

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlttdl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de microdiálise cerebral em ratos conscientes

LEONARDO MUNARI

PORTO ALEGRE, 2006.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de microdiálise cerebral em ratos conscientes

Dissertação apresentada por **Leonardo Munari**
para obtenção do GRAU DE MESTRE
em Ciências Farmacêuticas

Orientação: Profa. Dr. Stela Maris Kuze Rates

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – Produção e Controle de Qualidade Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 4.9.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Helena Tanhauser Barros

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Profa. Dr. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

M963a Munari, Leonardo

Avaliação do efeito de um extrato lipofílico de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de microdiálise cerebral em ratos conscientes / Leonardo Munari – Porto Alegre: UFRGS, 2006. - xxii, 145 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Microdiálise cerebral. 2. *Hypericum caprifoliatum*. 3. Dopamina. 4. Ácido diidroxifenilacético. 5. Ácido homovanílico. 6. 3-metoxitiramina. I. Rates, Stela Maris Kuze. II. Título.

CDU: 615.322.07

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

*Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Psicofarmacologia e no Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) da Faculdade de Farmácia - UFRGS com financiamento do CNPq e da International Foundation for Science (IFS).
O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Stela pela orientação e confiança, pelo exemplo de pesquisadora e professora e principalmente pela amizade e bons momentos compartilhados.

Aos meus colegas e grandes amigos do laboratório de Psicofarmacologia: Raquel (Kéka), Gilda, Andresa e Cássia, que me ajudaram em tudo. Ao Ênio que foi o meu bolsista mais esforçado. À Alice (Vivi) que sempre se prontificou a me ajudar e ao Gusti que me ajudou em tudo e mais um pouco! À Ana e à Michele (meiguxa) que mesmo não trabalhando mais conosco serão sempre as bolsistas preferidas.

Às meninas da farmacognosia: Carol, Dani, Paulinha, Jú e Kênia que me ajudaram na parte de preparação do extrato e se tornaram grandes amigas.

Aos meus amigos farmacocinéticos que compartilharam comigo todo o sofrimento da validação do método analítico e sempre estiveram dispostos a me ajudar, principalmente Vitória, Sandrinha e a Dani, que é MESTRE com todas as letras maiúsculas e uma das pessoas mais generosas que eu conheço.

À doutora Lenir do Instituto de Bioquímica da UFRGS que me ensinou a utilizar o criostato e sempre foi muito prestativa.

À professora Dr. Cristina Bonorino do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do IPB-PUCRS que foi quem me apresentou o mundo científico. Ao professor Fábio Maito e à técnica Vanessa do laboratório de patologia da PUCRS pela ajuda na análise histológica.

Aos meus amigos que de alguma forma participaram desse trabalho, mesmo que fosse só ouvindo meus problemas sem entender nada.

Finalmente, à minha família que me deu apoio e confiou em mim o tempo todo: pai, mãe, mana, Fonso, Ivo, Sandra e, principalmente aos meus irmãos de Porto Alegre, Kamila e Mano que foram os que realmente agüentaram todo o meu estresse, amo vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: Validação da técnica de microdiálise cerebral em animais conscientes para medida dos níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos	
1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 Princípio	12
2.2 Vantagens e limitações da técnica	13
2.2.1 Vantagens	13
2.2.2 Limitações da técnica	16
2.3 A técnica e os equipamentos	19
2.4 Métodos de recuperação e calibração das sondas	23
2.4.1 Método da variação do fluxo	25
2.4.2 Método do fluxo líquido zero	25
2.4.3 Método do fluxo líquido zero dinâmico	26
2.4.4 Retrodiálise	27
2.4.5 Substâncias de referências endógenas	28
2.5 Aplicações da técnica	29
2.5.1 Estudos clínicos	29
2.5.2 Levodopa e Mal de Parkinson	31
2.5.3 Estudo dos neurotransmissores	32
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Animais	45

4.2 Drogas, Fármacos, Solventes e Reagentes	46
4.3 Equipamentos	46
4.4 Procedimento de microdiálise cerebral	46
4.4.1 Cirurgia para implantação da guia de sonda	46
4.4.2 Composição do líquido cerebrospinal artificial	48
4.4.3 Procedimento de microdiálise	49
4.4.4 Taxa de recuperação das sondas	50
4.5 Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE-DE	51
4.5.1 Condições cromatográficas	51
4.5.2 Preparação das soluções padrão e controles de qualidade	52
4.5.3 Validação da metodologia analítica por CLAE-DE	52
4.6 Validação da técnica de microdiálise cerebral	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Validação da metodologia analítica por cromatografia líquida	57
5.1.1 Validação da metodologia analítica por CLAE-DE	58
5.2 Validação da técnica de microdiálise cerebral	69
6. CONCLUSÕES	75

CAPÍTULO 2: Avaliação do efeito de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltidl sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos através de microdiálise cerebral

1. INTRODUÇÃO	79
2. REVISÃO DA LITERATURA	83
2.1 Taxonomia	83
2.2 Constituição química	84
2.3 Dados farmacológicos	89
2.4 Estudos de MD envolvendo o gênero <i>Hypericum</i>	92
3. OBJETIVO	95
4. MATERIAIS E MÉTODOS	97
4.1 Material vegetal	97
4.2 Animais	98
4.3 Drogas, Fármacos, Solventes e Reagentes	99
4.4 Equipamentos	99

4.5 Avaliação do efeito do extrato de <i>H. caprifoliatum</i>	99
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
6. CONCLUSÃO	107
CONSIDERAÇÕES FINAIS	109
REFERÊNCIAS	115
ANEXO	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Representação esquemática da difusão passiva de substâncias endógenas para a sonda de MD após a sua liberação no meio extracelular	13
Figura 1.2 Sonda rígida do tipo concêntrica usada em MD cerebral.	22
Figura 1.3 Corte em criostato mostrando o local de inserção da sonda de MD no estriado.	48
Figura 1.4 Cromatogramas obtidos por CLAE-DE mostrando a seletividade do método analítico.	60
Figura 1.5 Média das três curvas padrão em LCA utilizadas na validação da metodologia por CLAE-DE.	61
Figura 1.6 Média da percentagem dos níveis extracelulares de DA após administração de sulfato de anfetamina.	70
Figura 1.7 Média da percentagem dos níveis extracelulares de DOPAC após administração de sulfato de anfetamina.	72
Figura 1.8 Média da percentagem dos níveis extracelulares de HVA após administração de sulfato de anfetamina.	73
Figura 2.1 Média da percentagem dos níveis extracelulares de DA após administração de HCP ou salina.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Vantagens e limitações da técnica de microdiálise.	20
Tabela 1.2 Coeficientes de determinação de DA, DOPAC, HVA e 3-MT utilizados na validação da metodologia analítica.	62
Tabela 1.3 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de DA em LCA.	63
Tabela 1.4 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de DOPAC em LCA.	64
Tabela 1.5 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de HVA em LCA.	65
Tabela 1.6 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de 3-MT em LCA.	66
Tabela 1.7 Exatidão das amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva de DA, DOPAC, HVA e 3-MT e as faixas de concentração determinadas.	67
Tabela 1.8 Valores de limite inferior de quantificação para DA e seus metabólitos e a concentração determinada.	68
Tabela 2.1 Níveis extracelulares de DA, DOPAC e HVA no núcleo acumbens de animais do grupo controle.	102
Tabela 2.2 Níveis extracelulares de DA, DOPAC e HVA no núcleo acumbens de animais do grupo tratado com HCP.	103

ABREVIATURAS

3-MT -	3-metoxitiramina
5-HIAA -	Ácido 5-hidroxiindol-3-acético
5-HT -	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
6-OHDA -	6-hidroxidopamina
ACh -	Acetilcolina
AChE -	Acetilcolinesterase
BHE -	Barreira Hematoencefálica
Ch -	Colina
COMT -	Catecol-O-metiltransferase
DA -	Dopamina
DE -	Detector Eletroquímico
DOPAC -	Ácido diidrofenilacético
GABA -	Ácido γ -aminobutírico
HVA -	Ácido homovanílico
ISRS -	Inibidor Seletivo da Recaptação de Serotonina
LCA -	Líquido Cerebroespinal Artificial
MAO -	Monoamino oxidase
MD -	Microdiálise
NA -	Noradrenalina
NAc -	Núcleo acumbens
NMDA -	N-metil-D-aspartato
SNC -	Sistema Nervoso Central
TTX -	Tetrodotoxina

RESUMO

OBJETIVO: Desenvolver e validar a técnica de CLAE-DE para o doseamento de dopamina (DA), ácido diidrofenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e 3-metoxitiramina (3-MT); validar a técnica de microdiálise (MD) cerebral em animais conscientes e avaliar o efeito do tratamento agudo com um extrato lipofílico das partes aéreas de *Hypericum caprifoliatum* (HCP) sobre os níveis cerebrais de DA e seus metabólitos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** A validação analítica foi realizada conforme o preconizado pela ANVISA, com análise dos parâmetros linearidade, precisão, exatidão, especificidade e limite inferior de quantificação. A técnica de microdiálise foi realizada de forma clássica: guias de sonda foram implantadas nas regiões cerebrais de interesse por cirurgia estereotáxica; os dialisados foram obtidos, 48 horas após a cirurgia, através da perfusão da sonda com líquido cérebrospinal artificial (1 µL/min) e coleta durante três horas, em intervalos de 20 min; as três primeiras coletas foram utilizadas para determinação da linha de base e só então foram administrados os tratamentos. Para a validação da MD a sonda foi implantada no estriado (A: -0,3; L: + 3,2; P: - 4,5) e o tratamento foi sulfato de anfetamina (2 mg/kg, s.c.). Para a avaliação do efeito de HCP, a sonda foi implantada no núcleo acumbens (A: +2,2; L: -1,5; P: -5,8) e o tratamento foi uma dose de 270 mg/kg do extrato (v.o.). **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os parâmetros avaliados para validar o método analítico ficaram dentro dos limites especificados pela ANVISA. O sulfato de anfetamina produziu um aumento nos níveis extracelulares de DA em 160% e uma redução de DOPAC e de HVA em 80% e 50%, respectivamente. O extrato HCP não alterou o conteúdo intersticial de DA, DOPAC e HVA no núcleo acumbens. Os valores basais encontrados estão de acordo com dados relatados na literatura. Não foi possível quantificar 3-MT. **CONCLUSÃO:** A metodologia analítica e as condições experimentais de microdiálise utilizadas permitiram a mensuração de mudanças induzidas por anfetamina nos níveis extracelulares de DA e seus principais metabólitos demonstrando que os fundamentos da técnica estão estabelecidos em nossas condições. O regime de tratamento empregado com HCP não foi suficiente para alterar os níveis de DA e seus principais metabólitos no núcleo acumbens de ratos.

Palavras chave: microdiálise cerebral, *Hypericum caprifoliatum*, dopamina, DOPAC, HVA e 3-MT.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl lipophilic extract on the extracellular levels of dopamine and its metabolites by cerebral microdialysis in freely moving rats

OBJECTIVE: The objectives of this work were to validate the HPLC-ED technique for measuring dopamine (DA), dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and 3-methoxytyramine (3-MT); to put into operation the brain microdialysis technique (MD) in freely moving rats; to evaluate, by using MD, the effect of a single treatment with lipophilic extract from aerial parts of *Hypericum caprifoliatum* (HCP) on DA, DOPAC, HVA and 3-MT brain levels.

MATERIALS AND METHODS: In order to validate the analytical technique we followed the parameters established by ANVISA for bioanalytical samples. The parameters were: precision, accuracy, specificity and also the lower limit of quantitation. The microdialysis technique was carried out following classical procedures: male Wistar rats were submitted to stereotaxic surgery for the guide cannula implantation in the brain regions of interest; 48 hours later, the microdialysis probe was inserted and perfused with cerebrospinal fluid (1 μ L/min). After baseline samples collecting (1 h), the treatments were administrated and samples were collected every 20 min, during 2h. To accomplish MD technique validation the animals were treated with amphetamine sulfate (2 mg/kg, s.c.) and the extracellular levels of DA, DOPAC e HVA were measured in striatum (A: -0,3; L: + 3,2; P: - 4,5). The effect of HCP acute treatment (270 mg/kg, p.o.) was evaluated in nucleus accumbens (A: +2,2; L: -1,5; P: -5,8). **RESULTS AND**

DISCUSSION: The analytical parameters values found were within the acceptable ranges for bio-analytical limits specified by ANVISA. As expected, amphetamine sulfate administration significantly increased DA (160%) extracellular levels and decreased DOPAC (80%) and HVA (50%) levels. The quantification of 3-MT was not possible. Acute HCP administration did not affected DA, DOPAC and HVA levels in the nucleus accumbens. **CONCLUSION:** The HPLC-ED methodology and microdialysis procedures employed allowed the detection of amphetamine-induced changes in extracellular levels of DA and its metabolites demonstrating that the technical starting point was acceptable. The acute administration of 270 mg/kg, p.o. of HCP to rats was not sufficient to modify the extracellular levels of DA, DOPAC and HVA in the nucleus accumbens.

Key words: brain microdialysis, *Hypericum caprifoliatum*, dopamine, DOPAC, HVA, 3-MT.

INTRODUÇÃO

Distúrbios cerebrais sejam eles primários ou decorrentes de alguma disfunção em outros sistemas do organismo, representam um importante problema em nossa sociedade e um campo no qual a intervenção farmacológica desempenha um papel-chave (RANG *et al.*, 2004; FILLENZ, 2005).

A depressão é o mais comum dos distúrbios afetivos, podendo variar desde uma condição muito branda, limítrofe com a normalidade, até uma depressão severa acompanhada de sintomas melancólicos e pensamentos suicidas (GRAEFF *et al.*, 2000; STHAL, 2000). A depressão é considerada um problema de saúde pública mundial, sendo a principal causa de incapacidade e morte prematura entre pessoas com idade variando de 15 - 44 anos de ambos os sexos (WHO, 2000; RANG *et al.*, 2004). Estima-se que 5% da população sofrerá, em algum momento da sua vida, de um episódio depressivo (STAHL, 2000).

As bases neuroquímicas da depressão têm sido desvendadas a partir do efeito observado por fármacos antidepressivos. SCHILDKRAUT E KETY (1967) e OXENKRUG E LAPIN (1971) afirmaram que a depressão era causada por uma diminuição dos níveis cerebrais de NA e 5-HT baseados nos seguintes fatos: reconhecimento de que a imipramina bloqueava a recaptação neuronal de noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT); observação de que a reserpina, substância que depleta as monoaminas, provocava quadros depressivos em 10 a 20% dos pacientes e observação de que a anfetamina, substância que aumenta a liberação das monoaminas, provocava efeito euforizante. Estes estudos compõem o que foi denominado de teoria monoaminérgica clássica da depressão.

No entanto, a teoria monoaminérgica clássica não explicava o fato de que os efeitos bioquímicos diretos dos fármacos antidepressivos aparecem muito rapidamente, enquanto que o efeito antidepressivo demora semanas para se desenvolver (RANG *et al.*, 2004). Com a introdução de técnicas inovadoras, como ensaios de radioligação, na

década de 70, foi verificado que o tratamento prolongado com antidepressivos leva a alterações complexas na neurotransmissão monoaminérgica, principalmente na densidade dos receptores das monoaminas, sugerindo que as alterações adaptativas é que são responsáveis pela melhora clínica (GRAEFF *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2004).

Com os indícios de que uma das causas das doenças psiquiátricas era o desequilíbrio neuroquímico, sobretudo dos neurotransmissores monoaminérgicos, começaram a surgir técnicas que objetivavam monitorar o espaço intersticial cerebral com o intuito de verificar mudanças nos níveis desses neurotransmissores. Os primeiros avanços surgiram ainda na década de 60 com o surgimento da técnica de *push-pull* (GADDUM, 1961; NIEOULLON *et al.*, 1977) que trouxe grandes contribuições para o entendimento da química cerebral. Uma nova metodologia tornou-se viável com o desenvolvimento da voltametria *in vivo*, em 1973, quando foi possível analisar mudanças nos níveis extracelulares das monoaminas, sobretudo de dopamina e seus metabólitos (KISSINGER *et al.*, 1973).

Porém, foi reconhecido que essas técnicas não refletiam precisamente as alterações químicas em nível celular (HUTCHINSON *et al.*, 2002). Assim, estudos que investigavam mudanças neuroquímicas em nível de sinapses não podiam ser realizados por tais técnicas, devido à impossibilidade de se localizar precisamente regiões específicas do cérebro e aos instrumentos utilizados para medir/coletar as amostras, como eletrodos e cânulas, serem muito invasivos (PARSONS; JUSTICE, 1994; BOURNE, 2003). Além disso, as complicações comumente encontradas como geração de dano no cérebro do animal e perda da resolução temporal limitavam o uso destas técnicas (BLANCO-LEZCANO *et al.*, 2001; BOURNE, 2003).

Neste contexto, surgiu a técnica de microdiálise cerebral para o monitoramento de substâncias no fluido extracelular cerebral *in vivo* e *in situ* (TSAI, 2003), principalmente neurotransmissores. Através da microdiálise cerebral podem-se realizar estudos de liberação de neurotransmissores, metabólitos ou neuromoduladores, causada por uma determinada droga/substância ou tratamento terapêutico em uma região cerebral definida e limitada do sistema nervoso central (BLANCO-LEZCANO *et*

al., 2001). Esta técnica tem sido utilizada no estudo das bases neuroquímicas da depressão e mecanismo de ação dos antidepressivos (BOURIN *et al.*, 2002).

Com relação aos antidepressivos disponíveis no mercado, até o momento foram poucos os avanços em relação ao surgimento de moléculas com mecanismos de ação diferenciados. Os fármacos mais novos ainda atuam como inibidores seletivos da recaptação das monoaminas, principalmente serotonina (CASSIDY *et al.*, 2006; PERAHIA *et al.*, 2006). Além disso, cerca de 30 - 35 % dos pacientes não apresentam boa resposta ao arsenal terapêutico atual e muitos desses medicamentos apresentam efeitos adversos relevantes que impedem a continuidade do tratamento (GRAEFF *et al.*, 2000; STAHL, 2000). Devido a isso, nos últimos dez anos o interesse sobre plantas, principalmente do gênero *Hypericum* (Guttiferae) cresceu consideravelmente, sobretudo após a comprovação da eficácia clínica dos extratos de *Hypericum perforatum* L. no tratamento de depressões leves a moderadas (LINDE *et al.*, 2005; GASTPAR *et al.*, 2006; KASPER *et al.*, 2006) e baixa incidência de efeitos adversos (SCHULZ, 2006).

Tem sido demonstrado, através de técnicas de microdiálise cerebral, que antidepressivos, entre eles *H. perforatum*, aumentam os níveis extracelulares das aminas biogênicas, inclusive dopamina (DI MATTEO *et al.*, 2000; ROMMELSPACHER *et al.*, 2001; YOSHITAKE *et al.*, 2004). Desde 1998 nosso grupo investiga os efeitos farmacológicos das espécies nativas de *Hypericum*, tendo sido encontrado resultados promissores em relação à atividade antidepressiva de um extrato lipofílico de *H. caprifoliatum* (DAUT *et al.*, 2000; GNERRE *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2005).

Assim, este trabalho tem por objetivo implementar a técnica de microdiálise cerebral em animais conscientes em nosso laboratório, o que possibilitará o aprofundamento da investigação da atividade antidepressiva encontrada tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo* para *H. caprifoliatum*, além de auxiliar em outros estudos que investigam a ação de fármacos/drogas no SNC neste Programa de Pós-Graduação.

CAPÍTULO 1

**VALIDAÇÃO DA TÉCNICA DE MICRODIÁLISE CEREBRAL EM ANIMAIS
CONSCIENTES PARA MEDIDA DOS NÍVEIS CEREBRAIS DE DOPAMINA E SEUS
METABÓLITOS**

1. INTRODUÇÃO

A possibilidade de se monitorar alterações nas concentrações dos neurotransmissores, juntamente com o conhecimento da fisiologia do Sistema Nervoso Central (SNC), da patofisiologia das doenças psiquiátricas e da resposta observada com a utilização de fármacos empregados na terapêutica e de estudos comportamentais (FILLENZ, 2005) propiciou grandes avanços na compreensão das doenças neuropsiquiátricas, bem como no descobrimento de novas e inovadoras moléculas que podem ser usadas no tratamento de tais doenças (ZHANG; BEYER, 2006).

Existem várias técnicas que podem ser usadas para avaliar os níveis de neurotransmissores, como *push-pull*, voltametria *in vivo*, voltametria cíclica rápida, estudos eletrofisiológicos, microdiálise cerebral e estudos com homogenatos e fatias cerebrais (MINDERMAN *et al.*, 1998).

A técnica de *push-pull* desenvolvida por GADDUM (1961) e que posteriormente deu origem a MD consiste na inserção de uma cânula no cérebro do animal, para a administração da substância, e de uma segunda cânula (alguns milímetros de distância da primeira) para a coleta da amostra. Uma das principais desvantagens dessa técnica é que envolve um sistema aberto no qual o tecido cerebral entra em contato direto com o líquido de perfusão (CADOGAN; MARSDEN, 1997), gerando uma extensa lesão tecidual com formação de edema (FILLENZ, 2005). Esse dano cerebral atua como uma barreira à difusão, interferindo diretamente nos níveis dos neurotransmissores medidos, além de causar perda da resolução temporal (DREW *et al.*, 2004).

A voltametria *in vivo* consiste na implantação de eletrodos de carbono na região do cérebro a ser analisada. Os neurotransmissores são oxidados ou reduzidos na superfície desses eletrodos por meio da aplicação de um potencial elétrico. Cada neurotransmissor e seus metabólitos têm seu potencial de oxidação característico e isso gera uma corrente elétrica, a qual tem sua magnitude mensurada (HUTCHINSON

et al., 2002). O maior problema dessa técnica, no entanto, é que a diferença entre os potenciais de oxidação é tão pequena para alguns compostos que não se consegue ter uma boa especificidade (FILLENZ, 2005). Devido a isto, foi desenvolvida a voltametria cíclica rápida (*fast cyclic voltammetry* – FCV) que fornece uma boa resolução química e temporal. O potencial do eletrodo é linearmente aumentado até um valor suficiente para oxidar o analito e depois retorna ao valor basal em menos de 10 ms. Ainda assim, muitas vezes a corrente elétrica de fundo (*background*) é muito alta e não se consegue medir concentrações muito baixas dos neurotransmissores (FILLENZ, 2005). Essa técnica foi desenvolvida para mensurar mudanças nos níveis de dopamina e seus metabólitos durante uma estimulação elétrica. Por isso, a voltametria não é adequada para verificar os níveis basais de DA em situação fisiológica, com baixas concentrações. Além disso, quantidades significativas de outras substâncias oxidáveis como DOPAC e ácido ascórbico, podem mascarar o verdadeiro sinal da dopamina (CHEN, 2005).

