuírem um papel chave na eliminação de radicais livres descrito em vários trabalhos (Moller e cols., 1999; Madsen e cols., 1996 Ban e cols., 2008; Pereira e cols., 2009).

### **3.2) DISCINESIA TARDIA:**

A DT é uma desordem caracterizada por movimentos anormais involuntários e repetitivos que consiste em um efeito colateral decorrente da terapia prolongada com medicamentos neurolépticos ou após a retirada dos mesmos, os quais são amplamente utilizados, desde 1950, no tratamento de pacientes com doenças mentais crônicas, tais como a esquizofrenia (Soares e McGrath, 1999). Os neurolépticos clássicos são efetivos no controle de sintomas positivos desta doença, como alucinações, porém 20-25% dos pacientes em tratamento contínuo com estas drogas, apresentam sinais da desordem (Andreassen e Jorgensen, 2000), o que pode resultar em considerável desabilidade física e social. (Barnes e Edwards, 1993). Esta síndrome hiperkinética atinge mais frequentemente a face, a boca e a língua (região orofacial), porém uma variedade de anormalidades motoras menos frequentes nos membros superiores, inferiores e no tronco podem também ocorrer (Kane, 1995). Além da alta prevalência da DT, um dos aspectos mais sérios desta síndrome é que ela pode persistir por meses ou anos após a retirada da droga, e em alguns pacientes, é

irreversível (Crane, 1973; Jeste e cols., 1979; Casey, 1985; Glazer e Hafez, 1990). A prevalência da DT aumenta fortemente com a idade, sendo acima de 50% em pacientes com mais de 50 anos. Desta forma, a idade é um dos mais importantes fatores de risco para a ocorrência desta síndrome (Kane, 1995; Cavallero e Smeraldi, 1995; Woerner, 1998), podendo também ser mais severa e persistente em pessoas idosas (Kane, 1992, 1995; Gardos e Cole, 1992). Discinesias espontâneas (pessoas não tratadas) também podem ocorrer, com uma prevalência de aproximadamente 5% (Kane e Smith, 1982), sendo também mais frequente com o aumento da idade (Casey, 1985). Outros fatores de risco podem incluir patologias estruturais do cérebro, déficits neuropsicológicos, diabetes mellitus, doenças mentais severas (distúrbios afetivos e esquizofrenia), outros efeitos colaterais extrapiramidais, porém resultados conflitantes têm sido obtidos em relação à importância destes fatores (Kane, 1995; Cavallero e Smeraldi, 1995). Alguns estudos têm indicado que fatores genéticos também podem desempenhar um papel na susceptibilidade ao desenvolvimento da DT (Yassa e Ananth, 1981; Weinhold e cols, 1981; Waddington e Yussef, 1986; Tamminga e cols., 1990; Rosengarten e cols., 1994; Steen e cols., 1997).

É importante ressaltar também que os antipsicóticos atípicos têm um risco muito baixo de induzir DT, porém apresentam uma série de outros efeitos colaterais, como por exemplo, diabetes mellitus tipo 2 e agranulocitose (Henderson, 2002), além de não serem tão eficazes no controle dos sintomas positivos da esquizofrenia e terem um custo mais elevado que os típicos.

As bases patofisiológicas da DT permanecem ainda não totalmente elucidadas, porém várias hipóteses têm sido apresentadas. Por muitos anos, a hipótese da supersensibilidade dopaminérgica foi amplamente aceita, porém hoje é considerada inadequada (Wolfarth e Ossowska, 1989). Esta hipótese defende a idéia de que o bloqueio dos receptores de DA pelas drogas neurolépticas poderia produzir um aumento compensatório no número e na sensibilidade dos receptores dopaminérgicos, o que poderia culminar com um estado hiperdopaminérgico e sintomas clínicos tais como a DT (Cavallero e Smeraldi, 1995; Kane, 1995). Outra explicação defendida por alguns autores é a hipótese da excitotoxicidade, onde o tratamento prolongado com neurolépticos poderia aumentar a liberação estriatal de glutamato, levando a excitotoxicidade (DeKeyser, 1991), o que exerceria importante papel no desenvolvimento da DT. Nesta revisão, daremos ênfase

às hipóteses mais relevantes para o nosso estudo, que são a hipótese gabaérgica e a hipótese dos radicais livres, as quais estão entre as mais aceitas atualmente, todavia devemos ressaltar que este fato não exclui a participação dos outros sistemas neurotransmissores como o dopaminérgico e o glutamatérgico.

### **3.2.1) Hipótese gabaérgica para explicar a patofisiologia da DT:**

Esta hipótese baseia-se em dados que demonstram uma diminuição na atividade da enzima ácido glutâmico descarboxilase (GAD), que catalisa a descarboxilação do glutamato para a síntese do ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), na *substantia nigra*, *globus pallidus* e núcleo subtalâmico de macacos e ratos apresentando movimentos orais induzidos por neurolépticos. Isto provocaria alterações na transmissão do GABA nos gânglios basais levando ao desenvolvimento da DT. Além disso, esta hipótese é sustentada por estudo em ratos, onde agonistas GABA inibem MMV induzidos por neurolépticos (Kaneda e cols., 1992; Gao e cols., 1994). Há também alguns estudos em humanos onde agonistas GABA melhoram a DT (Tamminga e cols., 1979, 1983).

### **3.2.2) Hipótese dos radicais livres para explicar a patofisiologia da DT:**

Esta hipótese sugere que o estresse oxidativo é um mecanismo envolvido na patogênese da DT (Cadet e cols., 1987; Lohr e cols., 2003). Este evento ocorreria da seguinte forma: os neurolépticos atuam bloqueando os receptores dopaminérgicos, podendo causar um aumento compensatório na síntese de DA. Este aumento de DA, aumentaria também sua desaminação oxidativa catalisada pela enzima monoamina oxidase (MAO) bem como sua autooxidação, com consequente formação de  $H_2O_2$  que pode ser convertido a radical hidroxil, altamente tóxico, via reação de Fenton, mediada por ferro (Graham, 1978; Chiueh e cols, 1992). Estes radicais então iniciariam a peroxidação lipídica, oxidação de cadeias de aminoácidos nas proteínas e provocariam danos no DNA e outras biomoléculas vitais (Finkel e cols., 2000; Valko e cols., 2004; 2007). Os níveis

aumentados de EROs poderiam prejudicar tanto a neurotransmissão quanto a viabilidade celular. Esta hipótese é também sustentada por estudos *in vitro* onde o haloperidol induz estresse oxidativo (Behl e cols., 1996; Sagara, 1998; Post e cols., 1998) e a vitamina E diminui as mudanças no metabolismo estriatal de monoaminas induzidas por neurolépticos (Jackson-Lewis e cols., 1991), além de proteger contra a morte celular induzida por neurolépticos (Behl e cols., 1995). Vários estudos têm mostrado efeito protetor da vitamina E nos sintomas da DT (Egan e cols., 1992; Dabiri e cols., 1994; Abílio e cols., 2003, Faria e cols., 2005). Além da vitamina E, outras substâncias antioxidantes também têm sido estudadas na tentativa de reverter esta síndrome (Faria e cols., 2005; Burger e cols., 2004). Várias evidências na literatura demonstram tratamentos antioxidantes prevenindo DT (Lohr e col., 2003; Dannon e cols., 1997).

Um outro fator, que também sustenta a hipótese dos radicais livres, é o fato de que há um aumento na geração e no acúmulo de EROs com a idade, resultando no dano oxidativo de moléculas biológicas críticas (Ames e cols., 1993; Gunne e cols., 1986; Hensley e cols., 2002; Wickens, 2001), e evidências demonstram que há também um aumento da DT com a idade (Ames e cols., 1993; Casey e cols., 2000; Lohr e cols., 2003; Burger e cols., 2004). De acordo com esta idéia, alguns estudos também mostraram aumento no estresse oxidativo em pacientes com DT (Tsai e cols., 1998).

### **3.3) DOENÇA DE PARKINSON:**

A DP é uma das desordens neurodegenerativas mais comuns, caracterizada por uma perda seletiva de neurônios dopaminérgicos na *substantia nigra* (Dawson e Dawson, 2003), afetando 1-2% da população acima de 65 anos (Eberhardt e Schulz, 2003). A causa desta desordem permanece ainda desconhecida. Fatores ambientais e genéticos parecem estar relacionados à sua etiologia (Gorell e cols., 2004; Sulzer, 2007).

Pacientes com DP apresentam distúrbios motores, déficits cognitivos (Dubois e cols., 1994; Shults, 2003; Lauterbach, 2004; Owen, 2004; Matsui e cols., 2006), alterações associadas à resposta a estímulos (Shohamy e cols., 2005; Nagy e cols., 2007), entre outros sintomas. Alguns pacientes podem também sofrer de ansiedade, depressão, distúrbios

autonômicos e demência (Dawson e Dawson, 2003). Estudos sugerem que os sintomas cognitivos observados parecem estar diretamente relacionados com os déficits motores (Carvalho e cols., 2006). Apesar de haverem terapias sintomáticas efetivas, nenhuma terapia neuropreventiva ou neurorestaurativa foi demonstrada (Dawson e Dawson, 2002).

Interações entre diversos sistemas neurotransmissores nos gânglios da base estão envolvidas nos aspectos que regulam a função motora relacionada ao parkinsonismo. Além da DA, pesquisas têm sugerido vários outros neurotransmissores, incluindo acetilcolina, serotonina, glutamato e GABA, em aspectos da função e disfunção motora (DeLong, 1990; Salamone e cols., 2001; Wichmann e cols., 2001; Cousins e cols., 1997). Mais recentemente, a adenosina também tem sido implicada na regulação das funções motoras dos gânglios da base (Ferré e cols., 1997; Ferré e cols., 2001; Svenningsson e cols., 1999; Salamone e cols., 2008).

Uma variedade de marcadores em pacientes com DP e modelos animais indicam o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese desta doença. Estes incluem peroxidação lipídica (Dexter e cols., 1986, 1989; Jenner, 1996; Smith e cols., 1987), glutatona reduzida (Sian e cols., 1994), níveis aumentados de ferro e concentrações reduzidas de ferritina na *substantia nigra* destes pacientes (Dexter e cols., 1990, 1992; Jellinger e cols., 1993). Desta forma, estratégias antioxidantes estão sendo testadas na terapia da DP (Alexi e cols., 2000).

Apesar de a etiologia da DP não ser ainda completamente compreendida, análises genéticas, estudos epidemiológicos, investigações neuropatológicas e o uso de modelos experimentais da DP têm fornecido novas informações importantes na patogênese da DP (Siderowf e Stern, 2003; Dawson e Dawson, 2003, Betarbet e cols., 2002; Warner e Schapira, 2003; Beal, 2001). Dentre estes modelos experimentais, se destaca o uso da reserpina. De fato a administração de reserpina a roedores mimetiza alguns sintomas do Parkinson, por depletar monoaminas e causar distúrbios do movimento semelhantes ao Parkinson (Colpaert, 1987; Gerlach e Riederer, 1996).

#### **3.4) RESERPINA E DISCINESIA OROFACIAL:**



A DO é um importante fenômeno com implicações em uma série de condições neuropsiquiátricas incluindo DT (Llorca e cols., 2002), DP (Paille e cols., 2004; Jicha e Salamone, 1991), doença de Huntington (Smythies, 1999) e doença de Alzheimer (Donaire e Gil-Saladie, 2001). A DO induzida pela idade também tem sido relatada (Wolfarth e Ossowska, 1989).

A Reserpina é um alcalóide obtido do arbusto *Rauwolfia*, que tem sido utilizado durante séculos na Índia para o tratamento de distúrbios mentais. Em concentrações muito baixas, esta droga bloqueia o transporte de monoaminas nas vesículas sinápticas através da sua ligação à proteína carreadora (Liu e Edwards, 1997). As monoaminas se acumulam no citoplasma, onde são degradadas pela MAO, diminuindo o conteúdo destas monoaminas, ocorrendo inibição da transmissão sináptica. A reserpina era utilizada na clínica no tratamento da hipertensão, porém apresenta efeitos colaterais como depressão, sendo atualmente utilizada apenas experimentalmente (Rang e cols., 2004).

A DO induzida pelo tratamento agudo com reserpina em roedores tem sido amplamente descrita. De fato, animais tratados com um agente depletor de monoaminas desenvolve DO caracterizada por protusão da língua, tremor da musculatura facial e movimentos orais espontâneos (Faria e cols., 2005). Estes movimentos, frequentemente chamados de movimentos de mascar no vazio (MMV), são usualmente caracterizados por abertura da boca no plano vertical individual e involuntária, com ou sem protusão da língua (Andreassen e Jorgensen, 2000). A DO induzida por reserpina tem sido extensamente utilizados como modelo animal para o estudo da DT (Neisewander e cols., 1994; Bergamo e cols., 1997; Queiroz e Frussa-Filho, 1999; Carvalho e cols., 2003; Raghavendra e cols., 2001; Calvente e cols., 2002; Abílio e cols., 2002, 2003, 2004; Burger e cols., 2003; Naidu e cols., 2004), bem como o modelo serve também para o estudo da DP, pois apresenta características similares aos tremores parkinsonianos (Baskin e Salamone, 1993; Steinpreis e cols., 1993; Salamone e Baskin, 1996). De acordo com as características farmacológicas do Parkinsonismo humano, MMV são também induzidos por agonistas muscarínicos (Baskin e cols., 1994; Finn e cols., 1997; Ishiwari e cols., 2004; Rupniak e cols., 1983) e por anticolinesterásicos (Collins e cols., 1993; Mayorga e cols., 1997, Trevitt e cols., 1997). Assim, este modelo de DO induzido por reserpina é interessante em vista da relevância

clínica das patologias acima citadas, proporcionando assim uma alternativa para um maior esclarecimento destas importantes desordens do movimento.

Similarmente ao que é observado clinicamente, onde o estresse oxidativo parece estar relacionado com as discinesias orais, o desenvolvimento de DO induzido por reserpina tem sido associado ao aumento do estresse oxidativo. A reserpina causa depleção dos estoques de DA vesicular por atuar bloqueando a recaptação de monoaminas, assim aumentam os níveis citosólicos de DA e, conseqüentemente, seu metabolismo via MAO. Este metabolismo acelerado pode levar a superprodução de RL nos gânglios basais (Abílio e cols., 2003; Bilska e Dubiel, 2007; Burger e cols., 2003; Naidu e cols., 2004). Além disso, a DA que está em excesso pode sofrer auto-oxidação formando DA quinona que pode agir como espécie reativa de oxigênio (Lohr, 1991; 2003). Assim, o cérebro sendo rico em monoaminas, é mais vulnerável ao dano causado pelos radicais livres e estresse oxidativo (Lohr e cols., 2003). Vários estudos usando o modelo de DO induzido por reserpina, mostram evidências de estresse oxidativo e peroxidação lipídica estriatal aumentados e compostos com propriedades antioxidantes, tais como melatonina (Reiter, 1998), ebselen, quercetina e vitamina E sendo eficazes em reverter os sintomas da DO (Abílio e cols., 2002, 2003; Burger e cols., 2003; Naidu e cols., 2004).

A diminuição na transmissão gabaérgica parece estar relacionada com a manifestação de MMV (Castro e cols., 2006). Neste contexto, outros estudos demonstram a habilidade de drogas gabaérgicas inibirem os movimentos orais (incluindo MMV) induzidos por reserpina. Por exemplo, o tratamento agudo com ácido valpróico (Peixoto e cols., 2003), uma droga gabamimética que aumenta a quantidade de GABA através da estimulação de enzimas que participam da sua síntese e inibição de enzimas que degradam o mesmo (MacNamara, 2001), bem como o tratamento com agonistas GABA apresentaram este efeito contra os MMV em ratos (MacNamara, 2001; Peixoto e cols., 2005). Em camundongos, o topiramato que, entre outros efeitos, aumenta a transmissão gabaérgica, diminuiu também os MMV neste modelo.

É importante salientar aqui, que alguns autores chamam atenção para o fato de que o modelo de DO induzido por reserpina apresenta algumas limitações, por exemplo, no estudo da DP, o modelo se limita pelo fato de que a droga não causa degeneração nigroestriatal (Fernandes e cols., 2008). E no caso do estudo da DT, sabe-se que, em

humanos, a retirada do tratamento prolongado com neurolépticos leva a exacerbação da síndrome, o que não é observado em modelos agudos de DO (Gunne e cols., 1982; Egan e cols., 1994).

### **3.5) PRODUTOS NATURAIS E *Valeriana officinalis*:**

Há um crescente número de trabalhos demonstrando os benefícios dos produtos naturais à saúde humana. Considerando estes produtos, destacam-se as plantas medicinais, que têm sido tradicionalmente usadas no tratamento de várias doenças. Suas propriedades terapêuticas e farmacológicas são atribuídas a diferentes constituintes químicos isolados de seus extratos. Dentre tais constituintes, destacam-se aqueles com atividade antioxidante, que têm demonstrado efeitos preventivos em várias doenças degenerativas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e desordens neurológicas, como, por exemplo, a doença de Alzheimer (Carlini, 2003; Cui e cols., 2004; Evans e cols., 2006; Mentreddy, 2007; Leite e cols., 1986; Velioglu e cols., 1998; Dreostic e cols., 1997; Jankun e cols., 1997; Wiseman e cols., 1997; Hertog e cols., 1993; Au Kono e cols., 1996; Tijburg e cols., 1997). Desta forma, as plantas medicinais têm mostrado boa perspectiva de aplicação na saúde humana (Silva e cols., 2005). Além disso, dados da literatura demonstram que as propriedades farmacológicas de extratos brutos de plantas podem ser perdidas quando se isolam componentes específicos. Isto indica que parte destas propriedades pode estar relacionada com o efeito sinérgico de diversos compostos. Assim, extratos brutos, como por exemplo, extratos aquosos (chás), podem oferecer maiores vantagens do que compostos isolados, uma vez que oferecem um menor custo, apresentam atividade farmacológica, baixa toxicidade, além de ser a forma mais utilizada tradicionalmente pela população (Petrovski e cols., 2006; Carlini, 2003; Pereira e cols., 2009).

