

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**EFEITO DO RESVERATROL NAS ALTERAÇÕES
MOTORAS E OXIDATIVAS INDUZIDAS POR
RESERPINA EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alcindo Busanello

Santa Maria, RS, Brasil

2012

PPG BTOX/UFSM, RS

BUSANELLO, Alcindo

Mestre

2012

**EFEITO DO RESVERATROL NAS ALTERAÇÕES
MOTORAS E OXIDATIVAS INDUZIDAS POR RESERPINA
EM CAMUNDONGOS**

Alcindo Busanello

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 Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.

Orientadora: Dr^a. Nilda Berenice de Vargas Barbosa
Co-orientadora: Dr^a. Roselei Fachinetto

Santa Maria, RS, Brasil
2012

Busanello, Alcindo

Efeito do resveratrol nas alterações motoras e oxidativas induzidas por reserpina em camundongos/ Alcindo Busanello. -Santa Maria,2012.

47 p.; 21 x 29,7cm

Orientadora: Nilda Berenice de Vargas Barbosa
Dissertação (mestrado)- Universidade Federal de Santa Maria,
Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Toxicológica, RS, 2012

1. Resveratrol. 2. Discinesia orofacial. 3. Parkinsonismo
I. Barbosa, Nilda Berenice de Vargas II. Título.

**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

**EFEITO DO RESVERATROL NAS ALTERAÇÕES MOTORAS E
OXIDATIVAS INDUZIDAS POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS**

elaborada por
Alcindo Busanello

como requisito parcial para a obtenção de grau de
Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.

COMISSÃO EXAMINADORA

Nilda Berenice de Vargas Barbosa
(Presidente/Orientadora)
(UFSM)

Ana Flavia Furian
(UFSM)

Cristiane Lenz Dalla Corte
(UFSM)

Santa Maria, 17 de agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que nas suas mais diferentes formas de manifestação, está sempre presente guiando meus passos.

Aos meus pais, Luiz e Zelia, meus maiores exemplos de vida, pelo amor, compreensão, ensinamentos, apoio em todos os momentos.

À minha orientadora Prof. Nilda de Vargas Barbosa, pela orientação, amizade, paciência, confiança, dedicação e apoio dado à realização deste trabalho. Minha admiração e gratidão.

À minha grande companheira, Roselei, pelo amor, carinho, amizade, incentivo, parceria, compreensão em todos os momentos e principalmente paciência e atenção.

Aos meus irmãos Jorge, Nestor e Rosane e suas famílias, pela amizade e carinho.

Aos Professores João Batista, Félix, Carlos, Juliano, Marilise, Kátia e Maria Amália e ao pessoal dos seus laboratórios, pela colaboração na execução deste trabalho e pela amizade.

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

Aos colegas e amigos de laboratório: Luis, Luana, Caroline, Tássia, Milena, Patrícia, Larissa, Jivago, Fernanda, Elizete, Catiuscia, Barbara, Mayara, Augusto, Sandra, Francielli, Sônia, Jéssie, Daniel, Alessandro, Glaecir, Kelli, Romaiana, Rodrigo, Assis, Carlos, Angélica, Mateus, Rafael e demais colegas pelo auxílio em experimentos, pela partilha de conhecimento, disponibilidade, incentivo, e principalmente, pelos momentos de alegria, companheirismo e amizade.

Aos funcionários Elvadir, Márcia e Florindo pela ajuda, pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

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

Aos animais utilizados, todo o meu respeito, pois sem eles não teria sido possível a realização deste trabalho.

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.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano."

(Isaac Newton)

RESUMO

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

EFEITO DO RESVERATROL NAS ALTERAÇÕES MOTORAS E OXIDATIVAS INDUZIDAS POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS

AUTOR: Alcindo Busanello
ORIENTADORA: Nilda Berenice de Vargas Barbosa
CO-ORIENTADORA: Roselei Fachinetto
LOCAL E DATA DA DEFESA: Santa Maria, 17 de agosto de 2012.

A administração de reserpina consiste num modelo animal de discinesia orofacial, tremor e parkinsonismo. Neste trabalho, investigamos o efeito do resveratrol, um polifenol com propriedades neuroprotetoras encontrado principalmente em frutas vermelhas e no vinho tinto, em um modelo animal de movimentos de mascar no vazio induzidos (MMVs) por tratamento com reserpina em camundongos. Os camundongos foram tratados com reserpina (1 mg/kg, administrado subcutaneamente nos dias 1 e 3) e/ou resveratrol (5 mg/kg, administrado intraperitonealmente durante 3 dias consecutivos). Foram avaliados os MMVs, atividade locomotora e exploratória. Também analisamos os níveis de tióis não-protéicos e de ácido ascórbico em córtex e região contendo ambos, substância negra e estriado, como parâmetros de defesa antioxidante. O tratamento com reserpina produziu um aumento na intensidade dos MMVs, os quais foram significativamente reduzidos pelo co-tratamento com resveratrol. A reserpina também diminuiu a atividade locomotora e exploratória no teste de campo aberto. Contudo, o co-tratamento com resveratrol não foi capaz de modificar estes efeitos. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos quando os parâmetros de defesa antioxidantes foram avaliados. Os dados obtidos sugerem que o resveratrol poderia ser um agente promissor no tratamento de MMVs em camundongos. Contudo, investigações adicionais são necessárias para entender os exatos mecanismos envolvidos nos efeitos neuroprotetores do resveratrol.

Palavras-chave: Resveratrol, discinesia orofacial, parkinsonismo

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF RESVERATROL ON MOTOR AND OXIDATIVE CHANGES INDUCED BY RESERPINE IN MICE

AUTHOR: Alcindo Busanello
ADVISOR: Nilda Berenice de Vargas Barbosa
CO-ADVISOR: Roselei Fachinetto
PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, August 17, 2012

Reserpine treatment is a putative animal model of orofacial dyskinesia, tremor, and Parkinsonism. Here, we examined the effects of resveratrol, a polyphenol with neuroprotective properties primarily contained in red grapes and red wine, in an animal model of vacuous chewing movements (VCM) induced by treatment with reserpine in mice. Mice were treated with reserpine (1 mg/kg, subcutaneously administered on days 1 and 3) and/or resveratrol (5 mg/kg, intraperitoneally administered 3 consecutive days). VCM, locomotor, and exploratory performance were evaluated. It was also analysed non-proteic thiol groups and Vitamin C levels in cortex and region containing both *substantia nigra* and striatum as antioxidant defense parameters. Reserpine treatment produced an increase in VCM intensity, which was significantly reduced by resveratrol co-treatment. Reserpine also decreased locomotor and exploratory activity in the open field test. However, resveratrol co-treatment was not able to protect against these effects. We did not find any statistical differences among the groups when antioxidant defense parameters were evaluated. The data suggest that resveratrol could be a promising pharmacological tool for treating VCM in rodents. However, further investigations are needed to understand the exact mechanisms involved in the neuroprotective effects of resveratrol.

Key-words: Resveratrol, orofacial dyskinesia, Parkinsonism.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Mecanismo de ação da reserpina (bloqueio do transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2)) 21

Resultados

Figura 1: Effects of resveratrol on reserpine-induced extrapyramidal symptoms in mice represented by number of vacuous chewing movements (VCM) during 6 min of observation 31

Figura 2: Effects of reserpine and/or resveratrol in the open field test in mice. Number of (a) crossings and (b) rearing in 5 min 31

Figura 3: Efeito da reserpina e/ou resveratrol sobre os níveis de ácido ascórbico em córtex e região contendo a substância negra e o estriado 35

Figura 4: Efeito da reserpina e/ou resveratrol sobre os níveis de tiól não-protéico em córtex e região contendo a substância negra e o estriado 36

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – ácido ascórbico
COMT - catecol-O-metiltransferase
DA – dopamina
DO - discinesia orofacial
DOPAC – ácido 3,4-diidroxifenilacético
DOPA – diidroxifenilalanina
DP – doença de Parkinson
DT – discinesia tardia
EROS – espécies reativas de oxigênio
Fe³⁺ - íon férrico
GSH - glutathiona reduzida
GSSG – glutathiona oxidada
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HVA – ácido homovanílico
MAO – enzima monoaminoxidase
MMVs – movimentos de mascar no vazio
MPP⁺ - íon 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NH₃- amônia
NMDA – N-Metil-D-Aspartato
O₂^{*-} - radical superóxido
OH[·] – radical hidroxila
SNC – sistema nervoso central
SOD – superóxido dismutase
SQ^{*} - semiquinona
TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TDA – transportador de dopamina
TF – tremor facial
TNP – tióis não-protéicos
VMAT-2 – transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE ABREVIATURAS	10
APRESENTAÇÃO	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Antipsicóticos e o desenvolvimento da discinesia tardia	14
1.2. Doença de Parkinson	16
1.3. Sistema dopaminérgico	18
1.4. Metabolismo da dopamina e estresse oxidativo	19
1.5. Reserpina: aspectos farmacológicos	21
1.6. Reserpina: modelo de distúrbio motor	22
1.7. Resveratrol	24
2. OBJETIVOS	26
3. RESULTADOS	27
3.1. Artigo científico	28
3.2. Dados adicionais	34
3.3. Discussão dos dados adicionais	37
4. CONCLUSÕES	38
5. PERSPECTIVAS	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrita uma revisão sucinta sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um artigo científico, o qual se encontra no item **RESULTADOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÕES** encontrado no final desta dissertação, apresenta comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

Desde o século XX as desordens motoras, comuns na doença de Parkinson (DP) e as induzidas por antipsicóticos como a discinesia tardia (DT), têm sido relacionadas com alterações nos circuitos neuronais dos gânglios da base, com especial destaque para as alterações nos circuitos dopaminérgicos. Estas alterações motoras têm sido amplamente estudadas devido à sua alta prevalência, sendo que 1-2% da população apresenta esta alteração motora enquanto que 20-40% dos pacientes que fazem uso de antipsicóticos típicos apresentam a DT (HUGHES et al., 2000; ANDREASSEN e JORGENSEN, 2000).

Os gânglios da base consistem em um grupo de núcleos subcorticais que têm sido ligados ao controle dos movimentos desde o final do século XIX quando David Ferrier concluiu que o corpo estriado continha os “centros de integração automática ou subvoluntária” dos movimentos (FERRIER, 1876). Fazem parte dos gânglios da base o núcleo caudado, o putâmen, o globo pálido e o núcleo subtalâmico. Além disso, podemos citar também como fazendo parte dos gânglios da base, a substância negra, que está reciprocamente conectada aos gânglios da base do prosencéfalo. O caudado e o putâmen, em conjunto são chamados de estriado, que também é o alvo da aferência cortical aos gânglios da base (BEAR, 2002).