Os estudos eletrofisiológicos são empregados principalmente quando se busca uma análise temporal e qualitativa dos estímulos que levam a ativação dos neurônios monoaminérgicos (FILLENS, 2005). Publicações recentes estão concentradas em estudos comportamentais que envolvem a apresentação de estímulos auditivos ou visuais (FILLENS, 2005; BLATER; SCHULTZ, 2006), na tentativa de mapear a intensidade e as velocidades das descargas elétricas geradas pelos neurotransmissores liberados durante o processo de aprendizagem e memória. Com estudos eletrofisiológicos não se pode quantificar nem se obter informações sobre a liberação dos neurotransmissores nos terminais nervosos (FILLENZ, 2005). Por isso, experimentos de microdiálise são realizados concomitantemente a estes estudos para complementar melhor os resultados. Com isso, são obtidos os índices de liberação do neurotransmissor e da atividade neuronal (GRUSS *et al.*, 1999).

Estudos utilizando homogenatos ou fatias cerebrais (*ex vivo*) são de fácil execução e fornecem dados sobre a quantidade total de cada neurotransmissor e seus metabólitos existentes no tecido (PARSON; JUSTICE, 1994). Porém, essa abordagem fornece uma medida inexata da atividade neuronal, uma vez que, as mudanças nas

concentrações extracelulares são mascaradas pelas altas concentrações intraneuronais dos neurotransmissores. Além disso, os resultados obtidos a partir de análise tecidual fornecem uma medida neuroquímica num ponto isolado de tempo, não se conseguindo realizar estudos dinâmicos do metabolismo dos neurotransmissores (PARSON; JUSTICE, 1994; OROSCO *et al.*, 1995). Uma outra variável que deve ser levada em conta é o erro de processamento da amostra (*post mortem*), que pode gerar diferenças consideráveis (BLANCO-LEZCANO *et al.*, 2001).

A microdiálise (MD) cerebral surgiu no início da década de setenta como uma técnica inovadora. Estudos de microdiálise podem ser realizados em qualquer região onde se possa inserir uma sonda de MD. O princípio básico desta técnica consiste em imitar a função de um capilar sanguíneo através da difusão passiva (UNGERSTEDT; HALLSTRÖM, 1987; LA PEÑA *et al.*, 2000; TSAI, 2003). Uma pequena sonda é implantada no cérebro do animal, sendo constantemente perfundida com líquido cerebrospinal artificial. Pequenas moléculas presentes no espaço intersticial se difundem através da sonda devido a um gradiente de concentração formado. O líquido perfundido é, então, analisado quimicamente e reflete a composição do fluido extracelular cerebral (MÜLLER *et al.*, 1996).

Desde a sua introdução, a MD cerebral tem sido extensivamente utilizada para análise dos diversos sistemas de neurotransmissores, principalmente dopaminérgico (DI CHIARA *et al.*, 1993; 2004; CARBONI *et al.*, 2001), colinérgico (DAY *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2004) e glutamatérgico (DREW *et al.*, 2004), em estudos que verificam a sua liberação. A técnica vem sendo utilizada também para avaliação de outras substâncias endógenas ou exógenas em fluidos corporais, mecanismo de ação de fármacos, bem como no estudo de fenômenos fisiológicos e patológicos. Com relação aos fármacos, o principal uso tem sido em estudos farmacocinéticos não somente no cérebro, mas também em outros tecidos como pele, músculos, tecido subcutâneo, coração, olhos, pulmões, fígado e sangue, tanto em animais quanto em humanos (LA PEÑA *et al.*, 2000; MÜLLER, 2000).

2. REVISÃO DE LITERATURA

A microdiálise cerebral surgiu com o avanço das neurociências. Foi inicialmente aplicada por DELGADO (1972) e depois por UNGERSTEDT E PYCOCK (1974) que, para medir concentrações de neurotransmissores, principalmente dopamina, introduziram no cérebro de ratos fibras ocas que eram continuamente perfundidas por líquido cerebroespinal artificial (UNGERSTEDT; HALLSTRÖM, 1987). Em 1987, a microdiálise foi utilizada pela primeira vez em humanos (MÜLLER, 2000). Porém, o termo microdiálise surgiu no final da década de 50 quando foi usado para descrever o método de diálise e extração simultâneas de esteróides polares do plasma sanguíneo num volume muito pequeno (KALANT *apud* PLOCK; KLOFT, 2005)¹.

A partir desses experimentos iniciais, a MD cerebral foi gradativamente ganhando importância em diversas áreas das ciências biomédicas e atualmente é uma técnica largamente utilizada para o monitoramento de diferentes substâncias no fluido extracelular cerebral *in vivo* e *in situ*, como catecolaminas, aminoácidos, peptídeos, ácido ascórbico, glicose e fármacos, (UNGERSTEDT; HALLSTRÖM, 1987; STENKEN, 1999; BLANCO-LEZCANO *et al.*, 2001; TSAI, 2003). Desde a sua introdução no estudo do SNC, a MD cerebral passou a ser uma ferramenta importante, sobretudo no campo da neurofarmacologia, neuroquímica, neuroanatomia e neurofisiologia e dentre os seus principais usos estão (BOURNE, 2003):

- Análise de substâncias endógenas cerebrais, como neurotransmissores, glicose, aminoácidos, lactato e metabólitos;
- Administração intracerebral de fármacos ou drogas ou substâncias endógenas;
- Estudos comportamentais correlacionando com alterações neuroquímicas;

¹ KALANT, H. A microdialysis procedure for extraction and isolation of corticosteroids from peripheral blood plasma. **Biochem. J.**, v.69, p.99-103, 1958 *apud* PLOCK, N. e KLOFT, C. Microdialysis – theoretical and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.25, p.1-24, 2005.

- Estudos de *binding*: essa técnica envolve a determinação da afinidade de um composto por determinada região cerebral, através da quantificação desse composto no dialisado.

2.1 Princípio

O objetivo principal da MD cerebral em estudos de farmacodinâmica (PD) é analisar as mudanças na composição neuroquímica do espaço intersticial de uma região cerebral específica em função do tempo (BOURNE, 2003).

A técnica está baseada no princípio da diálise, no qual uma sonda contendo uma membrana semipermeável é continuamente perfundida de um lado com uma solução que mimetiza o líquido cerebrospinal sem a adição da(s) substância(s) de interesse enquanto que o outro lado está em contato direto com a região cerebral sob análise. Dessa forma, um gradiente de concentração é criado e isto forma a base para a difusão da(s) substância(s) de interesse do espaço intersticial para a sonda de MD (Figura 1.1) (BENVENISTE *et al.*, 1989). Substâncias químicas podem ser retiradas do espaço extracelular ou introduzidas no mesmo (retrodiálise), dependendo da concentração do líquido de perfusão (UNGERSTEDT; HALLSTRÖM, 1987).

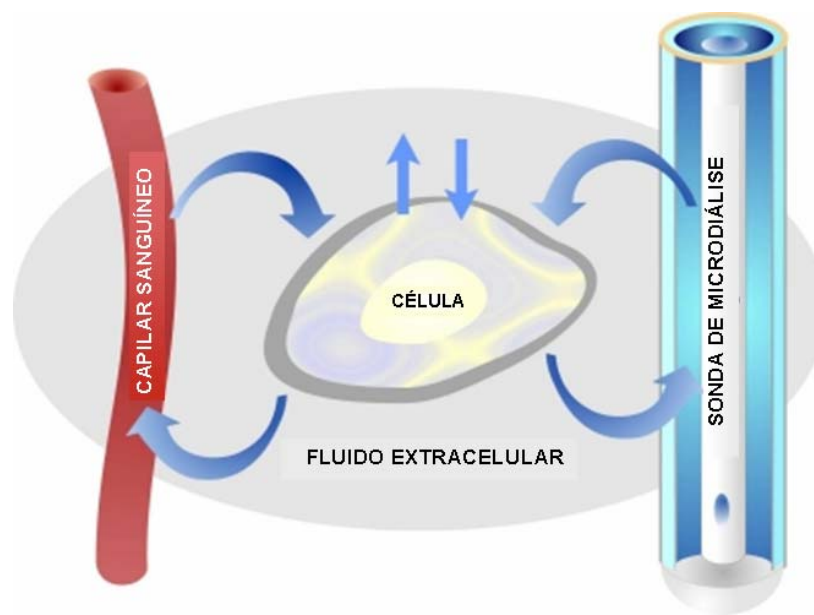


Figura 1.1 Representação esquemática da difusão passiva de substâncias endógenas para a sonda de MD após sua liberação no meio extracelular (Adaptado de CMA/Microdialysis, 2006. Disponível em < http://www.microdialysis.se/www/md_pic_int.htm >. Acesso em 8.7.2006).

2.2 Vantagens e Limitações da Microdiálise Cerebral em PD

2.2.1 Vantagens

Coleta das amostras no local de ação

A possibilidade de se monitorar continuamente mudanças neuroquímicas no líquido extracelular cerebral em função do tempo no local de implante da sonda é, sem dúvida, a principal vantagem da MD cerebral (PARSONS; JUSTICE, 1994; BOURNE, 2003). Através dessa técnica podem-se realizar estudos de liberação de neurotransmissores, neuromoduladores, segundos mensageiros e seus metabólitos em uma região definida e limitada do SNC (BLANCO-LEZCANO *et al.*, 2001).

Liberção de substâncias exógenas

A técnica oferece a possibilidade de se liberar substâncias diretamente em regiões específicas do cérebro, podendo se estudar os efeitos locais de tais substâncias sem o risco de efeitos adversos sistêmicos (WAGA, 2000; ZHAO *et al.*, 2004). Nesse caso, denomina-se retrodiálise.

Amostras prontas para análise

As amostras obtidas por MD cerebral são livres de proteínas e macromoléculas. Isso permite que possam ser analisadas imediatamente, não havendo necessidade de nenhum tipo de tratamento prévio como é o caso das amostras plasmáticas (BUERGER *et al.*, 2003). Essa é uma grande vantagem em estudos farmacocinéticos visto que, as concentrações livres teciduais do fármaco é que são responsáveis pelo seu efeito terapêutico (LA PEÑA *et al.*, 2000; MÜLLER, 2000; LIU *et al.*, 2005).

Atualmente pode-se analisar as amostras imediatamente após a coleta, sem a necessidade de congelá-las. Existem coletores automáticos refrigerados que são acoplados diretamente ao injetor do equipamento de análise. As amostras podem ser analisadas a cada 3 minutos (KEHR, 1992).

Amostragem em longo prazo

A MD cerebral pode ser usada para obtenção de perfis de distribuição de fármacos ou substâncias endógenas por várias horas ou dias. Como não existe perda de fluidos corporais durante o experimento, animais de pequeno porte também podem ser analisados (HORAL *et al.*, 1995). Uma grande vantagem é que um único animal pode ser usado com as características fisiológicas e anatômicas do tecido analisado mantendo-se intactas durante todo o período de perfusão, reduzindo o número de animais utilizados por grupo (PLOCK; KLOFT, 2005).

Estudos com animais acordados

Muitos autores concordam que a administração de um anestésico, por si só, pode comprometer a função neuronal, alterando os níveis dos neurotransmissores

(HAMILTON *et al.*, 1992; BOURNE, 2003). Com MD cerebral se tem a facilidade de trabalhar com os animais acordados (BOURNE, 2003). No entanto, deve-se considerar o aumento dos neurotransmissores provocado pelo meio onde se encontra o animal. Já foi demonstrado um aumento de DA relacionado com estresse ambiental (FOSBRAEY, 1993; DALLEY; STANFORD, 1995). O animal deve ser habituado ao local do experimento algumas horas antes e deve-se evitar mudanças no manipulador para diminuir ao máximo possível os fatores que estressam o animal (SALORD *et al.*, 1997).

Os estudos de MD cerebral com o uso de animais acordados não estão limitados apenas em analisar alterações neuroquímicas, mas são utilizados também como uma ferramenta para complementação de estudos comportamentais. A técnica é adequada para correlacionar liberação de neurotransmissores com alterações no comportamento natural ou farmacologicamente alterado, sendo utilizada em estudos comportamentais envolvendo locomoção, natação, o sistema de recompensa, testes de memória e na investigação do comportamento sexual dos animais (HAMILTON *et al.*, 1992; WESTERINK, 1995).

Possibilidade de diferentes locais de implantação da sonda

Estudos de MD cerebral teoricamente podem ser realizados em qualquer órgão ou tecido nos quais seja possível inserir uma sonda (BENVENISTE *et al.*, 1989; ANAND, 2004; EMMERTSEN, 2005). Pode-se também inserir mais de uma sonda no mesmo animal (MACHA; MITRA, 2001; WEIKOP, 2004). Dessa forma, os níveis de uma ou mais substâncias podem ser monitorados concomitantemente, por exemplo, em várias regiões cerebrais, do mesmo indivíduo. Estes dados são extremamente importantes para o entendimento da neuroquímica cerebral e o processo de comunicação entre os diferentes neurotransmissores (STEINIGER; KRETSCHMER, 2003; DREW *et al.*, 2004).

2.2.2 Limitações da Microdiálise

Dano tecidual

É comum acontecer um pequeno dano no tecido onde foi inserida a sonda de MD. Normalmente, observa-se um processo inflamatório em todos os tecidos. Um estudo mostrou infiltração de linfócitos 6h após a inserção da sonda (AULT *et al.* 1994). Os trabalhos de DAVIES E LUNTE (1995) e de MATHY e colaboradores (2003) relataram o surgimento de fibrose em torno da membrana de diálise, oito dias após a implantação da guia de sonda, provavelmente devido à contaminação bacteriana. Em se tratando de MD periférica, isso não seria considerado um problema (AULT *et al.*, 1994), porém em MD cerebral o desenvolvimento de gliose pode obstruir a membrana causando um entupimento da sonda (GEORGIEVA *et al.*, 1993).

QU e colaboradores (2001) estudaram mudanças morfológicas no cérebro de ratos após a implantação da sonda, realizando imunohistoquímica da proteína fibrilar ácida da glia (PFAG). Esses autores demonstraram que a densidade das células PFAG-positivas em torno da sonda aumenta com o passar do tempo, e que, a densidade de células em torno da guia de sonda parece ser maior do que em torno da membrana de diálise, onde o processo de difusão acontece. Os autores concluíram que os estudos crônicos de MD cerebral, principalmente aqueles com a sonda permanentemente implantada podem ser limitados devido a problemas técnicos e mudanças residuais.

Danos à barreira hematoencefálica

Normalmente, a integridade da barreira hematoencefálica (BHE) é restabelecida 2h após a implantação da sonda (BENVENISTE; HUTTEMEIER, 1990). Porém, alguns trabalhos demonstraram o dano causado na BHE após a inserção da sonda e encontraram dados divergentes. GROOTHUIS e colaboradores (1998) registraram um aumento da permeabilidade da membrana imediatamente (19x) e 1-2 dias (17x) após a inserção da sonda. A implantação da guia de sonda também causou aumento da permeabilidade da membrana (25x) em relação ao controle. Os autores observaram

que a disfunção da BHE é máxima logo após a inserção da sonda ou guia de sonda, mas persiste por no mínimo 28 dias. Estudos anteriores, como o de MORGAN e colaboradores (1996) verificaram que o transporte de pequenas moléculas através da BHE fica comprometido alguns dias após a inserção da sonda. Um outro estudo que analisou o perfil de distribuição no estriado de sacarose marcada através de autoradiografia, concluiu que a injúria causada pela inserção da sonda de MD desregula a BHE da região próxima ao local de implantação da sonda. Essa desregulação leva a um influxo de água e outros constituintes do plasma causando edema vasogênico no animal (DYKSTRA, 1992). Os autores aconselham a dar mais atenção a alterações na permeabilidade da BHE, principalmente em estudos que envolvem o transporte de fármacos através da BHE.

Contaminação bacteriana

Além da resposta inflamatória que mobiliza células do sistema imunológico, a sonda de MD pode introduzir bactérias no meio intersticial estudado e causar infecção. Dessa forma, métodos de desinfecção ou esterilização de sondas de MD têm sido estudados e comparados com sondas caseiras e manufaturadas num ambiente limpo, para melhorar a saúde dos animais estudados em longo prazo. Os resultados mostraram que mesmo a desinfecção da sonda feita manualmente é suficiente para garantir a saúde do animal. No entanto, quando comparada às outras técnicas, a inserção da sonda de MD pode ser considerada minimamente invasiva e bem tolerada pelo animal (HUFF *et al.*, 2003).

Calibração das sondas

A capacidade de recuperação (transporte do analito através da membrana da sonda de MD) de uma sonda de MD nunca alcançará 100%. Mas, é fundamental determinar a taxa de recuperação para que as concentrações medidas do analito no dialisado tenham validade (JOHANSEN *et al.*, 1997) e representem a verdadeira concentração no local de implantação da sonda (STENKEN, 1999; PLOCK; KLOFT, 2005). Existem diversos métodos para se calibrar as sondas de MD e dependendo do tipo de estudo deve ser escolhido o mais adequado para tal. Cada método possui

vantagens e limitações próprias da técnica. Estes métodos serão discutidos com mais detalhes no item 2.4.

Método de quantificação sensível

Os estudos realizados com MD cerebral necessitam de sofisticados equipamentos para analisar as amostras. A detecção dos níveis extracelulares dos neurotransmissores continua sendo um desafio analítico e técnico, devido principalmente aos seus baixos níveis basais (fM) e ao volume reduzido (20 µL em média) de amostra coletado (LIU *et al.*, 2000; ZHANG; BEYER, 2006). Além disso, as amostras de MD cerebral são misturas complexas contendo altas concentrações de sais inorgânicos que requerem métodos cromatográficos de alta sensibilidade e precisão que permitam a quantificação de cada neurotransmissor com mínima interferência (BERGQUIST *et al.*, 2002; ZHANG; BEYER, 2006).

Tempo de amostragem

Experimentos de MD são limitados em tempo e geralmente não duram mais do que 3-4 dias. Alguns pesquisadores relatam que os níveis basais dos neurotransmissores decrescem consideravelmente 3-4 dias após a implantação da sonda. O tempo de amostragem é dependente do limite de detecção do método analítico utilizado e da taxa de recuperação do analito (WESTERINK, 1995). Normalmente é necessário um intervalo entre coletas de 5-30 minutos para se conseguir quantidade de amostra suficiente para a análise (DAY *et al.*, 2001). Portanto, a concentração medida do analito em cada amostra coletada reflete a concentração do analito em cada intervalo de tempo específico.

Na tabela 1.1 estão sumarizadas as principais vantagens e limitações da técnica de MD (adaptada de PLOCK; KLOFT, 2005).

2.3 A técnica e os equipamentos

A sonda de MD foi planejada para mimetizar um capilar sangüíneo. Normalmente é constituída por dois capilares (diâmetro interno entre 0,15-0,3 mm), um de entrada do líquido de perfusão, chamado perfundido, e o outro de saída deste líquido denominado dialisado, e uma membrana semipermeável na parte terminal (Fig. 1.2). Os capilares são feitos com materiais do tipo sílica fundida, teflon ou polietiléster cetona e permitem que a membrana seja constantemente irrigada com o líquido de perfusão. A membrana é fabricada de material compatível biologicamente com o tecido cerebral, como acetato de celulose ou éter policarbonato, de maneira a minimizar os danos causados pela sua inserção no cérebro do animal. Cada membrana da sonda limita a passagem de moléculas de acordo com o seu tamanho de poro (*cut-off*) que varia entre 6 e 100 kDa (JOHANSEN *et al.*, 1997; PLOCK; KLOFT, 2005).

Tabela 1.1 Vantagens e limitações da técnica de microdiálise.

VANTAGENS	LIMITAÇÕES
Coleta de substâncias no local de ação.	Tamanho das substâncias limitado.
Liberação direta de fármacos/drogas no tecido-alvo.	Determinação da concentração média de substâncias exógenas/endógenas em um intervalo de tempo.
Manutenção dos fluidos biológicos – coletas de amostras continuamente.	Necessidade calibração. A recuperação não atinge 100%.
Dialisado livre de proteínas. Amostras prontas para serem analisadas, ganho de tempo.	Necessidade de um método analítico sensível e capaz de utilizar um volume de amostra pequeno.
Medida das concentrações livres do fármaco.	Risco de trauma tecidual, gliose e alterações na BHE.
Análise das amostras <i>on-line</i> .	
Coleta simultânea de amostra em locais diferentes num mesmo animal.	
Aplicável a quase todos os órgãos.	
Uso de animais acordados.	

As sondas podem ser inseridas no cérebro vertical ou transcerebralmente, dependendo do tipo utilizado. Normalmente, sondas do tipo concêntricas (*I-shaped*), inseridas verticalmente são as preferidas por possuírem *design* mais apropriado. Outros

tipos disponíveis, porém menos utilizados, são as sondas do tipo *loop* ou *U-shaped*, de *design* mais simples e as sondas transcerebrais, que pelo fato de serem inseridas transcerebralmente aumentam o risco de dano tecidual (HUTCHINSON *et al.*, 2002). Existe também a possibilidade de se construir a sonda no laboratório (*homemade*). Porém, o tempo gasto para o preparo e o custo dos materiais para a fabricação fazem com que a produção caseira de sondas seja vista, atualmente, como uma desvantagem. Muitas vezes o processo de produção pode tornar-se até mais caro do que comprar a sonda pronta de uma companhia fornecedora. Seja qual for o tipo de sonda utilizada, vertical ou transcerebral, ou a procedência, caseira ou manufaturada, todas devem ser validadas e calibradas.

Quanto ao tamanho de membrana das sondas, em estudos com animais utilizam-se membranas que variam de 1 – 4 mm, dependendo do local do cérebro onde será inserida a sonda, e em estudos com humanos, normalmente a sonda possui 10 mm.

A velocidade do fluxo através da membrana de MD deve ser determinada através de estudos preliminares. Velocidades muito altas podem romper o tecido, gerando um processo inflamatório local e velocidades muito baixas podem remover da região analisada grandes quantidades do analito, fazendo com que ocorram mudanças profundas nos processos fisiológicos locais. Em experimentos de MD cerebral geralmente se trabalha com uma faixa de fluxo que varia entre 0,5-5 $\mu\text{L}/\text{min}$, sendo o fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ o mais utilizado e 10–30 minutos o intervalo de tempo de coleta mais usual (UNGERTEDT; HALLSTRÖM, 1987; PLOCK; KLOFT, 2005).

Outros equipamentos são necessários para a realização de estudos utilizando a técnica de MD cerebral e incluem:

- Bomba de perfusão: a bomba de perfusão deve liberar durante todo o tempo de realização do experimento o líquido de perfusão a um fluxo constante, com o mínimo de variação.

- Tubos de MD: os tubos que fazem a conexão do animal com o equipamento de MD devem ser fabricados de material inerte para prevenir a adsorção de substâncias ao tubo e também possuírem o lúmen estreito para que o dialisado que passa pela membrana da sonda não demore a chegar até o tubo de coleta, garantindo a resolução temporal.
- Sistema de coleta: os dialisados são coletados em tubos de microcentrífuga que são trocados de acordo com o tempo de coleta. A troca dos tubos pode ser feita manualmente ou por um coletor automático refrigerado.