Dentre os compostos que fazem parte da constituição dos extratos de plantas, estão os compostos fenólicos, tais como os flavonoides, que apresentam atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica e anticarcinogênica (Pereira e cols., 1996; Yang e cols., 1999; Thompson, 2000; Atoui e cols., 2005; Geetha e cols., 2005). Estudos também demonstram que estes compostos são mais efetivos que as vitaminas C e E em proteger as

células contra o dano causado por radicais livres (Wiseman e cols., 1997; Vinson e cols., 1995).

A *Valeriana officinalis* (*V. officinalis* L., Valerianaceae) é um exemplo de planta medicinal que tem sido amplamente utilizada mundialmente, principalmente nos Estados Unidos e na Europa. Os extratos das raízes desta planta são utilizados na medicina alternativa para o tratamento de insônia e ansiedade (Houghton, 1999; Richman e Witkowski, 1998, 1999; Abourashed e cols., 2004).

Dados recentes da literatura demonstraram efeito citoprotetor do extrato de *V. officinalis* em um modelo *in vitro* da DP (Oliveira e cols., 2008). Além disso, o extrato também tem demonstrado ação contra a peroxidação lipídica, apresentando atividade antioxidante frente a várias neurotoxinas (Malva e cols., 2004; Sudatti e cols., 2009) e não apresentou sinais de toxicidade em ratos após tratamento crônico (Fachinetti e cols., 2007).

As propriedades farmacológicas da *Valeriana* podem estar relacionadas, pelo menos em parte, a sua atividade antioxidante, porém outros mecanismos de ação também têm sido propostos para esta planta. Estas atividades são atribuídas a diferentes constituintes presentes na sua composição, incluindo valepotriatos (valtrato, isovaltrato e dihidrovaltrato), ácido valerênico e ácido valérico (Von der Hude e cols., 1985; Houghton, 1999).

Além disso, constituintes da *Valeriana* podem ativar receptores purinérgicos da adenosina (Müller e cols., 2002; Schumacher e cols., 2002). O ácido valerênico, principal constituinte da *Valeriana*, em altas concentrações ativa receptores do tipo GABA<sub>A</sub> (Khom e cols., 2007; Yuan e cols., 2004). O mecanismo molecular de ação dos constituintes da *Valeriana in vivo* permanece ainda desconhecido. Porém, Benke e cols. (2009) demonstraram recentemente que o ácido valerênico exerce atividade ansiolítica via receptores GABA<sub>A</sub> contendo subunidade  $\beta_3$ , pois neste estudo, camundongos com mutação em um aminoácido da subunidade  $\beta_3$ , não apresentaram atividade ansiolítica frente ao ácido valerênico, somente frente ao diazepam.

#### **4- MANUSCRITO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no manuscrito, o qual está disposto na forma em que será submetido para publicação.

*Valeriana officinalis* MELHORA OS MOVIMENTOS DE MASCAR NO  
VAZIO INDUZIDOS POR RESERPINA EM RATOS

**Manuscrito**

*Valeriana officinalis* AMELIORATE VACUOUS CHEWING

MOVEMENTS INDUCED BY RESERPINE IN RATS

ROMAIANA P. PEREIRA; ROSELEI FACHINETTO; ALESSANDRO S. PRESTES;  
CAROLINE WAGNER; JÉSSIE H. SUDATI; ALINE A. BOLIGON; MARGARETH L.  
ATHAYDE; VERA M MORSCH; JOÃO B.T. ROCHA.

*Valeriana officinalis* ameliorate vacuous chewing movements  
induced by reserpine in rats

<sup>a</sup>Romaiana Picada Pereira, <sup>a</sup>Roselei Fachinetto, <sup>a</sup>Alessandro de Souza Prestes, <sup>a</sup>Caroline  
Wagner, <sup>a</sup>Jéssie Haigert Sudati, Aline Augusti Boligon, <sup>b</sup>Margareth Linde Athayde, <sup>a</sup>Vera  
Maria Morsch, João Batista Teixeira Rocha<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica,  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Abdus Salam International Centre for Theoretical Physics

Corresponding author:

Dr. João Batista Teixeira Rocha  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Toxicológica  
97105-900, Santa Maria, RS, Brazil  
Tel: x21-55-220-8140  
Fax: x21-55-220-8978

e-mail: [jbtrocha@yahoo.com.br](mailto:jbtrocha@yahoo.com.br)

### ***Abstract***

Considering the hypothesis that GABA and oxidative stress are involved in the development of oral movements associated with important neuropathologies, the present study investigated the possible ability of *V. officinalis* in the prevention of vacuous chewing movements (VCMs) induced by reserpine in rats. Adult male rats were treated with reserpine (1 mg/kg, s.c.) and/or with *V. officinalis* (in the drinking water). VCMs, locomotor activity and oxidative stress measurements were evaluated. The neuroprotective effect of *V. officinalis* against iron-induced cell toxicity was investigated in brain cortical slices. Furthermore, we carried out the identification of valeric acid and gallic acid by HPLC in the *V. officinalis* tincture. Our findings demonstrate that reserpine caused a marked increase on VCMs and the co-treatment with *V. officinalis* was able to reduce the intensity of VCM. Reserpine did not induce oxidative stress in cerebral structures (cortex, hippocampus, striatum and *substantia nigra*). However, a significant positive correlation between DCF-oxidation (an estimation of oxidative stress) in the cortex and VCMs ( $p < 0.05$ ) was observed. Moreover, a tendency for a negative correlation between  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity in *substantia nigra* and the number of VCMs was observed ( $p = 0.06$ ). *In vitro*, *V. officinalis* protected brain cortical slices viability against Fe(II)-induced neurotoxicity. In conclusion, *V. officinalis* had *in vitro* and *in vivo* neuroprotective effects in rats, i.e., reduced Fe(II) neurotoxicity and reserpine-induced VCMs, probably via modulation of oxidative stress in specific brain nucleus and its GABA-mimetic action. However, the mechanisms involved in this protective activity needs to further investigated to better understand the action of *V. officinalis*.

Keywords: *Valeriana officinalis*; Reserpine; Tardive Dyskinesia; Parkinson's disease; Oxidative stress; Vacuous chewing movements; Oral Dyskinesia; Gallic Acid; Valeric Acid.



## 1. INTRODUCTION:

Oral movements are important symptoms associated with neuropathological and pharmacological conditions such as Tardive Dyskinesia (TD), Parkinson's disease, Huntington's disease and Alzheimer's disease. These syndromes are particularly important due to their high prevalence in humans (Llorca, 2002; Paille, 2004; Jicha and Salomone, 1991; Smythies, 1999; Donaire and Gil-Saladie, 2001). Of note TD, a syndrome related to chronic use of neuroleptics, appears in about 20-30% of patients under neuroleptic treatment (Kane and Smith, 1982; Woerner et al., 1991; Yassa and Jeste, 1992; Andreassen e Jorgensen, 2000). Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent age-related neurodegenerative disorder with over one million cases in the United States alone (Bove et al, 2005). Several works have focused on the mechanisms involved in the pathogenesis of these syndromes. However, the mechanisms involved in the development of these syndromes remain still unclear.

In this respect, literature data have proposed different animal models to study oral movements disturbances, in particular vacuous chewing movements (VCMs), as potential surrogate models of orofacial dyskinesia (OD) that have been considered a model of TD (Abílio et al., 2002, 2003, 2004, Carvalho et al., 2003; Faria et al., 2005; Neisewander et al., 1991; Neisewander, 1994; Raghavendra et al., 2001) and/or Parkinsonism-like symptoms (Baskin and Salamone, 1993; Salamone and Baskin, 1996; Paille et al., 2004). Regarding VCMs development, literature data have given a special attention to the role of oxidative stress and have supported its involvement in OD (Abílio et al, 2003; Burger et al., 2003; Naidu et al., 2004). However, changes in the balance between GABAergic, dopaminergic and glutamatergic neurotransmission can be considered more important

factors in OD installation that could be followed by oxidative stress in specific brain areas (Coyle and Puttfarcken, 1993; Dekeyser, 1991; Fibiger and Lloyd, 1984; Burger et al., 2005).

One model that has been extensively used in the literature to induce OD involves acute treatment with reserpine. Reserpine causes depletion of vesicular dopamine stores via blockage of monoamine reuptake, which can increase dopamine levels and, consequently, its metabolism via monoaminoxidase (MAO). In this scenario, exacerbation of dopamine metabolism can lead to overproduction of free radicals, particularly, in basal ganglia (Abílio et al., 2003a; Bilska and Dubiel, 2007; Burger et al., 2003; Naidu et al., 2004). The relative high content of iron in basal ganglia can also contribute to worsen oxidative stress in this dopamine-rich region (Arreguin et al., 2009). Indeed, it has been postulated that iron and dopamine interaction in basal ganglia can be an important factor for the development of PD and TD syndromes (Aisen et al., 1999; Qian et al., 1997; Swaiman, 1991).

Another important hypothesis has discussed the involvement of pallidal and nigral GABAergic pathways in the development of VCMs in rats. This hypothesis is supported by studies in rats, where GABA agonists inhibited the development of reserpine and neuroleptic-induced VCMs (Peixoto et al., 2003; Kaneda et al., 1992; Gao et al., 1994). Importantly, there are also some human studies showing that GABA agonists can improve negative symptoms of TD (Tamminga et al., 1979; 1983; Morselli et al., 1985). Thus, the study of preparations, which could modulate both oxidative stress and GABAergic neurotransmission, can be considered of interest in the treatment of movement disorders.

Valerian root (*Valeriana officinalis* L., Valerianaceae) has been used for centuries as a calming and sleep-promoting herb (McCabe, 2002; Morazzoni and Bombardelli, 1995)

and it is among the most widely used medicinal herbs (Fugh-Berman and Cott, 1999). The mechanisms involved in the pharmacological and therapeutic activities of *V. officinalis* have not yet completely clarified. Literature data have indicated that an increase in GABAergic transmission could dictate the therapeutic properties of this plant extract (Abourashed et al 2004; Mennini et al., 1993; Cavadas et al., 1995; Houghton, 1999). Recently, literature data have indicated that *V. officinalis* extracts exhibit antioxidant activity in different *in vitro* models (Malva et al. 2004; Sudati et al, 2009) and presented cytoprotective effect on an *in vitro* experimental model of Parkinson disease (Oliveira et al. 2009). Furthermore, no toxicity of its use has been reported in humans or in rodents after chronic treatment with *V. officinalis* extracts (Fachinetto et al., 2007; Tabach et al., 2009).

In this context, considering that *V. officinalis* has antioxidant and GABA-mimetic properties and that VCMs development seems to involve oxidative stress and the participation of GABA neurotransmission, we have tested the effect of *V. officinalis* in a reserpine-induced VCMs models in rats. Furthermore, we investigate the presence of a phenolic compound that have potential antioxidant properties (Pereira et al., 2009; Ban et al., 2008; Wu et al., 2009) and of Valeric acid, which can be one of the components responsible for the pharmacological activities of *V. officinalis*, in the tested extract.

## 2. MATERIALS AND METHODS:

### Drugs

Reserpine (methyl reserpate 3,4,5-trimethoxybenzoic acid ester), gallic acid and valeric acid (minimum 99%) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). A standard tincture of *V. officinalis* (10 g of valerian roots per 100 mL of ethanol) was obtained from Bio extracts (São Paulo, Brazil).

### Quantification of valeric acid and identification of gallic acid by HPLC analysis

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with the HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to the degasser DGU 20A5 with integrator CBM 20A, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and Software LC solution 1.22 SP1. Reverse phase chromatographic analyses were carried out in isocratic conditions using C-18 column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 $\mu$ m diameter particles, the mobile phase was methanol: water (80:20 v/v), 0.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; pH = 2. The mobile phase was filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane filter and then degassed by an ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of valeric acid standard reference were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 3.12 to 50.0 mg/mL. All solutions and samples were first filtered through a 0.45  $\mu$ m membrane filter (Millipore). Quantification was carried out by the integration of the peak using external standard method at 220 nm. The flow rate was 1.5 ml/min and the injection volume was 10  $\mu$ l. The chromatographic peaks were confirmed by

comparing their retention time and DAD-UV spectra with those of the reference standards and by spiking the isolated compounds in the plant sample. The presence of gallic acid in the plant was confirmed by the HPLC (290 nm; injection volume = 5  $\mu$ L; flow rate = 1 mL/min; column = C18; mobile phase = methanol: H<sub>2</sub>O and 0.4% acetic acid) in comparison with a standard reference of gallic acid. All chromatographic operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

### **Animals**

Male Wistar rats weighing 270-320 g and with age from 3 to 3.5 months, from our own breeding colony were kept in cages of 3 or 4 animals each, with continuous access to foods and *V. officinalis* or its vehicle (ethanol 1%) in a room with controlled temperature (22 $\pm$ 3 °C) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 am. The animals were maintained and used in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA).

### **Treatments**

The rats were divided into four groups: control group received acetic acid 0.1% (that was the reserpine vehicle, s.c.) and ethanol 1% (in the drinking water, that was *V. officinalis* vehicle); *V. officinalis* group received acetic acid 0.1% (s.c.) and *V. officinalis* 1% (in the drinking water); reserpine group received reserpine 1mg/kg (s.c.) and ethanol 1% (in the drinking water); and reserpine plus *V. officinalis* group received reserpine (s.c.) and *V. officinalis* 1% (in the drinking water). The number of animals in each group that received treatment was 5, 7, 7 and 6 for control, *V. officinalis*, reserpine and reserpine plus *V.*

*officinalis* groups, respectively. Reserpine or its vehicle was administered subcutaneously (s.c.) every each 2 days (1 mg/Kg, s.c.). *V. officinalis* was administered in the drinking water in a proportion of 1% (final concentration of 100 mg/mL). The dosage was calculated every week by the amount of water drunk assuming equal drinking among the four animals. Thus, each animal received *V. officinalis* extract in a dosage about 200-250 mg/Kg/day.

*V. officinalis* and its vehicle were placed daily before the beginning of the dark cycle. It was not observed a reduction in liquid intake among the groups (data not shown).

*V. officinalis* treatment started 15 days before the administration of the reserpine. The treatment with reserpine was carried out during 3 days every other day concomitantly with *V. officinalis*.

### **Behavioral analysis**

#### **Quantification of VCMs**

Behavior measurement of VCMs was assessed before the treatment with reserpine or its vehicle (basal evaluation). The effect of drugs on behavior was examined in the beginning of *V. officinalis* administration (basal evaluation), in the beginning of reserpine administration (day 15) and after reserpine and *V. officinalis* treatment (day 18). To quantify the occurrence of VCMs, rats were placed individually in cages (20x20x19 cm) and hand operated counters were employed to quantify VCMs frequency. VCMs are defined as single mouth openings in the vertical plane not directed towards physical material. If VCMs occurred during a period of grooming they were not taken into account. The behavioral parameters of OD were measured continuously for 6 min after a period of 6 min adaptation. During the observation sessions, mirrors were placed under the floor of the

experimental cage to permit observation when the animal was faced away from the observer. Experimenters were always blind with regard to the treatment conditions.

### **Open field test**

To analyze changes in spontaneous locomotor activity caused by treatment with Reserpine and/or *V. officinalis*, the animals were placed individually in the center of an open-field arena (40×40×30 cm) with black plywood walls and a white floor divided into 9 equal squares, as previously described (Broadhurst, 1960). The number of rearing, number of line crossings and the time of immobility was measured over 2 min and taken as an indicator of locomotor activity.

### **Tissue preparations**

Rats were killed about 24 hours after the last session of behavioral quantification (on the 4<sup>th</sup> day after the first administration of reserpine). The brains were immediately excised and put on ice. The cortex, hippocampus, striatum and region containing the substantia nigra were separated, weighed and homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4.

### **Preparation of Cortical Slices for *in vitro* assay**

Rats were decapitated and the left cerebral hemisphere was used for preparation of cortical slices. Cortex was dissected and coronal slices (0.4 mm thickness) were obtained from the parietal area using a McIlwain tissue chopper.

### **Oxidative stress parameters**

To evaluate the levels of reactive oxygen species (ROS), the homogenates were centrifuged for 10 min at 1,500 x g. Just after the centrifugation, an aliquot of supernatant was used for 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) oxidation. DCFH-DA-oxidation was determined spectrofluorimetrically, using 7  $\mu$ M of DCFH-DA. Fluorescence was determined at 488 nm for excitation and 520 nm for emission. A standard curve was carried out using increasing concentrations of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) incubated in parallel (Pérez-Severiano et al, 2004).

To assess lipid peroxidation, we quantified thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The homogenates were centrifuged for 10 min at 1,500 x g. Just after the centrifugation, an aliquot of 200  $\mu$ l or of supernatant was incubated for 1 h at 37°C and then used for lipid peroxidation quantification as earlier described (Ohkawa et al, 1979).

To verify protein carbonyl, cortical and nigral tissues were homogenized in 10 volumes (w/v) of 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4. The protein carbonyl content was determined by the method described by Yan et al. (1995), with some modifications. Briefly, homogenates were diluted 1:8 in 10 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 and 1 ml aliquots were mixed with 0.2 ml of 2,4-dinitrophenylhydrazine (10 mM DNPH) or 0.2 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark ambient, 0.5 ml of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 2 ml of heptane (99.5%) and 2 ml of ethanol (99.8%) were added sequentially, and mixed with vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. After that, the protein isolated from the interface was washed two times with 1ml of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 ml of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm against the corresponding HCl



sample (blank), and total carbonylation calculated using a molar extinction coefficient of  $22,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  according to Levine et al. (1990).

The ATPase activity from brain regions was measured spectrophotometrically by determining the inorganic phosphate (Pi) released (Fiske and Subbarow, 1925).  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity was calculated as the difference between the total  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity (samples without ouabain) and  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity determined in the presence 0.5 mmol/L of ouabain. Both activities were determined in the presence of 125 mmol/L NaCl and 20 mmol/L KCl.