1.1 Antipsicóticos e desenvolvimento da discinesia tardia

Os antipsicóticos são fármacos utilizados no tratamento de psicoses, em particular a esquizofrenia, a qual consiste numa importante desordem mental que afeta cerca de 1% da população em todo o mundo (MAHADIK et al., 2001), independente da cultura, país ou grupo racial (BROMET e FENNING, 1999). A clorpromazina, uma fenotiazina, foi o primeiro neuroléptico descrito, em 1952, por Delay e Deniker. No final da década de 50, a flufenazina, um potente fármaco antipsicótico pertencente também à classe das fenotiazinas foi introduzida na prática clínica (DARLING, 1959; TAYLOR, 1959). Naquela época, a flufenazina foi considerada uma descoberta importante em relação às fenotiazinas já existentes (por exemplo, a clorpromazina) principalmente porque não produzia o efeito colateral da acatisia, comum a esta classe de medicamentos (DARLING, 1959). Em 1957, Paul Janssen descobriu a atividade antipsicótica das butirofenonas. Nesta classe, encontra-

se o haloperidol, um antipsicótico que se destaca por sua potência, especificidade e longa ação (NIEMEGEERS, 1983). A principal ação farmacológica dos antipsicóticos clássicos ou típicos (haloperidol e flufenazina) consiste em bloquear receptores dopaminérgicos D₂ (CREESE et al., 1976). No entanto, o tratamento com estes fármacos possui eficácia comprometida por causar efeitos colaterais extrapiramidais agudos e crônicos como, por exemplo, a DT e o Parkinsonismo (ANDREASSEN e JORGENSEN, 2000).

Em 1958, Schmutz et al. sintetizaram uma série de compostos identificados quimicamente como dibenzazepinas tricíclicas, sendo clozapina, o protótipo dos antipsicóticos atípicos, uma delas (SCHMTZ e EICHENBERGER, 1982). Estes novos compostos foram efetivos em alguns modelos animais de ação antipsicótica. Contudo, em contraste aos antipsicóticos típicos, os antipsicóticos atípicos não foram efetivos em modelos de estereotipia induzidos por anfetamina e apomorfina (HEALY, 2002; HIPPIUS, 1989).

Mais tarde, observou-se que pacientes resistentes ao tratamento com haloperidol e clorpromazina, principalmente aqueles com sintomas negativos de esquizofrenia, respondiam de maneira satisfatória ao tratamento com clozapina (KANE et al., 1988). Desta forma, novos antipsicóticos atípicos, começaram a ser sintetizados visando minimizar os efeitos colaterais extrapiramidais sem, contudo, diminuir a eficácia terapêutica. Entretanto, os antipsicóticos atípicos, além de não possuírem eficácia satisfatória nos sintomas positivos da esquizofrenia, causam uma série de efeitos colaterais, entre eles diabetes *mellitus* tipo 2, agranulocitose e, em alguns casos, a própria DT (HENDERSON, 2002). Além disso, os antipsicóticos atípicos possuem custo muito elevado se comparados aos típicos. Desta forma os neurolépticos clássicos continuam sendo largamente empregados no tratamento sintomático das psicoses embora apresentem como efeito adverso a DT.

A DT consiste em um distúrbio do movimento decorrente do uso prolongado de antipsicóticos, sendo considerado o principal efeito adverso destes fármacos. As primeiras descrições desta síndrome foram publicadas entre 1956 e 1957. Inicialmente, a DT foi denominada de “discinesia persistente” sendo também referida como “síndrome buco-língua-mastigatória” ou “síndrome da insuficiência extrapiramidal terminal” (CRANE, 1968; KANE, 1995). O termo DT foi proposto em 1964, por Faurbye e colaboradores.

A DT caracteriza-se por movimentos anormais hipercinéticos, sem propósito, repetitivos e involuntários que podem ocorrer durante ou após a interrupção de um tratamento prolongado com antipsicóticos. Estes distúrbios do movimento ocorrem, mais freqüentemente, na região orofacial e incluem movimentos de mastigação, protrusão da língua, estalido dos lábios, movimentos de franzir a face e piscar os olhos. Em alguns casos, os distúrbios hipercinéticos podem também atingir o pescoço, os membros (principalmente os superiores) e o tronco (KANE, 1995). Também podem desenvolver-se sintomas axiais de movimentos pélvicos para frente e para trás ou movimentos rotatórios, descontínuos, dos quadris. Estes sintomas possuem flutuações no decorrer do tempo, podendo variar em intensidade até mesmo dentro do mesmo dia (GARDOS et al., 1983; WOLFARTH e OSSOWASKA, 1989; LAPORTA et al., 1990).

Em 1988, a Associação Psiquiátrica Americana estimou a prevalência da DT em cerca de 10 a 20% dos pacientes que utilizam cronicamente fármacos neurolépticos. Alguns autores estimam que a média de prevalência da DT em pacientes recebendo tratamento com neurolépticos clássicos consiste de um índice em torno de 20–25%; mas este índice aumenta com a idade. De fato, a idade é considerada um dos fatores de risco para a DT, a qual atinge cerca de 50% dos pacientes, com mais de 50 anos de idade, em tratamento com neurolépticos (KANE e SMITH, 1982; GARDOS et al., 1983; YASSA e JESTE, 1992). Um dos aspectos mais graves da DT consiste na persistência da síndrome por meses ou até anos após a retirada do tratamento, ou ainda sua irreversibilidade (CRANE, 1973; JESTE et al., 1979; CASEY, 1985; GLAZER et al., 1990).

A hipótese clássica para explicar o desenvolvimento da DT após uso crônico de neurolépticos é baseada na supersensibilidade dopaminérgica. Segundo esta hipótese, a DT é resultante de uma resposta do sistema nervoso central (SNC), secundária ao bloqueio crônico dos receptores dopaminérgicos pelos neurolépticos, em locais relacionados ao controle dos movimentos, como a via nigro-estriatal. Em resposta a este bloqueio crônico, há um aumento compensatório no número de receptores dopaminérgicos, os quais provavelmente respondem a menores níveis de DA levando a um estado hiperdopaminérgico e a manifestações clínicas como, por exemplo, a DT (KLAWANS e RUBOVITS, 1972; BURT et al., 1977; RUBINSTEIN et al., 1990). No entanto, esta teoria possui algumas contradições. A principal inconsistência da teoria é que o mais importante

fator de risco para o desenvolvimento da DT é a idade (CAVALLERO e SMERALDI, 1995; KANE, 1995; WOERNER et al., 1998). Contudo, foi demonstrado que o envelhecimento faz com que ocorra a redução tanto do número quanto da sensibilidade dos receptores dopaminérgicos (LOHR e JESTE, 1988; SACHDEV, 1999).

Apesar da hipótese da supersensibilidade dos receptores dopaminérgicos possuir algumas inconsistências, o sistema dopaminérgico é reconhecido por estar diretamente relacionado ao desenvolvimento da DT em humanos e da discinesia orofacial (DO) em roedores. Dados da literatura demonstram que a administração de neurolépticos, por bloquear receptores dopaminérgicos pré-sinápticos responsáveis pela retroinibição da síntese de DA, causa um aumento secundário na síntese e nos níveis extracelulares deste neurotransmissor (LOHR, 1991; ANDREASEN e JORGENSEN, 2000), e que este desequilíbrio na neurotransmissão dopaminérgica, em especial no estriado acarretaria no desenvolvimento dos movimentos involuntários. No entanto, apesar da DT ser amplamente estudada, os mecanismos envolvidos na sua etiologia, bem como um tratamento eficaz ainda são alvos de pesquisas.

1.2 Doença de Parkinson

A DP é uma doença neurodegenerativa de causa desconhecida. Esta doença costuma ter seu surgimento em pacientes que possuem em média 57 anos de idade (KOLLER et al., 1987) e sua prevalência está estimada em 1-2% da população com mais de 60 anos (HUGHES et al., 2000) sendo que com o aumento da idade este índice aumenta consideravelmente. A DP foi primeiramente descrita em 1817, na monografia clássica “*Essay on the Shaking Palsy*” de James Parkinson, na qual ele descreveu as características clínicas desta que é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003). Os pacientes com DP podem apresentar um ou mais dos seguintes sintomas:

- rigidez, que se refere ao aumento na resistência ao movimento passivo dos membros;
- bradicinesia: redução de movimentos;
- hipocinesia: redução na amplitude dos movimentos;

- acinesia: ausência de movimentos normais não-conscientes, como a movimentação dos braços durante a caminhada;

- escassez de expressão facial normal (hipomímia);

- diminuição do volume da voz (hipofonia);

- falha de deglutição (babeira);

- diminuição do tamanho e da velocidade da escrita;

- diminuição do comprimento do passo durante a caminhada.

É importante destacar que a bradicinesia pode prejudicar significativamente a qualidade de vida destes pacientes, uma vez que torna bastante demorado a execução de tarefas simples como comer e vestir-se. Os pacientes com DP também desenvolvem postura tipicamente parada e podem perder reflexos posturais normais levando a quedas e muitas vezes à necessidade de utilização de cadeira de rodas, além da incapacidade de iniciar movimentos (freezing). Anormalidades cognitivas e afetivas ocorrem com frequência. Os pacientes podem tornar-se passivos ou arredios, com falta de iniciativa; podem permanecer sentados e quietos, menos incentivados a participar de atividades; apresentam atraso de respostas a questionamentos. Quadros de depressão também são comuns nestes pacientes e a demência é significativamente mais frequente em pacientes com DP comparado a outras causas de demências, especialmente em idosos (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; GÓMEZ-ESTEBAN et al., 2007).

- A patogênese da DP não está completamente elucidada, e a doença pode ter múltiplas causas, incluindo fatores de risco genéticos (LEWITT, 2008). Dentre os pacientes com DP, 10-15% possuem história familiar sugestiva de doença hereditária, sendo que já foram identificadas 11 formas genéticas da doença (GASSER, 2007). Para os casos esporádicos, várias vias metabólicas têm sido reconhecidas, (LEWITT e TAYLOR, 2008); mas fatores comuns de iniciação e finalização destas vias ainda não são bem definidos.

Os prejuízos motores da DP originam-se de perdas seletivas de neurônios mesencefálicos localizados na substância negra *pars compacta* (JELLINGER, 2007). Estes neurônios projetam-se para os núcleos caudado e putamen (o estriado), onde liberam dopamina. A neurotransmissão dopaminérgica no estriado é o primeiro passo na sinalização

de vias que passam, na sequencia, através do globo pálido, o núcleo subtalâmico e o tálamo em uma via para o córtex motor (WICHMANN e DELONG, 2003). O parkinsonismo surge quando mais da metade dos terminais nervosos dopaminérgicos no estriado são perdidos. Há 50 anos atrás, uma pesquisa pioneira conduzida pelos neurocientistas Arvid Carlsson e Oleh Hornykiewicz demonstrou que o parkinsonismo poderia ser revertido temporariamente por intervenções farmacológicas que restauram a neurotransmissão dopaminérgica estriatal (HORNYKIEWICZ, 2002). Esta reversão pode ser realizada por terapia de reposição de dopamina usando tanto a L-DOPA (1-3,4-dihydroxyphenylalanine) como agonistas dopaminérgicos. Nos estágios iniciais da DP, o tratamento é altamente efetivo, mas com a progressão da doença, as complicações motoras decorrentes do uso destes fármacos tornam-se muito evidentes (JANKOVIC, 2006; JANKOVIC e STACY, 2007). Estas complicações incluem movimentos involuntários, denominados discinesia, as quais são limitantes para o tratamento (AHLKOG, J. E. e MUEENTER, 2001; JANKOVIC, 2005; SCHRAG et al., 2002). Desta forma, assim como para a discinesia induzida por antipsicóticos, a DP e discinesias decorrentes de fármacos utilizados para o seu tratamento, não possuem um tratamento efetivo e desprovido de efeitos colaterais. Além disso, é importante ressaltar que o sistema dopaminérgico, mais especificamente a via nigroestriatal, parece ser um ponto em comum à DP e às discinesias induzidas por antagonistas (ex. haloperidol, flufenazina) e agonistas (L-dopa) dopaminérgicos.