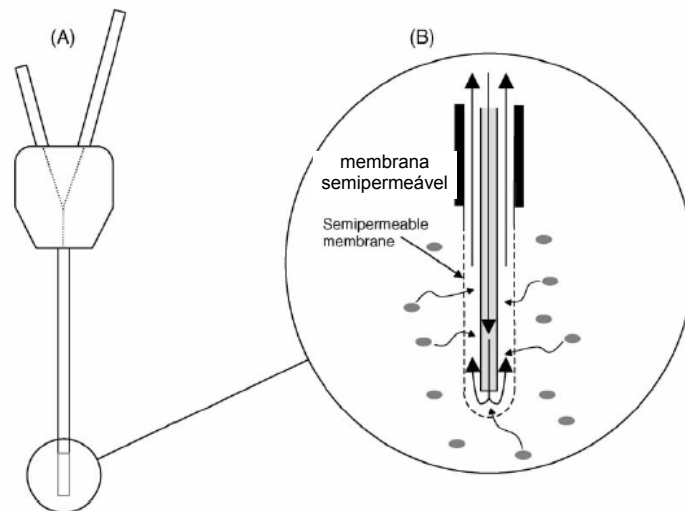


Figura 1.2 (A) Sonda rígida do tipo concêntrica usada em MD cerebral; (B) Região aumentada da mesma sonda. Moléculas ultrapassam a membrana semipermeável e são levadas até o capilar de saída pelo líquido de perfusão. As setas indicam a direção do fluxo (Adaptado de PLOCK; KLOFT, 2005).

As principais companhias fornecedoras destes equipamentos são a CMA Microdialysis (Suécia), Applied Neuroscience (Inglaterra) e BioAnalytical Systems (EUA). A comercialização dos equipamentos para microdiálise resultou no surgimento de muitos grupos de pesquisa que utilizam esta técnica em humanos e numa variedade de animais não anestesiados, como camundongos, ratos, cobaias, macacos.

Atualmente o sistema de microdiálise *in vivo* pode ser totalmente automatizado em termos de coleta e injeção das amostras no CLAE, e é realidade em muitas indústrias farmacêuticas, auxiliando no descobrimento e desenvolvimento de novos fármacos (ZHANG; BEYER, 2006).

2.4 Métodos de recuperação e calibração das sondas de microdiálise

A determinação da recuperação relativa é fundamental para que os resultados experimentais quantitativos tenham validade (JOHANSEN *et al.*, 1997), pois a taxa de recuperação está envolvida diretamente nas concentrações do analito no dialisado (STENKEN, 1999).

Entre os fatores que afetam a taxa de recuperação relativa das sondas podem-se citar o fluxo de perfusão, a área superficial da membrana, as propriedades físico-químicas do analito, a temperatura, a composição do líquido de perfusão e as características do tecido analisado (MENACHERRY *et al.*, 1992; PLOCK; KLOFT, 2005).

A recuperação (E_d) em MD foi originalmente definida como a razão $C_{\text{outlet}}/C_\alpha$, onde C_{outlet} é a concentração (μM) do analito no dialisado e C_α é a concentração do analito no tecido no tempo infinito (UNGERSTEDT *apud* STENKEN, 1999)². Termos mais generalizados que descrevem a razão da concentração do dialisado com a concentração externa em qualquer situação são: razão de extração, fração de extração

² UNGERSTEDT, U.; HERRERA-MARSCHITZ, M.; JUNGNELIUS, U.; STÄHLE, L.; TOSSMAN, U.; ZETTERSTRÖM, T. In: Kohsaka, M (Ed.). **Advances in dopamine research**. New York: Pergamon Press, 1982, p.219-231 *apud* STENKEN, J. A. Methods and issues in microdialysis calibration. **Analytica Chimica Acta**, v.379, p.337-358, 1999.

ou eficiência da extração e recebem o mesmo símbolo (E_d) (STENKEN, 1999). O termo fração de extração tem sido mais adotado, pois fornece uma definição mais generalizada de recuperação e não indica uma direção de fluxo.

A Equação (1) mostra como se calcula E_d .

$$\text{Fração de Extração} = E_d = \frac{C_{\text{OUTLET}} - C_{\text{INLET}}}{C_\alpha - C_{\text{INLET}}}$$

Equação 1

Esta equação pode ser usada para determinar E_d para diferentes tipos de experimentos de MD incluindo:

- Experimentos onde $C_{\text{INLET}} = 0$ e C_α é um valor finito, e se diz recuperação porque o transporte do analito ocorre do lado de fora da membrana em torno do lúmen. C_{OUTLET} nesse caso é a porcentagem de C_α que reflete a E_d da sonda de MD.
- Uma infusão local através da sonda de MD ou um experimento de liberação onde $C_\alpha = 0$ e C_{INLET} é um valor conhecido. O analito é liberado no local de implantação da guia de sonda.
- Método do fluxo líquido zero (*no-net flux*) que envolve calcular o analito C_α no *steady-state* através da infusão de diferentes concentrações do analito, C_{INLET} , e plotar as diferenças *versus* C_{INLET} para se obter C_α e E_d .

Existem diferentes métodos para a determinação da recuperação das sondas de MD, todos baseados na Equação 1.

2.4.1 Método da variação do fluxo

Esse método foi introduzido por JACOBSON e colaboradores (1985). A calibração é realizada variando-se a velocidade de perfusão. A recuperação relativa é dependente

do fluxo de perfusão. Concentrações de equilíbrio serão alcançadas quando o fluxo for igual a zero, dessa forma, construindo um gráfico da velocidade de fluxo *versus* concentrações medidas e extrapolando para o fluxo zero, seria estimada a concentração quando o fluxo fosse zero e com isso a real recuperação relativa da sonda (JACOBSON *et al.*, 1985).

A grande desvantagem desse método é o longo tempo necessário para coletar as amostras quando o fluxo for muito baixo. Além do mais, a concentração no tecido no tempo infinito tem que ser constante e a extrapolação do fluxo zero somente fornece o valor mais próximo da recuperação e não o valor verdadeiro (PLOCK; KLOFT, 2005).

2.4.2 Método do fluxo líquido zero (no-net-flux)

Nesse método, adicionam-se diferentes concentrações do analito no perfundido, mantendo-se a mesma velocidade de fluxo. Foi desenvolvido por LONNROTH e colaboradores (1987) como um método para calibração *in vivo* enquanto se mantinha a concentração do analito em *steady-state* no tecido analisado.

O composto de interesse é adicionado ao perfundido em diferentes concentrações conhecidas. Se a concentração do analito no perfundido (C_{perf}) se mantiver mais baixa do que no espaço intersticial em torno da sonda (C_{pf}), o analito irá se difundir através da membrana para o perfundido, resultando em um aumento da sua concentração no dialisado (C_{dial}). Se ocorrer o contrário, isto é, $C_{perf} > C_{pf}$, a concentração do analito no perfundido irá diminuir, resultando num decréscimo no dialisado. Uma situação especial ocorre no caso da C_{perf} ser igual a C_{dial} . Nessa circunstância C_{pf} será a mesma de C_{perf} , resultando no fluxo líquido zero (PLOCK; KLOFT, 2005).

As diferenças de concentrações do analito ($C_{dial} - C_{perf}$) são graficamente plotadas em função da concentração do analito no perfundido (C_{perf}), a reta que descreve esta relação intercepta a abscissa no valor da C_{dial} igual à concentração do analito no fluido extracelular: ponto de fluxo líquido zero. Se existir uma relação linear, a

inclinação negativa da reta fornece a taxa de recuperação da sonda de MD para o analito avaliado (ELMQUIST; SAWCHUK, 1997).

Apesar de ser adequada quando se trabalha com fármacos, esta técnica requer um tempo relativamente grande para sua realização, devido à utilização de diferentes concentrações do perfundido e a necessidade de se trabalhar em condições *steady-state* (PLOCK; KLOFT, 2005).

2.4.3 Método do fluxo líquido zero dinâmico (Dynamic no-net-flux)

Essa técnica também conhecida como calibração sob condições transitórias (STAHL *et al.*, 2002), foi introduzida em 1993 (OLSON; JUSTICE, 1993) devido à necessidade de se ter um método que fosse aplicável durante a monitorização da resposta de um analito durante a administração de um fármaco. A principal diferença com relação ao método do fluxo líquido zero é que três ou quatro animais são perfundidos com uma única concentração do analito e os dados são unidos ao invés de perfundir um único animal com diferentes concentrações. Essa técnica tem sido usada para medir concentrações de dopamina no cérebro de ratos após injeções de cocaína, anfetamina e haloperidol (OLSON; JUSTICE, 1993) e para observar os efeitos da glicoproteína-P na distribuição cerebral de esparfloxacino (DE LANGE *et al.*, 2000).

A desvantagem é que não é possível calibrar as sondas individualmente, mas somente coletivamente. Juntando-se os dados de diferentes animais, a variabilidade - que poderia ser chamada de variabilidade inter-sondas - na estimativa da taxa de recuperação é introduzida neste conjunto (PLOCK; KLOFT, 2005).

2.4.4 Retrodiálise

Os métodos descritos anteriormente consomem tempo para a sua execução ou requerem o uso de muitos animais. A retrodiálise também chamada técnica de liberação (STAHL *et al.*, 1991) surgiu para acabar com esses problemas. O analito é adicionado ao líquido de diálise numa concentração conhecida e se assume que o processo de difusão é quantitativamente igual em ambas as direções. Dessa maneira, a

perda da substância é a mesma como na recuperação *in vivo*. O cálculo é feito de acordo com a Equação 2.

$$\text{Recuperação (\%)} = 100 - \frac{(C_{\text{dial}} \times 100)}{C_{\text{perf}}} \quad \text{Equação 2}$$

No entanto, para que se obtenham resultados corretos devem-se levar em conta algumas considerações: o processo de difusão somente será igual se não houver nenhuma substância adicionada à solução antes do processo de calibração. Se o método de retrodiálise for usado para medir concentrações de fármacos, a determinação da recuperação relativa deve ser feita antes da aplicação do fármaco em questão.

Uma variação do método de retrodiálise emprega um padrão interno (calibrador) para determinar a recuperação relativa *in vivo* (LARSSON, 1991). O calibrador é adicionado ao líquido de perfusão e perfundido continuamente durante todo o experimento. A substância escolhida deve possuir um coeficiente de difusão semelhante ao do analito de interesse caso não seja o próprio analito, dessa forma a perda do calibrador refletirá a recuperação relativa do analito (PLOCK; KLOFT, 2005).

Como ambos os métodos de retrodiálise possuem vantagens bem como desvantagens, uma técnica conjunta foi sugerida por BOW E HAMMARLUND-UDENAE (1998). Essa técnica associa o uso do próprio analito para determinação da recuperação relativa (retrodiálise por fármaco) com o uso de um padrão interno (retrodiálise por calibrador) para monitorar a recuperação da sonda durante o experimento. O calibrador serviria como um controle de qualidade da vida útil da sonda (PLOCK; KLOFT, 2005).

2.4.5 Substâncias de referências endógenas

Foram propostas técnicas que usavam substâncias endógenas como referência para a determinação da recuperação relativa das sondas. Elas surgiram com o intuito de se gastar menos tempo e não necessitar de condições *steady-state* para o processo de calibração. A uréia tem sido o principal composto mensurado, por ser uma molécula que se difunde livremente através da sonda. Os resultados obtidos até agora são inconsistentes (PLOCK; KLOFT, 2005). Enquanto alguns autores não confirmam a equivalência entre as técnicas de recuperação já estabelecidas e o uso de referências endógenas (uréia) (BRUNNER *et al.*, 2000) outros concluíram como adequado o uso de uréia como marcador de recuperação (STRINDBERG; LONNROTH, 2000). Mais estudos devem ser conduzidos usando outras substâncias endógenas como referência para que sejam obtidas conclusões mais confiáveis.

2.5. Aplicações da técnica

A técnica de microdiálise tem permitido o estudo das bases biológicas de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, como drogadição, depressão, esquizofrenia, mal de Parkinson e, também, as conseqüências e progressão de danos causados por injúrias isquêmicas. Paralelamente, as técnicas de microdiálise têm permitido o estudo do mecanismo de ação de fármacos ou drogas potencialmente úteis no tratamento dessas doenças (FINK-JENSEN, 2000; BLANCO-LEZANO *et al.*, 2001; BOURIN *et al.*, 2002; DI CHIARA *et al.*, 2004; INVERNIZZI, 2004; CARBONI *et al.*, 2006).

2.5.1 Estudos Clínicos

O primeiro estudo envolvendo MD em humanos foi realizado em 1987 e investigava as concentrações intersticiais de glicose em voluntários sadios (MÜLLER, 2000). Os primeiros trabalhos com drogas/fármacos foram realizados a partir de 1991 e

utilizaram propranolol, cafeína e etanol (STAHL *et al.*, 2002). A microdiálise foi introduzida em neurocirurgias em 1990 (HILLERED; PERSSON, 2003).

Hoje em dia, a técnica é utilizada para analisar a penetração de fármacos no SNC, principalmente antibióticos e antiepiléticos (STAHL *et al.*, 2002), para aplicação de fármacos diretamente no cérebro em casos de epilepsia e câncer (REDGATE *et al.*, 1995) e para investigar uma série de doenças, compreendendo desde trauma craniano até tumores cerebrais e desordens neurodegenerativas (HILLERED; PERSSON, 2003).

Dentro da neurocirurgia as principais aplicações estão no monitoramento de mudanças neuroquímicas durante os procedimentos cirúrgicos, principalmente em casos de isquemia cerebral, onde os estudos de MD auxiliam na melhor compreensão das mudanças no metabolismo energético e na liberação de neurotransmissores produzidas por um acidente isquêmico (HILLERED *et al.*, 1990). O uso mais difundido, entretanto, é no centro de tratamento intensivo (CTI) neurocirúrgico (PERSSON; HILLERED, 1992, SIDDIQUI; SHUAIB, 2001). O objetivo principal da aplicação de MD cerebral neste caso é monitorar metabólitos preditivos de alguma complicação pós-cirúrgica, principalmente eventos isquêmicos secundários ou mudanças neuroquímicas relacionadas com atividade pró-convulsivante (HILLERED; PERSSON, 2003).

Outros dois enfoques estão sendo realizados em neurocirurgias: monitoramento geral e focal do cérebro. O primeiro enfoque objetiva detectar precocemente sinais de injúria cerebral relacionados com eventos globais como hipertensão intracranial e hipóxia. O segundo, pretende monitorar regiões específicas do cérebro que possuam risco de desenvolver deteriorização secundária, de acordo com observações durante o procedimento cirúrgico ou técnicas de neuroimagem (HILLERED; PERSON, 2003).

Com relação a fármacos, estudos utilizando MD cerebral em humanos têm monitorado a penetração de antibióticos e antiepiléticos através da barreira hematoencefálica. Estudos farmacocinéticos tentam correlacionar os níveis cerebrais com os níveis plasmáticos desses fármacos, objetivando otimizar a terapia (STHAL *et al.*, 2002). Trabalhos empregando MD cerebral mostraram que os níveis no *steady-state* dos fármacos são mais baixos no espaço extracelular cerebral do que no plasma

durante infusão contínua (SAWCHUK; ELMQUIST, 2000). Resultados similares foram encontrados em estudos que mediram a área sob a curva (AUC) da concentração livre de fármacos administrados em dose única sistemicamente, mostrando AUCs menores no cérebro do que no plasma (GOLDEN *et al.*, 1993; WANG; WELTY, 1996; SAWCHUK; ELMQUIST, 2000). Entretanto, análises realizadas com carbamazepina, fenitoína e rifampicina mostraram que os níveis extracelulares cerebrais desses fármacos no *steady-state* aproximam-se das concentrações séricas livres (SCHEYER *et al.*, 1994a; 1994b).

A MD também tem sido utilizada para administrar em locais específicos do cérebro antineoplásicos usados para tratar gliomas (RONQUIST *et al.*, 1992). A medida das concentrações intersticiais de fármacos citotóxicos em tumores sólidos cerebrais pode ajudar a explicar a resistência de alguns grupos de pacientes a fármacos antitumorais e pode ser útil na otimização de doses e regimes de tratamento (STAHL *et al.*, 2002).

2.5.2 Levodopa e Mal de Parkinson

A técnica de MD cerebral permitiu estudar a transmissão dopaminérgica em modelos experimentais de Parkinson. A síndrome parkinsoniana é induzida em ratos através da administração intracerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (UNGERSTEDT, 1971). Este modelo tem servido para estudar as características da transmissão dopaminérgica no SNC em condições de falta de DA, bem como para avaliar o efeito de novos fármacos – agonista e antagonistas, agentes neuroprotetores - nos neurônios dopaminérgicos centrais (PARSONS *et al.*, 1991; TANGANELLI *et al.*, 2004; MIGNON; WOLF, 2005).

Uma grande utilidade da MD consiste em poder estudar simultaneamente a neurotransmissão implantando sondas em ambos os hemisférios cerebrais. Com este procedimento tem se estudado a transformação de L-diidroxifenilalanina (levodopa) no estriado e na substância negra de ratos controle e com lesões unilaterais na via nigroestriatal (McGEER; McGEER, 1993).

Pode-se também administrar drogas/fármacos através da sonda de MD diretamente numa região de interesse específica do cérebro (SARRE *et al.*, 1992; SARRE *et al.*, 1997). Esta via de administração (intracerebral) implica que os efeitos estudados se limitam as terminações nervosas locais, em torno da sonda de MD. Enquanto que, se administrada sistemicamente os efeitos observados poderiam estar sendo influenciados por efeitos diretos ou indiretos do fármaco administrado em outras áreas do cérebro. Muitos desenhos experimentais têm feito esta abordagem: infunde-se levodopa no estriado e na substância negra de animais com as estruturas cerebrais intactas ou lesionadas com 6-OHDA, e se monitora os níveis extracelulares como um indicador da liberação de DA após a administração de levodopa (SARRE *et al.*, 1992).

Existem também alguns estudos que perfundem juntamente com levodopa, diferentes drogas agonistas e antagonistas dopaminérgicos no estriado e na substância negra, com o propósito de estudar o possível efeito que essas drogas exercem sobre a liberação de dopamina promovida por levodopa (SARRE *et al.*, 1996; SARRE *et al.*, 1997; SARRE *et al.*, 1998; MESHUL, 2002).

A aplicação da MD cerebral no estudo da neurotransmissão dopaminérgica em modelos experimentais de mal de Parkinson tem aberto novas expectativas sobre a utilização terapêutica de diferentes agonistas ou antagonistas dopaminérgicos, que, combinados com diferentes doses de levodopa podem manter os níveis de DA em níveis mais próximos do fisiológico e melhorar a qualidade de vida dos pacientes que sofrem dessa enfermidade (BLANZO-LEZCANO *et al.*, 2001).

2.5.3 Estudo dos Neurotransmissores

A análise de neurotransmissores é provavelmente a aplicação mais difundida da MD cerebral, principalmente para monitorar os níveis extracelulares desses compostos, na tentativa de entender o seu mecanismo de liberação e regulação (DEL ARCO *et al.*, 2003; FILLENZ, 2005). Normalmente, para determinar se a origem desses neurotransmissores é neuronal, adiciona-se tetrodotoxina (TTX) ou retira-se o íon Ca^{2+} do meio de perfusão. Os principais neurotransmissores estudados são dopamina, acetilcolina e glutamato (BOURNE, 2003).

A origem dos neurotransmissores pode ser tanto neuronal, como é o caso das monoaminas (HERY; TERNAUX, 1981; CHUNG *et al.*, 2004), como extraneuronal, caso de glutamato e GABA (DREW *et al.*, 2004). É importante conhecer a verdadeira origem de cada neurotransmissor, para determinação dos valores reais dos níveis basais de cada um deles.

Como a sonda de MD é inserida numa região extracelular limitada do cérebro, os dados obtidos através de estudos que empregam esta técnica representam uma medida da liberação direta do neurotransmissor na fenda sináptica no local de inserção da sonda. Com isso, consegue-se estudar a funcionalidade de cada sistema neurotransmissor em regiões isoladas do cérebro (BLANZO-LEZCANO *et al.*, 2001).

A liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica acontece por um mecanismo dependente de íons Ca^{2+} (COOPER *et al.*, 1996). A liberação é abolida por drogas que bloqueiam os canais de Na^+ (por exemplo, TTX), pois estes são responsáveis pela propagação do potencial de ação, bem como por drogas que bloqueiam os canais de Ca^{2+} . O efeito observado nos níveis dos neurotransmissores após a administração de tais drogas é o teste para provar a origem da liberação neuronal de um neurotransmissor (FILLENZ, 2005).

Noradrenalina

Com a utilização da MD cerebral foi possível estudar o envolvimento do sistema noradrenérgico na resposta ao estresse e verificar mudanças na concentração extracelular de NA em diferentes regiões do cérebro *in vivo*. Uma outra maneira que também é bastante utilizada é a quantificação dos seus metabólitos (GLAVIN *et al.*, 1983; FILLENZ, 2005). Para demonstrar que a NA medida por microdiálise cerebral é de origem neuronal, estudos demonstraram a sua diminuição nas amostras coletadas, quando foi perfundida com TTX ou omitido Ca^{2+} no dialisado (VAHABZADEH e FILLENZ, 1994; PUDOVKINA *et al.*, 2001).

Experimentos de microdiálise têm demonstrado que estímulos aversivos, como choques nas patas, imobilização e estresse psicológico, aumentam as concentrações

extracelulares de NA no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos (VAHABZADEH e FILLENZ, 1994; TANAKA, 1999; HAJOS KORCSOK *et al.*, 2003). Isso também foi demonstrado com estímulos considerados pouco aversivos como a manipulação do animal e a apresentação de novidade (McQUADE *et al.*, 1999).

Experimentos similares mostraram que o aumento de NA é classificado em tamanho e duração, dependendo do tipo e intensidade do estímulo. A resposta também é afetada pelo histórico prévio do animal. Por exemplo, após um aumento de 200% na noradrenalina hipocampal em resposta ao choque nas patas, não houve aumento de NA nos ratos que foram submetidos a um segundo choque 60 minutos depois (HAJOS KORCSOK, 2003).

A microdiálise cerebral pode determinar as circunstâncias que controlam a liberação de NA, mas não o efeito gerado por essa liberação. Comparações devem ser feitas entre as respostas comportamentais e os níveis de NA. A aplicação de repetidos choques nas patas do animal gera um comportamento consistente com ansiedade, mostrando mudanças que foram paralelas com mudanças na liberação de NA, porém estudos de interação social não mostraram correlação com a liberação de NA (HAJOS KORCSOK, 2003). O aumento inespecífico de NA em resposta aos estímulos aversivos sugere que esse neurotransmissor não inicia os impulsos eferentes que levam a um determinado comportamento, mas modulam as redes neuronais envolvidas na sua elaboração (FILLENZ, 2005).