#### **Cell viability *in vitro* by Tetrazolium salt method (MTT assay)**

To prepare cortical slices, rats were decapitated and the left cerebral hemisphere was used for preparation of the slices. Cortexes were dissected and coronal slices (0.4 mm thickness) were obtained from the parietal area using a McIlwain tissue chopper.

The viability assay was performed by the colorimetric 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) method. Slices from cortex of rats were pre-incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 1 hour in cerebral spinal fluid buffer (CSF) (pH 7.4) (1:10 (w:v)) in the presence or absence of *V. officinalis* (0-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and of iron sulfate (10  $\mu\text{M}$ ). Immediately after preincubation, 0.5 mg/ml of MTT was added to the medium containing the slices, followed by incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 1 hour. The formazan product generated during the incubation was solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and measured at 570 and 630 nm. Only viable slices are able to reduce MTT. (Mosmann, 1983).

#### **Statistical Analysis**

Data from behavioral parameter were analyzed by one-way or two-way ANOVA. F values are presented in the text only if p value associated with it was  $<0.05$ . Data from TBARS, ROS quantification, carbonyl content and cell viability were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey Post Hoc test when appropriate. A possible relationship between oxidative stress parameters and VCM were also determined using linear regression analysis. Significance was considered when  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTS:

#### HPLC analyses

HPLC analysis of *V. officinalis* extract revealed a peak with a retention time of 2.57 min, which corresponds to valeric acid (Figure 1A and B). Valeric acid concentration was 6.11 mg/mL in the analyzed sample (10 mg/mL). Additionally, a peak (r.t = 2.74 min) can be attributed to the presence of gallic acid in the tincture of *V. officinalis* used in this work (Figure 2).

#### Effects of *V. officinalis* on reserpine-induced VCMs

Reserpine caused a marked increase on VCMs when compared with its vehicle ( $p < 0.001$ ; Figure 3). Consumption *V. officinalis* tincture prevented the increase in the incidence of VCM caused by reserpine and *V. officinalis* extract alone did not cause any significant effect on VCMs intensity (Figure 3).

#### Effects of long-term treatment with *V. officinalis* and reserpine on locomotor activity in rats

Reserpine did not change locomotor activity, as assessed by the number of rearing, crossings and immobility in the open field test. *V. officinalis* also did not cause change in locomotor activity neither alone nor when administered concomitantly with reserpine (Figure 4).

#### Effects of reserpine and *V. officinalis* on oxidative stress parameters

Reserpine treatment (alone or with *V. officinalis*) did not change cortical, hippocampal, striatal or nigral TBARS levels (Figure 5A-D), DCFH-DA oxidation (Figure 6A-D), protein carbonyl levels (7A-B) or Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity (8A-B).

However, a positive correlation between DCF production in cortex and number of VCMs ( $r=0.42$  and  $p=0.04$ ), and also a tendency for a significant negative correlation between Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in *substantia nigra* and VCMs intensity ( $r=0.41$  and  $p=0.055$ ; Figure 9).

**Effect of *V. officinalis* on Fe(II)-induced cerebral cortex slices toxicity (cell viability)**

Iron sulfate (10  $\mu$ M) caused a significant decrease in cell viability relative to control. However, *V. officinalis*, at all tested concentrations (2, 8, 16 and 32  $\mu$ g/mL), was able to cause a concentration dependent protection against cell toxicity provoked by Fe(II) in cortical brain slices (Figure 10).

#### 4. DISCUSSION:

In the present study we investigate the possible preventive effect of *Valeriana officinalis*, a medicinal plant widely used to improve disturbances of the sleep, against well known symptoms associated with neuropathological and pharmacological conditions, namely oral movements (including VCMs). For this objective, we have used a accepted animal model of OD which is induced by reserpine and have been considered a model of TD (Abílio et al., 2002, 2003, 2004, Carvalho et al., 2003; Faria et al., 2005; Neisewander et al., 1991; Neisewander, 1994; Raghavendra et al., 2001) or a model of acute parkinsonian tremor by different laboratories (Baskin and Salamone, 1993; Salamone and Baskin, 1996; Paille et al., 2004). This model has been used by various laboratories to study movement disorder associated with oxidative stress and neurodegenerative diseases (Abílio et al., 2003; Bilska and Dubiel, 2007; Castro et al., 2006; Naidu et al., 2004; Peixoto et al., 2005). Where reserpine, a monoamine depletor, prevents the storage of dopamine (DA) in neuronal synaptic vesicles and interferes with the vesicular monoamine transporter (VMAT), causing an increase in cytosolic DA that can be oxidatively metabolized by monoamine oxidase (MAO). This accelerated DA metabolism can lead to the formation of reactive metabolites and hydrogen peroxide, which can be associated with the oxidative stress process in dopaminergic neurons (Abílio et al., 2003; Bilska and Dubiel, 2007; Burger et al., 2003; Naidu et al., 2004). Furthermore, autoxidation of DA produce O-quinone aminochrome that can undergo one-electron reduction to form the leukoaminochrome O-semiquinone radical, which is thought to be one of the major sources of endogenous reactive species involved in the degenerative processes (Fuentes et al., 2007;

Paris et al., 2001, 2005; Segura-Aguilar et al., 2002). Particularly, the brain basal ganglia are rich in monoamines and iron, which therefore makes this region more vulnerable to oxidative stress (Lohr et al., 2003).

Since literature data demonstrate that VCMs development is associated with oxidative stress (Abílio et al., 2003; Burger et al., 2003; Naidu et al., 2004), we have tested *V. officinalis*, which have been shown to exhibit antioxidant properties in different in vitro models (Malva et al., 2004; Sudati et al., 2009; Oliveira et al., 2009). In accordance with this, we have demonstrated the presence of a phenolic compound (gallic acid) with is well-known antioxidant agent (Pereira et al., 2009; Ban et al., 2008; Wu et al., 2009).

Reserpine-induced VCMs has been considered as a tentative model of oxidative stress, basically based on TBARS determination (Burger et al., 2004; Teixeira et al., 2009). Here we have not found alterations in oxidative stress parameters as determined by TBARS, DCFH-DA oxidation and protein carbonylation. The discrepancies between the results are difficult to explain, but may be related to the fact that oxidative stress after reserpine treatment could occur in specific area and can spread to other brain areas depending on subtle factors that was not controlled in these studies. Anyway, we have observed here a positive correlation between cerebral DCFH-DA-oxidation and VCM frequency, indicating that ROS can play a role in OD development. We have also detected a negative correlation between VCM frequency with  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity in *substantia nigra*. This SH-containing enzyme is a key component of cellular ion homeostasis and oxidative damage can cause its inactivation (Thevenod and Friedmann, 1999). Here we have observed that  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity decreases as the intensity of OD increases. So, oxidative stress could be involved in  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase inhibition and in OD development..

Furthermore, recently we have observed that fluphenazine and haloperidol, classical antipsychotic drugs that can also lead to OD in animal models, did not cause gross punctual changes in oxidative stress in different brain areas of rats (Fachinnetto et al., 2007a, b).

Although here we have not confirmed the presence of oxidative stress after reserpine administration, we have observed a clear protective effect of *V. officinalis* against reserpine-induced OD development. *V. officinalis* is a world widely used herbal product to induce sleep (Richman and Witkowski, 1998, 1999; Houghton, 1999; Ang-Lee et al., 2001; Malva et al., 2004; Ang-Lee, 2003), increasing the significance of the present findings. The pharmacological activities of *V. officinalis* are attributed to its different constituents, including valepotriates (valtrate/isovaltrate and dihydrovaltrate) (Von der Hude et al., 1985), valerenic acid and valeric acid. Here we have confirmed the presence of some of these components, particularly valeric acid. One tentative mechanism of *V. officinalis* beneficial effects has been linked to a potentiation of GABAergic transmission (Mennini et al., 1993; Ortiz et al., 1999; Santos et al., 1994; Cavadas et al., 1995; Houghton, 1999). Of particular importance, literature data have indicated that pharmacological activation of GABAergic neurotransmission can reduce reserpine-induced OD development in rodents (Peixoto et al., 2003; 2005, Araujo et al., 2005; White et al., 1997a,b; Castro et al., 2006). In this vein, *Withania somnifera* extracts can protect against reserpine-induced neurotoxic effects tentatively via a GABAergic activation (Kulkarni and Dhir et al., 2008; Naidu et al., 2006).

Literature data have suggested that iron deposition associated with dopaminergic neurotransmission can be an important factor in the development of dyskinesias in different pathologies (Arreguin e cols., 2009; Aisen et al., 1999; Qian et al., 1997; Swaiman, 1991).

Here we have investigated the potential antioxidant effect of *V. officinalis* against Fe(II) induced neurotoxicity in brain cortical slices and we have observed that Fe(II) caused a decrease in cell viability that was counteracted by *V. officinalis*, indicating an additional mechanism via which the extract could protect against the neurotoxic effect of reserpine.

The results presented here suggest that *V. officinalis* extracts can be a neuroprotective agent against reserpine-induced neurotoxicity. In fact, *V. officinalis* extracts prevented OD induced by reserpine. Literature data have suggested that reserpine-induced OD can be used as a model of PD or TD (Abílio et al., 2002, 2003, 2004, Carvalho et al., 2003; Faria et al., 2005; Neisewander et al., 1991; Neisewander, 1994; Raghavendra et al., 2001; Baskin and Salamone, 1993; Salamone and Baskin, 1996; Paille et al., 2004). In view of the fact that there are no effective treatments for these pathologies, literature data should investigate whether the regular intake of *V. officinalis* could reduce the incidence of TD in patients using drugs that can increase the incidence of TD.

#### *Acknowledgments*

The financial support by CAPES, CNPq (014/2006), FAPERGS and Cristália-SP is gratefully acknowledged.



## 5. REFERENCES:

1. Abílio, V.C.; Araujo, C.C.S.; Bergamo, M.; Calvente, P.R.V.; D'Almeida, V.; Ribeiro, R. de A.; Frussa-Filho, R., 2003. Vitamin E attenuates reserpine induced oral dyskinesia and striatal GSSG/GSH ratio enhancement in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 109–114.
2. Abílio, V.C.; Silva, R.H.; Carvalho, R.C.; Grassl, C.; Calzavara, M.B.; Registro, S.; D'Almeida, V.; Ribeiro, R. de A.; Frussa-Filho, R., 2004. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia, *Neuropharmacology* 47: 263–272.
3. Abílio, V.C.; Vera-Jr, J.A.R.; Ferreira, L.S.M.; Duarte, C.R.M.; Carvalho, R.C.; Grassl, C.; Martins, C.R.; Torres-Leite, D.; Bignotto, M.; Tufik, S.; Ribeiro, R. de A.; Frussa-Filho, R., 2002. Effects of melatonin on orofacial movements in rats, *Psychopharmacology* 161: 340–347.
4. Abourashed, E.A., Koetter, U.; Brattstrom, A., 2004. *In vitro* binding experiments with a Valerian, hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors. *Phytomedicine* 11:633–8
5. Aisen, P.; Wessling-Resnick, M.; Leibold, E.A., 1999. Iron metabolism. *Curr Opin Chem Biol* 3:200–206
6. Andreassen, O.A. and Jorgensen, H.A., 2000. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol* 61: 525-541.
7. Ang-Lee, M.K., 2003. Most commonly used herbal medicines in the USA. In: Yuan, C.S., Bieber, E.J. (Eds.), *Textbook of Complementary and Alternative Medicine*. Parthenon, New York, pp. 7–32.
8. Ang-Lee, M.K., Moss, J., Yuan, C.S., 2001. Herbal medicines and perioperative care. *JAMA* 286, 208–216.
9. Araujo, N.P.; Abílio, V.C.; Silva, R.H.; Pereira, R.C.; Carvalho, R.C.; Gonzalez, C.; Bellot, R.G.; Castro, J.P.M.V.; Fukushiro, D.F.; Rodrigues, M.S.D.; Chinen, C.C.; Frussa-Filho, R., 2005. Effects of topiramate on oral dyskinesia induced by reserpine, *Brain Res Bull* 64: 331–337.
10. Arreguin, S.; Nelson, P.; Padway, S.; Shirazi, M.; Pierpont, C., 2009. Dopamine complexes of iron in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *J Inorg Biochem* 103: 87–93.

11. Ban, J. Y.; Nguyen, T. T. H.; Lee, H.J.; Cho, S. O.; Ju, H. S.; Kim, J. Y.; Bae, K.H.; Song, K.S.; Seong, Y. H., 2008. Neuroprotective Properties of Gallic Acid from *Sanguisorbae Radix* on Amyloid  $\beta$  Protein (25—35)-Induced Toxicity in Cultured Rat Cortical Neurons. *Biol Pharm Bull* 31: 149- 153.
12. Baskin, P.; Salamone, J., 1993. Vacuous jaw movements in rats induced by acute reserpine administration: interactions with different doses of apomorphine, *Pharmacol Biochem. Behav* 46: 793–797.
13. Bilska A, Dubiel M., 2007. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neuroscience* 146:1758- 71.
14. Bove, J.; Prou, D.; Perier, C.; Przedborski, S., 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2:484–494.
15. Broadhurst, P.L., 1960. Experiments in psychogenetics. In: Eysenk HJ, editor. *Experiments in personality*. London: Routledge & Kegan Paul; p. 76.
16. Burger, M.E.; Audrei, A.; Callegari, L.; Athayde, F. R.; Nogueira, C. W.; Zeni, G.; Rocha, J. B.T., 2003. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:135– 140
17. Burger, M.E.; Fachineto, R.; Alves, A.; Callegari, L.; Rocha, J.B.T., 2005. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. *Brain Res*, 1031: 202-210.
18. Burger, M.E.; Fachineto, R.; Calegari, L.; Paixão, M.W.; Braga, A.L.; Rocha, J.B.T., 2004. Effects on age on orofacial dyskinesia reserpine-induced and possible protection of diphenyl-diselenide. *Brain Res Bull* 64: 339–45.
19. Carvalho, R.C.; Silva, R.H.; Abílio, V.C.; Barbosa, P.N.; Frussa-Filho, R., 2003. Antydyskinetic effects of risperidone on animal models of tardive dyskinesia in mice, *Brain Res Bull* 60: 115–124.
20. Castro, J. P.M.V.; Frussa-Filho, R.; Fukushiro, D. F.; Silva, R. H.;Medrano, W. A.; Ribeiro, R. de A.; Abílio, V. C. , 2006. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull* 68 : 436–441.
21. Cavadas, C., Araujo, I., Cotrim, M.D., Amaral, T., Cunha, A.P., Macedo, T., Ribeiro, C.F., 1995. In vitro study on the interaction of *Valeriana officinalis* L. extracts and their amino acids on GABAA receptor in rat brain. *Arzneimittelforschung* 45: 753–755.

22. Coyle, J. T.; Puttfarcken, P., 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262: 689-695.
23. Dekeyser, J., 1991. Excitotoxic mechanisms may be involved in the pathophysiology of tardive-dyskinesia. *Clin Neuropharmacol*, 14: 562-565.
24. Donaire, A.M., Gil-Saladie, D., 2001. Progressive primary aphasia associated with corticobasal degeneration. *Rev Neurol* 32: 1051-1054.
25. Fachinetto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Puntel RL, Paixão MW, Braga AL, Calixto JB, Rocha JBT, Ferreira J, 2007. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology* 194:423–432
26. Fachinetto, R.; Villarinho, J.G.; Wagner, C.; Pereira, R.P.; Ávila, D.S.; Burger, M.E.; Calixto, J.B.; Rocha, J.B.T.; Ferreira, J., 2007. *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: Role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1478–1486.
27. Faria, R.R.; Abílio, V.C.; Grassl, C.; Chinen, C.C.; Ribeiro, L.T.; Castro, J.P.M.V.; Fukushima, D.F.; Dutra-Rodrigues, M.S.; Zanier-Gomes, P.H.; Registro, S.; Carvalho, R.C.; D’Almeida, V.; Silva, R.H.; Ribeiro, R. de A.; Frussa-Filho, R., 2005. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: critical role of striatal catalase activity, *Neuropharmacology* 48: 993–1001.
28. Fibiger, H. C.; Lloyd, K. G., 1984. Neurobiological substrates of tardive-dyskinesia - the GABA hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 7: 462-464
29. Fiske, C.F., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66, 375–400.
30. Fuentes, P.; Paris, I.; Nassif, M.; Caviedes, P.; Segura-Aguilar, S., 2007. Inhibition of VMAT-2 and DT diaphorase induced cell death in a substantia nigra-derived cell line-na experimental cell model for dopamine toxicity studies. *Chem Res Toxicol* 20:776–83.
31. Fugh-Berman, A., Cott, J.M., 1999. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. *Psychosom Med* 61:712–28.
32. Gao, X.M.; Kakigi, T.; Friedman, M.B.; Tamminga, C.A., 1994. Tiagabine inhibits haloperidol-induced oral dyskinesias in rats. *J Neural Transm Gen Sect* 95: 63-69
33. Houghton, P.J., 1999. The scientific basis for the reputed activity of valerian. *J. Pharm Pharmacol* 51, 505–512.

34. Jicha, G.A., Salomone, J.D., 1991. Vacuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: possible relation to parkinsonian symptoms. *Journal of Neuroscience* 11: 3822-3829.
35. Kane JM, Smith J.M., 1982. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Arch Gen Psychiatry* 39: 473-81.
36. Kaneda, H.; Shirakawa, O.; Dale, J.; Goodman, L.; Bachus, S.E.; Tamminga, C.A., 1992. Co-administration of progabide inhibits haloperidol-induced oral dyskinesias in rats. *Eur J Pharmacol* 121: 43-49.
37. Kulkarni, S.K.; Dhir, A., 2008. *Withania somnifera*: An Indian ginseng. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32: 1093-1105.
38. Levine, R.L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G., et al., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 86:464-78.
39. Llorca, P.M., Chereau, I., Bayle, F.J., Lancon, C., 2002. Tardive dyskinesia and antipsychotics: a review. *Eur Psychiatry* 17:129-138.
40. Lohr, J.B.; Kuczenski, R.; Niculescu, A.B., 2003. Oxidative mechanisms and Tardive dyskinesia. *CNS Drugs*; 17:47-62.
41. Malva, J.O., Santos, S., Macedo, T., 2004. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extracts. *Neurotox Res* 6, 131-140.
42. McCabe S., 2002. Complimentary herbal and alternative drugs in clinical practice. *Perspect Psychiatr Care* 38:98-107.
43. Mennini, T., Bernasconi, P., Bombardelli, E., Morazzoni, P., 1993. In vitro study on the interaction of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots with GABA, benzodiazepine and barbiturate receptors in rat brain. *Fitoterapia* 64, 291-300.
44. Morazzoni, P.; Bombardelli, E., 1995. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia* 66:99-112.
45. Morselli, P.L.; Fournier, V.; Bossi, L.; Musch, B., 1985. Clinical activity of GABA agonists in neuroleptic- and L-dopa-induced dyskinesia. *Psychopharmacology* 2:128-36.
46. Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J Immunol Methods* 16: 55-63.