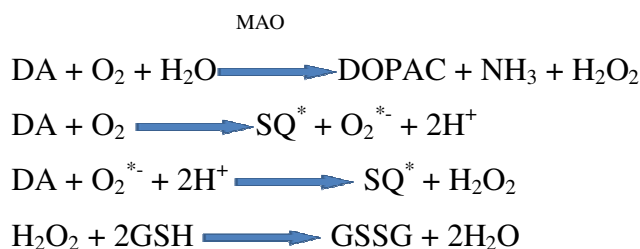
1.3 Sistema dopaminérgico

Existem quatro vias dopaminérgicas no cérebro de mamíferos, as quais compõem o sistema dopaminérgico: via mesolímbica, via mesocortical, via tuberoinfundibular e via nigroestriatal (DAHLSTROM e FUXE, 1964). A via nigroestriatal, que contém cerca de 80% da dopamina no cérebro, tem seus corpos celulares na *substantia nigra* e suas projeções para o corpo estriado (ALBIN et al., 1989). Esta via está envolvida no funcionamento normal dos gânglios da base e a degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais é que leva aos sintomas motores que caracterizam a DP e a DT por esta ser uma via que exerce controle inibitório sobre outras vias não dopaminérgicas (CROSSMAN, 1990; 2000). O sistema dopaminérgico possui como neurotransmissor a dopamina, cuja síntese inicia-se a partir do aminoácido tirosina e tem como etapa limitante a conversão da

tirosina a DOPA pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Por sua vez, a DOPA é convertida a dopamina pela enzima DOPA descarboxilase. A dopamina é, então, transportada do citoplasma onde é sintetizada para vesículas de estocagem especializadas, via transportador vesicular de monoaminas 2 (TVMA-2). Em resposta ao estímulo do neurônio pré-sináptico ocorre a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (GOODMAN e GILMAN, 2010). O aumento na concentração de cálcio citosólico leva a fusão das vesículas de dopamina com a membrana plasmática e liberação deste neurotransmissor na fenda sináptica. A dopamina presente no espaço sináptico pode agir em receptores dopaminérgicos exercendo suas ações celulares. Para a redução dos níveis de dopamina extracelular, a dopamina presente no espaço sináptico pode ser transportada para o interior dos neurônios pré-sinápticos pelo transportador de dopamina (DAT) (AMARA e KUHAR, 1993). Além disso, a ligação da dopamina em receptores pré-sinápticos D2 inibe sua síntese diminuindo, desta forma, seu armazenamento e liberação (ALBIN et al., 1989). Os principais metabólitos da dopamina formados no sistema nervoso central (SNC) são principalmente o ácido homovanílico (HVA) e o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), sendo estes formados principalmente através da atividade da enzima monoaminaoxidase (MAO) acoplada na membrana mitocondrial e da catecol-O-metiltransferase (COMT). Tendo em vista que tanto na DP como na DT o sistema dopaminérgico parece ser um ponto em comum, dados da literatura têm dado ênfase a relação existente entre os mecanismos oxidativos envolvidos no metabolismo da dopamina e a gênese das desordens motoras.

1.4 Metabolismo da dopamina e estresse oxidativo

O estresse oxidativo consiste numa condição deletéria que resulta de mecanismos insuficientes de neutralização das espécies reativas de oxigênio (EROS), as quais podem ser geradas por várias reações bioquímicas que envolvem a dopamina conforme demonstrado a seguir (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002):





Normalmente, as EROS são neutralizadas por sistemas antioxidantes intracelulares, os quais podem estar comprometidos como resultado de processos relacionados à idade ou à doenças. Por exemplo, muitos organismos apresentam diminuição nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) durante o processo normal do envelhecimento (SOHAL e WEINDRUCH, 1996).

Neurônios dopaminérgicos nigrais estão particularmente expostos ao estresse oxidativo, porque o metabolismo da dopamina dá origem a várias moléculas que podem atuar como toxinas endógenas se não forem eliminadas adequadamente, conforme as reações demonstradas anteriormente. Em pH fisiológico, a dopamina pode sofrer auto-oxidação a espécies reativas tóxicas, denominadas quinonas de dopamina, radicais superóxido e peróxido de hidrogênio (GRAHAM, 1978). Por outro lado, a dopamina pode ser desaminada enzimaticamente pela MAO ao metabólito não tóxico DOPAC e H_2O_2 (MAKER et al., 1981). O radical superóxido não é altamente reativo, mas pode ser convertido à H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD), ou a radicais instáveis como o peroxinitrito na presença de óxido nítrico. O H_2O_2 pode ser convertido em radicais hidroxilas citotóxicos, em uma reação que é catalisada por ferro, cujos níveis são mais altos na substância negra do que em outras regiões do cérebro. As espécies reativas causam alterações na funcionalidade de proteínas, lipídeos e DNA. O dano aos lipídeos, por sua vez, leva a perda de integridade da membrana e aumenta a permeabilidade a íons como o cálcio, o qual pode promover excitotoxicidade (HALLIWELL, 1992).

Como a dopamina citoplasmática pode rapidamente formar EROS, a dopamina que foi sintetizada e/ou recaptada a partir da fenda sináptica torna-se não reativa quando armazenada rapidamente nas vesículas pré-sinápticas. Por sua vez, as vesículas, devido ao seu baixo pH e ausência da MAO, tornam este ambiente estável para a dopamina. Em condições normais, o armazenamento adequado da dopamina em vesículas é provavelmente a principal via de proteção das células nigrais contra os efeitos deletérios da oxidação da dopamina (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002).

Adicionalmente, contribuindo para um maior aumento na renovação de dopamina e possível toxicidade da mesma, foi demonstrado que alguns neurolépticos, dentre eles o

haloperidol, foram capazes de inibir a captação de dopamina, *in vitro*, via interação direta com o transportador para dopamina (LEE et al., 1997). Dados prévios de nosso grupo também demonstraram que a redução na captação de dopamina no estriado parece estar relacionada com a DO em ratos (FACHINETTO et al., 2007a; 2007b). Alguns modelos experimentais têm sido propostos para o estudo de desordens motoras e dentre estes podemos destacar o modelo induzido por reserpina.

1.5 Reserpina: aspectos farmacológicos

A reserpina, um alcalóide extraído das raízes da planta *Rauwolfia serpentina*, que se liga às vesículas de armazenamento de monoaminas em neurônios monoaminérgicos centrais e periféricos, inibindo o transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2) Fig. 01. Por conseguinte, as terminações nervosas perdem a sua capacidade de concentrar e armazenar a monoaminas, como por exemplo, a dopamina. As catecolaminas extravasam no citoplasma, onde são metabolizadas pela MAO intraneural, de modo que pouco ou nenhum transmissor é liberado das terminações nervosas com a despolarização (GOODMAN e GILMAN, 2010).

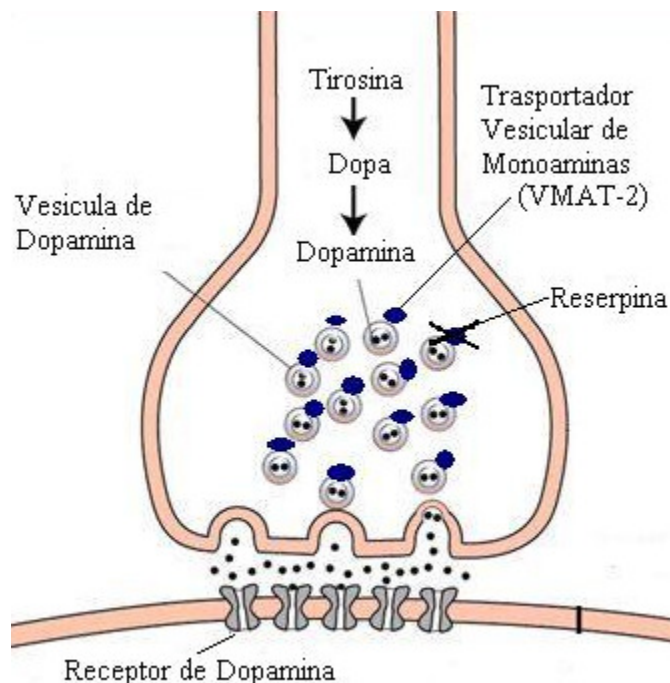


Figura 01: Mecanismo de ação da reserpina (bloqueio do transportador vesicular de monoaminas (VMAT-2)).

1.5.1 Mecanismo de ação

A reserpina causa depleção de catecolaminas das fibras simpáticas pós-ganglionares e da medula das adrenais; a adrenalina, a noradrenalina, e a serotonina se reduzem também no SNC, pela ação da reserpina.

O efeito anti-hipertensivo da reserpina se deve fundamentalmente à depleção periférica de catecolaminas, embora se discuta uma ação hipotensora de ação central.

A reserpina impede a passagem de NA do axoplasma para o interior da vesícula de estocagem através da inibição do sistema ATP-Mg. A NA no citoplasma é então metabolizada pela MAO, o que leva a uma redução da função simpática. Os efeitos hemodinâmicos resultantes são dependentes do grau de depleção de NA. Assim, doses elevadas podem causar hipotensão ortostática, e doses pequenas produzem efeito anti-hipertensivo discreto (SILVA, 2010).

1.5.2 Farmacocinética

A reserpina é bem absorvida por via oral e, em decorrência de sua ação cumulativa, requer de 2 a 3 semanas para exibir o efeito anti-hipertensivo máximo. Não há correlação entre os níveis plasmáticos e o efeito terapêutico. São necessários cerca de 21 dias para que a reserpina seja totalmente eliminada do organismo (SILVA, 2010).

1.5.3 Usos clínicos

Para o tratamento de hipertensos em regime ambulatorial, as doses iniciais variam de 0,25 a 0,5 mg diariamente, por 7 dias. A seguir usam-se doses de manutenção entre 0,1 a 0,25 mg diários. A administração parenteral de reserpina causa acentuada obnubilação e pode dificultar a avaliação de funções neurológicas. Por esse motivo, em urgências hipertensivas em que o acidente vascular encefálico seja uma iminência ou uma condição já instalada, a reserpina não deve ser usada. Quando houver indicação, a dose intramuscular é de 1 a 2,5 mg, e o efeito anti-hipertensivo máximo ocorre após 1 a 3 horas. Não há vantagem em utilizar-se a via intravenosa (SILVA, 2010).