Acetilcolina

A introdução da MD cerebral *in vivo* para medir os níveis de acetilcolina (ACh) em animais conscientes trouxe novas oportunidades para testar a hipótese relacionando sistema colinérgico e cognição (DAY *et al.*, 2001; PEPEU; GIOVANNINI, 2004; TSUKADA, 2004). Devido aos níveis fisiológicos extracelulares de acetilcolina (ACh) serem muito baixos, inibidores da acetilcolinesterase (AChE), como neostigmina, são freqüentemente adicionados ao líquido de perfusão em experimentos envolvendo MD cerebral com a finalidade de aumentar as concentrações de ACh no dialisado (VIGNY *et al.*, 1978; ANGLISTER *et al.*, 1994). Entretanto, evidências mostraram que

os níveis extracelulares de ACh são estreitamente regulados pela AChE endógena e o acréscimo de um inibidor de AChE poderia causar alterações farmacológicas que modificariam os resultados obtidos (ANTONIOU *et al.*, 1997). Com o refinamento das técnicas cromatográficas para análise de dialisados, tem se conseguido medir concentrações basais de ACh sem a adição de inibidores de AChE ou com a adição de inibidores na concentração de nM, ao invés de μ M como era feito anteriormente (ICHIKAWA *et al.*, 2000; ZHANG; BEYER, 2006).

Trabalhos envolvendo MD cerebral e sistema colinérgico são realizados na região do estriado, não somente por seu papel na interface locomoção/cognição, ou por ser uma região equipada com um grande número de sistemas neurotransmissores que possivelmente regulam a atividade e liberação da ACh, mas também devido à grande área que ele representa no cérebro e ao fácil acesso para implantação da sondas (DAY, 2001).

Experimentos envolvendo MD no estriado de ratos demonstraram que a ACh liberada pode ser inibida por galanina (ANTONIOU *et al.*, 1997) e estimulada por um agonista dos receptores de adenosina A_{2a} (KUROKAWA *et al.*, 1996). A liberação de ACh no estriado pode ser alterada também por outros neurotransmissores, como dopamina (DE BOER *et al.*, 1996; ABERCROMBIE; DE BOER, 1997; ACQUAS *et al.*, 1997). Além do estriado, o sistema colinérgico presente no núcleo acumbens (NAc) tem sido bastante estudado. A regulação dopaminérgica da ACh presente no NAc é similar à regulação estriatal e parece ser resultado da influência estimulatória dos receptores D_1 e inibitória dos receptores D_2 (KEYS; MARK, 1998).

Estudos farmacológicos envolvendo a liberação de ACh nas regiões do córtex, hipocampo e amígdala vêm sendo realizados por diversos grupos. Já foi demonstrado que fármacos dopaminérgicos (NILSSON *et al.*, 1992; IMPERATO *et al.*, 1993b; DAY; FIBIGER, 1993; 1994; CHUNG *et al.*, 2004), fármacos que aumentam a neurotransmissão serotoninérgica central (HIRANO *et al.*, 1995; CONSOLO *et al.*, 1996; YAMAGUCHI *et al.*, 1997), e a ativação de receptores serotoninérgicos $5-HT_{1A}$ (FUJII *et al.*, 1997; SOMBOONTHUM *et al.*, 1997; ZHELYAZKOVA-SAVOVA *et al.*, 1997; SCHECHTER *et al.*, 2005), $5-HT_{1B}$ (CONSOLO *et al.*, 1996), $5-HT_{2A}$ (HIRANO *et al.*,

1995), 5-HT_{2C} (FUJII *et al.*, 1997; SOMBOONTHUM *et al.*, 1997; ZHELYAZKOVA-SAVOVA *et al.*, 1997), 5-HT₃ (CONSOLO *et al.*, 1994) e 5-HT₄ (CONSOLO *et al.*, 1994; YAMAGUCHI *et al.*, 1997; NAIR; GUDELSKY, 2005) estimulam a liberação de ACh tanto no córtex como no hipocampo. Parece haver um consenso entre os estudos que utilizam MD de que antagonistas dos receptores α_2 noradrenérgicos aumentam a ACh liberada no córtex e que agonistas α_2 diminuem seus níveis basais (ACQUAS *et al.*, 1998; TELLEZ *et al.*, 1999).

Neurotransmissores aminoácidos como GABA e glutamato (DEL ARCO; MORA, 2005) também exercem atividade sobre os neurônios colinérgicos presentes no córtex, hipocampo e amígdala. Estudos de MD sugerem que o GABA inibe a liberação de ACh nessas regiões (GIOVANNINI *et al.*, 1994; MOOR *et al.*, 1998) e que moduladores alostéricos como benzodiazepínicos (IMPERATO *et al.*, 1993a; MOOR *et al.*, 1998) e neuroesteróides (RHODES *et al.*, 1997; PALLARES *et al.*, 1998;) atuam da mesma maneira. Com relação aos efeitos de drogas glutamatérgicas sobre a ACh cortical e hipocampal, depende do tipo de receptor sob o qual essas drogas atuam e a via de administração (DAY *et al.*, 2001). Além dos neurotransmissores clássicos, outras substâncias mostraram atividade sobre os neurônios colinérgicos presentes no córtex, hipocampo e amígdala, estimulando a liberação de ACh ou afetando os níveis basais. Essas substâncias incluem adenosina (KUROKAWA *et al.*, 1996), glicose (RAGOZZINO *et al.*, 1996; KOPF *et al.*, 2001), histamina (BLANDINA *et al.*, 1996), opióides (HIRAMATSU *et al.*, 1998), citocinas (RADA *et al.*, 1991), canabinóides (GESSA *et al.*, 1998), galanina (OGREN *et al.*, 1996) e corticosterona (IMPERATO *et al.* 1989; DAY *et al.*, 1997).

Um outro enfoque mais recente, utilizando MD cerebral, está relacionado com a complementação de experimentos eletrofisiológicos e análises de eletroencefalograma que investigam e caracterizam as terminações colinérgicas envolvidas com o estado de sono/vigília (LEONARD; LYDIC, 1997; MORTAZAVI *et al.*, 1999; CROUZIER *et al.*, 2006). Os resultados obtidos mostraram que a liberação de ACh aumenta no prosencéfalo durante períodos de atividade (WATANABE *et al.*, 1990) em comparação com os níveis durante sono de ondas lentas. Também foi mostrado um aumento

considerável em ratos durante a fase escura do ciclo claro/escuro (MIZUNO *et al.*, 1991; MITSUSHIMA *et al.*, 1996). Até o momento, os dados encontrados sugerem que a liberação de ACh normalmente aumenta durante estados de alerta (DAY *et al.*, 2001).

GABA e Glutamato

Glutamato e GABA são os principais neurotransmissores excitatórios e inibitórios, respectivamente, porém a origem dos seus níveis extracelulares permanece ainda incerta (TIMMERMAN; WESTERINK, 1997). Ao contrário de neurotransmissores como dopamina e acetilcolina, as concentrações extracelulares de glutamato e GABA medidas por MD cerebral, não fornecem um índice confiável de sua liberação, devido a sua rápida remoção e difusão limitada na fenda sináptica (DEL ARCO *et al.*, 2003; DREW *et al.*, 2004; FILLENZ, 2005).

Glutamato e GABA podem ter origem sinaptossomal (níveis sinápticos) ou não neuronal (níveis extrasinápticos), como carreadores ou metabolismo das células da glia, que parece ser a responsável pelos níveis basais desses aminoácidos (TIMMERMAN; WESTERINK, 1997). É importante conhecer estas duas fontes de liberação (sináptica e extrasináptica), pois há evidências de que os receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos conseguem distinguir entre o glutamato liberado na sinapse e o extrasináptico (NUSSER *et al.*, 1994), e os receptores NMDA parecem possuir rotas de ativação diferentes nos mecanismos de morte e sobrevivência das células neuronais, quando estimulados pelo glutamato neuronal ou extraneuronal (HARDINGHAM; BADING, 2003).

A MD cerebral, combinada com as técnicas de eletroforese capilar e fluorescência, tem sido utilizada para monitorar os níveis extracelulares de aminoácidos, na tentativa de entender o seu mecanismo de liberação (FILLENZ, 2005). Os níveis basais, tanto de GABA como de glutamato são, virtualmente, TTX e cálcio independentes. Alguns trabalhos mostraram que nem a adição de TTX, nem a diminuição do Ca^{2+} extracelular tiveram efeito sob os níveis extracelulares de glutamato (MIELE *et al.*, 1996a; TIMMERMAN; WESTERINK, 1997) e GABA (BIGGS *et al.*, 1995; TIMMERMAN; WESTERINK, 1997).

Trabalhos com manipulação comportamental ou farmacológica apresentam resultados contraditórios quanto à origem dos aminoácidos. Num estudo, o estresse por contenção durante 20 minutos, produziu um aumento nos níveis de glutamato em ratos que foi abolido pela infusão de TTX (MOGHADDAM, 1993). De maneira similar, um trabalho mostrou que os níveis basais de GABA no NAc aumentaram duas vezes após a retirada de cocaína usada cronicamente e que essa elevação foi bloqueada pela adição de TTX (provando a origem sináptica) (XI *et al.*, 2003). Um outro estudo demonstrou aumento dos níveis de GABA e glutamato no hipocampo de ratos durante a atividade exploratória. O aumento nesses neurotransmissores foi completamente abolido com a adição de TTX (1 mM). No entanto, em outro trabalho, a indução de comportamento de auto limpeza em ratos produziu um lento e duradouro aumento no glutamato estriatal que foi insensível à infusão de TTX (MIELE, 1996b; BIANCHI *et al.*, 2003).

A microdiálise tem sido uma ferramenta importante em estudos envolvendo a relação entre GABA e glutamato e outros sistemas de neurotransmissores principalmente dopaminérgico (YAMAMOTO *et al.*, 1994; ABEKAWA *et al.*, 2000) e os resultados obtidos sugerem que existem complexas interações entre os sistemas GABAérgico, dopaminérgico e glutamatérgico no cérebro de ratos (HERNANDEZ *et al.*, 2003).

Serotonina

Serotonina (5-HT) está envolvida em varias funções mediadas pelo SNC como, dormir, acordar, alimentar-se, atividades motoras e resposta ao estresse. Para esclarecer exatamente sua função fisiológica e comportamental, estudos utilizando MD cerebral *in vivo* têm se preocupado em investigar as condições sob as quais a liberação de serotonina é alterada.

Os níveis extracelulares de serotonina já foram monitorados em mais de 15 regiões do cérebro de ratos, durante uma grande variedade de estudos comportamentais e aplicações de estímulos aversivos. A maioria desses estudos encontrou aumento (30-100%) na liberação de 5-HT em quase todas as regiões

estudadas. Estudos eletrofisiológicos mostraram que o comportamento de alerta/atenção é determinante na atividade serotoninérgica central, sugerindo que o aumento de 5-HT encontrado na grande maioria dos estudos comportamentais, deve-se principalmente ao comportamento de alerta associado à manipulação do animal (RUETER *et al.*, 1997).

Apesar disso, a grande maioria dos estudos de microdiálise envolvendo o sistema serotoninérgico objetiva o entendimento da neuromodulação causada por fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) para tratamento da depressão e compreender a patofisiologia desta doença. Estudos comportamentais, eletrofisiológicos e de microdiálise mostraram que os receptores de serotonina, principalmente os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}, desempenham um papel chave na modulação da atividade antidepressiva (ADELL; ARTIGAS, 1991; RUTTER *et al.*, 1995; HJORTH *et al.*, 2000; BOURIN *et al.*, 2002).

Dopamina

A análise dos níveis extraneuronais de dopamina através da microdiálise cerebral é, sem dúvida, a maior aplicação da MD cerebral. Uma busca no banco de dados PubMed, de 2000 até agora, utilizando como palavras chave *dopamine and microdialysis* resultou em 999 artigos. Limitando a busca por revisões publicadas nos últimos cinco anos, utilizando as mesmas palavras chave, o número reduz para 33 (<<http://www.pubmed.gov>>). De uma maneira bastante abrangente, estes trabalhos dividem-se em estudos que visam compreender a anátomo-fisiologia das vias dopaminérgicas, identificar a origem da dopamina liberada, monitorar alterações nos níveis de DA correlacionando com mudanças comportamentais e compreender os mecanismos de ativação farmacológica.

A dopamina mensurada por MD é de origem neuronal, que também é responsável pela manutenção dos níveis cerebrais basais (KUCZENSKI *et al.*, 1991; SAIGUSA *et al.*, 2001). Isso foi demonstrado em estudos, nos quais a liberação de DA foi completamente abolida pela adição de TTX (HEERINGA; ABERCROMBIE, 1995; FEENSTRA; BOTTERBLOM, 1996; ELVERFORS *et al.*, 1997; REMBLIER *et al.*, 1999)

ou retirada de Ca^{2+} (KALIVAS; DUFFY, 1991; YOSHIMOTO *et al.*, 1997) do líquido de perfusão. Alguns trabalhos envolvendo MD concluíram que a dopamina extracelular não provém somente da região terminal dos neurônios dopaminérgicos, mas também dos dendritos dessas células (liberação somatodendrítica). WESTERINK e colaboradores (1992) realizaram um estudo, no qual foram implantadas duas sondas em regiões distintas (substância negra e estriado) do cérebro dos animais. Estes autores demonstraram que a liberação somatodendrítica e a liberação terminal neuronal variam de uma maneira impulso-dependente. Um estudo mais recente confirmou a liberação somatodendrítica dos neurônios dopaminérgicos através de lesão feixe prosencefálico medial causada pela perfusão de 6-OHDA (SARRE *et al.*, 2004). Os autores pontuam que a membrana somatodendrítica possui propriedades eletrofisiológicas únicas e que os neurônios dopaminérgicos apresentam canais de Ca^{2+} de limiares baixo e alto, que são ativados independentemente dos canais de Na^+ (HOUNSGAARD *et al.*, 1992).

O sistema dopaminérgico, assim como os outros sistemas, sofre influência de outros neurotransmissores. Desse modo, com a MD cerebral pode-se investigar a maneira como isso acontece nas mais diversas regiões do cérebro. Estudos farmacológicos procurando conhecer os diferentes mecanismos de ativação/inibição dos tipos de receptores de DA e a interação entre o sistema dopaminérgico e os outros sistemas de neurotransmissores, representam uma parte importante dos estudos realizados atualmente envolvendo o sistema dopaminérgico e MD cerebral (KOELTZOW *et al.*, 1998; SCHWARTZ *et al.*, 2000; JOYCE, 2001; ZAPATA *et al.*, 2001; HERNANDEZ *et al.*, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2003; STEINIGER; KRETSCHMER, 2003; DELARCO; MORA, 2005; ROSSI *et al.*, 2005; SEGOVIA; MORA, 2005; ZAPATA; SHIPPENBERG, 2005).

Entre as principais aplicações da MD no estudo do sistema dopaminérgico e distúrbios relacionados, está o estudo dos substratos neurais da drogadição. A DA está diretamente relacionada com o mecanismo do vício, não somente como substrato do sistema de recompensa, mas também como uma substância implicada no aprendizado e neuroadaptação (DI CHIARA *et al.*, 2004). As drogas de abuso preferencialmente aumentam os níveis extracelulares de DA no núcleo acumbens comparado com o

estriado (IMPERATO; DI CHIARA, 1986; CARBONI *et al.*, 1989) e no núcleo acumbens o aumento acontece mais visivelmente na região conhecida como *shell* (TANDA *et al.*, 1997; CADONI *et al.*, 2005).

A maioria dos estudos de MD cerebral é realizada para monitorar os níveis de DA liberados na fenda sináptica após a administração principalmente de cocaína (FUCHS *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006); seguido de etanol (MELENDEZ *et al.*, 2005; HALLADAY *et al.*, 2006; MATHEWS *et al.*, 2006) e nicotina (JANHUNEN *et al.*, 2005; SHEARMAN *et al.*, 2005; QUARTA *et al.*, 2006). Estudos mais recentes investigam o envolvimento do metilenedióximetanfetamina (*ecstasy*) (COLADO *et al.*, 2001; GOUGH *et al.*, 2002; CADONI *et al.*, 2005; GALINEAU *et al.*, 2005) e dos canabinóides, principalmente Δ -9-THC (TANDA *et al.*, 1999; PISTIS *et al.*, 2002) com o sistema dopaminérgico, utilizando animais conscientes.

Existem dados que mostram que a dopamina facilita o comportamento sexual masculino em todas as espécies, incluindo roedores e humanos (BOWERS *et al.*, 1971). A MD tem sido utilizada como ferramenta para o estudo da relação entre os neurônios dopaminérgicos e o comportamento sexual masculino (PFAUS *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 2006) e feminino (JENKINS; BECKER, 2003). Através dessa técnica é possível examinar qual receptor ou subtipo de receptor está envolvido na cópula e motivação sexual. Também é possível monitorar as mudanças extraneuronais de DA antes, durante e depois da cópula (DOMINGUEZ; HULL, 2005)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Implementar no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS a técnica de microdiálise cerebral em ratos conscientes.

3.2 Objetivos Específicos

- Validar metodologia analítica para doseamento de dopamina e de seus metabólitos 3 – metoxitiramina, ácido 3,4 - diidroxifenilacético e ácido homovanílico em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico.
- Validar a técnica de microdiálise cerebral através do doseamento de dopamina e seus metabólitos 3 – metoxitiramina, ácido 3,4 – diidroxifenilacético e ácido homovanílico na região do estriado de ratos conscientes tratados com sulfato de amfetamina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 60-90 dias, pesando de 250 a 350 g, procedentes da colônia da FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde e do Biotério Central da UFRGS. Antes dos experimentos, os animais foram ambientados por 72h no Biotério de passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS e mantidos em caixas plásticas com, no máximo, cinco animais. Os animais tiveram livre acesso à água e ração (Nuvolab-CR1[®]) e o ambiente teve umidade monitorada e temperatura controlada (23 ± 2 °C). Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12h (07 às 19h).

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para experimentação animal relatados por Goldim (1995), as normas do Conselho Canadense de Cuidados com Animais (CCAC, 2003), do Centre National de la Recherche Scientifique da França (CNRS, 2000) e da Resolução número 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASIL, 2002). Imediatamente após a finalização do experimento, o animal foi sacrificado pelo método da decapitação por guilhotina e o seu cérebro retirado para posterior análise histológica. Cada animal foi sacrificado isoladamente e a guilhotina e o ambiente foram limpos entre um animal e outro. A carcaça animal foi acondicionada em embalagem plástica branca apropriada e conservada em freezer a -20 °C até ser recolhida pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Porto Alegre. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (CEP/UFRGS, nº. 2005440) (Anexo 1).

4.2 Drogas, Fármacos, Solventes e Reagentes

Sulfato de anfetamina (Sigma, EUA); hidrato de cloral (Fluka, Alemanha); cloridrato de lidocaína 2% / epinefrina 1:50.000 (Lidostesin[®], Proben, Brasil); cloreto de cálcio e cloreto de potássio (ambos Fisher Scientific, EUA); cloreto de magnésio e

cloreto de sódio (ambos Acros Organics, EUA); ácido perclórico e hidrocloreto de cisteína 99% (ambos Acros Organics, EUA), todos em grau farmacêutico. Fosfato de potássio monobásico e EDTA (ambos Fisher Scientific, EUA); metanol e ácido heptanosulfônico (Acros Organics, EUA); ácido homovanílico 98%, ácido 3,4 – dihidroxifenilacético 98% e 3-metoxitiramina (Acros Organics, EUA) e hidrocloreto de dopamina 98,5% (Alfa Aesar, EUA); todos em grau CLAE.

4.3 Equipamentos

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Japão), Detector Eletroquímico (Antec Leyden, Holanda), Estereotáxico (ASI Instruments, EUA), Controlador de Temperatura Animal (FHC Inc., EUA), Sistema de Microdiálise (BAS Bioanalytical Systems), Criostato (Leika) e Bomba de infusão (BAS Bioanalytical Systems), Microscópio óptico (Olympos, EUA), Microcâmera (Sony CCD-IRIS)

4.4 Procedimento de Microdiálise (MD) Cerebral

4.4.1 Cirurgia para implantação da guia de sonda de microdiálise

Foi implantada uma guia de sonda de microdiálise cerebral no estriado dos animais, utilizando-se a técnica cirúrgica estereotáxica conforme descrito por COOLEY E VANDERWOLF (1990). Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram levados ao laboratório e aclimatados por 1 h até serem anestesiados com hidrato de cloral (400 mg/kg, i.p.). A implantação da guia de sonda (CMA/11 - 14 mm) foi realizada de acordo com as coordenadas definidas pelo Atlas de Anatomia Cerebral de Ratos de PAXINOS e WATSON (1998): Estriado (Anterioridade: -0,3; Lateralidade: + 3,2; Profundidade: - 4,5). Após a cirurgia, os animais voltaram ao biotério, onde ficaram em recuperação em caixas individuais e com água e comida “*ad libitum*”, por 48 horas, até o dia da realização da microdiálise propriamente dita. Durante o período de recuperação, os animais foram cuidadosamente observados para sinais de sofrimento excessivo ou

infecção. Caso isso fosse verificado, seriam sacrificados em câmara de CO₂ e desconsiderados do experimento.

Verificação do local de implantação da guia sonda de microdiálise:

Ao final do experimento, o animal foi sacrificado pelo método de decapitação por guilhotina para a retirada do cérebro, que foi congelado (-80 °C) e posteriormente seccionado (secções coronais de 25 µm) em criostato (-20 °C). Os cortes foram fixados em lâminas gelatinizadas e corados segundo a técnica histológica de cresil-violeta (PIERCE; KALIVAS, 1995; PORRAS *et al.*, 2002).

As lâminas foram mergulhadas em uma solução de cresil-violeta (cresil-violeta 5%, acetato de sódio 1%, pH 3,5) por 10 minutos. Após este período, elas foram colocadas por 5 segundos em dois banhos consecutivos de água e álcool 50% para retirada do excesso do corante. Depois deste processo, os cortes foram desidratados através de banhos em uma solução alcoólica 95% por 3 min, seguido de álcool absoluto (100%) por mais 3 min. Para a fixação do corante e conservação das lâminas, estas foram colocadas em um banho contendo metilciclohexano por 5 min. Os cortes foram fixados entre lâmina e lamínula com resina de Damar[®].

O local de inserção da guia de sonda de microdiálise (Figura 1.3) foi determinado de acordo com o Atlas de anatomia cerebral de ratos de Paxinos e Watson (1998), com auxílio de um analisador de imagens (Image Pro-Plus, versão 4.5, Media Cybernetics[®]). Os animais nos quais a guia de sonda não foi corretamente implantada foram descartados do experimento.