47. Naidu, P.S.; Singh, A.; Kulkarni, S.K., 2004. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin, *Pharmacology* 70: 59–67.
48. Naidu, P.S.; Singh, A.; Kulkarni, S.K., 2006. Effect of *Withania somnifera* root extract on reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction. *Phytother Res* 20: 140-146.
49. Neisewander, J.L.; Castañeda, E.; Davis, D.A.; 1994. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia, *Psychopharmacology* 116: 79–84.
50. Neisewander, J.L.; Lucki, I. Mcgonigle, P., 1991. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment, *Brain Res* 558: 27–35.
51. Ohkawa, H.; Ohishi, H.; Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–8.
52. Oliveira, D.M.; Barreto, G.; De Andrade, D.E.V.; Saraceno, E.; Aon-Bertolino, L.; Capani, F.; El Bacha, R.S.; Giraldez, L.D., 2009. Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an in vitro experimental model of Parkinson disease. *Neurochem Res* 34: 215-220.
53. Paille, V., Brachet, P., Damier, P., 2004. Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson' disease. *Neuroreport* 15: 561-564.
54. Paille, V., Brachet, P., Damier, P., 2004. Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson' disease. *Neuroreport* 15: 561-564.
55. Paris, I.; Dagnino-Subiabre, A.; Marcelain, K.; Bennett, L.B.; Caviedes, P.; Caviedes, R., Azar, C.O.; Segura-Aguilar, J., 2001. Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and oneelectron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. *J Neurochem* 77:519–29.
56. Paris, I.; Martinez-Alvarado, P.; Cardenas, S.; Perez-Pastene, C.; Graumann, R.; Fuentes, P.; Olea-Azar, C.; Caviedes, P.; Segura-Aguilar, J., 2005. Dopamine-dependent iron toxicity in cells derived from rat hypothalamus. *Chem Res Toxicol* 18:415–9.
57. Peixoto, M.F.; Abílio, V.C.; Silva, R.H.; Frussa-Filho, R., 2003. Effects of valproic acid on an animal model of tardive dyskinesia, *Behav. Brain Res* 142: 229–233.
58. Peixoto, M.F.; Araujo, N.P.; Silva, R.H.; Castro, J.P.M.V.; Fukushiro, D.F.; Faria, R.R.; Zanier-Gomes, P.H.; Medrano, W.A.; Frussa-Filho, R.; Abílio, V.C., 2005.

- Effects of gabaergic drugs on reserpine-induced oral dyskinesia, *Behav. Brain Res* 160: 51–59.
59. Pereira, R.P.; Fachinetto, R.; Prestes, A.S.; Puntel, R.L.; Silva, G.N.S.; Heinzmann B.M.; Boschetti, T.K.; Athayde, M.L.; Burger, M.E.; Morel, A.F.; Morsh, V.M.; Rocha, J.B.T., 2009. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citrates*. *Neurochem Res* 34:973–983
  60. Pérez-Severiano, P.; Rodríguez-Pérez, M.; Pedraza-Chaverri, J.; Maldonado, P.D.; Medina-Campos, O.N.; Ortiz-Plata, A.; Sánchez-García, A.; Villeda-Hernández, J.; Galván-Arzate, S.; Aguilera, P.; Santamaría, A., 2004. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 45:1175–83.
  61. Qian, Z.M.; Wang, Q.; Pu, Y., 1997. Brain iron and neurological disorders. *Chin Med J* 110:455–458
  62. Raghavendra, V.; Naidu, P.S.; Kulkarni, S.K.; 2001. Reversal of reserpine-induced vacuous chewing movements in rats by melatonin: involvement of peripheral benzodiazepine receptors, *Brain Res* 904: 149–152.
  63. Richman, A., Witkowski, J.P., 1998. 4th Annual Herbal Products Sales Survey. *Whole Foods* 21, 19–26.
  64. Richman, A., Witkowski, J.P., 1999. 5th Annual Herbal Products Sales Survey. *Whole Foods* 22, 49–56.
  65. Salamone, J.D.; Baskin, P., 1996. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible mode of parkinsonian tremor, *Pharmacol. Biochem. Behav* 53 179–183.
  66. Segura-Aguilar, J.; Diaz-Veliz, G.; Mora, S.; Herrera-Marschitz, M., 2002. Inhibition of DT diaphorase is a requirement for Mn<sup>3+</sup> to produce a 6-OH-dopamine like rotational behaviour. *Neurotoxicol Res*; 4:127–31.
  67. Smythies, J., 1999. The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationship in health and disease. *Neurotoxicol Res*1: 27-39.
  68. Sudati, J.H.; Fachinetto, R.; Pereira, R.P.; Boligon, A.A.; Athayde, M.L.; Soares F.A.; Barbosa, N.B.V.; Rocha, J.B.T., 2009. *In vitro* Antioxidant Activity of *Valeriana officinalis* Against Different Neurotoxic Agents. *Neurochem Res* doi: 10.1007/s11064-009-9917-8

69. Swaiman, K.F., 1991. Hallervorden-Spatz and brain iron metabolism. *Arch Neurol* 48:1285–1293
70. Tabach, R.; Rodrigues, E.; Carlini, E.A., 2009. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product - CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L., and *Valeriana officinalis* L.). *Phytotherapy Research* , 23 : 33-40
71. Tamminga, C.A.; Crayton, J.W.; Chase, T.N., 1979. Improvement in tardive dyskinesia after muscimol therapy. *Arch Gen Psychiatry* 36:595–8.
72. Tamminga, C.A.; Thaker, G.K.; Ferraro, T.N.; Hare, T.A., 1983. GABA agonist treatment improves tardive-dyskinesia. *Lancet*, 2: 97-98.
73. Teixeira, A.M.; Reckziegel, P.; Muller, L.; Pereira, R.P.; Roos, D.; Rocha, J.B.T.; Burger, M.E., 2009. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacol Biochem Behav* 92: 231-235.
74. Thevenod, F., Friedmann, J.M., 1999. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J.* 13: 1751–1761.
75. Von der Hude, W., Scheutwinkel-Reich, M., Braun, R., Dittmar, W., 1985. *In vitro* mutagenicity of valepotriates. *Arch Toxicol* 56: 267–271.
76. White, H.S.; Brown, S.D.; Skeen, G.A.; Wolf, H.H.; Twyman, R.E., 1997. The anticonvulsivant topiramate displays a unique ability to potentiate GABA-evoked chloride currents, *Epilepsia* 36: S39–S40.
77. White, H.S.; Brown, S.D.; Woodhead, J.H.; Skeen, G.A.; Wolf, H.H., 1997. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold, *Epilepsy Res* 28: 167–179.
78. Woerner M.G., Kane J.M., Lieberman J.A., Alvir J., Bergmann K.J., Borenstein M., Schooler, N.R.; Mukherjee, S.; Rotrosen, J.; Rubinstein, M.; et al., 1991. The prevalence of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 11: 34–42.
79. Wu, J.W.; Hsieh, C.L.; Wang, H.Y.; Chen, H.Y., 2009. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chem* 113 : 78-84
80. Yan, L.J.; Traber, M.G., 1995. Packer L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal Biochem* 228:349–51.

81. Yassa R., Jeste D.V., 1992. Gender differences in tardive dyskinesia: a critical review of the literature. *Schizophr Bull* 18:701–15.



## LEGENDS FOR FIGURES

**Figure 1 A** High performance liquid chromatography of *V. officinalis* tincture. 1 Represents an unknown peak; 2 corresponds to valeric acid peak. **B** Represents a high performance liquid chromatography of valeric acid (peak 2) used as standard reference. Chromatographic conditions are described in the experimental section

**Figure 2 A:** High performance liquid chromatography of *V. officinalis* tincture. 1 corresponds to gallic acid peak 2 Represents an unknown peak. **B:** Represents a high performance liquid chromatography of gallic acid (peak 1) used as standard reference. Chromatographic conditions are described in the experimental section

**Figure 3:** Effects of *V. officinalis* on reserpine-induced orofacial dyskinesia. Number of vacuous chewing movements (VCM) during 6 min. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M. (Control, n=5; *V. officinalis*, n=7; reserpine, n=7; reserpine + *V. officinalis*, n=6). One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc tests. \*Represents significant differences from control group.

**Figure 4:** Effects of *V. officinalis* on open field test in rats. Number of (A) rearing, (B) crossings and (C) time of immobility during 2 min. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M. (Control, n=5; *V. officinalis*, n=7; reserpine, n=7; reserpine + *V. officinalis*, n=6).

**Figure 5:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on TBARS production in different brain regions of rats: cortex (**A**), hippocampus (**B**), striatum (**C**) and *substantia nigra* (**D**). C = Control; V = *V.officinalis*; R = Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test.

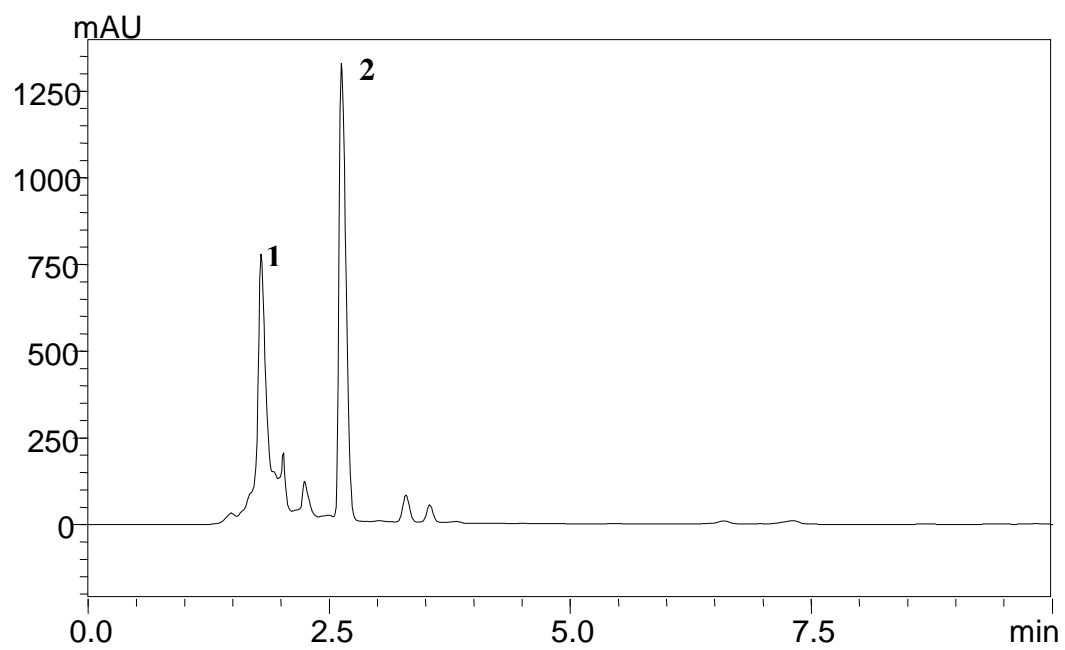
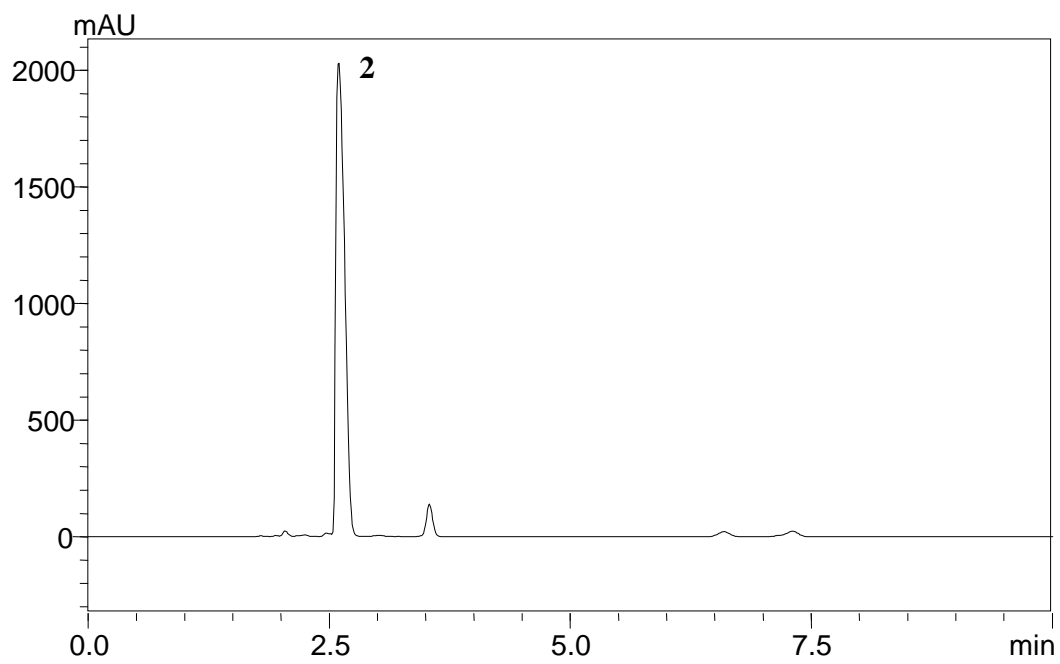
**Figure 6:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on DCF production in different brain regions of rats: cortex (**A**), hippocampus (**B**), striatum (**C**) and *substantia nigra* (**D**). C = Control; V = *V.officinalis*; R = Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test.

**Figure 7:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on protein carbonyl levels in different brain regions of rats: cortex (**A**), hippocampus (**B**), striatum (**C**) and *substantia nigra* (**D**). C = Control; V = *V.officinalis*; R = Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test.

**Figure 8:** Effects of reserpine and *V. officinalis* treatment on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in different brain regions of rats: cortex (**A**), hippocampus (**B**), striatum (**C**) and *substantia nigra* (**D**). C = Control; V = *V.officinalis*; R = Reserpine; V+R = *V.officinalis* + Reserpine. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test.

**Figure 9 A:** Linear regression analysis between ROS production in cortex and number of VCMS developed by acute treatment with reserpine. Significance was considered when  $p < 0.05$ . **B :** Linear regression analysis between  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in substantia nigra and VCMS intensity developed by acute treatment with reserpine. Significance was considered when  $p < 0.05$ .

**Figure 10:** Effect of *V. officinalis* (0-32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on iron sulfate (10  $\mu\text{M}$ ) induced a decrease in cell viability in slices from cortex of rats. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.. One Way ANOVA followed by Tukey Post Hoc test. Different symbols represent statistically significant differences.

**Figure 1A:****Figure 1B:**

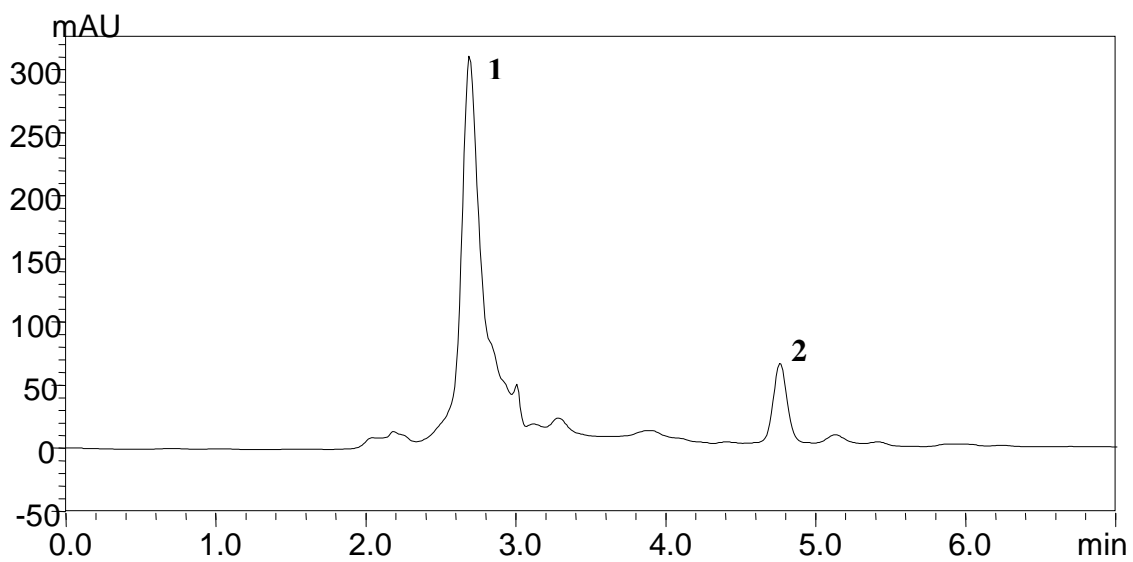
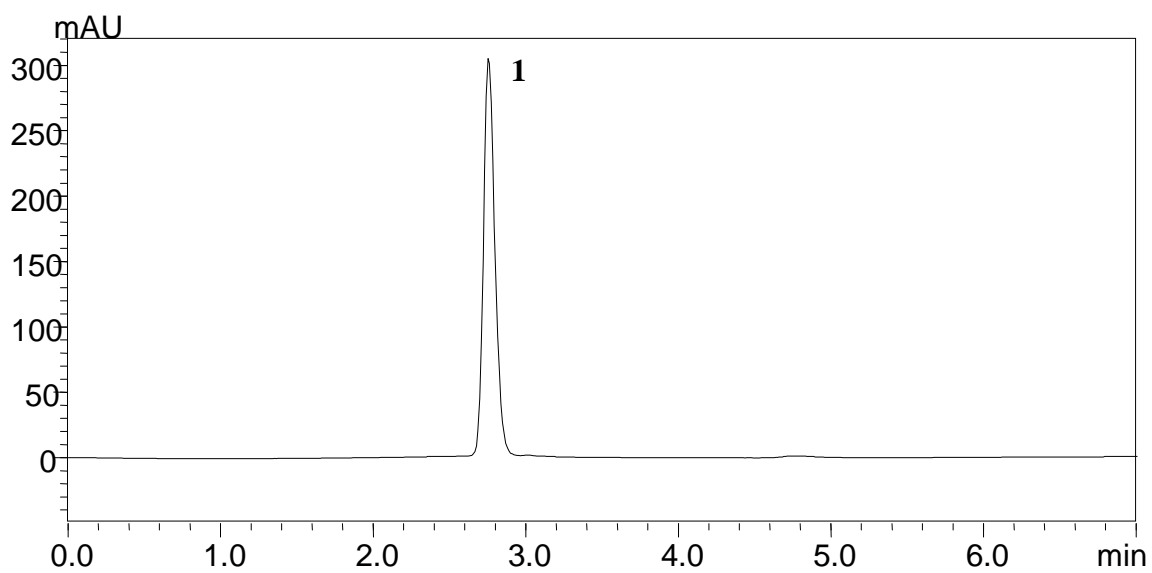
**Figure 2A:****Figure 2B:**