1.6 Reserpina: modelo de distúrbio motor

Alguns modelos animais têm sido propostos para estudar a patofisiologia de distúrbios motores que ocorrem em humanos (NEISEWANDER et al., 1991; 1994; SALAMONE e BASKIN, 1996; BURGER et al., 2004; 2005; CASTRO et al., 2006;

FACHINETTO et al., 2005; 2007a; 2007b). Dentre estes está o modelo experimental induzido por reserpina que produz movimentos extrapiramidais considerados relacionados à discinesia orofacial por alguns autores e ao parkinsonismo por outros (NEISEWANDER et al., 1991a; 1994; SALAMONE e BASKIN, 1996; BURGER et al., 2004; 2005; AGUIAR et al., 2009; PEREIRA et al., 2011).

Os modelos agudos, como é o caso da reserpina, em geral têm sido criticados quando relacionados à discinesia tardia devido a uma série de fatores, sendo que a principal crítica consiste no fato de a síndrome extrapiramidal aguda apresentar mais similaridades com Parkinsonismo do que com a DT propriamente dita (EGAN et al., 1996). Desta forma, a idéia proposta inicialmente de que o modelo refere-se a DT (NEISEWANDER et al., 1991a,b; NEISEWANDER et al., 1994; BALDESSARINI e TARSY, 1980) vem sendo contestada por outros autores (SALAMONE e BASKIN, 1996; SALAMONE et al., 2008).

Com relação aos mecanismos de indução de desordens motoras pela reserpina, tem sido proposto que um aumento nos níveis de dopamina extracelulares pode ser responsável pela toxicidade dopaminérgica induzida pelo tratamento com reserpina em animais (NEISEWANDER et al., 1991a; 1994; ANDREASSEN e JORGENSEN, 2000). Conforme descrito anteriormente, a reserpina previne o armazenamento da dopamina em vesículas neuronais pré-sinápticas por interferir com o VMAT-2. Desta forma, ocorre um aumento na formação de metabólitos acídicos e H_2O_2 como consequência do aumento no catabolismo citosólico da dopamina pela MAO. Esta ação da reserpina mimetiza, pelo menos em parte, o turnover aumentado da dopamina em terminais dopaminérgicos que tem sido verificados no curso da DP (ABÍLIO et al., 2004; BURGER et al., 2004; NAIDU et al., 2004; BILSKA et al., 2007) e também nas fases iniciais do tratamento com neurolépticos que leva a DO.

Tendo em vista que o metabolismo da dopamina pode levar a um aumento das EROS, diversos trabalhos têm investigado o papel de antioxidantes em modelos de desordens motoras com efeito promissor em alguns casos. Em modelos animais de discinesia, diferentes paradigmas experimentais confirmam a ação protetora de antioxidantes (BURGER et al., 2004; JACKSON-LEWIS et al., 1991; NAIDU et al., 2003a; SINGH et al., 2003), enquanto pró-oxidantes, tais como a neurotoxina mitocondrial ácido 3-nitropropionico, agravam o efeito da reserpina ou haloperidol no desenvolvimento

da discinesia orofacial (BERGAMO et al., 1997; CALVENTE et al., 2002; BURGER et al., 2004).

Embora os mecanismos de indução da DO por neurolépticos pareça ter semelhanças com os mecanismos de indução da DO por reserpina, dados do nosso grupo mostram que a *Valeriana officinalis*, por exemplo, foi efetiva em reduzir apenas a DO induzida por reserpina e não por haloperidol (FACHINETTO et al., 2007a; PEREIRA et al., 2011), demonstrando que devem existir diferenças importantes entre estes dois modelos. Além disso, estes resultados são de fundamental importância na busca de terapias naturais para o tratamento de distúrbios neurológicos. Neste contexto o resveratrol pode ser promissor no tratamento de distúrbios motores relacionadas ao sistema dopaminérgico uma vez que além da ação antioxidante, possui algumas ações relacionadas ao sistema dopaminérgico.

1.7 Resveratrol

O resveratrol (3,4,5-tri-hidroxi-trans-estilbeno) é uma fitoalexina polifenólica que ocorre naturalmente em muitas espécies de plantas, incluindo uvas vermelhas (PERVAIZ e HOLME, 2009). A concentração de resveratrol varia bastante de acordo com a fonte, sendo que o vinho tinto normalmente apresenta uma concentração de 0,1-14,3 mg/L (BAUR E SINCLAIR, 2006). Com relação a toxicidade, poucos são os relatos, sendo que em ratos mesmo doses de 300 mg/kg não apresentam efeitos tóxicos (BAUR E SINCLAIR, 2006). Esta fitoalexina tem recebido atenção especial na literatura nas últimas décadas devido a seus efeitos cardioprotetor, antioxidante, imunomodulador, anti-carcinogênico e neuroprotetor (RAMASSAMY, 2006; PERVAIZ e HOLME, 2009). Com ênfase no sistema dopaminérgico, dados da literatura têm demonstrado que o resveratrol possui ação protetora contra a neurotoxicidade dopaminérgica em animais experimentais (JIN et al., 2008; BLANCHET et al., 2008) e também restaura a expressão do transportador de dopamina (TDA) em neurônios dopaminérgicos tratados com íon 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPP⁺) (GÉLINAS e MARTINOLI, 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado que o tratamento com resveratrol também é eficaz em modular a atividade da MAO (XU et al., 2010). Além disso, estudos têm sugerido que o resveratrol pode exercer seus efeitos benéficos através de uma interação com as moléculas que conferem resistência ao estresse oxidativo (ANEKONDA, 2006; BAUR e SINCLAIR, 2006).

Com ênfase em patologias neurológicas, vários ensaios clínicos mostram a efetividade do resveratrol presente em frutas vermelhas e vinho tinto em conferir neuroproteção contra os sintomas causados pelo Alzheimer (KWON et al., 2010) em humanos (VINGTDEUX et al., 2008; KIM et al., 2010; SUN et al., 2010). No entanto, são escassos os dados na literatura demonstrando a ação do resveratrol em desordens como DO e DP.

Tendo em vista que o sistema dopaminérgico está diretamente envolvido com o desenvolvimento de desordens motoras, as quais são complicações severas em algumas desordens neurológicas; torna-se importante a realização de estudos que visem buscar, através do uso do resveratrol uma forma de tratamento eficaz que possa atenuar, prevenir e/ou retardar os efeitos deletérios causados por desordens neurológicas.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo consiste em avaliar o efeito do resveratrol em um modelo de desordem motora induzido por reserpina em camundongos.

Objetivos específicos

→ investigar o efeito do resveratrol sobre os movimentos de mascar no vazio induzidos por reserpina em camundongos;

→ verificar o efeito do resveratrol sobre parâmetros locomotores em camundongos tratados com reserpina;

→ Investigar possíveis alterações ocasionadas pelo resveratrol e/ou reserpina sobre parâmetros de defesas antioxidantes em córtex e região estriato nigral em camundongos.

3- RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O **artigo** está disposto na forma que foi publicado na edição da revista científica **Behavioural Pharmacology**.

**3.1 – O RESVERATOL PROTEGE CONTRA OS MOVIMENTOS DE MASCAR
EM UM MODELO INDUZIDO POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS**

Artigo

**RESVERATROL PROTECTS AGAINST A MODEL OF VACUOUS
CHEWING MOVEMENTS INDUCED BY RESERPINE IN MICE**

ALCINDO BUSANELLO; NILDA BERENICE VARGAS BARBOSA; LUIS RICARDO
PEROZA; LUANA ECHEVERRIA FARIAS; MARILISE ESCOBAR BURGER; KATIA
PADILHA BARRETO; ROSELEI FACHINETTO.

Behavioural Pharmacology 22 (1) (2011) 71-75.



Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice

Alcindo Busanello^b, Nilda Berenice Vargas Barbosa^b, Luis Ricardo Peroza^a, Luana Echeverria Farias^a, Marilise Escobar Burger^a, Katia Padilha Barreto^a and Roselei Fachinetto^a

Reserpine treatment is a putative animal model of orofacial dyskinesia, tremor, and Parkinsonism. Here, we examined the effects of resveratrol, a polyphenol with neuroprotective properties primarily contained in red grapes and red wine, in an animal model of vacuous chewing movements (VCM) induced by treatment with reserpine. Mice were treated with reserpine (1 mg/kg, subcutaneously on days 1 and 3) and/or resveratrol (5 mg/kg, intraperitoneally 3 consecutive days). VCM, locomotor, and exploratory performance were evaluated. Reserpine treatment produced an increase in VCM intensity, which was significantly reduced by resveratrol co-treatment. Reserpine also decreased locomotor and exploratory activity in the open field test. However, resveratrol co-treatment was not able to protect against these effects. The data suggest that resveratrol could be a promising pharmacological tool for studying VCM

in rodents. However, further investigations are needed to understand the exact mechanisms involved in the neuroprotective effects of resveratrol. *Behavioural Pharmacology* 00:000–000 © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Behavioural Pharmacology 2010, 00:000–000

Keywords: mouse, neurodegenerative disease, open field test, orofacial dyskinesia, Parkinsonism

^aDepartamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia and ^bDepartamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

Correspondence to Dr Roselei Fachinetto, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil
E-mail: roseleifachinetto@yahoo.com.br

Received 7 June 2010 Accepted as revised 29 September 2010

Introduction

Extrapyramidal symptoms are associated with important neurological disorders in humans. Parkinson's disease and Tardive dyskinesia are chronic and progressive neurodegenerative diseases associated with impairment of motor function with clinical relevance because of their high incidence in the population (Kane and Smith, 1982; Jicha and Salamone, 1991; Woerner *et al.*, 1991; Andreassen and Jorgensen, 2000; Bove *et al.*, 2005). Despite numerous studies of syndromes, their etiology remains incompletely understood. However, data in the literature have pointed to the loss of dopaminergic neurons, especially in the basal ganglia, as the main cause of these disorders (Andreassen *et al.*, 2003; Lohr *et al.*, 2003).

Corroborating these findings, several studies have showed alterations in dopamine homeostasis in patients presenting disturbed oral movements (Burt *et al.*, 1977; Andreassen and Jorgensen, 2000). It is proposed that disturbances of dopamine homeostasis could lead to neurotoxic events through autooxidation of dopamine (Andreassen and Jorgensen, 2000). Several studies have shown that dopamine autooxidation can produce oxidative stress, which has been correlated with the occurrence of Parkinson's disease and Tardive dyskinesia (Yokoyama *et al.*, 1998; Dauer and Przedborski, 2003; Lohr *et al.*, 2003).