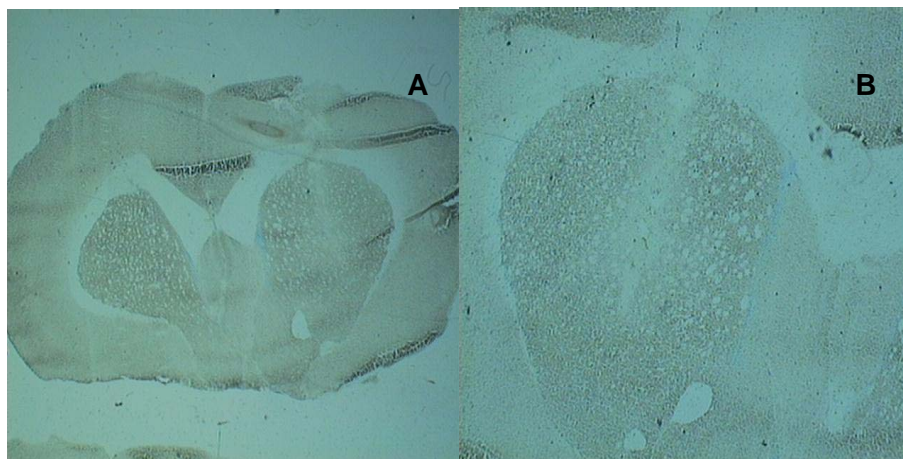


Figura 1.3 (A) Corte em criostato (30 μm) mostrando o local de inserção da sonda de MD no estriado. (B) Detalhe ampliado do mesmo corte, mostrando a cicatriz deixada pela guia de sonda.

4.4.2 Composição do líquido cerebrospinal artificial (LCA)

A composição final do LCA utilizado para perfusão do sistema de microdiálise foi de (em mM): NaCl 145; KCl 2,7; CaCl_2 1,2; MgCl_2 1. Esta solução foi preparada no dia do experimento através da retirada de uma alíquota para diluição (20x) a partir de uma solução estoque (NaCl 2,9 M; KCl 54 mM; CaCl_2 24 mM; MgCl_2 20 mM), conservada sob refrigeração constante (4 $^{\circ}\text{C}$). Antes de sua utilização o LCA foi filtrado em membrana de 0,45 μm (Millipore) e o pH ajustado para 7,4 com NaOH 0,1 M.

4.4.3 Procedimento de microdiálise

No dia do experimento de microdiálise, a sonda foi colocada (CMA/11, 3mm, 6 kDa, cut-off), através da guia de sonda anteriormente implantada. Depois da colocação o animal permaneceu em repouso por trinta minutos, após o que este foi conectado ao sistema de MD e se iniciou a perfusão (1 $\mu\text{L}/\text{min}$) com LCA. A primeira hora de perfusão com LCA serviu para a estabilização do animal no sistema. Dessa forma, o dialisado não foi coletado a fim de que o animal se adaptasse ao equipamento e o microambiente em torno da sonda se estabilizasse (FOSBRAEY, 1993; DALLEY; STANFORD, 1995). Após este período, foram coletadas 3 (três) amostras de 20 μL , em intervalos de vinte minutos, por 1h, para determinação dos níveis basais de DA e seus metabólitos. A

média destas três amostras foi considerada como valor basal. Em seguida, foram administrados os tratamentos e amostras do dialisado foram coletadas em intervalos de 20 (vinte) minutos.

As amostras foram coletadas em tubos do tipo eppendorf de 200 μ L (Labcon, EUA) contendo 10 μ L da solução de conservação composta de cisteína 0,1% e ácido perclórico 0,1 N (para impedir a degradação de dopamina e seus metabólitos), mantidas ao abrigo da luz e imersas num recipiente contendo gelo picado até o final do procedimento, quando foram armazenadas em freezer à -80°C até o momento da análise em CLAE-DE.

4.4.4 Taxa de recuperação das sondas de microdiálise:

Para uma estimativa da eficiência das sondas, foi utilizado o método de recuperação *in vitro*, proposto por DI CHIARA e colaboradores (1993) e CADOGAN E MARSDEN (1997), onde $C_{\text{INLET}} = 0$ e C_{α} é um valor fixo. Esse procedimento foi realizado após a sonda de microdiálise ter sido utilizada em cinco animais.

A sonda foi inserida em um tubo de microcentrífuga contendo uma solução de LCA e ácido perclórico 15 mM (VIRAG; WHITTINGTON, 2002) e DA, HVA, DOPAC e 3-MT na concentração de 20 pg/ μ L e perfundida (1 μ L/min) durante 1 h para estabilização da mesma. Após esse período 4 (quatro) amostras de 20 μ L foram coletadas a cada 20 minutos e congeladas para posterior análise. Todo o sistema foi mantido em temperatura média de 25 $^{\circ}\text{C}$. A taxa de recuperação de cada sonda de microdiálise, em percentagem, foi calculada conforme Equação (1). A taxa de recuperação média das sondas de microdiálise foi de 9,5 % para DOPAC; 18,0 % para DA; 9,1 % para HVA e 22,2 % para 3-MT. Estes valores estão dentro da faixa individual para cada composto encontrada na literatura, 3,5 – 37 % (ZETTERSTRÖM *et al.*, 1983; KUCZENSKI *et al.*, 1991; GLICK *et al.*, 1994; GERHARDT; MALONEY, 1999), apesar de um estudo ter alcançado uma recuperação de 60% para DA (PARSONS *et al.*, 1991).

Os dados de recuperação não foram considerados no cálculo para quantificação das amostras.

4.5 Desenvolvimento de metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico (CLAE-DE)

4.5.1 Condições Cromatográficas

A fase móvel foi composta de: KH_2PO_4 64,5 mM, EDTA 1 mM, metanol 1,58 M e ácido heptanosulfônico 0,8 mM diluídos em qsp 1 L de água miliQ. O pH foi ajustado para 3,4 utilizando HCl 0,1 N e 0,01 N. A solução foi preparada somente no dia da análise, filtrada em membrana 0,45 μm (Millipore) e desgaseificada por 30 minutos antes do uso.

O sistema de CLAE utilizado para quantificar as amostras consistiu de uma bomba isocrática modelo LC-10ADVp (Shimadzu, Japão), um autoinjeter modelo SIL-10ADVP (Shimadzu, Japão) e um detector amperométrico DECADE (Antec Leyden, Holanda). O modelo de célula eletroquímica utilizado foi VT-03 (Antec Leyden, Holanda) contendo como eletrodo de trabalho *glassy carbon* (3 mm) e eletrodo de referência de Ag/AgCl. O potencial de trabalho foi ajustado em +0,8 V e a sensibilidade do detector eletroquímico entre 1-5 nA. Para a aquisição e integração dos picos foi utilizado o programa CLASS-VP, versão 6.12 (Shimadzu, Japão).

A separação dos analitos foi feita por meio de uma coluna do tipo C18 *microbore* (2 x 150 mm, 3 μm , ESA, EUA), fase reversa, com fluxo da fase móvel de 0,2 mL/min. Foi utilizado o sistema de injeção automático, com a temperatura do carrossel contendo as amostras de 4 °C e do forno onde se encontravam a coluna e a célula eletroquímica, de 30 °C. Os volumes de injeção variaram de 5 – 30 μL e o tempo total de corrida foi de 50 minutos.

4.5.2 Preparação das Soluções Padrão e Controles de Qualidade

Para as curvas de calibração foi preparada uma solução estoque na concentração de 1 mg/mL de DA, DOPAC, HVA e 3-MT em Líquido Cerebroespinal Artificial contendo 15 mM de ácido perclórico. Alíquotas de 20 μL foram retiradas e congeladas a – 80 °C até o momento de uso. No dia do experimento as alíquotas foram descongeladas e pipetados 10 μL de cada alíquota que foram diluídos em 5 mL de LCA

contendo ácido perclórico 15 mM, resultando numa única solução contendo todos os analitos na concentração de 2 µg/µL. Em seguida uma alíquota de 25 µL dessa solução foi retirada e diluída em LCA até um volume final de 1 mL, obtendo-se uma solução na concentração de 50 pg/µL. Desta solução foram retiradas alíquotas para se obter soluções nas concentrações finais da curva padrão: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 pg/µL.

As amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas de forma semelhante, a partir de novas alíquotas da solução-mãe, obtendo-se concentrações finais de 5,0; 10,0 e 18,0 pg/µL.

Para a determinação da seletividade, as amostras de dialisado obtidas experimentalmente foram descongeladas somente no dia da análise e não sofreram qualquer tipo de tratamento prévio antes da injeção no equipamento.

4.5.3 Validação da Metodologia Analítica por CLAE-DE

A metodologia analítica foi validada através da avaliação da linearidade, seletividade, repetibilidade (DPR intradia), precisão intermediária (DPR interdia), exatidão e limite de quantificação. Todos esses parâmetros foram avaliados por meio de curvas padrão e controles de qualidade, de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), métodos bioanalíticos. A validação também foi baseada no trabalho de VIRAG E WHITTINGTON (2002) que descreveu a metodologia empregada e os parâmetros eleitos para serem validados.

A análise da linearidade do método foi avaliada pela preparação, em triplicata, e respectiva determinação dos sete níveis de concentrações da curva padrão (2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0; 16,0 e 20,0 pg/µL), por três dias consecutivos. Por meio da análise de regressão simples foram obtidas equações de reta que representaram todas as curvas padrão, determinando-se o coeficiente de correlação linear. Para verificar o desvio da linearidade foi aplicada a estatística ANOVA para os pontos analisados na curva. A exatidão e a precisão do método foram demonstradas por meio da preparação de seis amostras de cada um dos três níveis de concentração correspondentes aos controles

de qualidade CQ1, CQ2 e CQ3 (5,0; 10,0 e 18,0 pg/ μ L, respectivamente). Este procedimento foi realizado a cada dia, por três dias consecutivos e ao final determinaram-se os coeficientes de correlação intra e interdia.

A seletividade do método foi estabelecida mediante a obtenção de cromatogramas de preparações contendo somente LCA, padrões de DA, DOPAC, HVA e 3-MT e de dialisados obtidos experimentalmente. Estes cromatogramas foram analisados com relação à existência de picos (interferentes) nos tempos de retenção de DA ou de algum de seus metabólitos, a fim de avaliar a presença de compostos interferentes.

O Limite Inferior de Quantificação C_{LIQ} (LIQ) foi calculado como sendo a concentração do analito (C_A) que resulta em um sinal (S) três vezes maior do que o desvio padrão da linha de base (δ_{noise}), segundo a Equação 3 (VIRAG; WHITTINGTON, 2002).

$$C_{LIQ} = \frac{3\sigma_{noise}}{S} \times C_A$$

Equação 3

Onde δ_{noise} determinado como sendo 0,2 x a razão amplitude/ruído.

4.6 Validação da técnica de microdiálise cerebral

Para validação da técnica de microdiálise cerebral foi avaliado o efeito da administração de sulfato de anfetamina sobre os níveis de DA e seus metabólitos no estriado, pois a anfetamina estimula a liberação e inibe a recaptção de dopamina. Um grupo de animais ($n = 12$) foi tratado com sulfato de anfetamina (2 mg/Kg, s.c.) e o grupo controle ($n = 12$) recebeu solução salina (NaCl 0,9 %, 1 mL/kg), pela mesma via (volume máximo de administração de 0,3 mL). Os animais passaram pelo procedimento de microdiálise conforme descrito no item 4.4.3. Após a coleta das amostras para

determinação dos níveis basais, os dialisados foram coletados em intervalos de 20 minutos, durante as 2 h seguintes, totalizando 9 amostras.

Para cada tratamento foram operados 12 animais, sendo possível aproveitar um número final de 6 animais por grupo. Esta redução no número da amostra aconteceu devido aos seguintes fatores: verificação do local incorreto de inserção da guia de sonda no momento da análise histológica, perda da funcionalidade da sonda no experimento de microdiálise em si, morte do animal durante a cirurgia ou no pós-operatório. O índice de aproveitamento raramente é mencionado nos trabalhos publicados. BERT e colaboradores (2004) relataram um índice de 83%.

No dia da análise em CLAE-DE as amostras foram descongeladas e, com o auxílio de uma microseringa, tiveram seu volume real medido e foram transferidas para um *insert* de vidro (200 μ L, Waters, EUA) que foi colocado em um *vial* de vidro âmbar (1 mL, Waters, EUA). No início e final de cada corrida e a cada seis amostras foi inserida uma solução padrão contendo 20 pg/ μ L de DA, DOPAC, HVA e 3-MT, de modo que eram adicionadas três amostras padrões por corrida. Foi feita uma média entre a área do primeiro e segundo padrão, gerando o STD1, da mesma forma, uma média entre a área do segundo e terceiro, obtendo-se o STD2. Os valores de STD1 e STD2 foram inseridos na Equação 4 para a quantificação das amostras.

As áreas dos picos dos analitos de interesse (DA, DOPAC, HVA e 3-MT) foram anotadas e os dados foram plotados em planilhas de cálculos com o auxílio do programa Excel (Microsoft Office, Windows[®] 98) utilizando a Equação 4 para quantificar as amostras. A análise estatística foi feita através do programa Sigma Stat versão 2.03 (Jadel Scientific Corporation[®]), utilizando a estatística ANOVA de duas vias com medidas repetidas e o teste *post-hoc* de Tukey. O intervalo de confiança aceito foi de no mínimo 95% ($\alpha=0,05$).

$$C_{\text{analito}} = AA \times \left[\frac{\frac{\text{vol. med.}}{\text{vol. MD}}}{\frac{(\text{STD1} + \text{STD2})}{2}} \right] \times \left[\frac{\text{STD}}{\text{PMstd}} \right] \times 1000$$

Equação 4

Onde, *AA* é área do pico; *vol. med.* é o volume real medido na microsseringa; *vol. MD* é o volume teórico microdialisado (20 μ L); *STD1* e *STD2*, área do pico do padrão 1 e 2, respectivamente; *STD* concentração dos padrões na corrida e *PMstd* peso molecular do padrão correspondente (DA, DOPAC, HVA e 3-MT).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Validação da metodologia analítica por cromatografia líquida

A ausência de um grupo fluorescente e a presença de concentrações muito baixas nos fluidos biológicos torna os métodos analíticos fotométricos bastante limitados para o doseamento das catecolaminas e seus metabólitos (ZHANG; BEYER, 2006). O método analítico de escolha deve possuir capacidade de quantificar substâncias em concentrações baixíssimas (fM) em pequenos volumes de amostra.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico é a técnica de escolha (RAGGI *et al.*, 1999), considerada como um dos métodos mais populares para o doseamento das monoaminas, devido, principalmente, a sua versatilidade, alta sensibilidade e especificidade (BERGQUIST *et al.*, 2002; YOSHITAKE *et al.*, 2004; ZHANG; BEYER, 2006). O eluente que sai da coluna passa por uma célula eletroquímica localizada sob um eletrodo de *glassy carbon* e as substâncias são oxidadas na superfície do eletrodo, gerando uma corrente elétrica. A corrente elétrica produzida é convertida a um sinal de voltagem e enviada a um integrador. A resposta do detector é diretamente proporcional à quantidade de cada analito na amostra (CHENG; KUO, 1995; BERGQUIST *et al.*, 2002).

Outros métodos analíticos, menos usuais, podem ser utilizados para dosear os níveis das catecolaminas. O principal deles é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), porém há necessidade de fazer uma derivatização da amostra para tornar o analito volátil, adequado para análise. Outro método complementar a cromatografia líquida é a eletroforese capilar. Pode-se ainda submeter às amostras a um processo de derivatização, para acrescentar grupos que respondem ao detector de fluorescência (BERGQUIST *et al.*, 2002).

O método de quantificação por cromatografia líquida acoplada a detector eletroquímico, uma vez validado, apresenta-se como uma ferramenta analítica bastante sensível e adequada para análise de neurotransmissores no dialisado. Os parâmetros

tipicamente avaliados na validação de um método bioanalítico são: seletividade, linearidade, repetibilidade (DPR intradia), precisão intermediária (DPR interdía), exatidão e limite inferior de quantificação (BRASIL, 2003).

5.1.1. Validação da Metodologia por CLAE-DE

Seletividade

A seletividade é a habilidade de avaliar inequivocadamente o analito na presença de outras substâncias, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz biológica.

Nesse trabalho, esse parâmetro foi demonstrado, por meio da comparação dos cromatogramas representativos dos padrões de DA, DOPAC, HVA E 3-MT em LCA, somente de LCA e de dialisados obtidos experimentalmente (Figura 1.4). Considerando o cromatograma apresentado para o LCA, não foram observados interferentes nos tempos de retenção de nenhuma das substâncias pesquisadas. Da mesma forma, ao comparar o cromatograma referente a um ponto da curva padrão de DA e seus metabólitos com àquele referente à amostra de dialisado obtido experimentalmente após a administração de anfetamina, não se evidenciou a presença de nenhuma substância interferente.

Com relação à não visualização do pico correspondente ao metabólito 3-MT (55 min), curiosamente isso era, de certa forma, esperado. Por ser um metabólito intermediário oriundo apenas da degradação da dopamina liberada, a 3-MT encontra-se em concentrações muito baixas. DOPAC e HVA são metabólitos finais e provenientes tanto da dopamina liberada, quanto intraneuronal (COOPER *et al.*, 1996). Portanto, o método analítico (CLAE-DE) deve possuir alta sensibilidade capaz de detectar um sinal muito pequeno gerado pela oxidação dessa substância. A grande maioria dos artigos que utilizou o mesmo método analítico para o doseamento de DA e seus metabólitos, não mostrou os dados referentes a 3-MT.

O pico encontrado em aproximadamente 24 minutos, provavelmente seja o metabólito de serotonina, ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA), visto que a grande

maioria dos estudos que investigam o sistema dopaminérgico e seu metabolismo, também analisa o 5-HIAA. O sistema cromatográfico utilizado para separar DA e seus metabólitos propicia a separação deste composto. O tempo de retenção varia conforme as condições cromatográficas, mas normalmente ele aparece nos cromatogramas após a saída de DOPAC e DA e antes do HVA (LIU *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2004).

Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de fornecer resultados diretamente proporcionais às concentrações do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A faixa de concentração utilizada para a validação da curva padrão foi de 2,0 a 20,0 pg/ μ L. Esta faixa de concentração foi escolhida porque contempla os níveis basais de DA relatados na literatura (VIRAG; WHITTINGTON, 2002; YOSHITAKE *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2004; ZHANG; BEYER, 2006)

A média das curvas padrão de dopamina e seus metabólitos em LCA, utilizadas na validação da metodologia analítica por CLAE-DE está representada na Figura 1.5 com respectivas equações da reta e coeficiente de determinação (R^2).

1 1
2

3 3
4 4

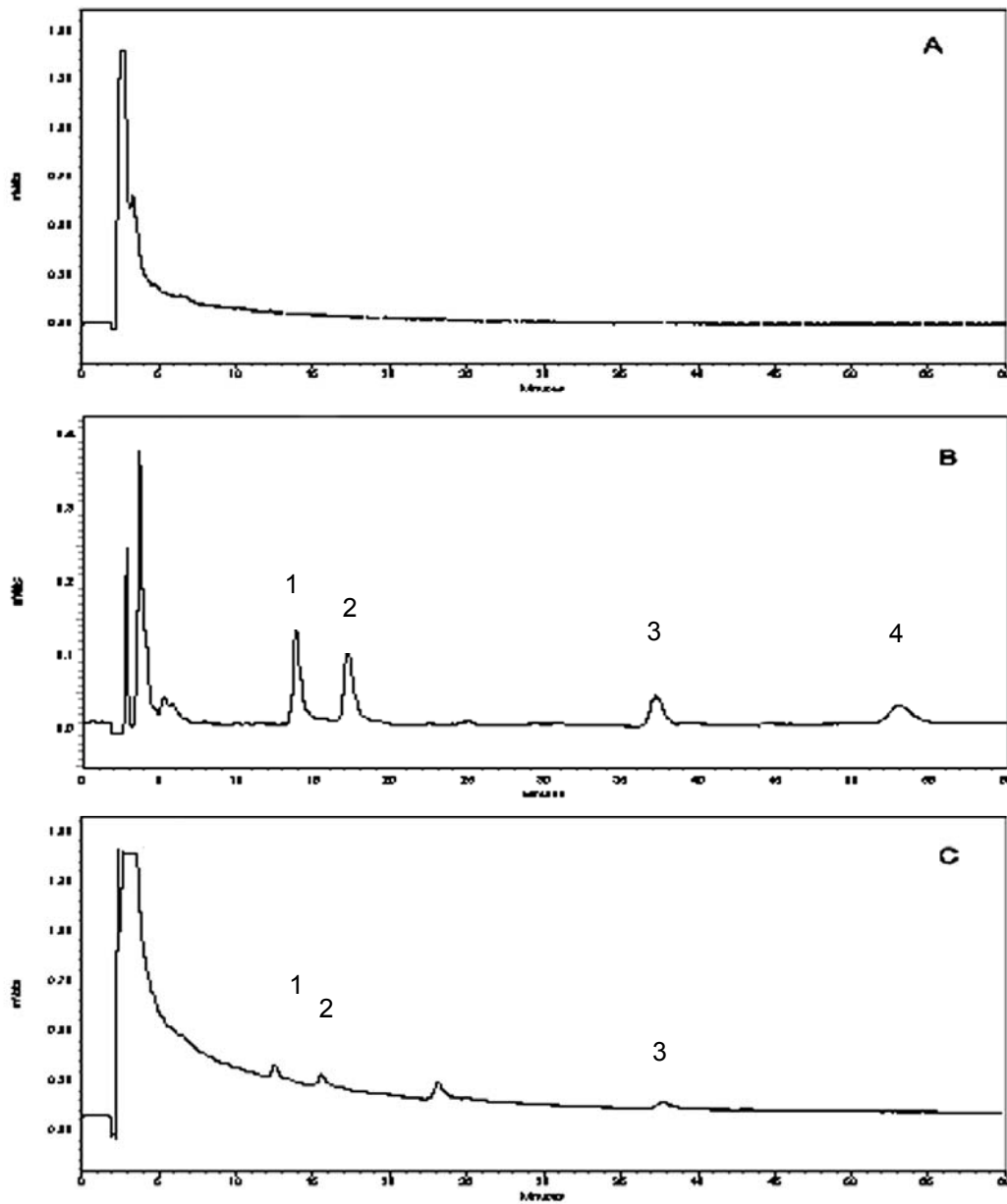


Figura 1.4 Cromatogramas obtidos por CLAE-DE. A) LCA; B) padrão de DA (2), DOPAC (1), HVA (3) e 3-MT (4) em LCA na concentração de 20 pg/ μ L; C) amostra de dialisado obtido experimentalmente de um animal tratado com anfetamina (2 mg/kg, s.c.).

Da mesma forma, foram calculados individualmente os coeficientes de determinação (R) para todas as curvas padrão em LCA empregadas na validação (Tabela 1.2). Os coeficientes de determinação obtidos, iguais ou superiores a 0,9883, indicam a linearidade entre a razão da área do analito e a concentração teórica deste

analito, tendo em vista que se aceita um valor de coeficiente de correlação linear superior a 0,95 para amostras biológicas (BRASIL, 2003). Não foi constatado desvio de linearidade no intervalo de concentração avaliado, o qual foi confirmado por análise estatística (ANOVA, $p < 0,001$).