Figure 3:

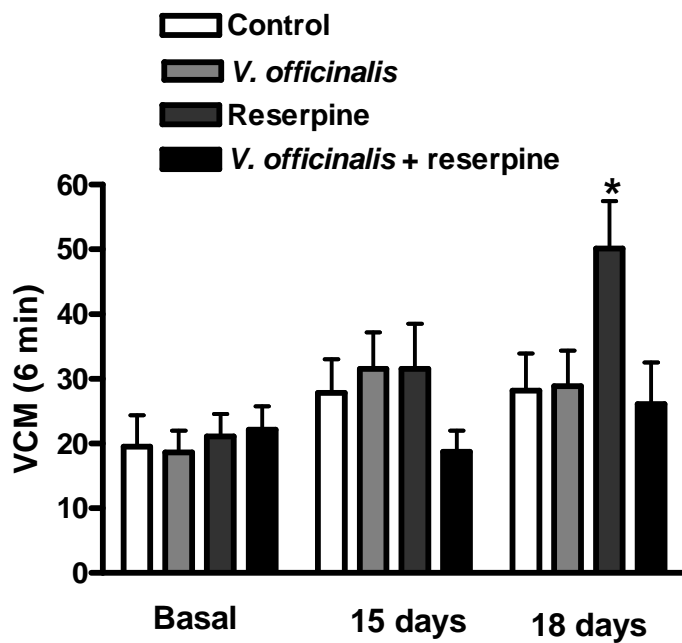


Figure 4:

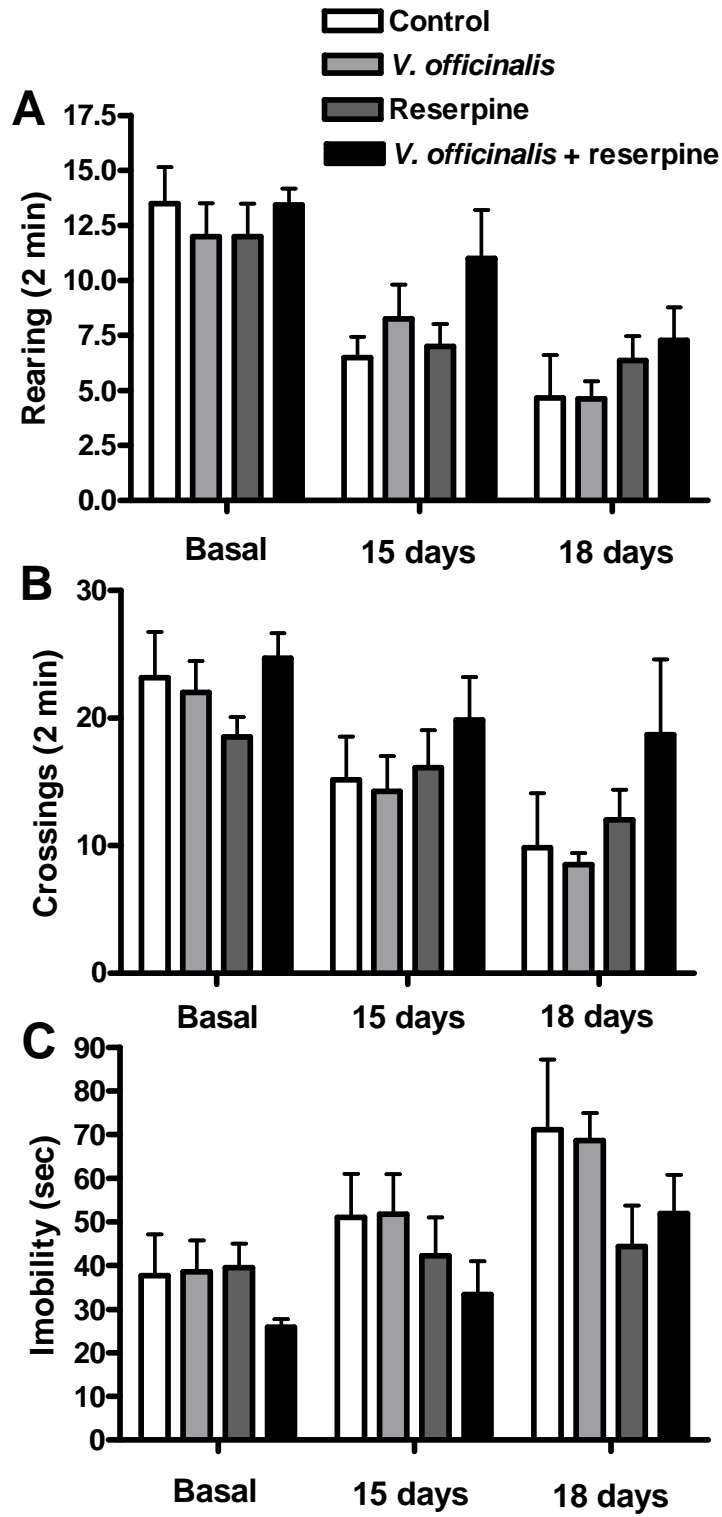


Figure 5

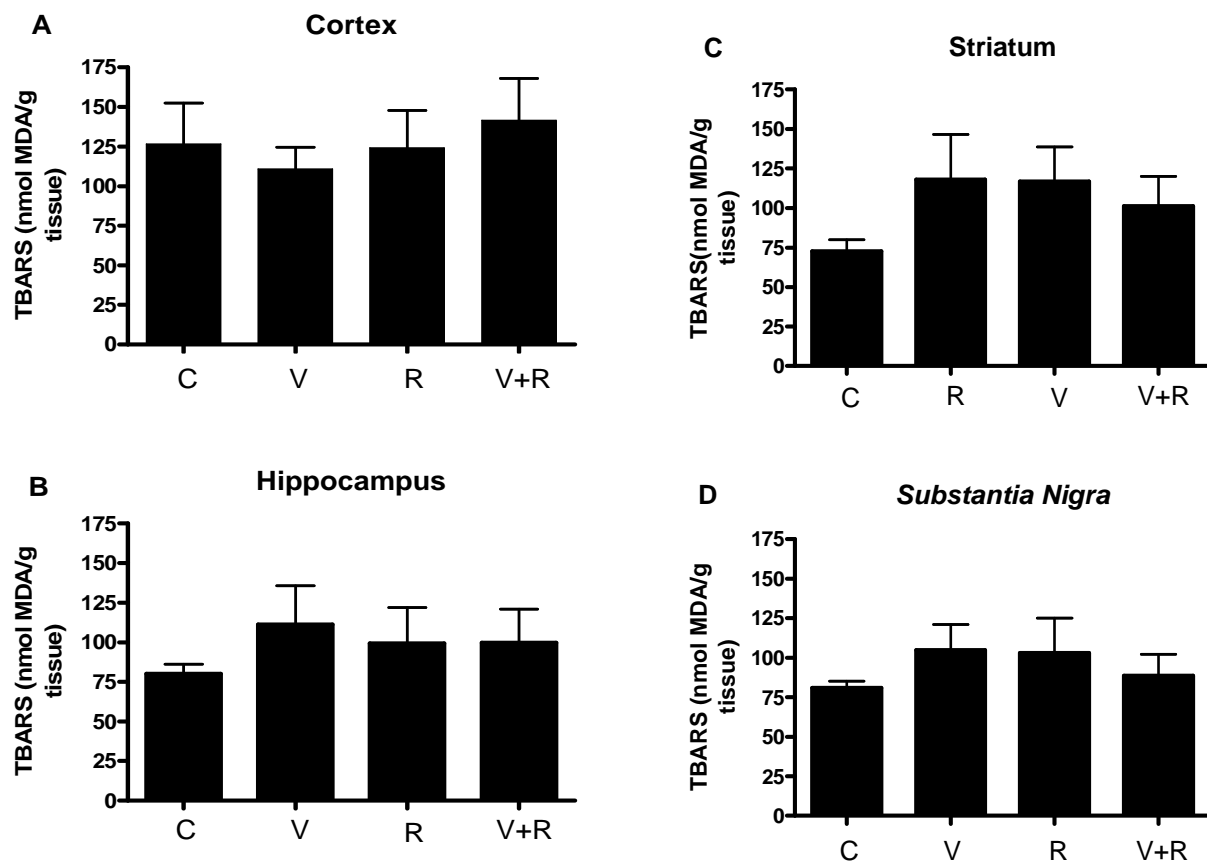




Figure 6:

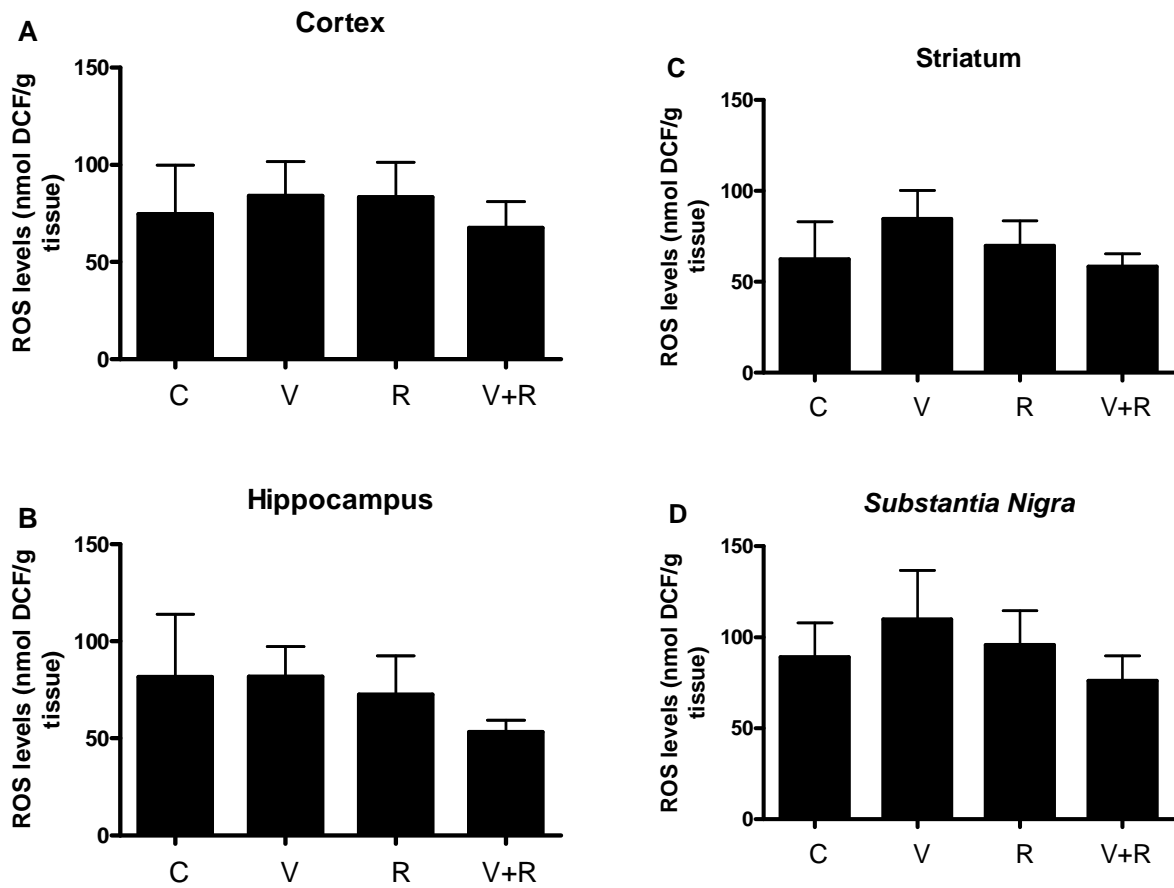


Figure 7:

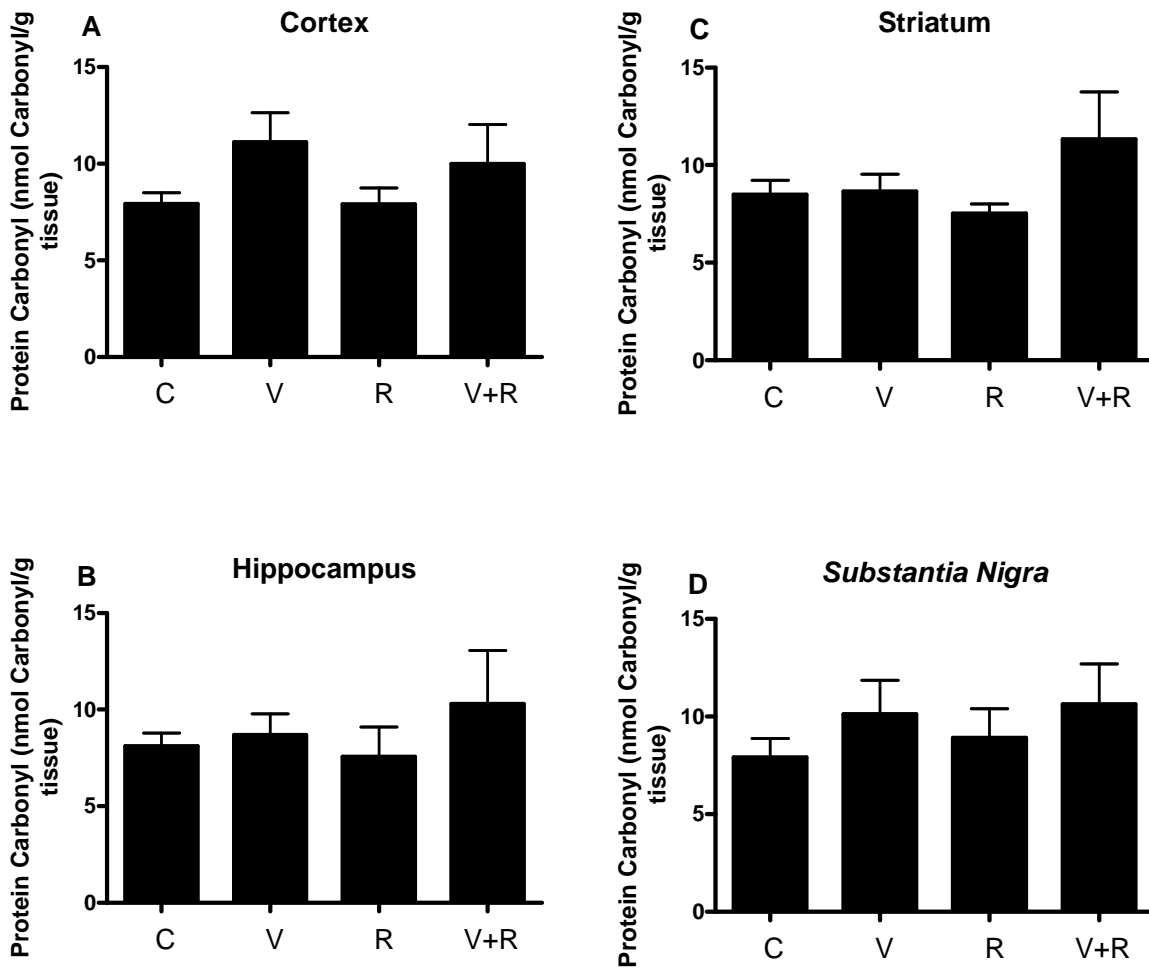


Figure 8:

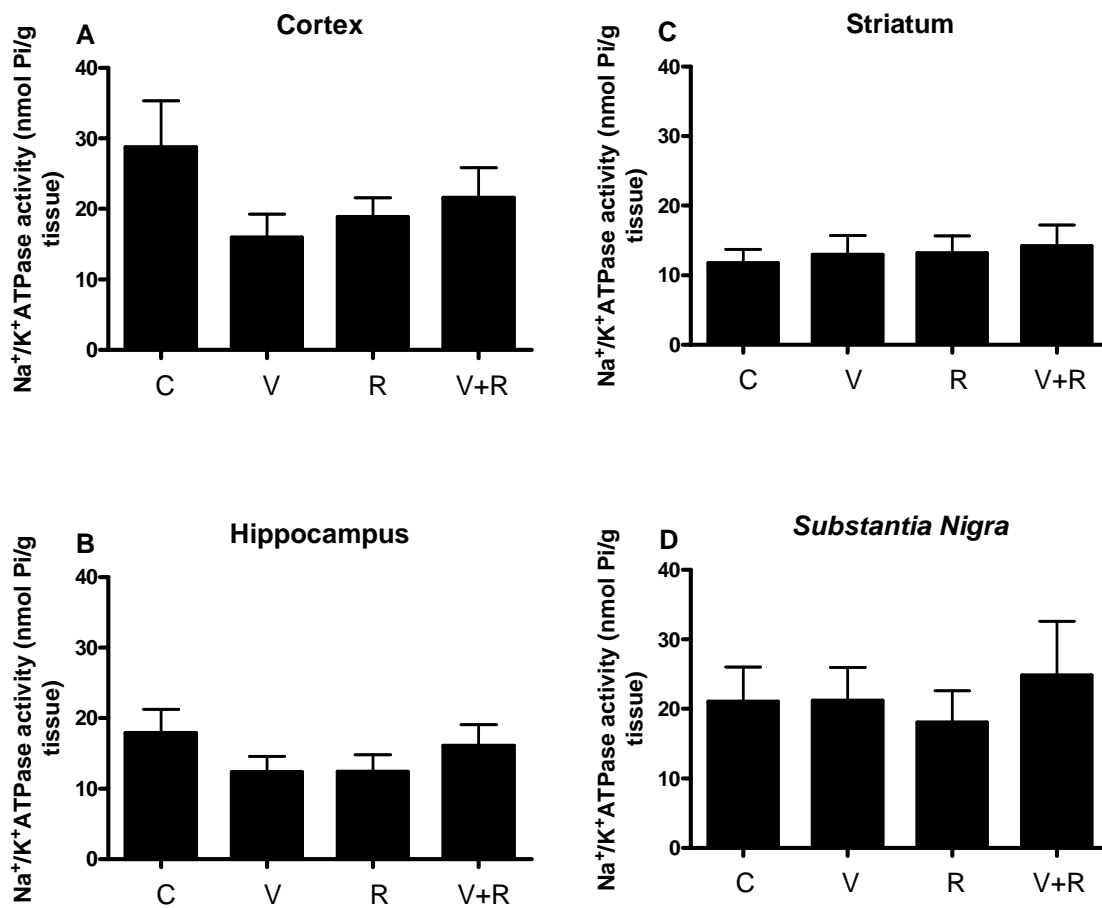


Figure 9:

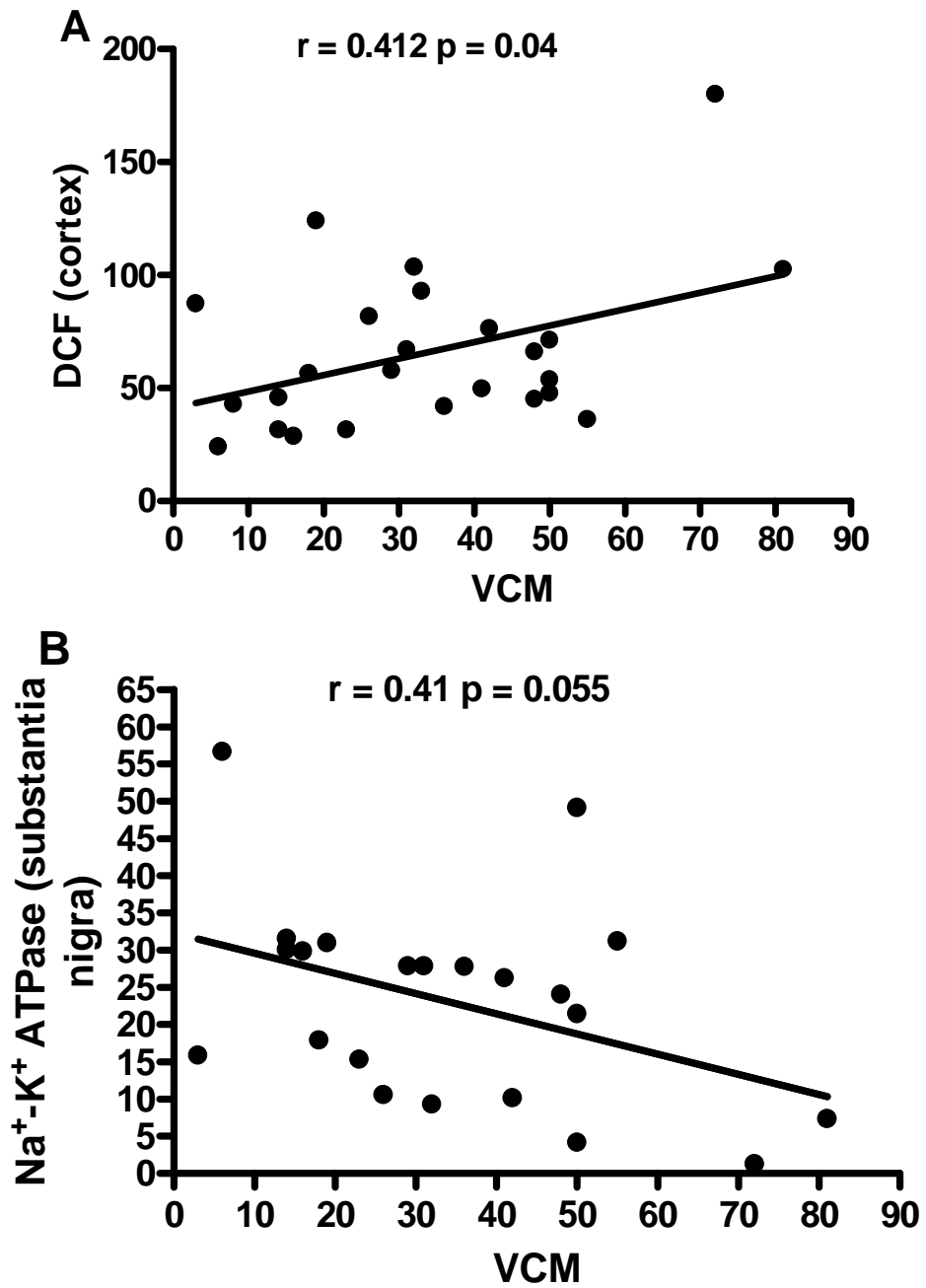
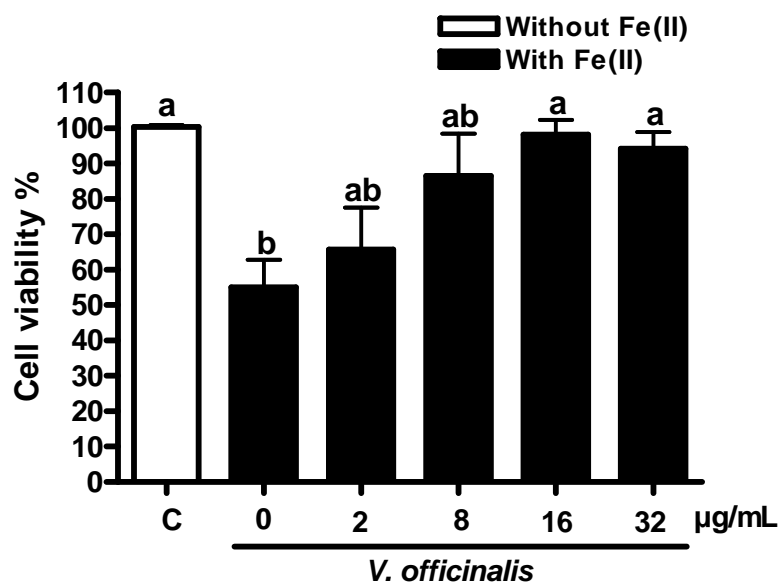


Figure 10:



## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado o possível efeito protetor da tintura de *Valeriana officinalis*, uma planta medicinal amplamente utilizada no tratamento de distúrbios do sono, contra movimentos orais (incluindo MMV), que podem ser sintomas associados com condições neuropatológicas e farmacológicas. Para este objetivo, utilizou-se um modelo que pode mimetizar aspectos tanto da DT (Abílio e cols., 2002, 2003, 2004, Carvalho e cols., 2003; Faria e cols., 2005; Neisewander e cols., 1991; Neisewander, 1994; Raghavendra e cols., 2001) como também da DP (Baskin e Salamone, 1993; Salamone e Baskin, 1996; Paille e cols., 2004). Este modelo tem sido usado por vários grupos de pesquisa para estudar desordens do movimento relacionadas ao estresse oxidativo e doenças neurodegenerativas (Abílio e cols., 2003; Bilaska e Dubiel, 2007; Castro e cols., 2006; Dutra e cols., 2002; Naidu e cols., 2004; Peixoto e cols., 2005). Neste modelo a reserpina, um depletor de monoamina, previne o armazenamento de DA nas vesículas sinápticas neuronais e interfere com o transportador vesicular de monoamina (TVMA), causando um aumento na DA citosólica que pode ser metabolizada oxidativamente pela enzima monoamina oxidase (MAO). Este metabolismo acelerado da DA pode levar à formação de metabólitos reativos e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, o qual pode estar associado ao processo de estresse oxidativo nos neurônios dopaminérgicos (Abílio e cols., 2003; Bilaska e Dubiel, 2007; Burger e cols., 2003; Naidu e cols., 2004). Visto que tem sido demonstrado na literatura que o desenvolvimento de MMV está relacionado com o estresse oxidativo, testou-se o efeito da tintura de *V. officinalis*, o qual apresentou uma atividade antioxidante em um estudo prévio do nosso grupo (Sudati e cols., 2009). Além disso, demonstramos a presença do ácido gálico, que possui propriedades antioxidantes conhecidas (Pereira e cols., 2009; Ban e cols., 2008; Wu e cols., 2009).

Apesar de MMV induzidos por reserpina ter sido considerado um modelo animal de estresse oxidativo por alguns autores (Burger e cols., 2004; Teixeira e cols., 2009), no presente trabalho, os animais tratados com reserpina não apresentaram alterações nos parâmetros de estresse oxidativo. Porém, foi encontrada uma correlação positiva entre os

níveis DCF oxidada no córtex e o número de MMV, indicando que espécies reativas de oxigênio (EROs) poderiam estar relacionadas com o desenvolvimento da DO. Além disso, detectou-se uma correlação negativa entre a incidência de MMV e a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase na *substantia nigra*. Esta enzima é essencial para a manutenção da distribuição celular adequada de íons e o estresse oxidativo pode causar a sua inibição (Thevenod e Friedmann, 1999). De acordo com os resultados obtidos, o fato da redução na atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase estar relacionada com o aumento na intensidade da DO, sugere a participação do estresse oxidativo nestes processos.

Apesar do modelo aqui desenvolvido não ter causado alterações nos parâmetros de estresse oxidativo, observou-se, neste trabalho, uma ação benéfica da *V. officinalis* em reverter à incidência de MMV induzida por reserpina.

Dados da literatura sugerem que metais de transição, principalmente o ferro, podem estar aumentados nos gânglios da base e o fato desta região ser rica em DA, poderia contribuir para uma exacerbação do estresse oxidativo e para a degeneração de neurônios dopaminérgicos nestes gânglios (Arreguin e cols., 2009; Aisen e cols., 1999; Qian e cols., 1997; Swaiman, 1991), neste trabalho verificou-se que a *V. officinalis* protege a viabilidade de fatias de córtex cerebral de ratos do estresse oxidativo induzido por ferro. Estes resultados sugerem um mecanismo adicional para a neuroproteção do extrato desta planta. Resumindo, a *V. officinalis* mostrou efeitos neuroprotetores em ratos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, isto poderia ocorrer via modulação do estresse oxidativo em núcleos específicos do cérebro e também através da sua ação gabamimética.

De acordo com as evidências comentadas anteriormente, podemos concluir que a tintura de *V. officinalis* poderia prevenir alguns sintomas observados em algumas condições neuropsiquiátricas tais como DT. Estes dados são importantes visto que há uma alta prevalência desta síndrome devido ao grande uso clínico de drogas neurolépticas típicas. Desta forma, produtos naturais com efeitos benéficos contra DT poderiam ser uma alternativa para diminuir a incidência de distúrbios orofaciais em pacientes neuropsiquiátricos. Os resultados do presente trabalho sugerem que estudos epidemiológicos ou de metanálise deveriam ser realizados para identificar se o uso regular de *V. officinalis* modifica a incidência de TD em humanos sendo tratados com neurolépticos típicos.

## 6. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados apresentados nesta dissertação, pode-se concluir o seguinte:

→ A tintura de *V. officinalis* aqui testada possui o composto fenólico ácido gálico e 6.11 mg/mL de ácido valérico em sua constituição;

→ O tratamento com a tintura de *V. officinalis* é capaz de diminuir os MMV induzidos por reserpina em ratos;

→ O tratamento com reserpina e/ou *V. officinalis* não alterou a atividade locomotora dos animais;

→ Não foram encontradas alterações significativas na peroxidação lipídica das diferentes estruturas cerebrais (córtex, hipocampo, estriado e *substantia nigra*) dos ratos após o tratamento com reserpina e/ou *V. officinalis*;

→ A produção de EROs nas diferentes estruturas cerebrais não foram alteradas após o tratamento com reserpina e/ou *V. officinalis*; Porém houve uma correlação positiva entre os níveis DCF oxidada no córtex e o número de MMV;

→ Os níveis de carbonilação de proteínas não apresentaram alterações estatisticamente significativas nas diferentes regiões cerebrais de ratos após o tratamento com reserpina e/ou *V. officinalis*;

→ Não houve alteração na atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase nas nas diferentes regiões cerebrais analisadas após o tratamento com reserpina e/ou *V. officinalis*; Porém



houve uma tendência da atividade desta enzima se correlacionar negativamente com o número de MMV;

→ A tintura de *V. officinalis* foi capaz de proteger a viabilidade celular de fatias do córtex cerebral de ratos contra a toxicidade provocada por ferro *in vitro*.

## 7. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes investigações são necessárias:

→ Avaliar o possível efeito do consumo de *V. officinalis* por pacientes que fazem uso de neurolépticos sobre a incidência da DT;

→ Avaliar o possível efeito do consumo de *V. officinalis* sobre distúrbios do movimento apresentados por pacientes com DP;

→ Investigar o efeito do ácido valerênico e do ácido valérico (constituintes do extrato de *V. officinalis*) sobre a DO induzida por reserpina em ratos;

→ Investigar o efeito do ácido valerênico e do ácido valérico sobre a viabilidade celular utilizando fatias de diferentes estruturas cerebrais de ratos expostas aos efeitos neurotóxicos do ferro;

→ Avaliar a atividade da enzima MAO e os níveis de DA no cérebro de ratos tratados com reserpina e/ou *V. officinalis*;

→ Investigar o efeito do extrato de *V. officinalis* em outros modelos experimentais que mimetizam sintomas da DP;

→ Determinar o nível de viabilidade celular em diferentes estruturas do cérebro de animais após tratamento com reserpina e/ou *V. officinalis*;

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, V.C.; ARAUJO, C.C.S.; BERGAMO, M.; CALVENTE, P.R.V.; D'ALMEIDA, V.; RIBEIRO, R. DE A.; FRUSSA-FILHO, R. Vitamin E attenuates reserpine induced oral dyskinesia and striatal GSSG/GSH ratio enhancement in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 109–114, 2003.

ABÍLIO, V.C.; SILVA, R.H.; CARVALHO, R.C.; GRASSL, C.; CALZAVARA, M.B.; REGISTRO, S.; D'ALMEIDA, V.; RIBEIRO, R. DE A.; FRUSSA-FILHO, R. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia, *Neuropharmacology* 47: 263–272, 2004.

ABÍLIO, V.C.; VERA-JR, J.A.R.; FERREIRA, L.S.M.; DUARTE, C.R.M.; CARVALHO, R.C.; GRASSL, C.; MARTINS, C.R.; TORRES-LEITE, D.; BIGNOTTO, M.; TUFIK, S.; RIBEIRO, R. DE A.; FRUSSA-FILHO, R. Effects of melatonin on orofacial movements in rats, *Psychopharmacology* 161: 340–347, 2002.

ABOURASHED, E.A.; KOETTER, U.; BRATTSTROM, A. *In vitro* binding experiments with a Valerian, hops and their fixed combination extract (Ze91019) to selected central nervous system receptors. *Phytomedicine* 11:633–8, 2004.

AISEN, P.; WESSLING-RESNICK, M.; LEIBOLD, E.A. Iron metabolism. *Curr Opin Chem Biol* 3:200–206, 1999.

ALEXI, T.; BORLONGAN, C. V.; FAULL, R. L.M.; WILLIAMS, C. E.; CLARK, R. G.; GLUCKMAN, P. D.; HUGHES, P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases *Prog Neurobiol* 60: 409-470, 2000.

AMES, B.N.; SHIGENAGA, M.K.; HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90 : 7915–7922, 1993.

ANDREASSEN, O.A. AND JORGENSEN, H.A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol* 61: 525-541, 2000.

ARREGUIN, S.; NELSON, P.; PADWAY, S.; SHIRAZI, M.; PIERPONT, C. Dopamine complexes of iron in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *J Inorg Biochem* 103: 87–93, 2009.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chem* 89: 27–36, 2005.

AU KONO, S.; SHINCHI, K.; WAKABAYASHI, K.; HONJO, S.; TODOROKI, I.; SAKURA, Y.; IMANISHI, K.; NISHIKAWA, H.; OGAWA, S.; KATSURADA, M. Relation of Green Tea Consumption to Serum Lipids and Lipoproteins in Japanese men. *J Epidemio* 6: 128-133, 1996.

ÁVILA, D.S.; GUBERT, P.; PALMA, A.; COLLE, D.; ALVES, D.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.; SOARES, F.A.A. An organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. *Brain Res Bull* 76:114–123, 2008.

BAN, J. Y.; NGUYEN, T. T. H.; LEE, H.J.; CHO, S. O.; JU, H. S.; KIM, J. Y.; BAE, K.H.; SONG, K.S.; SEONG, Y. H. Neuroprotective Properties of Gallic Acid from *Sanguisorbae Radix* on Amyloid  $\beta$  Protein (25—35)-Induced Toxicity in Cultured Rat Cortical Neurons. *Biol Pharm Bull* 31: 149- 153, 2008.