Animal models have been proposed to study the pathophysiology of abnormal oral movements (Neisewander *et al.*, 1991, 1994; Salamone and Baskin, 1996; Burger *et al.*, 2003, 2005; Naidu *et al.*, 2004, 2006; Faria *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2006; Fachinetto *et al.*, 2005; 2007a; 2007b). One model uses reserpine to induce extrapyramidal symptoms related to Parkinsonism and orofacial dyskinesia in experimental animals (Neisewander *et al.*, 1991, 1994; Salamone and Baskin, 1996; Burger *et al.*, 2003; Salamone *et al.*, 2008; Aguiar *et al.*, 2009). It has been proposed that an increase in extracellular dopamine levels may be responsible for the dopaminergic toxicity evoked by reserpine treatment in animals (Neisewander *et al.*, 1991, 1994; Andreassen and Jorgensen, 2000). Reserpine prevents the storage of dopamine in neuronal transmitter vesicles by interfering with the vesicular monoamine transporter. In this condition, the formation of acidic metabolites and hydrogen peroxide is increased as consequence of accelerated oxidative catabolism of cytosolic dopamine by monoamine oxidase. This action of reserpine mimics, to some extent, the increased turnover of dopamine at dopaminergic terminals that has been verified in the course of Parkinson's disease (Abílio *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2003; Naidu *et al.*, 2004; Bilska and Dubiel, 2007) and also at the beginning of treatment with neuroleptic drugs that leads to orofacial dyskinesia.

Resveratrol (3,5,4-trihydroxy-trans-stilbene) is a phytoalexin found in grapes, cranberries, and peanuts (Pervaiz and Holme, 2009). It has been reported that resveratrol has powerful antioxidative, anticancer, anti-inflammatory, and estrogenic activities (Ramassamy, 2006; Pervaiz and Holme, 2009). Indeed, there is evidence that resveratrol may exert its beneficial effects through an interaction with molecules associated with resistance to cellular stress (Anekonda, 2006; Baur and Sinclair, 2006). Of particular importance, a significant neuroprotective role of red grapes and red wine consumption in humans has been shown (Vingtdeux *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2010). However, there have been no studies of the efficacy of resveratrol to attenuate reserpine-induced extrapyramidal symptoms. Thus, in this study we investigated the possible protective effect of resveratrol in a vacuous chewing movements (VCM) model induced by reserpine in mice.

Methods

Subjects

Albino Swiss mice weighing 27–32 g from our own breeding colony were kept in cages of 4–5 animals each, with continuous access to food and water in a room with controlled temperature ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) and on a 12-h light/dark cycle with lights on at 7:00 a.m. The subjects were maintained and used in accordance to the guidelines of the Brazilian Society of Association for Laboratory Animal Science.

Treatments

The mice were randomly divided into following groups (four to five animals per group): (i) control group; (ii) resveratrol group; (iii) reserpine group; and (iv) reserpine and resveratrol group.

Reserpine was dissolved in acetic acid 0.1% in saline 0.9% and administered at a dose of 1 mg/kg subcutaneously on days 1 and 3 of treatment. Resveratrol was dissolved in saline (0.9%) and administered intraperitoneally on 3 consecutive days (5 mg/kg) beginning on the same day as the first reserpine injection. Control rats were similarly treated with the respective vehicles.

Quantification of vacuous chewing movements

VCM were assessed 48 h after the last administration of reserpine and/or resveratrol. Mice were placed individually in cages ($20 \times 20 \times 19$ cm) and hand-operated counters were used to quantify VCM frequency. VCMs are defined as mouth openings in the vertical plane that are not directed toward any object. Each individual mouth opening was counted as a single VCM. VCMs occurred during a period of grooming were not taken into account. VCMs were measured continuously for 6 min after a period of adaptation (6 min). During the observation sessions, mirrors were placed under the floor of the experimental cage to permit observation when the animal

was facing away from the observer. Experimenters were always blind with regard to the treatment conditions (Neisewander *et al.*, 1994; Abílio *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2003; Naidu *et al.*, 2004).

Open field test

To analyze possible changes in spontaneous locomotor and exploratory activity caused by treatment with reserpine and/or resveratrol, the animals were placed individually in the center of a circular open field arena divided into nine parts (Broadhurst, 1960). The effect of drugs on behavior was examined after reserpine and resveratrol treatment (on day 5). The number of rearing and the number of line crossings were measured over 5 min. Sections of open field test were evaluated immediately before VCMs quantifications.

Drugs

Reserpine (methyl reserpate 3,4,5-trimethoxybenzoic acid ester) was obtained from Sigma (St Louis, Missouri, USA). Resveratrol was bought from Pharma Nostra (Chengdu Hawk Bio Enginnerin, China) and its purity and structure was confirmed by chromatography and nuclear magnetic resonance, respectively (data not shown).

Statistical analysis

VCM and open field test (rearing and crossings) data were analyzed by one-way analysis of variance, followed by Duncan's multiple range tests when appropriate. *F* values are presented in the text only if significant at *P* value of less than 0.05.

Results

Effects of resveratrol on VCM induced by reserpine

Reserpine treatment caused a significant increase in VCM compared with the control group [$F(3,17) = 36.07$, $P < 0.001$; Fig. 1]; co-treatment with resveratrol prevented this effect ($P < 0.05$). Resveratrol did not cause any effect on VCM when administered alone.

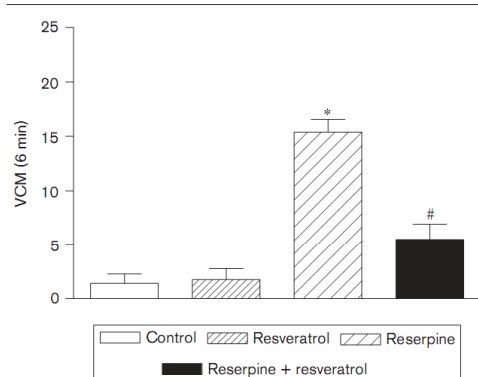
Effects of reserpine and/or resveratrol on locomotor and exploratory

Reserpine treatment caused a marked decrease in locomotor activity [$F(3,17) = 12.47$, $P < 0.001$, Fig. 2a] and exploratory activity [$F(3,17) = 5.08$, $P < 0.02$, Fig. 2b], represented by the number of crossings and rears in the open field test. Resveratrol co-treatment did not prevent these effects. Resveratrol alone did not modify either measure.

Discussion

Neurodegenerative diseases are present in a high percentage of the population and can cause devastating clinical symptoms including ataxia, tremor, and movement disorders because of dysfunction and loss of specific neurons in the brain. These include Parkinson's disease

Fig. 1

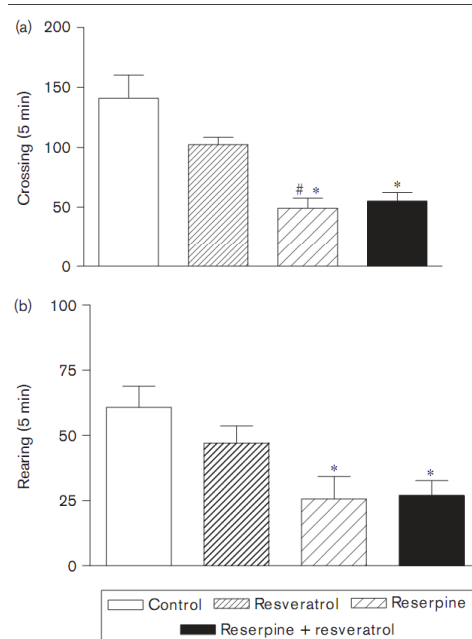


Effects of resveratrol on reserpine-induced extrapyramidal symptoms in mice represented by number of vacuous chewing movements (VCM) during 6 min of observation. Values are means \pm standard error of mean; control, $n=5$; resveratrol, $n=4$; reserpine, $n=5$; reserpine + resveratrol, $n=4$. *Significant difference from control and resveratrol groups; #Significant difference from reserpine group.

and the Tardive dyskinesia syndrome caused by pharmacological treatment of schizophrenia and other disorders (Kane and Smith, 1982; Jicha and Salamone, 1991; Woerner *et al.*, 1991; Andreassen and Jorgensen, 2000; Bove *et al.*, 2005). Several studies have been performed to search the mechanisms and possible treatments for neurodegenerative diseases (Liu *et al.*, 2010). However, the exact pathophysiological mechanisms remain unknown (Yokoyama *et al.*, 1998; Andreassen *et al.*, 2003; Dauer and Przedborski, 2003; Jenner, 2003; Lohr *et al.*, 2003) and there are no pharmacological treatments for neurodegenerative diseases that are considered really effective.

Alternative treatments using substances naturally presents in beverages such as tea and red wine have been proposed in the literature, mainly based on antioxidant properties of their chemical constituents (Zafar *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2005; Ishrat *et al.*, 2009). Many studies have shown the effectiveness of natural products against a number of pathological conditions, such as cancer, cardiovascular, and neurological disorders (Ramassamy, 2006; Pervaiz and Holme, 2009). It is important to emphasize that, in general, natural products exhibit protective effects against various pathologies without significant side effects (Colpo *et al.*, 2007; Cottart *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2010). An important neuroprotective action of red grapes and red wine has been shown in humans (Hall *et al.*, 2010). Most of these effects have been attributed to the presence of natural constituents such as resveratrol, a polyphenol that has shown beneficial effects in humans and in different animal

Fig. 2



Effects of reserpine and/or resveratrol in the open field test in mice. (a) Number of crossings and (b) rearing in 5 min. Values of number of crossings and rearing are means \pm standard error of mean; control, $n=5$; resveratrol, $n=4$; reserpine, $n=5$; reserpine + resveratrol, $n=4$. *Significant differences from control group; #Significant difference from resveratrol group.

disease models (Gélinas and Martinoli, 2002; Anekonda, 2006; Kumar *et al.*, 2006; Luo and Huang, 2006; Khan *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010). However, effects of resveratrol against extrapyramidal symptoms induced by reserpine treatment have not been shown earlier.

Our results show that resveratrol was effective, in mice, in reducing the number of VCM, an orofacial movement used as a model of extrapyramidal symptoms (Neisewander *et al.*, 1991, 1994; Salamone and Baskin, 1996; Andreassen and Jorgensen, 2000; Salamone *et al.*, 2008). Reserpine is a monoamine-depleting agent that exerts its detrimental effects through blockage of the vesicular monoamine transporter in the central nervous system (Abílio *et al.*, 2002; Burger *et al.*, 2003; Naidu *et al.*, 2004; Bilska and Dubiel, 2007), leading to an increase in monoamine turnover, mainly in basal ganglia, that is related to extrapyramidal symptoms. The increase in monoamine metabolism through the activity of monoamine oxidase can produce hydrogen peroxide that may interact with transition metals that are present at high

levels in the basal ganglia, producing free radicals (Coyle and Puttfarcken, 1993; Lohr *et al.*, 2003). Other antioxidants have been shown to prevent the appearance of VCM in the reserpine model (Burger *et al.*, 2003; Naidu *et al.*, 2004; Salamone *et al.*, 2008). Resveratrol has potent antioxidant properties (Jin *et al.*, 2008; Yousuf *et al.*, 2009) and also inhibits monoamine oxidase activity (Yáñez *et al.*, 2006), which could protect the accelerated metabolism of monoamines. Thus, it is reasonable to assume that the antioxidant capacity of resveratrol combined with its effect in reducing monoamine metabolism may be responsible for the reduction of reserpine-induced VCM.