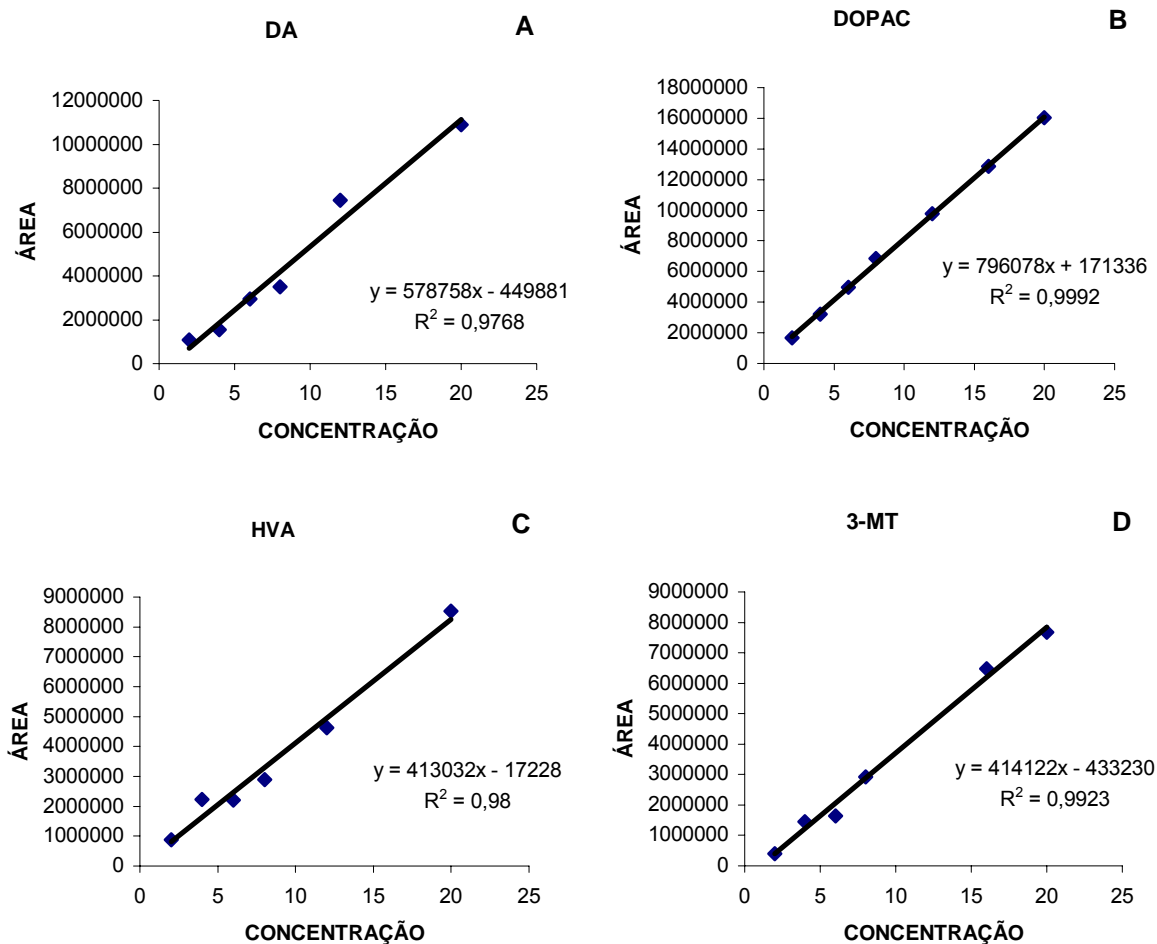


Figura 1.5 Média das três curvas padrão em LCA utilizadas na validação da metodologia por CLAE-DE para (A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA e (D) 3-MT.

Tabela 1.2 Coeficientes de determinação de DA, DOPAC, HVA e 3-MT, utilizados na validação da metodologia analítica por CLAE-DE.

Analito	Curva	Coeficiente de Determinação
	Dia 1	
DA		0,9917
DOPAC		0,9999
HVA		0,9908
3-MT		0,9941
	Dia 2	
DA		0,9952
DOPAC		0,9991
HVA		0,9912
3-MT		0,9970
	Dia 3	
DA		0,9883
DOPAC		0,9983
HVA		0,9899
3-MT		0,9961

Precisão

A precisão é o parâmetro que avalia o grau de concordância entre resultados de análises individuais, quando o método é aplicado repetidamente a múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea (BRASIL, 2003). Nesse contexto, a precisão foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (DPR intradia) e precisão intermediária (DPR interdia), empregando-se as três amostras definidas como controles de qualidade. Os valores de desvio padrão relativo (DPR) intradia e interdia obtidos para as três amostras de controles de qualidade da curva padrão para DA, DOPAC, HVA e 3-MT estão descritos nas Tabelas 1.3, 1.4, 1.5 e 1.6, respectivamente.

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2003), os desvios padrões relativos para a precisão não devem exceder 15%. Assim, pode-se observar que os valores encontrados (<12%) estão de acordo com o preconizado. Além do mais, os dados obtidos estão de acordo com estudos de validação semelhantes a este (LIU *et al.*, 2000; VIRAG; WHITTINGTON, 2002; ZHANG *et al.*, 2004).

Tabela 1.3 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de dopamina em LCA.

Concentrações dos CQs (pg/ μ L) para DA	Dia	Concentrações medidas *		
		Média (pg/ μ L)	DP	DPR (%)
Variação intradia				
5,0	1	5,35	0,1127	2,46
	2	5,14	0,2841	6,51
	3	5,25	0,1984	4,49
10,0	1	10,09	0,1689	1,87
	2	9,57	0,2972	3,38
	3	9,83	0,2330	2,66
18,0	1	19,88	0,8924	4,67
	2	17,58	0,5815	3,46
	3	18,73	0,7369	4,07
Variação interdia				
5,0		5,25		3,26
10,0		9,85		4,34
18,0		18,73		9,05

* Valores (média e desvio padrão, DP) para n = 6 determinações.

Tabela 1.4 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de DOPAC em LCA.

Concentrações dos CQs (pg/ μ L) para DOPAC	Dia	Concentrações medidas *		
		Média (pg/ μ L)	DP	DPR (%)
Variação intradia				
5,0	1	6,09	0,2084	4,13
	2	5,55	0,4019	8,93
	3	5,70	0,1611	3,46
10,0	1	11,52	0,2506	2,39
	2	10,24	0,2596	2,82
	3	9,82	0,2111	2,41
18,0	1	21,58	0,3567	1,74
	2	16,08	0,3859	2,57
	3	15,92	0,3755	2,53
Variação interdia				
5,0		5,78		5,90
10,0		10,52		9,34
18,0		16,00		0,79

* Valores (média e desvio padrão, DP) para n = 6 determinações.

Exatidão

A exatidão de um método analítico descreve a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo, em relação ao valor real de concentração do analito na amostra. Esse parâmetro pode ser avaliado por meio de amostras com quantidades conhecidas do analito em questão (BRASIL 2003).

Tabela 1.5 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de HVA em LCA.

Concentrações dos CQs (pg/ μ L) para HVA	Dia	Concentrações medidas *		
		Média (pg/ μ L)	DP	DPR (%)
Variação intradia				
5,0	1	4,47	0,2108	4,76
	2	4,71	0,3630	7,78
	3	4,60	0,2869	6,30
10,0	1	10,76	0,2756	2,57
	2	10,46	0,3026	2,91
	3	10,61	0,2990	2,74
18,0	1	18,19	0,5364	3,11
	2	17,79	0,3439	4,71
	3	17,99	0,4401	3,91
Variação interdia				
5,0		4,59		3,80
10,0		10,61		2,00
18,0		17,89		3,30

* Valores (média e desvio padrão, DP) para n = 6 determinações.

A Tabela 1.7 demonstra as faixas de concentração e as concentrações médias determinadas, bem como a exatidão em relação às concentrações teóricas das amostras de controle de qualidade utilizadas na validação dessa metodologia analítica.

A ANVISA (BRASIL, 2003) preconiza que a variação entre o valor real e o valor teórico das amostras deve manter-se em torno de 15% para um mínimo de 5 determinações. Pode-se observar que a exatidão calculada para as amostras não apresentou variação superior a 15%, o que indica que o método possui exatidão para a faixa de concentração empregada.

Tabela 1.6 Desvios padrões relativos intra e interdia das amostras de controle de qualidade para a curva padrão de 3-MT em LCA.

Concentrações dos CQs (pg/ μ L) para 3-MT	Dia	Concentrações medidas *		
		Média (pg/ μ L)	DP	DPR (%)
Variação intradia				
5,0	1	5,51	0,2376	9,19
	2	5,66	0,3312	8,88
	3	5,59	0,2844	9,04
10,0	1	9,95	0,4690	5,82
	2	9,85	0,1691	2,02
	3	10,05	0,3209	3,92
18,0	1	16,17	0,7006	4,51
	2	16,13	0,3817	3,01
	3	16,15	0,5517	3,76
Variação interdia				
5,0		5,72		1,80
10,0		9,95		2,12
18,0		16,04		0,24

* Valores (média e desvio padrão, DP) para n = 6 determinações.

Tabela 1.7 Exatidão das amostras de controle de qualidade utilizadas para a curva padrão de DA, DOPAC, HVA e 3-MT em LCA e as faixas de concentração determinadas com seus valores médios.

Concentração teórica (pg/ μ L)	Faixa de concentração determinada (pg/ μ L)	Média (pg/ μ L)	<i>D.P.</i>	Exatidão (%)*	
DA	5,0	4,71 – 5,52	5,25	0,23	94 – 110
	10,0	9,28 – 10,27	9,83	0,36	93 – 103
	18,0	17,01 – 20,63	18,73	1,40	94 - 115
DOPAC	5,0	5,29 – 6,35	5,78	0,28	106 – 115
	10,0	9,60 – 11,70	10,53	0,89	99 – 115
	18,0	15,66 – 21,13	17,86	3,22	88 – 115
HVA	5,0	4,18 – 5,13	4,58	0,31	85 - 103
	10,0	10,04 – 11,05	10,61	0,31	100 – 111
	18,0	17,33 – 18,89	17,99	0,47	96 – 105
3-MT	5,0	5,23 – 6,01	5,58	0,28	105 – 115
	10,0	9,31 – 10,52	9,90	0,34	93 – 105
	18,0	15,51 – 17,14	16,15	0,53	86 – 95

* n = 18 determinações

Limite Inferior de Quantificação

O limite inferior de quantificação (LIQ) é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser determinado com exatidão e precisão aceitável, sob as condições experimentais declaradas (BRASIL, 2003).

Neste trabalho, o LIQ foi calculado utilizando a equação retirada do trabalho de VIRAG E WHITTINGTON (2002) e do manual de instruções do detector eletroquímico

utilizado (DECADE, ANTEC LEYDEN, Holanda). A Tabela 1.8 mostra o LIQ calculado para DA, DOPAC, HVA e 3-MT.

O valor do LIQ encontrado para DA está de acordo com os resultados encontrados por outros estudos. Não existe uma uniformidade no cálculo do LIQ entre os estudos, porém, a Equação 3 apresentada neste trabalho parece ser a fórmula adotada pela maior parte dos estudos. O LIQ de DA e seus metabólitos varia bastante conforme o equipamento e condições cromatográficas de cada estudo. O LIQ de uma maneira geral fica em torno de 0,5 - 1,5 nM na maioria dos trabalhos encontrados (DI CHIARA *et al.*, 1993; PARSONS *et al.*, 1998; CARBONI *et al.*, 2001; VIRAG; WHITTINGTON, 2002; HERNANDEZ *et al.*, 2003; YOSHITAKE *et al.*, 2004). Porém, o recente estudo de CANNAZZA e colaboradores (2005) relatou um LIQ de 25 nM para DA.

Os valores do LIQ de DOPAC, HVA e 3-MT não são comumente citados nos trabalhos. ZHANG e colaboradores (2004) encontraram 0,3 nM para DOPAC e 1,25 nM para HVA. BROWN e colaboradores (1991) relataram o valor de 1,5 nM como sendo o LIQ de 3-MT. Já CANNAZZA e colaboradores (2005) encontraram valores superiores, 5 nM para DOPAC e 15 nM para HVA. Portanto, os valores encontrados neste trabalho para DA, DOPAC, HVA e 3-MT estão de acordo com a média geral dos dados encontrados na literatura.

Tabela 1.8 Valores de Limite Inferior de Quantificação para DA, DOPAC, HVA e 3-MT e diferentes unidades.

Analito	LIQ calculado (pg/ μ L)	LIQ calculado (nM)
DA	0,50	3,27
DOPAC	0,05	0,30
HVA	0,55	3,02
3-MT	0,70	3,44

5.2 Validação da técnica de Microdiálise Cerebral em animais conscientes

Para validar a técnica de microdiálise cerebral em animais conscientes, foi avaliado o efeito da administração de sulfato de anfetamina (2 mg/kg, s.c.), uma vez que este é um fármaco estimulante que promove a liberação de dopamina e, em menor grau, inibe a sua recaptção, através do bloqueio do seu transportador (STAHL, 2000; CARBONI *et al.*, 2001; HOFFMAN, 2001). A técnica foi escolhida baseada em evidências que mostraram que a anfetamina, assim como a cocaína, os analgésicos narcóticos e o etanol aumentam os níveis extracelulares de DA no núcleo acumbens e no estriado de ratos (ZETTERSTRÖM *et al.*, 1983; DI CHIARA *et al.*, 1993; PIERCE; KALIVAS, 1995).

O estriado foi a região escolhida para a validação da técnica por ser uma região equipada predominantemente com neurônios dopaminérgicos cuja organização funcional básica reflete a dinâmica encontrada em todos os neurônios dopaminérgicos (COOPER, 1996). Outro motivo da escolha foi devido a grande área que esta região representa no cérebro e ao fácil acesso para implantação das sondas (DAY, 2001).

Em termos percentuais, o grupo tratado com anfetamina apresentou um aumento de 260% ($\pm 34\%$) em relação aos níveis basais de DA ($F_{\text{fator tempo (6,78)}} = 3,206$; $p < 0,01$). (Figura 1.6). O aumento máximo dos níveis extracelulares de DA ocorreu 40 minutos após a administração do fármaco ($F_{\text{tratamento} \times \text{tempo (1,78)}} = 2,517$; $p < 0,05$) (Figura 1.6). Este dado está de acordo com a maioria dos estudos, onde o pico de liberação de DA ocorre entre 20-40 minutos e tende a voltar aos valores basais cerca de 120 minutos depois da administração de anfetamina (ZETTERSTRÖM *et al.*, 1983; BUTCHER *et al.*, 1988; DI CHIARA *et al.*, 1993; FERGUSON *et al.*, 2003). Os resultados de percentual de aumento de DA em relação aos níveis basais aqui apresentados são significativos, mas de magnitude um pouco inferior aos dados de literatura.

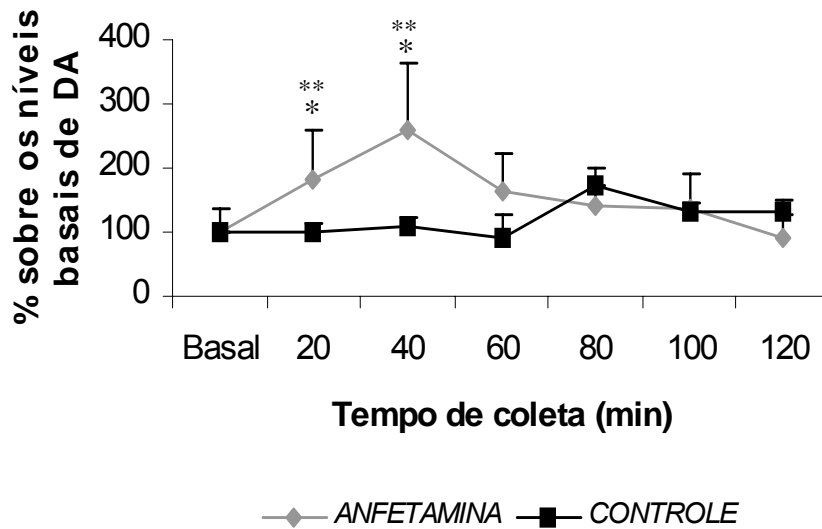


Figura 1.6 Média da porcentagem dos níveis extracelulares de DA (\pm erro padrão) após administração de sulfato de anfetamina (2 mg/kg, s.c.). Comparação entre os grupos controle (n = 6) e anfetamina (n = 6). Diferença significativa em relação aos valores basais (** $p < 0,01$) e com o grupo controle (* $p < 0,05$). ANOVA de dois fatores com medidas repetidas e teste *post-hoc* de Tukey.

LEWICKA e colaboradores (1995) encontraram um aumento de aproximadamente 500%, com a administração de 2 mg/kg de anfetamina pela via i.p.; DI CHIARA e colaboradores (1993) encontraram um aumento de mesma magnitude (500%), na DA extracelular no estriado de ratos tratados com a mesma dose de anfetamina, porém pela via s.c. Neste mesmo trabalho, no grupo de animais que recebeu uma dose menor de anfetamina (0,5 mg/kg, s.c.), o aumento de DA ficou em torno de 263 %.

Porém, outros estudos encontraram percentagens muito maiores de aumento. O trabalho de KUCZENSKI e colaboradores (1991) encontraram um aumento de 2930% na DA estriatal após a administração de 2,5 mg/kg, s.c. de anfetamina. ZETTERSTRÖM e colaboradores (1983) encontraram um aumento cerca de 14 vezes maior (1130%) do que o valor basal após a administração de anfetamina 2 mg/kg, s.c. Um outro estudo utilizando a mesma dose e mesma via encontrou um aumento de 912% (MIELE *et al.*, 2000). Um estudo mais recente relatou aumento de 1000% nos níveis extracelulares de DA similar aos trabalhos citados anteriormente (GAGNAIRE; MICILLINO, 2006).

Uma explicação para essa discrepância nos valores do aumento dos níveis de DA entre os trabalhos citados e os dados aqui apresentados, pode ser a diferença na concentração do íon cálcio presente no LCA. A liberação de dopamina nos terminais nervosos é dependente de íons cálcio e ocorre em resposta aos potenciais de ação (COOPER *et al.* 1996). Os valores fisiológicos de Ca^{2+} encontrados no estriado são de aproximadamente 1 mM e concentrações superiores tendem a aumentar a resposta do sistema dopaminérgico à manipulações farmacológicas (MOGHADDAM; BUNNEY, 1989; MATSUMOTO, 1993). A concentração de cálcio utilizada nos estudos citados acima está em torno de 2,2 mM, enquanto que neste trabalho foi utilizado a concentração de 1,2 mM, por ser mais próxima dos valores fisiológicos. Os valores encontrados pelos outros trabalhos provavelmente foram mais altos devido a maior concentração de cálcio no líquido de perfusão. Já foi relatado também que variações na composição do LCA, afetam os níveis de outras substâncias endógenas como a glicose, por exemplo. Essas alterações poderiam ser resultados de mudanças na atividade neuronal provocadas por diferenças na composição iônica do LCA (MCNAY; SHERWIN, 2004).

Os níveis extracelulares de DOPAC diminuíram cerca de 80% ($\pm 39\%$), em relação aos níveis basais ($F_{\text{tempo}(1,81)} = 25,686$; $p < 0,001$) (Figura 1.7) e esta redução foi significativa quando comparada com o grupo controle ($F_{\text{tratamento}(1,81)} = 11,621$; $p < 0,01$). Os níveis de HVA após a administração de anfetamina decresceram em 50% (Figura 1.8), porém esta redução não foi significativa, em função da grande variabilidade observada. Estes percentuais de queda já foram relatados por outros estudos. ZETTERSTRÖM e colaboradores (1983) encontraram uma diminuição semelhante nos níveis de DOPAC (77%) e HVA (60%). Um outro estudo encontrou queda de 30% para DOPAC e 50% para HVA após a administração de anfetamina 2,5 mg/kg, s.c. (KUCZENSKI *et al.*, 1991).

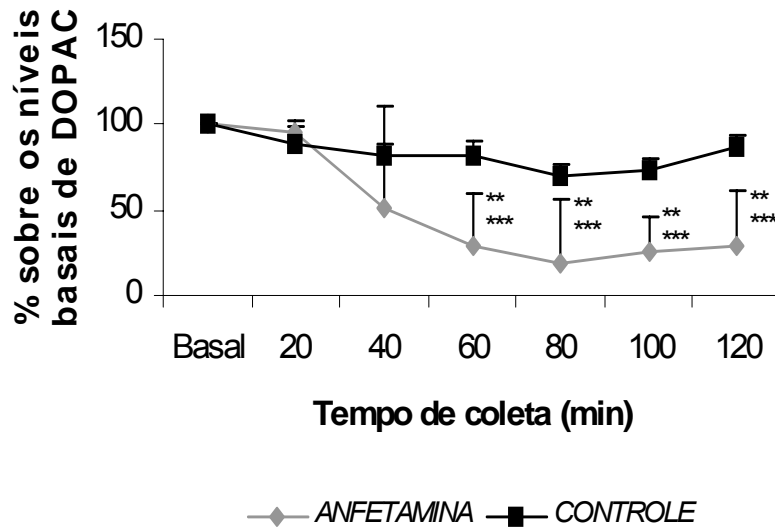


Figura 1.7 Média da porcentagem dos níveis extracelulares de DOPAC (\pm erro padrão) após administração de sulfato anfetamina (2 mg/kg, s.c.). Comparação entre os grupos controle ($n = 6$) e anfetamina ($n = 6$). Diferença significativa comparada com os valores basais (** $p < 0,001$) e com o grupo controle (** $p < 0,01$). ANOVA de dois fatores com medidas repetidas e teste *post-hoc* de Tukey.

Os resultados obtidos são compatíveis com o mecanismo de ação da anfetamina, relacionado com o processo de *turnover* da dopamina. Em condições fisiológicas normais, a DA liberada é captada da fenda sináptica e, ao entrar no citosol, a porção que não é novamente armazenada nas vesículas sinápticas é convertida em DOPAC pela enzima monoamino oxidase (MAO) intracelular. O DOPAC formado dentro do neurônio é liberado para o meio extracelular onde sofre ação da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT), de localização sináptica, formando um novo metabólito, chamado HVA. No cérebro de ratos, DOPAC é o principal metabólito encontrado, diferentemente do que acontece no cérebro de humanos e outros primatas onde HVA é o metabólito majoritário (COOPER *et al.*, 1996). A dopamina que não foi recaptada é metabolizada a 3-MT através de metilação seqüencial pela COMT e pela MAO existente nas células da glia, resultando também em HVA, provavelmente pela ação das mesmas enzimas (COOPER *et al.*, 1996).