BARNES, T.R.E.; EDWARDS, J. G. The side effects of antipsychotic drugs. I. CNS and neuromuscular effects. In: Barnes, T. R. E. (Ed.), *antipsychotic drugs and their side effects*. Haurcourt Brace & Company, London., 1993.

BASKIN, P.; GIANUTSOS, G.; SALAMONE, J.D. Repeated scopolamine injections sensitize rats to pilocarpine-induced vacuos jaw movements and enhance striatal muscarinic receptor binding, *Pharmacol Biochem Behav* 49: 437–442, 1994.

BASKIN, P.; SALAMONE, J. Vacuous jaw movements in rats induced by acute reserpine administration: interactions with different doses of apomorphine, *Pharmacol Biochem. Behav* 46: 793–797, 1993.

BASTIANETTO, S., QUIRION, R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. *Neurobiol Aging* 23:891–897, 2002.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Rev Neurosci* 2: 325 - 34, 2001.

BEHL, C.; LEZOULAC'H, F.; WIDMANN, M.; RUPPRECHT, R.; HOLSBOER, F. Oxidative stress-resistant cells are protected against haloperidol toxicity. *Brain Res* 717: 193 -195, 1996.

BEHL, C.; RUPPRECHT, R.; SKUTELLA, T.; HOLSBOER, F.. Haloperidol-induced cell death-mechanism and protection with vitamin E *in vitro*. *Neuroreport* 7: 360-364, 1995.

BENKE, D.; BARBERIS, A.; KOPP S.; ALTMANN, K.-H.; SCHUBIGER, M.; VOGT, K. E.; RUDOLPH, U.; MÖHLER, H.. GABA<sub>A</sub> receptors as *in vivo* substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. *Neuropharmacology* 56:174–181, 2009.

BERGAMO, M.; ABILIO, V.C.; QUEIROZ, C.M.T.; BARBOSA JR., H.M.; ABDANUR, L.R.A.; FRUSSA-FILHO, R. Effects of age on a new animal model of tardive dyskinesia. *Neurobiol Aging* 18, 623-629, 1997.

BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. *Bioessays* 24: 308-18, 2002.

BILSKA A, DUBIEL M. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neuroscience* 146:1758-71, 2007.

BOVE, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2:484-494, 2005.

BURGER, M.E.; ALVES, A.; CALLEGARI, L.; ATHAYDE, F.R.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum, *Progr Neuropharmacol Biol Psychiatry* 27: 135-140, 2003.

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

BURGER, M.E.; FACHINETTO, R.; CALEGARI, L.; PAIXÃO, M.W.; BRAGA, A.L.; ROCHA, J.B.T. Effects on age on orofacial dyskinesia reserpine-induced and possible protection of diphenyl-diselenide. *Brain Res Bull* 64: 339-45, 2004.

CADET, J.L., LOHR, J.B., JESTE, D.V. Tardive dyskinesia and Schizophrenic burnout: the possible involvement of cytotoxic free radicals. In: Henn FA, DeLisi LE (Eds). *Handbook of schizophrenia: The neurochemistry and pharmacology of schizophrenia. Elsevier, Amsterdam* p.425-438, 1987.

CALVENTE, P.R.V., ARAUJO, C.C.S., BERGAMO, M., ABILIO, V.C., D'ALMEIDA, V., RIBEIRO, R. DE A., FRUSSA-FILHO, R.. The mitochondrial toxin 3-

nitropropionic acid aggravants reserpine-induced oral dyskinesia in rats. *Prog in Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry* 26: 1-5, 2002.

CARLINI E.A. Plants and the central nervous system. *Pharmacol Biochem Behav* 75: 501-512, 2003.

CARVALHO, R.C.; PATTI, C.C.; TAKATSU-COLEMAN, A.L.; KAMEDA, S.R.; SOUZA, C.F.; GARCEZ DO-CARMO, L.; et al. Effects of reserpina on the plus-maze discriminative avoidance task: dissociation between memory and motor impairments. *Brain Res* 1122:176–83, 2006.

CARVALHO, R.C.; SILVA, R.H.; ABÍLIO, V.C.; BARBOSA, P.N.; FRUSSA-FILHO, R. Antydyskinetic effects of risperidone on animal models of tardive dyskinesia in mice, *Brain Res Bull* 60: 115–124, 2003.

CASEY, D.E. Spontaneous and tardive dyskinesias: clinical and laboratory studies. *J Clin Psychiatry* 46: 42-47, 1985.

CASEY, D.E. Tardive dyskinesia e pathophysiology. In: Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (Eds), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press Ltd, New York, pp. 1497-1502, 1995.

CASEY, D.E. Tardive dyskinesia: pathophysiology and animal models. *J Clin Psych* 61: 5–9, 2000.

CASTRO, J. P.M.V.; FRUSSA-FILHO, R.; FUKUSHIRO, D. F.; SILVA, R. H.; MEDRANO, W. A.; RIBEIRO, R. DE A.; ABÍLIO, V. C. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull* 68 : 436–441, 2006.

CAVADAS, C., ARAUJO, I., COTRIM, M.D., AMARAL, T., CUNHA, A.P., MACEDO, T., RIBEIRO, C.F. *In vitro* study on the interaction of *Valeriana officinalis* L.

extracts and their amino acids on GABA<sub>A</sub> receptor in rat brain. *Arzneimittelforschung* 45: 753–755, 1995.

CAVALLERO, R.; SMERALDI, E. Antipsychotic-induced tardive dyskinesia: recognition, prevention and management. *CNS Drugs*, 4: 278-293, 1995.

CHAVKO, M., AUKER, C. R. AND MCCARRON, R. M. Relationship between protein nitration and oxidation and development of hyperoxic seizures. *Nitric Oxide* 9: 18–23, 2003.

CHIUEH, C.C.; KRISHNA, G.; TULSI, P.; OBATA, T.; LANG, K.; HUANG, S-J.; MURPHY, D.J. Intracranial microdialysis of salicylic acid to detect hydroxyl radical generation through dopamine autooxidation in the caudate nucleus. *Free Radic Biol Med.* 13:581–583, 1992.

COHEN, G. Oxidative stress, mitochondrial respiration and Parkinson's disease. *Ann N Y Acad of Sci* 899:112-120, 2000.

COLLINS, P.B.; BROECKKAMP, C.L.E.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Electromyographic differentiation of the components of perioral movements induced by SKF 38393 and physostigmine in the rat. *Psychopharmacology* 112: 428–436, 1993.

COLPAERT, F.C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology* 26:1431–1440, 1987.

COUSINS, M.S.; CARRIERO, D.L.; SALAMONE, J.D. Tremulous jaw movements induced by the acetylcholinesterase inhibitor tacrine: effects of antiparkinsonian drugs. *Eur J Pharmacol* 322:137-45, 1997.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262: 689-695, 1993.



CRANE, G.E. Persistent dyskinesia. *Br J Psychiatry*, 122: 395-405, 1973.

CUI, K.; LUO, X.L.; XU, K.Y.; MURTHY, M.R.V. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 771-799, 2004.

DABIRI, L.M.; PASTA, D.; DARBY, J.K.; MOSBACHER, D., 1994. Effectiveness of vitamin E for treatment of long-term tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 151: 925-926.

DANNON, P.N.; LEPKIFKER, E.; IANCU, I.; ZIV, R.; HORESH, N.; KOTLER, M. Vitamin E treatment in tardive dyskinesia. *Hum Psychopharmacol* 12 : 217–220, 1997.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson's disease. *Nature Neurosci* 5 : 1058 -61, 2002.

DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest* 111: 145-51, 2003.

Dawson, T.M.; Dawson, V.L., 2003. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302 :819–822

DEKEYSER, J. Excitotoxic mechanisms may be involved in the pathophysiology of tardive-dyskinesia. *Clin Neuropharmacol*, 14: 562-565, 1991.

DELONG, M.R. Primate model of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-5, 1990.

DEXTER, D.; CARTER, C.; AGID, F.; AGID, Y.; LEES, A. J.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Lipid peroxidation as cause of nigral cell death in Parkinson's disease.. *Lancet* 2, 639–640, 1986.

DEXTER, D. T., CARAYON, A., VIDAILHET, M., RUBERG, M., AGID, F., AGID, Y., LEES, A. J., WELLS, F. R., JENNER, P., AND MARSDEN, C. D. Decreased ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55, 16–20, 1990.

DEXTER, D. T.; CARTER, C. J.; WELLS, F. R.; JAVOY-AGID, F.; AGID, Y.; LEES, A.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Basal lipid peroxidation in *substantia nigra* is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52, 381–389, 1989.

DEXTER, D. T., JENNER, P., SCHAPIRA, A. H., AND MARSDEN, C. D. Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann Neurol* 32: S94–100, 1992.

DONAIRE, A.M., GIL-SALADIE, D. Progressive primary aphasia associated with corticobasal degeneration. *Rev Neurol* 32: 1051-1054, 2001.

DREOSTIC, I.E.; WARGOVICH, M.J. YANG, C.S. Inhibition of carcinogenesis by tea: The evidence from experimental studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 761-770, 1997.

DUBOIS, B.; MALAPANI, C.; VERIN, M.; ROGELET, P.; DEWEER, B.; PILLON, B. Cognitive function and basal ganglia: the model of Parkinson disease. *Rev Neurol* 150:763–70,1994.

EBERHARDT, O.; SCHULZ, J.B. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett* 4:135–151, 2003.

EGAN, M.F.; HURD, Y.; HYDE, T.M.; WEINBERGER, D.R.; WYATT, R.J.; KLEINMAN, J.E. Alterations in mRNA levels of D2 receptors and neuropeptides in striatonigral and striatopallidal neurons of rats with neuroleptic-induced dyskinesias. *Synapse* 18: 178-189, 1994.

EGAN, M.F.; HYDE, T.M.; ALBERS, G.W.; ELKASHEF, A.; ALEXANDER, R.C.; REEVE, A.; BLUM, A.; SAENZ, R.E.; WYATT, R.J. Treatment of tardive dyskinesia with vitamin E. *Am J Psychiatry* 149: 773-777, 1992.

EVANS, D.A.; HIRSCH, J.B.; DUSHENKOV, S. Phenolics, inflammation and nutrigenomics. *J Sci Food Agric* 86: 2503-2509, 2006.

FACHINETTO R, VILLARINHO JG, WAGNER C, PEREIRA RP, PUNTEL RL, PAIXÃO MW, BRAGA AL, CALIXTO JB, ROCHA JBT, FERREIRA J. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology* 194:423–432, 2007.

FACHINETTO, R.; VILLARINHO, J.G.; WAGNER, C.; PEREIRA, R.P.; ÁVILA, D.S.; BURGER, M.E.; CALIXTO, J.B.; ROCHA, J.B.T.; FERREIRA, J. *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: Role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:1478–1486, 2007.

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

FERNANDES, V. S.; RIBEIRO, A. M.; MELO, T. G.; GODINHO, M.; BARBOSA, F. F.; MEDEIROS, D. S.; MUNGUBA, H.; SILVA, R. H. Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: Possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry* 32: 1479–1483, 2008.

FERRÉ, S.; FREIDHOLM, B.B.; MORELLI, M.; POPOLI, P.; FUXE, K. Adenosinedopamine receptor-receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 20:482-7, 1997.

FERRÉ, S.; POPOLI, P.; GIMENEZ-LLORT, L.; RIMONDINI, R.; MÜLLER, C.E.; STROMBERG, I.; ÖGREN, S.O.; FUXE, K. Adenosine/dopamine interaction: implications for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 7:235-41, 2001.

FIBIGER, H. C.; LLOYD, K. G. Neurobiological substrates of tardive-dyskinesia - the GABA hypothesis. *Trends in Neurosciences*, 7: 462-464, 1984.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239-247, 2000.

FINN, M.; JASSEN, A.; BASKIN, P.; SALAMONE, J.D. Tremulous characteristics of the vacuos jaw movements induced by pilocarpine and ventrolateral striatal dopamine depletions. *Pharmacol Biochem Behav* 57 : 243-249, 1997.

FUGH-BERMAN, A., COTT, J.M. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. *Psychosom Med* 61:712-28, 1999.

GAO, X.M.; KAKIGI, T.; FRIEDMAN, M.B.; TAMMINGA, C.A. Tiagabine inhibits haloperidol-induced oral dyskinesias in rats. *J Neural Transm Gen Sect* 95: 63-69, 1994.

GARDOS, G.; COLE, J.O. Severe tardive dyskinesia. In: Joseph, A.B., Young, R.R. (Eds.), *Movement Disorders in Neurology and Neuropsychiatry*. Blackwell, Cambridge, pp. 40-45, 1992.

GEETHA, T.; MALHOTRA, V.; CHOPRA, K.; KAUR, I.P. Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of Quercetin. *Indian. J Exp Biol.*, 43: 61–67, 2005.

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

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

GLAZER, W. M.; HAFEZ H. A comparison of masking effects of haloperidol versus molindone in tardive dyskinesia. *Schizophrenia Research* 3: 315-320, 1990.

GORELL, J.M.; PETERSON, E.L.; RYBICKI, B.A.; JOHNSON, C.C. Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 217:169–174, 2004.

GRAHAM D.G., 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14: 633–643.

GUNNE, L.M. ; GROWDON, J. ; GLAESER, B. Oral dyskinesia in rats following brain lesions and neuroleptic drug administration. *Psychopharmacology*, 77: 134-139, 1982.

GUNNE, L.M.; ANDERSSON, U.; BONDESSON, U.; JOHANSSON, P., 1986. Spontaneous chewing movements in rats during acute and chronic antipsychotic drug administration, *Pharmacol Biochem Behav* 25: 897–901.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609–1623, 1992.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem*, 97: 1634–1658, 2006.

HAYASHI, M. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Neuropathology* 29: 1-8, 2009.

HENDERSON, D.C. Diabetes mellitus and other metabolic disturbances induced by atypical and antipsychotic agents. *Curr diab Rep*, 2: 135-140, 2002.

HENSLEY, K.; FLOYD, R.A. Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys* 397: 377–383, 2002.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VAN DE PUTTE, B. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *J Agric Food Chem* 41: 1242-1246, 1993.

HONDA, K., CASADESUS, G., PETERSON, R.B., PERRY, G., SMITH, M.A. Oxidative stress and redox active iron in Alzheimer's disease. *Annal of the New York Academy Sciences* 1012: 179-182, 2004.

HOUGHTON, P.J. The scientific basis for the reputed activity of valerian. *J Pharm Pharmacol* 51, 505–512, 1999.

ISHIWARI, K.; MINGOTE, S.; CORREA, M.; TREVITT, J.T.; CARLSON, B.B.; SALAMONE, J.D. The GABA uptake inhibitor  $\beta$ -alanine reduces pilocarpine- induced tremor and increases extracellular GABA in substantia nigra pars reticulata as measured by microdialysis, *J Neurosci Meth* 140: 39–46, 2004.

JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S.; KOSTIC, V.; SUBER, F.; FAHN, S.; CADET, J.L. Partial attenuation of chronic  $\alpha$ -uphenazine- induced changes in regional

monoamine metabolism by D-alpha- tocopherol in rat brain. *Brain Res Bull* 26: 251-258, 1991.

JANKUN, J.; SELMAN, S.H.; SWIERCZ, R.; SKRZYPCZAK-JANKUN, E. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387: 561, 1997.

JELLINGER, K. A.; KIENZL, E.; RUMPELMAIER, G.; PAULUS, W.; RIEDERER, P.; STACHELBERGER, H.; YODIM, M. B.; BEN-SHACHAR, D. Iron and ferritin in substantia nigra in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 60: 267-272, 1993.

JENNER, P. Oxidative stress in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Pathol Biol* 44: 57-64, 1996.

JESTE, D.V., POTKIN, S.G., SINHÁ, S., FEDER, S., WYATT, R.J. Tardive dyskinesia-reversible and persistent. *Arch Gen Psychiatry.*, 36: 585-590, 1979.

JICHA, G.A., SALOMONE, J.D. Vacuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: possible relation to parkinsonian symptoms. *J Neurosci* 11: 3822-3829, 1991.

KANE JM, SMITH J.M. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Arch Gen Psychiatry* 39: 473-81, 1982.

KANE, J.M. Tardive dyskinesia. In: Joseph, A.B., Young, R.R. (Eds.), *Movement Disorders in Neurology and Neuropsychiatry*. Blackwell, Cambridge, pp. 33-39, 1992.

KANE, J.M. Tardive dyskinesia: epidemiology and clinical presentation. In: Bloom, F.E., Kupfer, D.J. (Eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, vol. 39. Raven Press, Ney York, pp. 1485-1495, 1995.

KANEDA, H.; SHIRAKAWA, O.; DALE, J.; GOODMAN, L.; BACHUS, S.E.; TAMMINGA, C.A. Co-administration of progabide inhibits haloperidol-induced oral dyskinesias in rats. *Eur J Pharmacol* 121: 43-49, 1992.

KHOM, S.; BARBURIN, I.; TIMIN, E.; HOHAUS, A.; TANNER, G.; KOPP, B.; HERING, S. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA<sub>A</sub> receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology* 53: 178–187, 2007.

LAUTERBACH, E.C. The neuropsychiatry of Parkinson's disease and related disorders. *Psychiatr Clin North Am* 27:801–25, 2004.

LEITE, J.R.; SEABRA, M. L.; MALUF, E.; ASSOLANT, K.; SUCHECKI, D.; TUFIK, S.; KLEPACZ, S.; CALIL, H.M.; CARLINI, E.A. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf).III. Assessment of eventual toxic, hypnotic and anxiolytic effects on humans. *J Ethnopharmacol* 17: 75–83, 1986.

LIU, J., WANG, X., SHIGENGA, M.K., YOO, H.C., MORI, A., AMES, B.S. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein and DNA in the brain of rats. *FASEB J* 10:1532-1538, 1996.

LIU, Y.; EDWARDS, R.H. The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20: 125-156, 1997.

LLORCA, P.M., CHEREAU, I., BAYLE, F.J., LANCON, C. Tardive dyskinesia and antipsychotics: a review. *Eur Psychiatry* 17:129-138, 2002.