Another effect commonly associated with reserpine administration in rodents is a decrease in locomotor and exploratory activity (Neisewander *et al.*, 1991, 1994). As expected, reserpine administration caused a pronounced reduction in these behaviors. However, these effects of reserpine were not reversed by co-treatment with resveratrol. The divergent effects of resveratrol on the behaviors examined may reflect the differential anatomical actions of resveratrol, as VCM have been linked to actions on the ventrolateral nigrostriatum, whereas the suppression of locomotion resulting from dopamine depletion has been linked to the nucleus accumbens (Kelley *et al.*, 1989; Salamone *et al.*, 1998).

In summary, the results obtained in this study show that resveratrol prevents the neurotoxic effects of reserpine in an animal model of VCM, suggesting a possible use of this polyphenol as a therapeutic agent for treating Parkinsonism. However, additional investigations to determine the efficacy of resveratrol in reducing extrapyramidal symptoms and its ability as an antioxidant agent are warranted.

Acknowledgements

The financial support by FAPERGS (0904348-ARD-03/2009), CAPES, CNPq (473365/2009-0), FINEP research grant 'Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)' (01.06.0842-00) and FIPE/UFSM is gratefully acknowledged. N.B.V.B is the recipient of CNPq fellowships.

References

- Abílio VC, Vera JAR Jr, Ferreira LSM, Duarte CRM, Carvalho RC, Grassl C, *et al.* (2002). Effects of melatonin on orofacial movements in rats. *Psychopharmacology* **161**:340–347.
- Aguiar AS Jr, Araújo AL, da-Cunha TR, Speck AE, Ignácio ZM, De-Mello N, *et al.* (2009). Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpine-treated rats. *Brain Res Bull* **79**:452–457.
- Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Yousuf S, Ansari MA, Khan MB, *et al.* (2005). Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: neurobehavioral, neurochemical and immunohistochemical evidences. *J Neurochem* **93**:94–104.
- Anekonda TS (2006). Resveratrol—a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev* **52**:316–326.
- Andreassen OA, Jorgensen HA (2000). Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats. Implications for tardive dyskinesia? *Prog Neurobiol* **61**:525–541.
- Andreassen OA, Ferrante RJ, Aamo TO, Beal MF, Jorgensen HA (2003). Oral dyskinesias and histopathological alterations in substantia nigra after long-term haloperidol treatment of old rats. *Neuroscience* **122**:717–725.
- Baur JA, Sinclair DA (2006). Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* **5**:493–506.
- Biliska 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**:1758–1771.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* **2**:484–494.
- Broadhurst PL (1960). Experiments in psychogenetics. In: Eysenk HJ, editor. *Experiments in personality*. London: Routledge & Kegan Paul. pp. 76.
- Burger ME, Audrei A, Callegari L, Athayde FR, Nogueira CW, Zeni G, *et al.* (2003). Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**:135–140.
- Burger ME, Fachineto R, Alves A, Callegari L, Rocha JBT (2005). Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. *Brain Res* **1031**:202–210.
- Burt D, Creese I, Snyder SH (1977). Antischizophrenic drugs: chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain. *Science* **196**:326–327.
- Castro JPMV, Frussa-Filho R, Fukushiro DF, Silva RH, Medrano WA, Ribeiro R de A, *et al.* (2006). Effects of baclofen on reserpine-induced vacuuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull* **68**:436–441.
- Colpo G, Trevisol F, Teixeira AM, Fachineto R, Pereira RP, Athayde ML, *et al.* (2007). Ilex paraguariensis has antioxidant potential and attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia and memory dysfunction in rats. *Neurotox Res* **12**:171–180.
- Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudeux JL (2010). Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res* **54**:7–16.
- Coyle JT, Puttfarcken P (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**:689–695.
- Dauer W, Przedborski S (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**:889–909.
- Fachineto R, Burger MB, Wagner C, Wondracek DC, Brito VB, Nogueira CW, *et al.* (2005). High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. *Pharmacol Biochem Behav* **81**:585–592.
- Fachineto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Puntel RL, Paixão MW, *et al.* (2007a). Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. *Psychopharmacology* **194**:423–432.
- Fachineto R, Villarinho JG, Wagner C, Pereira RP, Ávila DS, Burger ME, *et al.* (2007b). *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: role of dopamine transporter. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**:1478–1486.
- Faria RR, Abílio VC, Grassl C, Chinen CC, Ribeiro LT, Castro JPMV, *et al.* (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.
- Gélinas S, Martinoli M (2002). Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* **70**:90–96.
- Hall ED, Vaishnav RA, Mustafá AG (2010). Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* **7**:51–61.
- Ishrat T, Hoda MN, Khan MB, Yousuf S, Ahmad M, Khan MM, *et al.* (2009). Amelioration of cognitive deficits and neurodegeneration by curcumin in rat model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT). *Eur Neuropsychopharmacol* **19**:636–647.
- Jenner P (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53**:S26–S36.
- Jicha GA, Salamone JD (1991). Vacuuous jaw movements and feeding deficits in rats with ventrolateral striatal dopamine depletion: possible relation to Parkinsonian symptoms. *J Neurosci* **11**:3822–3829.
- Jin F, Wu Q, Lu YF, Gong QH, Shi JS (2008). Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol* **600**:78–82.
- Kane JM, Smith JM (1982). Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Arch Gen Psychiatry* **39**:473–481.
- Kelley AE, Bakshi VP, Delfs JM, Lang CG (1989). Cholinergic stimulation of the ventrolateral striatum elicits mouth movements in rats: pharmacological and regional specificity. *Psychopharmacology* **99**:542–549.
- Khan MM, Ahmad A, Ishrat T, Khan MB, Hoda MD, Khuwaja G, *et al.* (2010). Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* **1328**:139–151.
- Kim J, Lee HJ, Lee KW (2010). Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem* **112**:1415–1430.

- Kumar P, Padi SS, Naidu PS, Kumar A (2006). Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioral changes: possible neuroprotective mechanisms. *Behav Pharmacol* **17**:485–492.
- Liu XK, Wang G, Chen SD (2010). Modulation of the activity of dopaminergic neurons by SK channels: a potential target for the treatment of Parkinson's disease? *Neurosci Bull* **26**:265–271.
- Lohr JB, Kuczenski R, Niculescu AB (2003). Oxidative mechanisms and Tardive dyskinesia. *CNS Drugs* **17**:47–62.
- Luo L, Huang YM (2006). Effect of resveratrol on the cognitive ability of Alzheimer mice. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **31**:566–569.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2004). Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. *Pharmacology* **70**: 59–67.
- Naidu PS, Singh A, Kulkarni SK (2006). Effect of *Withania somnifera* root extract on reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction. *Phytother Res* **20**:140–146.
- Neisewander JL, 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.
- Neisewander JL, Castañeda E, Davis DA (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.
- Pervaiz S, Holme AL (2009). Resveratrol: its biological targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal* **11**:2851–2897.
- Ramassamy C (2006). Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol* **545**:51–64.
- Salamone JD, 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.
- Salamone JD, Mayorga AJ, Trevitt JT, Cousins MS, Conlan A, Nawab A (1998). Tremulous jaw movements in rats: a model of Parkinsonian tremor. *Progress Neurobiol* **56**:591–611.
- Salamone JD, Ishiwari K, Betz AJ, Farrar AM, Mingote SM, Font L, *et al.* (2008). Dopamine/adenosine interactions related to locomotion and tremor in animal models: possible relevance to parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord* **2**:S130–S134.
- Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010). Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol* **41**:375–383.
- Vingldeux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P (2008). Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience* **9**:S6.
- Wagner C, Vargas AP, Roos DH, Morel AF, Farina M, Nogueira CW, *et al.* (2010). Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices. *Arch Toxicol* **84**:89–97.
- Woerner MG, Kane JM, Lieberman JA, Alvir J, Bergmann KJ, Borenstein M, *et al.* (1991). The prevalence of Tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* **11**:34–42.
- Xu Y, Wang Z, You W, Zhang X, Li S, Barish PA, *et al.* (2010). Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: involvement of serotonin and noradrenaline system. *Eur Neuropsychopharmacol* **20**:405–413.
- Yáñez M, Fraiz N, Cano E, Orallo F (2006). Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **344**:688–695.
- Yokoyama H, Kasai N, Ueda Y, Niwa R, Konaka R, Mori N, *et al.* (1998). In vivo analysis of hydrogen peroxide and lipid radicals in the striatum of rats under long-term administration of a neuroleptic. *Free Radic Biol Med* **24**:1056–1060.
- Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, Islam F (2009). Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res* **1250**:242–253.
- Zafar KS, Sayeed I, Siddiqui A, Ahmad M, Salim S, Islam F (2003). Dose-dependent protective effect of selenium in partial lesion model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J Neurochem* **84**:438–446.

3.2 DADOS ADICIONAIS

Preparação tecidual para os ensaios *ex vivo*

Após a avaliação comportamental, os animais foram mortos por deslocamento cervical e o cérebro imediatamente retirado. O córtex, e o estriado juntamente com a região contendo a substância negra foram dissecados e homogeneizados em tris-HCl 10 mM pH=7,4 para determinação de parâmetros antioxidantes. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi precipitado na proporção de 1:1 com TCA 10% para a determinação dos níveis de tióis não protéicos e de ácido ascórbico.

Níveis de tióis não protéicos

Os níveis de tióis não-protéicos (TNP) foram determinados espectrofotometricamente (412 nm) conforme previamente descrito por Ellman (1959), utilizando como padrão glutathiona (GSH).

Níveis de ácido ascórbico

Os níveis de ácido ascórbico (AA) foram determinados espectrofotometricamente (520 nm) conforme previamente descrito por Jacques-Silva et al. (2001), utilizando como padrão ácido ascórbico.

Dosagem de proteína

A quantificação da proteína total nas estruturas cerebrais foi realizada pelo método descrito por Lowry et al. (1951), usando a albumina sérica bovina como padrão.

Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de 1 via, seguidos pelo teste Post Hoc Tukey quando apropriado. As análises foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Os dados das figuras 3 e 4 mostram que o conteúdo de tióis não-protéicos e ácido ascórbico de córtex, e região contendo estriado e substância negra não foram modificados pelo tratamento com reserpina e/ou resveratrol quando comparado ao controle.