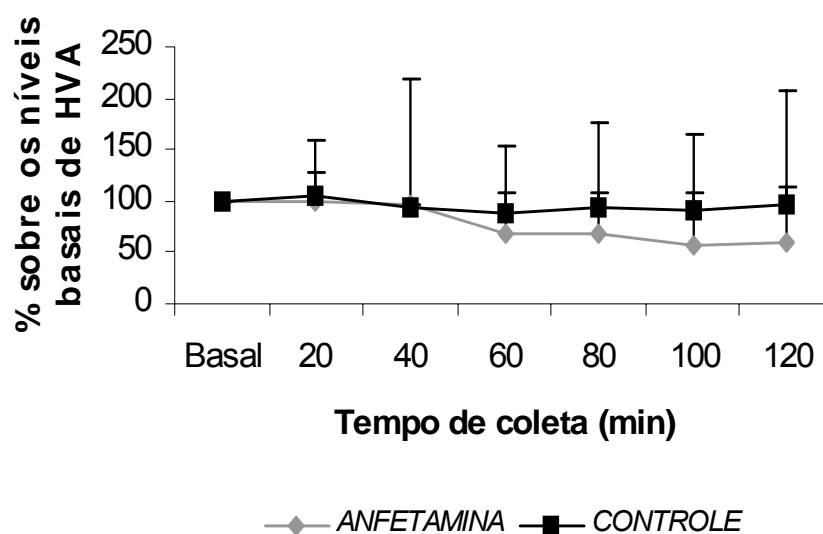


Figura 1.8 Média da porcentagem dos níveis extracelulares de HVA (\pm erro padrão) após a administração de sulfato anfetamina (2 mg/kg, s.c.). Comparação entre os grupos controle (n = 6) e anfetamina (n = 6).

O mecanismo de *turnover* da dopamina pode ser afetado por agentes farmacológicos como a anfetamina. Após sua administração ocorre um grande aumento na liberação e inibição parcial do processo de recaptção de DA, com isso os níveis deste neurotransmissor aumentam drasticamente na fenda sináptica. Esse aumento na liberação de DA faz com que ocorra uma redução nos níveis de DA intraneuronal e, conseqüentemente, redução na formação de DOPAC pela MAO localizada no citosol. Por isso, a administração de fármacos/drogas que promovem a liberação de DA diminuem os níveis de DOPAC. O metabólito HVA é originado predominantemente de DOPAC, mas também é formado a partir da dopamina extraneuronal e, devido a isso, seus níveis extracelulares sofrem uma queda menor do que os de DOPAC (COOPER *et al.*, 1996).

A quantificação dos níveis extracelulares de DOPAC no cérebro de ratos já foi considerada como um índice de atividade dos neurônios dopaminérgicos. Entretanto, a localização tanto intra como extraneuronal da MAO sugere que o DOPAC pode estar sendo formado antes da liberação e depois da recaptção de DA. Devido a isso, mudanças nesse metabólito não são mais consideradas como medida absoluta de

liberação de DA (COMMISSIONG, 1985; WESTERINK, 1985). Por outro lado, existem evidências de que os níveis extracelulares de 3-MT refletem a liberação de dopamina na fenda sináptica: cerca de 20 a 30% da dopamina liberada na fenda sináptica é metabolizada a 3-MT (WOOD *et al.*, 1987). WOOD e colaboradores (1988) concluíram que DOPAC representa um índice de metabolismo intraneuronal e 3-MT um índice de liberação de DA extracelular.

Neste trabalho não foi possível quantificar o metabólito 3-MT, pois seus níveis extracelulares ficaram abaixo do limite de quantificação do método. A maioria dos estudos que utiliza o mesmo método não apresenta dados referentes às concentrações extracelulares de 3-MT. Na tentativa de superar o problema de quantificação deste composto alguns trabalhos têm optado pelo uso da técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, obtendo resultados positivos (BERGQUIST *et al.*, 2002; ZHANG; BEYER, 2005).

6. CONCLUSÕES

Através da realização deste trabalho foi validada uma metodologia analítica em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector eletroquímico para dosear dopamina e de seus metabólitos 3 – metoxitiramina, ácido 3,4 - diidroxifenilacético e ácido homovanílico, conforme o proposto pela ANVISA (BRASIL, 2003) para métodos bioanalíticos e de acordo com trabalhos semelhantes relatados na literatura.

O método analítico mostrou-se adequado e sensível o suficiente para quantificar os níveis extracelulares de dopamina, DOPAC e HVA em amostras de dialisado coletadas na região do estriado de ratos tratados com sulfato de anfetamina (2 mg/kg, s.c.) ou solução salina (NaCl 0,9%, s.c.), porém não apresentou sensibilidade suficiente para detectar os níveis extracelulares de 3-MT, mesmo em animais tratados com anfetamina.

A administração de sulfato de anfetamina (2 mg/kg, s.c.) aumentou significativamente os níveis extracelulares de DA (260%) e diminuiu os níveis de DOPAC (80%) e HVA (50%) no estriado de ratos acordados, demonstrando que o método analítico e as condições de microdialise empregados são capazes de detectar mudanças farmacologicamente induzidas nos níveis extracelulares de dopamina e seus principais metabólitos.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *Hypericum caprifoliatum* CHAM. & SCHLTDL SOBRE OS NÍVEIS CEREBRAIS DE DOPAMINA E SEUS METABÓLITOS ATRAVÉS DE MICRODIÁLISE CEREBRAL

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos o interesse sobre o gênero *Hypericum* (Guttiferae) cresceu consideravelmente, principalmente após a comprovação da eficácia clínica dos extratos de *Hypericum perforatum* L. no tratamento de depressões leves a moderadas (GASTPAR *et al.*, 2006; KASPER *et al.*, 2006; LINDE *et al.*, 2006). Entretanto, nem o mecanismo de ação, nem a identidade dos constituintes ativos responsáveis pelo efeito terapêutico estão completamente esclarecidos. Muitos autores concordam que a atividade antidepressiva não se deve apenas a uma única substância, mas a uma combinação destas - como hipericina, flavonóides e principalmente hiperforina (BHATTACHARYA *et al.*, 1998; CALAPAI *et al.*, 1998; KAEHLER *et al.*, 1999; BUTTERWECK *et al.*, 2000; WURGLICS; SCHUBERT-ZSILAVECZ, 2005; PAULKE *et al.*, 2006).

Estudos indicam que os extratos de *H. perforatum* atuam de modo diferente dos antidepressivos usuais (BHATTACHARYA *et al.*, 1998; CHATTERJEE *et al.*, 1998a; KUMAR *et al.*, 2000; MÜLLER, 2003). Os extratos lipofílicos, bem como alguns componentes isolados (por exemplo, hiperforina) inibem a recaptação de NA, 5-HT, DA, GABA e glutamato, através de um mecanismo que não está diretamente relacionado com o bloqueio do sítio de recaptação destes neurotransmissores (KAEHLER *et al.*, 1999; MÜLLER *et al.*, 1998; 2001; GOBI *et al.*, 2001; JENSEN *et al.*, 2001). Alguns trabalhos justificam a não seletividade do *H. perforatum* sugerindo que a hiperforina inibe a recaptação vesicular das monoaminas através de alterações na condutividade dos canais de sódio (SINGER *et al.*, 1999), interferência na fluidez das membranas neuronais (ECKERT; MÜLLER, 2001; ECKERT *et al.*, 2004) e atuação sobre o eixo HPA (BUTTERWECK *et al.*, 2004; MURCK *et al.*, 2004; MEDINA *et al.*, 2006). Testes *in vivo* (FRANKLIN *et al.*, 2001; 2004) demonstraram que a hiperforina, a hipericina e a *pseudo*-hipericina diminuem os níveis plasmáticos de corticosterona e não alteram os níveis plasmáticos de prolactina e estudos *in vitro* mostraram que estas mesmas substâncias atuam como antagonistas do fator de liberação de corticotrofina (SIMMEN *et al.*, 2003).

Assim, considerando os dados existentes para *H. perforatum* e utilizando uma abordagem quimiotaxonômica para busca de moléculas bioativas em produtos naturais, o estudo do gênero *Hypericum* pode ser útil no descobrimento de fontes alternativas de moléculas com atividade antidepressiva e/ou protótipos para o desenvolvimento de fármacos com mecanismo de ação diferenciada dos antidepressivos atuais.

Estima-se a ocorrência de cerca de 20 espécies brasileiras de *Hypericum* e até 1995, apenas uma delas havia sido estudada (von POSER *et al.*, 2006). A partir das folhas e flores de *H. brasiliense* Choisy foram isolados xantonas e derivados de floroglucinol, e extratos contendo estas substâncias inibiram a enzima monoamino oxidase (MAO) (ROCHA *et al.* 1994; 1995), mas não foram ativos no teste de natação forçada (TNF) em ratos (MENDES *et al.*, 2002).

A partir de 1998, foi iniciada nesse Programa de Pós-Graduação uma linha de pesquisa visando à investigação química e farmacológica das espécies de *Hypericum* nativas. Dentre as espécies pesquisadas, nosso grupo detectou a espécie *H. caprifoliatum* como ativa em modelos animais de depressão (DAUDT *et al.*, 2000, VIANA *et al.*, 2005). O efeito antidepressivo observado no teste da natação forçada foi bloqueado por antagonistas dopaminérgicos, sugerindo o envolvimento do sistema dopaminérgico na resposta antidepressiva. Esta hipótese foi reforçada por experimentos *in vitro*, nos quais um extrato ciclohexânico de *H. caprifoliatum* e o seu principal constituinte, um derivado floroglucinol ainda não identificado, inibiu a captação sinaptossomal de monoaminas, principalmente dopamina (VIANA *et al.*, 2005).

Embora a maioria dos antidepressivos usuais na terapêutica apresente maior seletividade de ação no sistema serotoninérgico e/ou noradrenérgico, o sistema dopaminérgico está, também, reconhecidamente envolvido na patogênese da depressão (ESPOSITO, 2006; TREMBLAY; BLIER, 2006) e alguns antidepressivos, como a bupropiona, têm um papel importante na ativação do sistema dopaminérgico (DOGGRELL, 2006; INOUE *et al.*, 2006). Tem sido demonstrado, através de técnicas de microdiálise cerebral, que antidepressivos, entre eles *H. perforatum*, aumentam os níveis extracelulares das aminas biogênicas, inclusive dopamina (DI MATTEO *et al.*,

2000; ROMMELSPACHER *et al.*, 2001; YOSHITAKE *et al.*, 2004; KITAICHI *et al.*, 2005; INOUE *et al.*, 2006).

Assim, visando o aprofundamento do estudo da atividade antidepressiva de *H. caprifoliatum*, neste capítulo será apresentada a etapa inicial do estudo de um extrato desta planta sobre os níveis cerebrais de dopamina e seus metabólitos, empregando-se a técnica de microdiálise cerebral em ratos acordados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A revisão de literatura apresenta os dados mais significativos sobre o gênero *Hypericum* e a espécie *H. perforatum*, mas foi centralizada nos resultados obtidos até o momento referentes às espécies brasileiras de *Hypericum*.

2.1 Taxonomia

A família Guttiferae é constituída por mais de 1000 espécies e encontra-se subdividida em seis subfamílias. Dentre estas, Hypericoideae, formada pelas tribos Cratoxyleae, Vismieae e Hypericeae (CRONQUIST, 1981; BENNETT; LEE, 1989) é considerada, por alguns autores, como uma família independente (ROBSON, 1977).

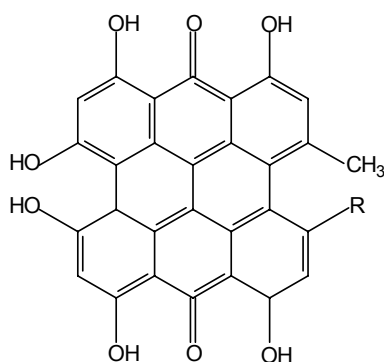
O gênero *Hypericum*, um dos maiores representantes da família Guttiferae, é formado por cerca de 400 espécies, que estão acomodadas em 30 seções (ROBSON, 1977; 1990). As espécies que têm sua ocorrência descrita para a Região Sul do Brasil pertencem a apenas duas seções, *Brathys* (88 espécies) e *Trigynobrathys* (52 espécies), esta última com um maior número de representantes nativos (ROBSON, 1990).

2.2. Constituição Química

Hipericina

Hipericina (1) e seus derivados (*pseudo*-hipericina (2), iso-hipericina, proto-hipericina e proto-*pseudo*-hipericina) são restritas a espécies do gênero *Hypericum* (BARNES *et al.*, 2001). Inicialmente, estas quinonas policíclicas foram isoladas de *H. perforatum* (BUTTERWECK *et al.*, 1997; BHATTACHARYA *et al.*, 1998; CHATTERJEE *et al.*, 1998a). Além desta espécie, hipericina e seus derivados já foram encontradas em

H. maculatum Crantz, *H. tetrapterum* Fries, *H. barbatum* Jacq., *H. bithynicum* Boiss., *H. humifusum* L., *H. hirsutum* L., *H. glandulosum* Aiton, *H. montanum* L. e *H. tomentosum* L. (KARTNIG *et al.*, 1989; 1996; KARTNIG; GÖBEL, 1992).



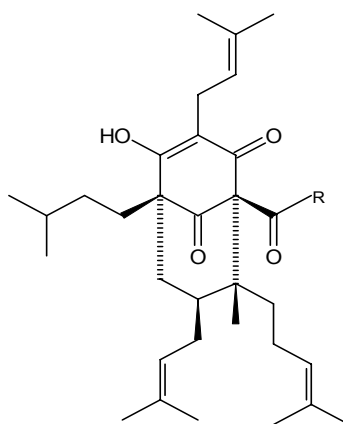
(1) R=CH₃

(2) R= CH₂OH

As partes aéreas de oito espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil foram analisadas através de técnicas cromatográficas (CCD e CLAE) quanto à ocorrência de hipericina e seus derivados e em nenhuma destas espécies foi detectada a presença de hipericina (FERRAZ *et al.*, 2002b).

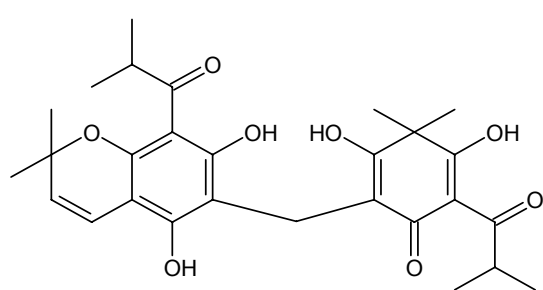
Derivados de floroglucinol

Muitos derivados de floroglucinol têm sido isolados a partir do gênero *Hypericum*. Alguns destes são poli-isoprenilados, como a hiperforina (3) e *ad*-hiperforina (4), substâncias isoladas de *H. perforatum*, enquanto outros são derivados diméricos, formados a partir de uma unidade de floroglucinol ligada por uma ponte metilênica ao ácido filicínico (NÖR *et al.*, 2004).

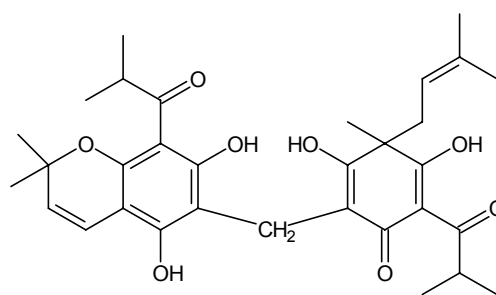


(3) R= CH₃ (4) R= CH₂CH₃

Nas espécies nativas do sul do Brasil, dois derivados de floroglucinol diméricos foram identificados como uliginosina B (5) obtida de *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002a), *H. carinatum* e *H. polyanthemum* e hiperbrasilol B (6) isolado de *H. caprifoliatum* e *H. connatum* (NÖR *et al.*, 2004).



(5)



(6)

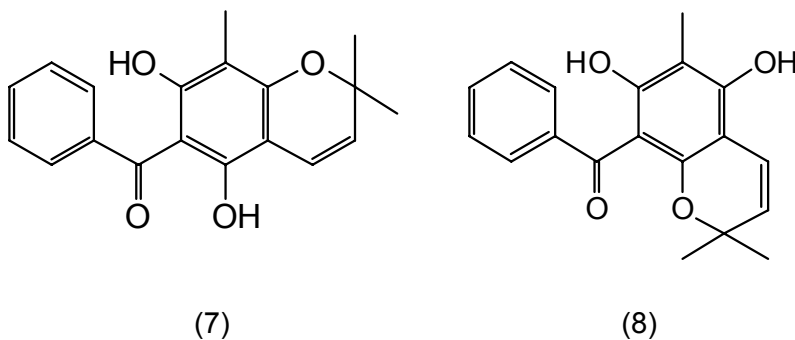
Este tipo de produto já havia sido relatado para outras espécies pertencentes às seções *Trigynobrathys* (ISHIGURO *et al.*, 1986; ROCHA *et al.*, 1995; 1996) e *Brathys* (JAYASURIYA; MCCHESENEY, 1989; JAYASURIYA *et al.*, 1991).

Todos os derivados diméricos de floroglucinol descritos na literatura para o gênero *Hypericum* foram isolados somente de espécies pertencentes às seções

Brathys e *Trigynobrathys*. Estes compostos foram propostos como marcadores quimiotaxonômicos destas duas seções (NÖR *et al.*, 2004).

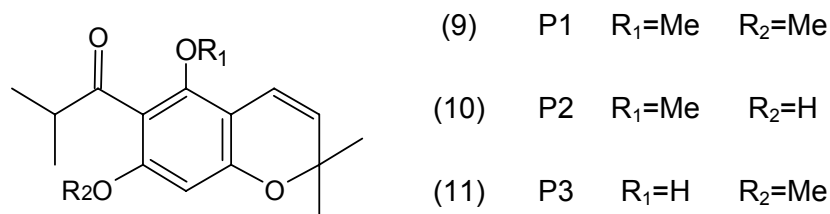
Benzofenonas

Outra classe de produtos naturais freqüentemente descritos em espécies da família Guttiferae são as benzofenonas. Sua presença é relevante devido as importantes propriedades citotóxicas e antivirais que apresentam (KUMAZAWA *et al.*, 1997; PECCHIO *et al.*, 2006; ROMINES *et al.*, 2006). As benzofenonas encontradas em Guttiferae podem ser divididas em dois grupos principais: tri-hidróxi-benzofenonas preniladas e benzofenonas poli-isopreniladas. Embora estes produtos fenólicos sejam freqüentes nesta família, no gênero *Hypericum* sua ocorrência é bastante discreta (KITANOV *et al.*, 2001). O único relato de benzofenonas, em espécies brasileiras, foi feito a partir das partes aéreas de *H. carinatum*, das quais foram isoladas duas novas benzofenonas, denominadas carifenona A (7) e carifenona B (8) (BERNARDI *et al.*, 2005).



Benzopiranos

Benzopiranos livres ou cromenos foram isolados de poucas espécies deste gênero, como *H. revolutum* Vahl (DÉCOSTERD *et al.*, 1986). A partir do extrato clorofórmico das partes aéreas de *H. polyanthemum*, três novos benzopiranos: 6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP1) (9); 7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) (10) e 5-hidróxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP3) (11) foram isolados (FERRAZ *et al.*, 2001).



Taninos e flavonóides

Taninos condensados são comumente encontrados em *Hypericum* e podem estar presentes em concentrações relativamente altas (até cerca de 16%) (KARTNIG *et al.*, 1989). Sete espécies brasileiras foram analisadas quanto à concentração de taninos verificando-se uma variação nos teores entre 5 a 16%. Dentre estas, *H. connatum* (11,5%) e *H. ternum* (16,7%) foram as espécies que apresentaram maior concentração destes compostos (DALL'AGNOLL *et al.* 2003).

Nas espécies de *Hypericum*, os flavonóides são abundantes, representando 11% nas flores e 7% nas folhas de *H. perforatum* (KARTNIG *et al.*, 1989). Os glicosídeos flavônicos mais comumente relatados no gênero são quercitrina, isoquercitrina, hiperosídeo e rutina, todos derivados da quercetina (12) (ROCHA *et al.*, 1995; MÁRTONFI *et al.*, 2001).

As frações fenólicas sem taninos de algumas espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil foram analisadas quanto à ocorrência de flavonóides glicosilados. A partir deste estudo, verificou-se a presença de substâncias seguidamente citadas na literatura, tais como hiperosídeo (13), quercitrina (14), isoquercitrina (15), guaijaverina (16) e apenas traços de rutina (17) em algumas espécies. Dentre estes, hiperosídeo é sempre encontrado em altas concentrações (DALL'AGNOLL *et al.*, 2003).

(12) R=H, quercetina

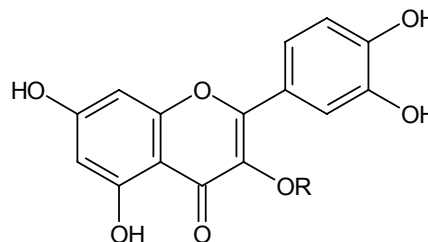
(13) R=α-L-ramnosil, quercitrina

(14) R=β-D-glucosil, isoquercitrina

(15) R=β-D-galactosil; hiperosídeo

(16) R=β-D-arabinopiranosil; guaijaverina

(17) R=β-rutinosil; rutina



Óleos voláteis

Apesar do gênero *Hypericum* ser relativamente grande, poucas são as espécies (*H. coris* L., *H. foliosum* Aiton, *H. maculatum*, *H. olimpicum*, *H. perforatum* L., *H. perforatum* e *H. triquetrifolium* Turra) que tiveram a constituição química dos óleos voláteis analisadas (GUDZIC *et al.*, 2001; 2002). Estas plantas não são caracteristicamente aromáticas e normalmente produzem no máximo 1% de óleo volátil. As espécies do sul do Brasil, *H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum*, *H. myrianthum*, *H. carinatum*, *H. connatum* e *H. ternum* A. St. Hil. apresentaram como rendimento de óleo volátil valores que variaram de 0.1% a 0.5%. Nessas plantas a concentração de sesquiterpenos foi superior aos teores encontrados de monoterpenos (FERRAZ *et al.*, 2005a).

2.3 Dados Farmacológicos

Atividade antimicrobiana, antiviral e antiproliferativa

Algumas espécies de *Hypericum* são usadas popularmente como agentes cicatrizantes e no tratamento de algumas doenças infecciosas (ISHIGURO *et al.*, 1986; 1987; JAYASURIYA *et al.*, 1991; YAMAKI *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1995). Derivados de floroglucinol freqüentemente encontrados na fração lipofílica de várias espécies de *Hypericum* demonstraram atividade antifúngica e antibacteriana contra alguns

microorganismos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Nocardia gardenen* (ISHIGURO *et al.*, 1986; DECOSTERD *et al.*, 1991; JAYASURIYA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1995; TRIFUNOVIC *et al.*, 1998).