LOHR, J.B. Oxygen free radicals and neuropsychiatric illness. *Arch Gen Psychiatry* 48: 1097-1106, 1991.

LOHR, J.B.; KUCZENSKI, R.; NICULESCU, A.B. Oxidative mechanisms and Tardive dyskinesia. *CNS Drugs*; 17:47–62, 2003.



MADSEN, H.L., NIELSEN, B.R., BERTELSEN, G., SKIBSTED, L.H. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chem* 57, 331–337, 1996.

MALVA, J.O., SANTOS, S., MACEDO, T. Neuroprotective properties of *Valeriana officinalis* extracts. *Neurotox Res* 6, 131–140, 2004.

MATSUI, H.; UDAKA, F.; MIVOSHI, T.; HARA, N.; TAMURA, A.; ODA, M.; KUBORI, T.; NISHINAKA, K.; KAMEYAMA, M. Frontal assessment battery and brain perfusion image in Parkinson's Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 19:41–6, 2006.

MAYORGA, A.J.; CARRIERO, D.L.; COUSINS, M.S.; GIANUTSOS, G.; SALAMONE, J.D. Tremulous jaw movements produced by acute tacrine administration: possible relation to parkinsonian side effects. *Pharmacol Biochem Behav* 56 : 273–279, 1997.

MCCABE S. Complimentary herbal and alternative drugs in clinical practice. *Perspect Psychiatr Care* 38:98–107., 2002.

MCNAMARA, J.O.; Drugs effective in the therapy of the epilepsies, in: J.G. HARDMAN, L.E. LIMBIRD, A.G. GILMAN (Eds.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, 2001, pp. 521–547.

MENNINI, T., BERNASCONI, P., BOMBARDELLI, E., MORAZZONI, P. In vitro study on the interaction of extracts and pure compounds from *Valeriana officinalis* roots with GABA, benzodiazepine and barbiturate receptors in rat brain. *Fitoterapia* 64, 291–300, 1993.

MENTREDDY, S.R. Review - Medicinal plant species with potential antidiabetic properties. *J Sci Food Agric* 87: 743-750, 2007.

MOLLER, J.K.S., MADSEN, H.L., ALTONEN, T., SKIBSTED, L.H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chem* 64, 215–219, 1999.

MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E. *Valeriana officinalis*: traditional use and recent evaluation of activity. *Fitoterapia* 66:99–112, 1995.

MORSELLI, P.L.; FOURNIER, V.; BOSSI, L.; MUSCH, B. Clinical activity of GABA agonists in neuroleptic- and L-dopa-induced dyskinesia. *Psychopharmacology* 2:128–36, 1985.

MÜLLER, C.; SCHUMACHER, B.; BRATTSTRÖM, A.; ABOURASHED, E.A.; KOETTER, U. Interaction of valerian extracts and a fixed valerian-hop extract combination with adenosine receptors. *Life Sci* 71: 1939–1949, 2002.

NAGY, H.; KÉRI, S.; MYERS, C.E.; BENEDEK, G.; SHOHAMY, D.; GLUCK, M.A. Cognitive sequence learning in Parkinson's disease and amnesic mild cognitive impairment: dissociation between sequential and non-sequential learning of associations. *Neuropsychologia* 45:1386–92, 2007.

NAIDU, P.S.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin, *Pharmacology* 70: 59–67, 2004.

NEISEWANDER, J.L.; CASTAÑEDA, E.; DAVIS, D.A. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia, *Psychopharmacology* 116: 79–84, 1994.

NEISEWANDER, J.L.; LUCKI, I. MCGONIGLE, P. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment, *Brain Res* 558: 27–35,1991.

OLIVEIRA, D.M.; BARRETO, G.; DE ANDRADE, D.E.V.; SARACENO, E.; AON-BERTOLINO, L.; CAPANI, F.; EL BACHA, R.S.; GIRALDEZ, L.D. Cytoprotective effect of *Valeriana officinalis* extract on an in vitro experimental model of Parkinson disease. *Neurochem Res* 34: 215-220, 2009.

ONODERA, K., OMOI, N.O., FUKUI, K., HAYASAKA, T., SHINKAI, T., SUZUKI, S., ABE, K., URANO, S. Oxidative damage of rat cerebral cortex and hippocampus, and changes in antioxidative defense systems caused by hyperoxia. *Free Radical Research* 37: 367-372, 2003.

OWEN, A.M. Cognitive dysfunction in Parkinson's Disease: the role of Frontostriatal Circuitry. *Neuroscientist*.10:525–37, 2004.

PAILLE, V., BRACHET, P., DAMIER, P. Role of nigral lesion in the genesis of dyskinesias in a rat model of Parkinson' disease. *Neuroreport* 15: 561-564, 2004.

PATEL, R.; GARG, R.; ERANDE, S.; MARU, G.B. Chemopreventive herbal anti-oxidants: current status and future perspectives. *J Clin Biochem Nutr* 40:82–91, 2007.

PEIXOTO, M.F.; ABÍLIO, V.C.; SILVA, R.H.; FRUSSA-FILHO, R. Effects of valproic acid on an animal model of tardive dyskinesia. *Behav Brain Res* 142: 229–233, 2003.

PEIXOTO, M.F.; ARAUJO, N.P.; SILVA, R.H.; CASTRO, J.P.M.V.; FUKUSHIRO, D.F.; FARIA, R.R.; ZANIER-GOMES, P.H.; MEDRANO, W.A.; FRUSSA-FILHO, R.; ABÍLIO, V.C. Effects of gabaergic drugs on reserpine-induced oral dyskinesia. *Behav Brain Res* 160: 51–59, 2005.

PEREIRA, M.A.; GRUBBS, C.J.; BARNES, L.H.; LI, H.; OLSON, G.R. Effect of the phytochemicals, curcumin and Quercetin upon azomethane- induced: cancer and 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 17: 1305–1311,1996.

PEREIRA, R.P.; FACHINETTO, R.; PRESTES, A.S.; PUNTEL, R.L.; SILVA, G.N.S.; HEINZMANN B.M.; BOSCHETTI, T.K.; ATHAYDE, M.L.; BURGER, M.E.; MOREL, A.F.; MORSH, V.M.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res* 34:973–983, 2009.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3h,6h,16h-trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 83: 90 – 99, 2006.

POST, A.; HOLSBOER, F.; BEHL, C. Induction of NF-kappaB activity during haloperidol-induced oxidative toxicity in clonal hippocampal cells: suppression of NF-kappaB and neuroprotection by antioxidants. *J Neurosci* 18: 8236-8246, 1998.

QIAN, Z.M.; WANG, Q.; PU, Y., 1997. Brain iron and neurological disorders. *Chin Med J* 110:455–458.

QUEIROZ, C.M.T., FRUSSA-FILHO, R. Effects of buspirone on an animal model of tardive dyskinesia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23: 1405-1418, 1999.

RAGHAVENDRA, V.; NAIDU, P.S.; KULKARNI, S.K. Reversal of reserpineinduced vacuous chewing movements in rats by melatonin: involvement of peripheral benzodiazepine receptors, *Brain Res* 904: 149–152, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia. In: Transmissão Noradrenérgica. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004 Cap. 11, p. 199-200.

REITER R. J. Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms the aging brain, FASEB J. 9:526–533, 1995.

REITER, R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. FASEB J 9: 526-533, 1998.

RICHMAN, A.; WITKOWSKI, J.P. 4th Annual Herbal Products Sales Survey. Whole Foods 21:19-26, 1998.

RICHMAN, A., WITKOWSKI, J.P. 5th Annual Herbal Products Sales Survey. Whole Foods 22, 49–56, 1999.

ROSENGARTEN, H.; SCHWEITZER, J.W.; FRIEDHOFF, A.J. Possible genetic factors underlying the pathophysiology of tardive dyskinesia. Pharmacol Biochem Behav 49: 663-667, 1994.

RUPNIAK, N.M.J.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Cholinergic modulation of perioral behavior induced by chronic neuroleptic administration to rats, Psychopharmacology 79: 226–230, 1983.

SAGARA, Y. Induction of reactive oxygen species in neurons by haloperidol. J Neurochem 71: 1002 -1012, 1998.

SALAMONE, J. D.; ISHIWARI, K.; BETZ, A. J.; FARRAR, A. M.; MINGOTE, S. M.; FONT, L.; HOCKEMEYER, J.; MÜLLER, C.E.; CORREA, M. Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: Possible relevance to parkinsonism. Parkinsonism Relat Disord 14: S130-S134, 2008.

SALAMONE, J.; CORREA, M.; CARLSON, B.; WISNIECKI, A.; MAYORGA, A.; NISENBAUM, E.; NISENBAUM, L.; FELDER, C. Neostriatal muscarinic receptor subtypes involved in the generation of tremulous jaw movements in rodents. Implications for cholinergic involvement in parkinsonism. *Life Sci* 68:2579-84, 2001.

SALAMONE, J.D.; BASKIN, P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible mode of parkinsonian tremor, *Pharmacol. Biochem. Behav* 53 179–183, 1996.

SCHUMACHER, B.; SCHOLLE, S.; HÖLZL, J.; KHUDEIR, N.; HESS, S., MÜLLER, C.E. Lignans isolated from Valerian: identification and characterization of a new olivil derivative with partial agonistic activity at A1 adenosine receptors. *J Nat Prod* 65: 1479–1485, 2002.

SHOHAMY, D.; MYERS, C.E.; GROSSMAN, S.; SAGE, J.; GLUCK, M.A. The role of dopamine in cognitive sequence learning: evidence from Parkinson's disease. *Behav Brain Res.* 159:191–9, 2005.

SHULTS, C.W. Treatments of Parkinson disease. *Arch Neurol* 60:1680–4, 2003.

SIDEROWF, A.; STERN, M. Update on Parkinson disease. *Ann Intern Med* 138: 651-8, 2003.

SIAN, J.; DEXTER, D. T.; LEES, A. J.; DANIEL, S.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36, 348–355, 1994.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; MATHIAS, C.J.; PANEK, A.D.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P.; RENNÓ, M.N.; FALCÃO, D.Q.; CERQUEIRA, D.M.; MINTO, A.B.M. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharm Res* 52: 229-233, 2005.

SIMONIAN, N.A.; COYLE, J.T. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36:83–106, 1996.

SMITH, M. T.; SANDY, M. S.; DI MONTE, D. Free radicals, lipid peroxidation, and Parkinson's disease. *Lancet* 1: 38, 1987.

SMYTHIES, J. The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationship in health and disease. *Neurotoxicol Res* 1: 27-39, 1999.

SOARES, K.V.S.; MCGRATH, J.J. The treatment of tardive dyskinesia—a systematic review and meta-analysis. *Schizophrenia Research* 39 : 1–16, 1999.

STEEN, V.M.; LOVLIE, R.; MACEWAN, T.; MCCREADIE, R.G. Dopamine D3-receptor gene variant and susceptibility to Tardive dyskinesia in schizophrenic patients. *Mol Psychiatry* 2: 139-145, 1997.

STEINPREIS, R.E., BASKIN, P., SALAMONE, J.D. Vacuous jaw movements induced by sub-chronic administration of haloperidol: interactions with scopolamine. *Psychopharmacology* 111: 99-105, 1993.

SUDATI, J.H.; FACHINETTO, R.; PEREIRA, R.P.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; SOARES F.A.; BARBOSA, N.B.V.; ROCHA, J.B.T.. *In vitro* Antioxidant Activity of *Valeriana officinalis* Against Different Neurotoxic Agents. *Neurochem Res* doi: 10.1007/s11064-009-9917-8, 2009.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 30:244–250, 2007.

SVENNINGSSON, P.; LE MOINE, C.; FISONE, G.; FREDHOLM, B.B. Distribution, biochemistry and function of striatal adenosine A2A receptors. *Prog Neurobiol* 59:355-6,1999.

SWAIMAN, K.F. Hallervorden-Spatz and brain iron metabolism. *Arch Neurol* 48:1285–1293, 1991.

TABACH, R.; RODRIGUES, E.; CARLINI, E.A. Preclinical toxicological assessment of a phytotherapeutic product - CPV (based on dry extracts of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L., and *Valeriana officinalis* L.). *Phytotherapy Research* 23 : 33-40, 2009.

TAMMINGA, C.A.; CRAYTON, J.W.; CHASE, T.N. Improvement in tardive dyskinesia after muscimol therapy. *Arch Gen Psychiatry* 36:595–8, 1979.

TAMMINGA, C.A.; DALE, J.M.; GOODMAN, L.; KANEDA, H.; KANEDA, N. Neuroleptic-induced vacuous chewing movements as an animal model of tardive dyskinesia: a study in three rat strains. *Psychopharmacology* 102: 474-478, 1990.

TAMMINGA, C.A.; THAKER, G.K.; FERRARO, T.N.; HARE, T.A. GABA agonist treatment improves tardive-dyskinesia. *Lancet*, 2: 97-98, 1983.

TEIXEIRA, A.M.; RECKZIEGEL, P.; MULLER, L.; PEREIRA, R.P.; ROOS, D.; ROCHA, J.B.T.; BURGER, M.E.. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacol Biochem Behav* doi:10.1016/j.pbb.2008.11.015, 2009.

THEVENOD, F.; FRIEDMANN, J.M. Cadmium-mediated oxidative stress in kidney proximal tubule cells induces degradation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase through proteasomal and endo-/lysosomal proteolytic pathways. *FASEB J* 13: 1751–1761, 1999.



THOMPSON, L.U. Lignans and Isoflavones. In: EISENBRAND, G., DAYAN, A.D., ELIAS, P.S., GRUNOW, W., SCHLATTER, J. (Eds.), *Carcinogenic/Anticarcinogenic Factors in Foods*. Dtsch. Forsch. Gem., Ger.. Wiley-VCH, Germany, 2000.

TIJBURG, L.B.M.; MATTERN, T.; FOLTS, J.D.; WEISGERBER, U.M.; KATAN, M.B. Tea Flavonoids and Cardiovascular Diseases: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 771-785, 1997.

TODORICH, B.M., CONNOR, J.R. Redox metals in Alzheimer's disease. *Annal of theNewYork Academyof Sciences* 1012: 171-178, 2004.

TREVITT, J.T.; LYONS, M.; ABERMAN, J.; CARRIERO, D.; FINN, M.; SALAMONE, J.D. Effects of clozapine, thioridazine, risperidone and haloperidol on behavioral tests related to extrapyramidal motor function. *Psychopharmacology* 132: 74–81, 1997.

TSAI, G.C.; GOLF, D.C.; CHANG, R.W.; FLOOD, J.; BAER, L.; COYLE, J.T. Markers of glutamatergic neurotransmission and oxidative stress associated with tardive dyskinesia, *Am J Psych* 155:1207–1213, 1998.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J.. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266:37–56, 2004.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:44–84, 2007.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMACH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem*, 46: 4113–4117, 1998.

VINSON, J.A.; DABBAGH, Y.A.; SERRY, M.M.; JANG, J. Plant flavonoids, especially tea flavonoids, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem* 43:2800–2802, 1995.

VON DER HUDE, W., SCHEUTWINKEL-REICH, M., BRAUN, R., DITTMAR, W. *In vitro* mutagenicity of valepotriates. *Arch Toxicol* 56, 267–271, 1985.

WADDINGTON, J.L.; YOUSSEF, H.A. An unusual cluster of tardive dyskinesia in schizophrenia: association with cognitive dysfunction and negative symptoms. *Am J Psychiatry* 143: 1162-1165, 1986.

WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; DALLA CORTE, C.L.; BRITO, V.B.; SEVERO, D.; DIAS, G.O.C.; MOREL, A.F.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T.. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation *in vitro*. *Brain Res* 1107:192–198, 2006.

WARNER, T. T.; SCHAPIRA, A. H. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 : S16 -23, 2003.

WEINHOLD, P.; WEGNER, J.T.; KANE, J.M. Familial occurrence of tardive dyskinesia. *J Clin Psychiatry* 42: 165-166, 1981.

WICHMANN, T.; KLIEM, M.A.; DELONG, M.R. Antiparkinsonian and behavioral effects of inactivation of the substantia nigra pars reticulata in hemiparkinsonian primates. *Exp Neurol* 167:410-24, 2001.

WICKENS, A.P. Ageing and free radical theory. *Respir Physiol* 128 : 379–391, 2001.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med* 36:838–849, 2004.

WISEMAN, S.A.; BALENTINE, D.A.; FREI, B. Antioxidants in Tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 705-718, 1997.

WOERNER M.G., KANE J.M., LIEBERMAN J.A., ALVIR J., BERGMANN K.J., BORENSTEIN M., SCHOOLER, N.R.; MUKHERJEE, S.; ROTROSEN, J.; RUBINSTEIN, M.; et al. The prevalence of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 11: 34–42, 1991.

WOERNER, M.G.; ALVIR, J.M.; SALTZ, B.L.; LIEBERMAN, J.A.; KANE, J.M. Prospective study of tardive dyskinesia in the elderly: rates and risk factors. *Am J Psychiatry* 155: 1521-1528, 1998.

WOLFARTH, S.; OSSOWSKA, K. Can the supersensitivity of rodents to dopamine be regarded as a model of tardive dyskinesia? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 13: 799-840, 1989.

WU, J.W.; HSIEH, C.L.; WANG, H.Y.; CHEN, H.Y. Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chem* 113 : 78-84, 2009.

YANG, C.S.; KIM, S.; YANG, G.Y.; LEE, M.J.; LIAO, J. Inhibition of the carcinogenesis by tea; bioavailability of the tea polyphenols and mechanisms of the action. *Pro Soc Exp Biol Med* 220: 213–217, 1999.

YASSA R., JESTE D.V. Gender differences in tardive dyskinesia: a critical review of the literature. *Schizophr Bull* 18:701–15, 1992.

YASSA, R.; ANANTH, J. Familial tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry* 138, 1618-1619, 1981.

YUAN, C.-S.; MEHENDALE, S.; XIAO, Y.; AUNG, H.H.; XIE, J.-T.; ANG-LEE, M.K. The GABAergic effects of valerian and valerenic acid on rat brain stem neuronal activity. *Anesth. Analg.* 98: 353–358, 2004.