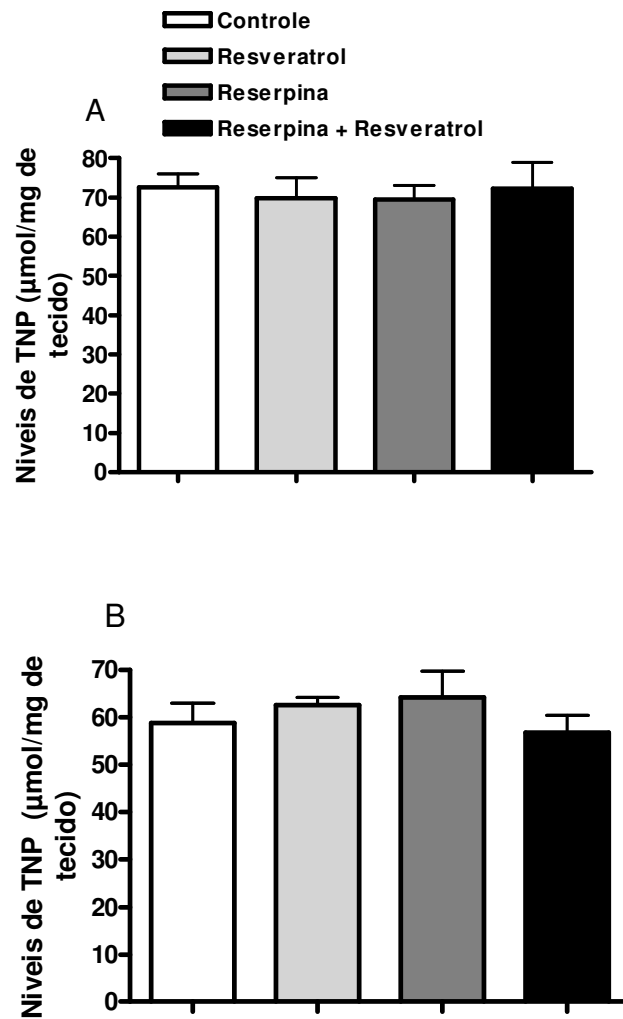


Figura 3: Efeito do resveratrol e/ou reserpina sobre os níveis de tióis não-protéicos (TNP) em (a) córtex e (b) região contendo o estriado e a substância negra em camundongos.

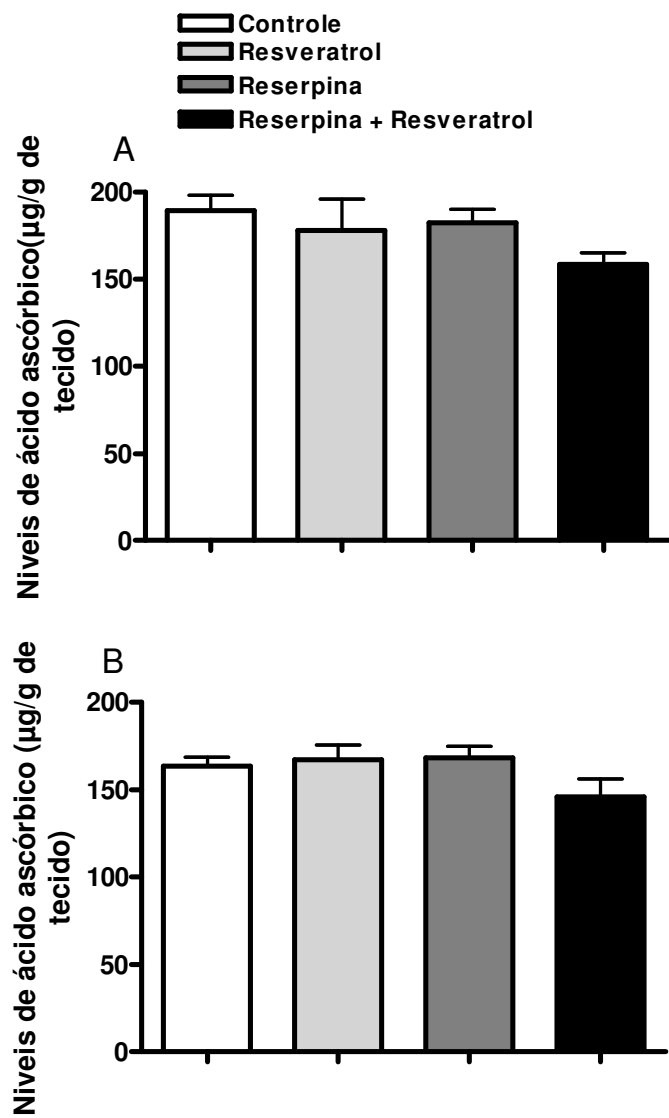


Figura 4: Efeito do resveratrol e/ou reserpina sobre os níveis de ácido ascórbico em (a) córtex e (b) região contendo o estriado e a substância negra em camundongos.

3.3 Discussão dos dados adicionais

O estresse oxidativo tem sido proposto como um importante mecanismo na patogênese da DT. É sugerido que o aumento nos níveis da DA causado pelos neurolépticos estimula a produção de substâncias reativas de oxigênio como produtos do metabolismo da DA por via enzimática ou não enzimática (por exemplo, peróxido de hidrogênio e quinonas de DA) (Andreassen e Jorgensen, 2000). Contudo, existem muitos resultados contraditórios nos estudos que investigam o estresse oxidativo na DT. De fato, o tratamento prolongado da DT com Vitamina E tem apresentado pouco sucesso (Lohr e cols., 1987; Egan e cols., 1992; Adler e cols., 1999). Além disso, a vitamina E produziu resultados contraditórios nos parâmetros de DO causados por tratamento crônico com flufenazina em ratos (Sachdev e cols., 1999; Lohr e cols., 2000). Neste contexto, demonstramos que o tratamento com reserpina ou resveratrol não alterou os níveis de vitamina C e tióis não-proteicos quando comparados com os animais do grupo controle. Estes dados, portanto, indicam que o estresse oxidativo pode não ser o principal fator envolvido no desenvolvimento de movimentos de mascar no vazio induzidos por reserpina ou pode estar ocorrendo em um grupo específico de neurônios o que dificulta a detecção pelas técnicas utilizadas neste trabalho. Além disso, o resveratrol poderia estar evitando as alterações motoras por mecanismos não diretamente dependentes de sua atividade antioxidante.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- o uso do resveratrol como terapia natural pode ser considerado promissor, visto que o co-tratamento com este flavonóide foi efetivo em reduzir a intensidade dos movimentos de mascar no vazio induzidos por reserpina;
- o tratamento com resveratrol não alterou o déficit locomotor induzido por reserpina em camundongos, sugerindo que o resveratrol possa ter uma ação específica em vias responsáveis pelos movimentos de mascar no vazio, as quais são diferentes daquelas relacionadas com a atividade locomotora espontânea;
- os efeitos neurotóxico da reserpina e neuroprotetor do resveratrol não foram associados com alterações nos níveis de tióis não-protéicos e ácido ascórbico nas regiões cerebrais córtex, região contendo estriado e substância negra.

5. PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, temos como perspectivas:

- investigar os efeitos do resveratrol em modelos de discinesia orofacial agudo e crônico em ratos;
- Com foco no sistema dopaminérgico, investigar os possíveis mecanismos envolvidos na neuroproteção oferecida pelo resveratrol nesses modelos: participação da atividade da MAO; alterações na expressão protéica dos transportadores de dopamina; possível interação do resveratrol com receptores de dopamina e atividade da tirosina hidroxilase.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGUIAR AS JR, ARAÚJO AL, DA-CUNHA TR, SPECK AE, IGNÁCIO ZM, DE-MELLO N, PREDIGER RD. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. *Brain Res Bull.* 14;79(6):452-7, 2009.

AHLKOG, J. E., MUENTER, M.D., Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord*;16(3):448-58, 2001.

ALBIN R. L., YOUNG A.B., PENNEY J.B., The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.*;12(10):366-75,1989.

AMARA, S.G., KUHAR, M.J. Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* 16:73–93, 1993.

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

ANEKONDA TS. Resveratrol-a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev.*, 52:316-3-26, 2006.

BALDESSARINI RJ, TARSY D. Dopamine and the pathophysiology of dyskinesias induced by antipsychotic drugs. *Annu Rev Neurosci.*;3:23-41, 1980.

BAUR JA, SINCLAIR DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5(6):493-506, 2006.

BEAR, M.F. *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BERGAMO M, ABÍLIO VC, QUEIROZ CM, BARBOSA-JÚNIOR HN, ABDANUR LR, FRUSSA-FILHO R. Effects of age on a new animal model of tardive dyskinesia. *Neurobiol Aging.* 18(6):623-9, 1997.

BILSKA A, DUBIEL M, SOKOŁOWSKA-JEZEWICZ M, LORENC-KOCI E, WŁODEK L. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neuroscience.* 8;146(4):1758-71, 2007.

BLANCHET J, LONGPRÉ F, BUREAU G, MORISSETTE M, DIPAOLO T, BRONCHTI G, MARTINOLI M. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects dopaminergic neurons in MPTP-treated mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 32:1243–1250, 2008.

BROMET, E.J., FENNIG, S. Epidemiology and natural history of schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 46: 871–881, 1999.

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: 339-345, 2004.

BURGER, M.E., FACHINETTO, R., ALVES, A., CALEGARI, 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.

BURT, D., CREESE, I., SNYDER, S.H. Antischizophrenic drugs: Chronic treatment elevates dopamine receptor binding in brain. *Science:* 196, 326-327, 1977.

CALVENT, P.R.V., ARAUJO, C.C.S., BERGAMO, M., ABILIO, V.C., ALMEIDA, V.D., RIBEIRO, R.D.A., FRUSSA-FILHO, R. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid aggravates reserpine-induced oral dyskinesia in rats. *Prog Neuropsychopharmacol & Biol Psychiatry.*, 26: 401-405, 2002.

CASEY, D.E. Tardive dyskinesia: reversible and irreversible. *Psychopharmacology*, 2: 88-97, 1985.

CASTRO JP, FRUSSA-FILHO R, FUKUSHIRO DF, SILVA RH, MEDRANO WA, RIBEIRO RDE A, ABÍLIO VC. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Res Bull.* 15;68(6):436-41, 2006.

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

CRANE, G.E. Tardive dyskinesia in patients treated with major neuroleptics: a review of the literature. *Am J Psychiatry.*, 124: 40-48, 1968.

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

CREESE, I., BURT, D., SNYDER, S.H. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*, 192: 481-483, 1976.

CROSSMAN AR. A hypothesis on the pathophysiological mechanisms that underlie levodopa- or dopamine agonist-induced dyskinesia in Parkinson's disease: implications for future strategies in treatment. *Mov Disord.*; 5(2):100-8, 1990.

CROSSMAN A. R., Functional anatomy of movement disorders JOURNAL Anatomy; 196(Pt 4): 519–525, 2000.

DAHLSTROM, A., FUXE K. Evidence for the existence of monoaminecontaining neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. Acta Physiol. Scand., Suppl. 232, 62:1–55, 1964.

DARLING, H.F. Fluphenazine: a preliminary study. Dis Nerv Syst., 20:167-70, 1959.

DAUER, W. E PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: mechanisms and models. Neuron, 39: 889-909, 2003.

DELAY J, DENIKER P. Le traitement des psychoses par une methode neurolytique derivée d'hibemotherapie; le 4560 RP utilisée seul en cure prolongée et continuée. Congrès Des Médecins Alienistes et Neurologistes de France et des Pays du Langue Française, 50:503–513, 1952.

ELLMAN, G.L. Tissue sulphydryl groups. Archives of Biochemistry and Biophysics 82, 70, 1959.

EGAN, M.F., HURD, Y., FERGUSON, J., BACHUS, S.E., HAMID, E.H., HYDE, T.M. Pharmacological and neurochemical differences between acute and tardive vacuous chewing movements induced by haloperidol. Psychopharmacology, 127: 337-345, 1996.

FACHINETTO, R., BURGER, M.B., WAGNER, C., WONDRACEK, D.C., BRITO, V.B., NOGUEIRA, C.W., FERREIRA, J., ROCHA, J.B.T. High fat diet increases the incidence of orofacial dyskinesia and oxidative stress in specific brain regions of rats. Pharmacol Biochem Behav., 81: 585-592, 2005.

FACHINETTO, R., VILLARINHO, J.G., WAGNER, C., PEREIRA, R.P., AVILA, D.S., BURGER, M.E., CALIXTO, J.B., ROCHA, J.B., 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, 2007a.

FACHINETTO, R., VILLARINHO, J.G., WAGNER, C., PEREIRA, R.P., PUNTEL, R.L., PAIXÃO, M.W., BRAGA, A.L., CALIXTO, J.B., ROCHA, J.B., FERREIRA, J. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. Psychopharmacology (Berl), 194:423-432, 2007b.

FAURBYE, A, RASCH PJ, PETERSEN PB, BRANDBORG G, PAKKENBERG H. Neurological symptoms in pharmacotherapy of psychoses. Acta Psychiatr Scand.;40:10-27, 1964.

FERRIER, D. The Functions of the Brain. Putnam's Sons, New York, 1876.

GARDOS, G., COLE, J.O. The prognosis of tardive dyskinesia. *Am J Psychiatry.*, 151: 177-179, 1983.

GASSER T. Update on the genetics of Parkinson's disease. *Mov Disord*;22: Suppl 17:S343-S350, 2007.

GÉLINAS S & MARTINOLI M. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res.*, 70:90–96, 2002.

GLAZER, W.M., MORGENSTERN, H., SCHOOLER, N., BERKMAN, C.S., MOORE, D.C. Predictors of improvement in tardive dyskinesia following discontinuation of neuroleptic medication. *Br J Psychiatry.*, 157, 585-592, 1990.

GÓMEZ-ESTEBAN JC, ZARRANZ JJ, LEZCANO E, et al. Influence of motor symptoms upon the quality of life of patients with Parkinson's disease. *Eur Neurol*; 57:161-5, 2007.

GOODMAN & GILMAN: Manual de Farmacologia e Terapêutica/ Laurence L. Brunton ... [et al.]. – Porto Alegre: AMGH, 2010.

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

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

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

HEALY, D. *The Creation of Psychopharmacology.* Harvard Univ. Press, Cambridge, MA, pp. 9– 128, 2002.

HIPPIUS, H. The history of clozapine. *Psychopharmacology*, 99: S3– S5, 1989.

HORNYKIEWICZ O. Dopamine miracle: from brain homogenate to dopamine replacement. *Mov Disord*;17:501-8, 2002.

HUGHES TA, ROSS HF, MUSA S, et al. A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. *Neurology*; 54:1596 – 602, 2000.

JACKSON-LEWIS, V., PRZEDBORSKI, S., KOSTIC, V., SUBER, F., FAHN, S., CADET, J.L. Partial attenuation of chronic fluphenazine-induced changes in regional monoamine metabolism by D-alpha-tocopherol in rat brain. *Brain Res Bull.*, 26: 251-258, 1991.

JANKOVIC, J. An update on the treatment of Parkinson's disease. *Mt. Sinai J. Med.* 73, 682–689 (2006).

JACQUES-SILVA, M.C., NOGUEIRA, C.W., BROCH, L.C., FLORES, E.M., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology and Toxicology*, 3, 119–127, 2001.

JANKOVIC, J. & STACY, M. Medical management of levodopa- associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 21, 677–692, 2007.

JANKOVIC, J. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestations. *Mov. Disord.* 20 (Suppl. 11), S11–S16, 2005.

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.

JELLINGER KA. Morphological substrates of parkinsonism with and without dementia: a retrospective clinico-pathological study. *J Neural Transm Suppl*;72: 91-104, 2007.

JIN F, WU Q, LU Y, GONG Q, SHI J. Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur J Pharmacol.*, 600:78–82, 2008.

KANE, J.M., SMITH, J.M. Tardive dyskinesia: prevalence and risk factors, 1959 to 1979. *Arch Gen Psychiatry.*, 39: 473-481, 1982.

KANE, J., HONIGFELD, G., SINGER, J., MELTZER, H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry.*, 45: 789–796, 1988.

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, New York, pp. 1485-1495, 1995.

KLAWANS, H.L., RUBOVITS, R. An experimental model of tardive dyskinesia. *J Neural Transm.*, 33, 235-246, 1972.

KOLLER W, O'HARA R, WEINER W, et al. Relationship of aging to Parkinson's disease. *Adv Neurol*;45:317-21, 1987.

KWON KJ, KIM HJ, SHIN CY, HAN SH. Melatonin Potentiates the Neuroprotective Properties of Resveratrol Against Beta-Amyloid-Induced Neurodegeneration by Modulating AMP-Activated Protein Kinase Pathways. *J Clin Neurol.*, 6:127-137, 2010.

LAPORTA, M., ARCHAMBAULT, D., ROSS-CHOUINARD, A., CHOUINARD, G. Articular impairment associated with tardive dyskinesia. *J Nerv Ment Dis.*, 178: 660-662, 1990.

LEE, S., OH, D., JUNG, S., KIM, Y., CHO, H., KOH, K., LEE, Y. Neuroleptic drugs alter the dopamine transporter-mediated uptake and release of dopamine: a possible mechanism for drug-induced tardive dyskinesia. *Pharmacol Res.*, 35: 447-450, 1997.

LEWITT, P.A. Levodopa for the Treatment of Parkinson's disease. *N Engl J Med*, 359:2468-76, 2008.

LEWITT PA, TAYLOR DC. Protection against Parkinson's disease progression: clinical experience. *Neurotherapeutics*;5:210-25, 2008.

LOHR, J.B., JESTE, D.V. Neuroleptic-induced movement disorders: tardive dyskinesia and other tardive symptoms. In: Cavenar Jr, J.O. Editor. *Psychiatry*. Philadelphia (PA): Lippincott., 1-17, 1988.

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

LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193:265-275, 1951.

LOTHARIUS, J. E BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. *Nature reviews neuroscience*, 3: 932-942, 2002.

MAHADIK, P.S., EVANS, D., LAL, H. Oxidative stress and role of antioxidant and ω -3 essential fatty acid supplementation in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*, 25: 463-493, 2001.

MAKER, H. S., WEISS, C., SILIDES, D. J. & COHEN, G. Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J. Neurochem.* 36, 589-593, 1981.

NAIDU PS, SINGH A, KULKARNI SK. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. *Pharmacology.*;70(2):59-67, 2004.

NEISEWANDER JL, LUCKI I, MCGONIGLE P. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. *Brain Res.* 30;558(1):27-35, 1991a.

NEISEWANDER JL, LUCKI I, MCGONIGLE P. Behavioral and neurochemical effects of chronic administration of reserpine and SKF-38393 in rats. *J Pharmacol Exp Ther.*;257(2):850-60, 1991b.

NEISEWANDER JL, CASTAÑEDA E, DAVIS DA. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl).*;116(1):79-84, 1994.

NIEMEGERES, C.J.E. Pharmacology and mechanism of action of neuroleptics haloperidol and haloperidol decanoate. Workshop haloperidol decanoate. Department of Pharmacology, Janssen Pharmaceutics Belgium, p. 1-13, 1983.

PEREIRA RP, FACHINETTO R, DE SOUZA PRESTES A, WAGNER C, SUDATI JH, BOLIGON AA, ATHAYDE ML, MORSCH VM, ROCHA JB. Valeriana officinalis ameliorates vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *J Neural Transm.*;118(11):1547-57, 2011.

PERVAIZ S, HOLME AL. Resveratrol: Its Biological Targets and Functional Activity. *Antioxid Redox Signal*, 11:2851-97, 2009.

RAMASSAMY C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: A review of their intracellular targets. *Eur J Pharmacol.*, 545:51-64, 2006.

RUBINSTEIN, M., MUSCHIETTI, J.P., GERSHANIK, O., FLAWIA, M.M., STEFANO, F.J. Adaptive mechanisms of striatal D1 and D2 dopamine receptors in response to a prolonged reserpine treated mice. *J Pharmacol Exp Ther.*, 252: 810-816, 1990.

SACHDEV, P., SAHAROV, T., CATHCART, S. The preventative role of antioxidants (selegiline and vitamin E) in a rat model of tardive dyskinesia. *Biol Psychiatry.*, 46: 1672-1681, 1999.

SALAMONE J, BASKIN P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible model of parkinsonian tremor. *Pharmacol Biochem Behav.*;53(1):179-83, 1996.

SALAMONE, J.D., MAYORGA, A.J., TREVITT, J.T., COUSINS, M.S., CONLAN, A., NAWAB, A. Tremulous jaw movements in rats: a model of parkinsonian tremor. *Prog Neurobiol.*, 56:591-611, 1998.

SCHRAG, A., BEN-SHLOMO, Y. & QUINN, N. How common are complications of Parkinson's disease? *J. Neurol.* 249, 419-423 (2002).

SCHMUTZ, J., EICHENBERGER, E. BINDRA, J.S., LEDMICER, D. (Eds.), *Chronicles of Drug Discovery*, vol. 1. Wiley, New York, pp. 39- 59, 1982.

SILVA, P., *Farmacologia/Penildon Silva*. 8. ed. -[Reimpr.]. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SINGH A, NAIDU PS, KULKARNI SK. Possible antioxidant and neuroprotective mechanisms of FK-506 in attenuating haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Eur J Pharmacol.*; 477:87-94, 2003.

SOHAL, R. S. & WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273, 59-63, 1996.

SUN AY, WANG Q, SIMONYI A, SUN GY. Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases. *Mol Neurobiol*, 41:375-83, 2010.

TAYLOR, I.J. Clinical evaluation of a new phenothiazine tranquilizer, fluphenazine (prolixin). *Am J Psychiatry*. 116:457-8, 1959.

VINGTDEUX V, DRESES-WERRINGLOER U, ZHAO H, DAVIES P, MARAMBAUD P. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neuroscience*, 9:S6, 2008.

WICHMANN T, DELONG MR. Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv Neurol*;91: 9-18, 2003.

WOERNER MG, ALVIR JMAJ, SALTZ BL, LIEBERMAN JA, KANE JM. Prospective study of tardive dyskinesia in the elderly: rates and risk factors. *Am J Psychiatry*,155:1521–1528, 1998.

XU Y, WANG Z, YOU W, ZHANG X, LI S, BARISH PA, et al. Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system. *Eur Neuropsychopharmacol*, 20:405-413, 2010.

YASSA, R. & JESTE, D.V. Gender differences in tardive dyskinesia: a critical review of the literature. *Schizophr Bull.*, 18: 701-715, 1992.