A atividade antimicrobiana das espécies brasileiras de *Hypericum* tem sido o foco de vários estudos. ROCHA e colaboradores (1994; 1995) demonstraram que *H. brasiliensis* possui atividade antimicrobiana. Mais tarde, DALL'AGNOL e colaboradores (2003) verificaram que *H. caprifoliatum* é ativo contra *S. aureus* enquanto que *H. polyanthemum* e *H. ternum* são ativos contra *B. subtilis*. A espécie *H. ternum* também apresentou ação antifúngica contra diferentes cepas clínicas de leveduras e fungos filamentosos oportunistas, incluindo dermatófitos (FENNER *et al.*, 2005).

Hipericina e *pseudo*-hipericina apresentam atividade sobre vírus de DNA e RNA envelopados e não envelopados (MERUELO *et al.*, 1988). Essas substâncias são efetivas na prevenção das manifestações de uma variedade de retrovírus *in vitro* e *in vivo* e reduzem a proliferação do HIV (VLIETINCK *et al.*, 1998). Apesar da ausência de hipericina, SCHIMITT e colaboradores (2001) demonstraram a ação antiviral *in vitro* de *H. connatum* contra o vírus da imunodeficiência felina (FIV). Além disso, extratos de *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum*, *H. ternum* e os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 isolados de *H. polyanthemum* apresentaram atividade antiproliferativa contra as células de carcinoma de cólon humano HT-29, células não pequenas de carcinoma de pulmão H-460 e células de glioma humano maligno U-373 (FERRAZ *et al.*, 2005b; 2005c).

Atividade antinociceptiva

H. brasiliensis e *H. connatum* são popularmente usados na região sul do Brasil para alívio de algumas desordens tais como angina, câibras e inflamações na faringe (MENTZ *et al.*, 1997), as quais podem estar associadas com o potencial analgésico e antiinflamatório do gênero *Hypericum*. VIANA e colaboradores (2003) demonstraram que *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum* possuem atividade antinociceptiva em roedores a qual parece ser mediada pelo sistema opióide. Os derivados de floroglucinol podem ser responsáveis pelo efeito do tipo opióide, já que SIMMEN e colaboradores (2001) demonstraram que a hiperforina inibe a ligação a receptores opióides. Com relação aos

flavonóides, BUTTERWECK e colaboradores (2002) mostraram que a amentoflavona (biflavonóide), isolada de *H. perforatum*, liga-se a receptores δ -opióides.

Atividade antidepressiva

O uso de espécies brasileiras de *Hypericum* pela população como antidepressivo não é documentado. As espécies do gênero *Hypericum* da região sul do Brasil mais amplamente distribuídas foram submetidas a um *screening* para verificar sua possível atividade antidepressiva: *H. brasiliensi* Choisy, *H. caprifoliatum* Cham. & Schltl., *H. carinatum* Griseb., *H. connatum* Lam., *H. cordatum* (Vell.) N. Robson, *H. myrianthum* Cham. & Schltl., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt e *H. ternum* A. St. Hil. (DAUDT *et al.*, 2000, GNERRE *et al.*, 2001, MENDES *et al.*, 2002). Dentre as espécies estudadas, *H. caprifoliatum* mostrou os resultados mais promissores no teste de natação forçada, um modelo animal de detecção de substâncias com possível atividade antidepressiva. Os extratos de *H. brasiliensi* (ROCHA *et al.*, 1994), *H. caprifoliatum*, *H. piriai* e *H. polyanthemum* (GNERE *et al.*, 2001) apresentaram atividade inibidora da MAO (IMAO) *in vitro*. No entanto, com exceção de *H. caprifoliatum*, nenhuma das outras espécies foi ativa no modelo animal de depressão testado e o extrato de *H. caprifoliatum* com atividade IMAO é diferente do ativo no teste da natação forçada. Dessa forma, o efeito do extrato de *H. caprifoliatum* neste teste, não parece ser devido à atividade IMAO (GNERE *et al.*, 2001).

O extrato lipofílico de *H. caprifoliatum* contém substâncias com potencial antidepressivo (DAUDT *et al.*, 2000). Uma dessas substâncias parece ser um derivado de floroglucinol, ainda não elucidado estruturalmente, denominado HC1 (VIANA *et al.*, 2005). Essa classe de metabólitos secundários tem sido apontada como uma das principais responsáveis pela atividade antidepressiva do *H. perforatum*, em estudos pré-clínicos e clínicos (CHATTERJEE *et al.*, 1998, MÜLLER *et al.*, 2003, MENNINI; GOBBI, 2004; CACCIA, 2005; WURGLICS; SCHUBERT-ZSILAVECZ, 2006).

Resultados de experimentos *in vivo* sugerem que *H. caprifoliatum* atua sobre o sistema dopaminérgico. Essa hipótese foi reforçada através de experimentos *in vitro*, nos quais o extrato ciclohexano de *H. caprifoliatum* e o derivado de floroglucinol HC1

inibiram a recaptação das monoaminas, principalmente dopamina sem se ligarem aos transportadores monoaminérgicos (VIANA *et al.*, 2005), o que sugere que a ação antidepressiva está relacionada a um mecanismo de ação diferente das outras classes de antidepressivos. Além disso, os derivados de floroglucinol de *Hypericum* não possuem átomos de nitrogênio em sua estrutura, indo de encontro aos estudos de relação estrutura-atividade dos transportadores e receptores das monoaminas biogênicas (APPEL *et al.*, 2004) o que contribui ainda mais para a existência de um mecanismo de ação particular.

2.4 Estudos de microdiálise cerebral envolvendo o gênero *Hypericum*

Os estudos de microdiálise cerebral envolvendo plantas do gênero *Hypericum* são ainda muito escassos. Os poucos trabalhos existentes investigam a ação de extratos e produtos isolados de *H. perforatum* (erva de São João) sobre os níveis cerebrais das monoaminas e seus metabólitos em diferentes regiões do cérebro, sempre com o objetivo de esclarecer seu mecanismo de ação.

DI MATTEO e colaboradores (2000) analisaram o efeito de um extrato de *H. perforatum* obtido com fluido supercrítico (CO₂) sobre os níveis cerebrais de DA e DOPAC no núcleo acumbens e estriado, e os níveis de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo de ratos acordados. A administração do extrato (1 mg/kg, v.o.) causou um discreto, porém significativo aumento nos níveis de DA tanto no estriado (25%) quanto no núcleo acumbens (19%). Os níveis extracelulares de DOPAC não sofreram qualquer alteração, assim como os níveis de 5-HT e 5-HIAA no hipocampo.

Pouco depois, o trabalho de ROMMELSPACHER e colaboradores (2001) investigou a ação do extrato metanólico padronizado LI 160 e de um extrato rico em hiperforina na região *Shell* do núcleo acumbens após administração aguda e tratamento repetido por 14 dias. Ambos os extratos provocaram um aumento nos níveis extracelulares de DA e 5-HT similares aos encontrados com o tratamento repetido de imipramina. No

tratamento agudo, os extratos de *H. perforatum* superaram o fármaco no aumento nos níveis de DA.

Um outro trabalho verificou o efeito de um extrato hidroalcoólico de *H. perforatum* (0,3% hipericina, 4,1% hiperforina) sobre os níveis extracelulares de DA, NA, 5-HT e dos metabólitos, DOPAC, HVA e 5-HIAA no córtex pré-frontal de ratos. Após administração aguda (60 mg/kg, i.p. ou 300 mg/kg, v.o.) houve um aumento na concentração de DA de 165% para a via intraperitoneal e 140% para a via oral. Os níveis extracelulares de 5-HT aumentaram em 135% quando *H. perforatum* foi administrado pela via i.p. e apenas 110% pela via oral. Não foi verificada qualquer alteração nos níveis de NA por ambas as vias de administração. Com relação às mudanças nas concentrações dos metabólitos, 5-HIAA permaneceu inalterado, DOPAC reduziu 16-20% e HVA reduziu 56-60% em média independente da via de administração do extrato (YOSHITAKE *et al.*, 2004).

Trabalhos envolvendo a perfusão local de hiperforina têm sido realizados com o auxílio de MD cerebral. Dentre estes, um estudo perfundiu hiperforina (100 μ M) diretamente no estriado e notou uma redução na liberação de ACh e aumento nos níveis de colina (Ch). Entretanto, quando hiperforina foi perfundida em um concentração baixa (10 μ M), foi notado um aumento nos níveis de ACh e queda no níveis de Ch. A administração sistêmica de hiperforina (1-10 mg/kg, i.p.) causou um aumento significativo na ACh estriatal (BUCHHOLZER, 2002). Resultados similares foram encontrados por KIEWERT e colaboradores (2004) que constataram um aumento entre 50-100 % nos níveis hipocampais de acetilcolina, após a administração sistêmica de hiperforina pura (1 e 10 mg/kg, i.p.). O efeito foi quase que completamente suprimido pela retirada de Ca^{2+} do líquido de perfusão ou infusão com TTX (1 μ M). Os autores concluíram que a hiperforina estimula a liberação de acetilcolina no hipocampo por um mecanismo de ação indireto.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito do tratamento agudo de um extrato ciclohexânico purificado das partes aéreas de *H. caprifoliatum* Cham. & Schltdl sobre os níveis intersticiais de dopamina e seus metabólitos, DOPAC, HVA e 3-MT na região cerebral núcleo acumbens, através da técnica de microdiálise cerebral em ratos conscientes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Material Vegetal*

As partes aéreas de *Hypericum caprifoliatum*, em floração, foram coletadas na cidade de Viamão (RS), identificadas pelo Professor Dr. Sérgio Bordignon (Centro Universitário La Salle e Ulbra), selecionadas, secas em ambiente arejado e ao abrigo da luz direta e exsiccadas foram depositadas no herbário ICN (Herbário do Departamento de Botânica – Instituto de Biociências - UFRGS) (Bordignon 1496).

Preparação do extrato

Para obtenção do extrato, o material vegetal foi moído em moinho de facas e então submetido à extração por maceração estática utilizando-se ciclohexano na proporção droga:solvente 1:10 (p/V). Este solvente foi evaporado sob pressão reduzida (55 °C), e o resíduo resultante ressuscitado em acetona. A adição desta cetona torna as ceras insolúveis, ocorrendo formação de precipitado, o qual foi removido por filtração em papel. Este processo foi realizado no intuito de se obter um extrato mais purificado, rico em floroglucínóis, o qual se denominou HCP.

Caracterização química do extrato

O extrato foi caracterizado através de cromatografia em camada delgada analítica (CCD) em sílica gel GF₂₅₄, verificando-se a presença de manchas indicativas da fração majoritária de HCP rica em floroglucínóis (HC1) que fora previamente isolada e praticamente identificada (VIANA, 2002). Empregou-se como fase líquida diclorometano:hexano (3:2 V/V) e como agentes cromogênicos anisaldeído (anisaldeído 0,5%, ácido sulfúrico R 5%, ácido acético glacial 10%, metanol 85%) e Reagente de Godim (solução aquosa de vanilina em etanol 1% e ácido perclórico 3%) (ROCHA *et al.*, 1994).

4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos com idade entre 60-90 dias, pesando de 250 a 350 g, procedentes da colônia da FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde e do Biotério Central da UFRGS. Antes dos experimentos, os animais foram ambientados por 72h no Biotério de passagem da Faculdade de Farmácia – UFRGS e mantidos em caixas plásticas com, no máximo, cinco animais. Os animais tiveram livre acesso à água e ração (Nuvolab-CR1[®]) e o ambiente teve umidade monitorada e temperatura controlada (23 ± 2 °C). Os animais foram mantidos em ciclos de claro/escuro de 12h (07 às 19h).

A manipulação animal foi realizada seguindo os princípios éticos para experimentação animal relatados por Goldim (1995), as normas do Conselho Canadense de Cuidados com Animais (CCAC, 2003), do Centre National de la Recherche Scientifique da França (CNRS, 2000) e da Resolução número 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASIL, 2002). Imediatamente após a finalização do experimento, o animal foi sacrificado pelo método da decapitação por guilhotina e o seu cérebro retirado para posterior análise histológica. Cada animal foi sacrificado isoladamente e a guilhotina e o ambiente foram limpos entre um animal e outro. A carcaça animal foi acondicionada em embalagem plástica branca apropriada e conservada em freezer a -20°C até ser recolhida pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de Porto Alegre. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (CEP/UFRGS, nº. 2005440) (Anexo 1).

4.3 Drogas, Fármacos, Solventes e Reagentes

Hidrato de cloral (Fluka, Alemanha); cloridrato de lidocaína 2% / epinefrina 1:50.000 (Lidostesin[®], Proben, Brasil); cloreto de cálcio e cloreto de potássio (ambos Fisher Scientific, EUA); cloreto de magnésio e cloreto de sódio (ambos Acros Organics, EUA); ácido perclórico e cloridrato de cisteína 99% (ambos Acros Organics, EUA),

todos em grau farmacêutico. Fosfato de potássio monobásico e EDTA (ambos Fisher Scientific, EUA); metanol e ácido heptanosulfônico (Acros Organics, EUA); ácido homovanílico 98%, ácido 3,4 – diidroxifenilacético 98% e 3-metoxitiramina (Acros Organics, EUA) e cloridrato de dopamina 98,5% (Alfa Aesar, EUA); todos em grau CLAE.

4.4 Equipamentos

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu, Japão), Detector Eletroquímico (Antec Leyden, Holanda), Estereotáxico (ASI Instruments, EUA), Controlador de Temperatura Animal (FHC Inc., EUA), Sistema de Microdiálise (BAS Bioanalytical Systems), Criostato (Leika) e Bomba de infusão (BAS Bioanalytical Systems), Microscópio óptico (Olympos, EUA), Microcâmera (Sony CCD-IRIS).

4.5 Avaliação do efeito do extrato *H. caprifoliatum* (HCP) sobre os níveis cerebrais de DA e seus metabólitos

Todo o procedimento de microdiálise cerebral foi realizado como descrito no item 4.4 do capítulo 1 deste trabalho.

Os animais foram submetidos à MD aproximadamente 48 horas após a cirurgia para implantação da guia de sonda (período de recuperação) no núcleo acumbens (A:+2,2; L:-1,5; P:-5,8). Grupos de quatorze animais foram tratados por via oral (gavage) com o extrato HCP (270 mg/kg) ou solução salina (1 mL/kg). Esta dose de HCP foi escolhida porque foi a que apresentou efeito no modelo de natação forçada de Porsolt (VIANA, 2002).

No dia do experimento, após a inserção da sonda de MD, o animal permaneceu em repouso por meia hora até ser instalado no sistema de microdiálise e iniciada a perfusão (1 μ L/min) com LCA. Passado o período de estabilização, foram coletadas 3 (três) amostras de 20 μ L para o cálculo dos valores basais dos analitos e após a coleta

da última amostra, o animal recebeu o tratamento (HCP ou solução salina). Após isso, amostras do dialisado foram coletadas em intervalos de 20 minutos, durante 100 minutos, totalizando 8 coletas. As amostras foram armazenadas (-80 °C) até o momento da análise.

Após o experimento os animais foram decapitados e o cérebro retirado para verificação do local de implantação da sonda. Só foram aceitos dados de animais que tiveram a sonda implantada no local correto. Foi possível considerar os dados obtidos de 07 animais por grupo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo da avaliação do efeito de *H. caprifoliatum* sobre os níveis cerebrais de DA e seus metabólitos foi iniciado no núcleo acumbens, pois foi demonstrado que a deficiência de dopamina nesta região está envolvida na patofisiologia e sintomatologia da depressão (DAILLY *et al.*, 2004; NESTLER; CARLEZON, 2006).

Os neurônios localizados no núcleo acumbens fazem parte da via dopaminérgica conhecida como mesolímbica que parece estar envolvida com o comportamento (COOPER *et al.*, 1996). O interesse maior nesta região surgiu após experimentos de psicofarmacologia mostrarem que a via mesolímbica está envolvida com o mecanismo de recompensa (WISE; ROMPRE, 1989). Esta afirmação levou a extensas discussões sugerindo que o desenvolvimento de dependência a drogas de abuso acontece devido à estimulação do sistema mesolímbico (DI CHIARA *et al.*, 2004). Outros estudos propuseram a hipótese de que o núcleo acumbens funciona como uma interface entre a função emocional (mesolímbico) e a função motora (mesoestriatal) (MOGENSON *et al.*, 1988). Devido à prevalência de anedonia e desmotivação na maioria dos indivíduos com depressão, estudos mais recentes, mostram que a deficiência de dopamina na via mesolímbica está envolvida na patofisiologia e sintomatologia desta doença e pode estar envolvida na sua etiologia (DAILLY *et al.*, 2004; NESTLER; CARLEZON, 2006).

Os resultados estão apresentados nas Tabelas 2.1 e 2.2. Os níveis basais de dopamina e seus metabólitos estão dentro da faixa relatada na literatura para o núcleo acumbens de ratos (ZETTERSTRÖM *et al.*, 1983; KUCZENSKI *et al.*, 1991). Não houve alteração significativa nos níveis extracelulares de DA após a administração aguda (270 mg/kg, v.o.) de um extrato ciclohexano purificado das partes aéreas de *H. caprifoliatum*, quando comparados ao grupo controle ($F_{1,83} = 0,982$; $p = 0,341$). Curiosamente, observa-se um aumento significativo dos níveis de dopamina 80 minutos após a administração do tratamento, em ambos os grupos ($F_{5,83} = 3,99$; $p < 0,01$) (Figura 2.1). Portanto, este efeito não pode ser relacionado ao extrato. Existem relatos na literatura de que o estresse devido à manipulação animal pode aumentar os níveis de

neurotransmissores, quando avaliados por MD, independentemente de qualquer resposta farmacológica, especialmente com serotonina (FOSBRAEY, 1993; DALLEY; STANFORD, 1995; RUETER *et al.*, 1997). Como este pico não foi observado quando os animais foram tratados pela via subcutânea com anfetamina ou salina (Capítulo 1) e a administração por gavagem é visivelmente estressante, pode ser que esta observação esteja refletindo uma resposta neuroquímica ao estresse comportamental. Um desenho experimental específico para testar essa hipótese seria necessário.

Tabela 2.1 Níveis extracelulares de DA, DOPAC e HVA no núcleo acumbens de animais do grupo controle. Valores expressos em % e média \pm desvio padrão (nM).

BASAL	37,0 \pm 30,8	100	187,6 \pm 78,5	100	155,3 \pm 169,7	100
T1	35,6 \pm 40,3	96	52,6 \pm 49,7	60	161,9 \pm 226,1	104
T2	29,5 \pm 34,2	80	66,7 \pm 66,3	76	119,6 \pm 133,1	77
T3	32,2 \pm 39,4	87	70,5 \pm 71,0	80	161,0 \pm 184,1	104
T4	87,7 \pm 90,0	237	79,7 \pm 72,5	91	204,9 \pm 268,3	132
T5	37,2 \pm 44,8	100	77,2 \pm 78,8	88	178,9 \pm 250,1	115

O tratamento agudo com *H. caprifoliatum* também não foi capaz de alterar os níveis extracelulares de DOPAC ($F_{1,77} = 1,131$; $p = 0,310$) (Tabela 2.2) e HVA ($F_{1,83} = 0,134$; $p = 0,721$) (Tabela 2.2), comparado com o grupo controle. Não foi possível quantificar os níveis extracelulares do metabólito 3-MT, pois estes ficaram abaixo do limite de detecção do método cromatográfico aplicado. Estes resultados estão dentro do esperado já que não houve alteração nos níveis de DA. Como estes compostos são resultantes do metabolismo da dopamina, as concentrações extracelulares desses metabólitos depende dos níveis de DA liberada na fenda sináptica.

Tabela 2.2 Níveis extracelulares de DA, DOPAC e HVA no núcleo acumbens de animais do grupo tratado com HCP (270 mg/kg; v.o.). Valores expressos em % e média \pm desvio padrão (nM)

	DA (nM)	DA (%)	DOPAC (nM)	DOPAC (%)	HVA (nM)	HVA (%)
Basal	26,0 \pm 11	100	230,1 \pm 424	100	121,4 \pm 107	100
T1	23,5 \pm 12	90	175,0 \pm 335	76	121,5 \pm 91	100
T2	18,6 \pm 7	72	191,7 \pm 381	83	105,0 \pm 81	86
T3	21,3 \pm 11	82	212,5 \pm 301	92	117,7 \pm 68	97
T4	49,8 \pm 56	191	216,8 \pm 259	94	215,2 \pm 224	177
T5	26,1 \pm 33	100	218,9 \pm 310	95	122,3 \pm 71	101

Estes resultados diferem dos dados publicados para *H. perforatum*, nos quais se observa que diferentes extratos desta espécie provocam aumentos significativos, de magnitudes variadas, nos níveis de dopamina no núcleo accumbens, estriado e córtex pré-frontal (DI MATTEO *et al.*, 2000; ROMMELSPACHER *et al.*, 2001; YOSHITAKE *et al.*, 2004). No entanto, não se espera que *H. caprifoliatum* e *H. perforatum* apresentem farmacologia estritamente igual, até porque a constituição química das duas espécies é bastante diferente. Contudo, como os dados *in vitro* demonstram que este extrato de *H. caprifoliatum* inibe a captação e induz a uma discreta liberação sinaptossomal de dopamina (VIANA *et al.*, 2005), esperava-se observar *in vivo* um aumento nos níveis intersticiais de dopamina.

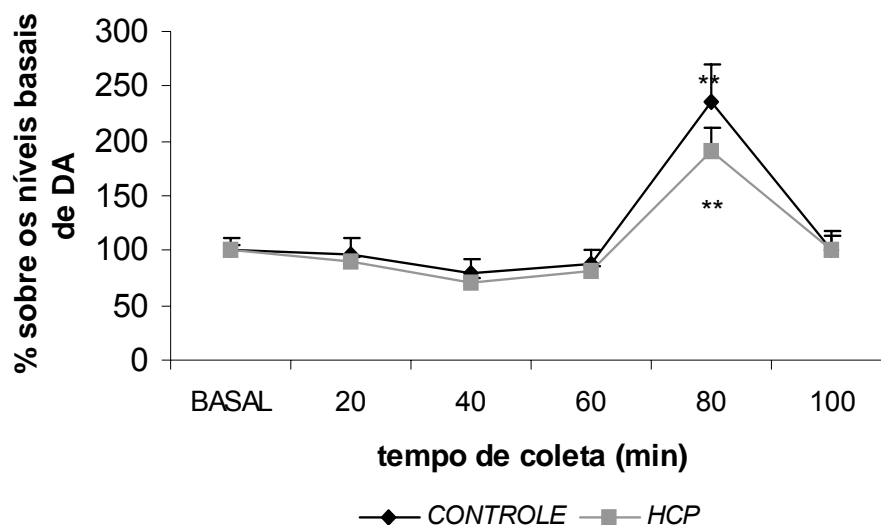


Figura 2.1 Percentual médio (\pm erro padrão) dos níveis extracelulares de DA após administração de HCP 270 mg/kg, v.o. ($n = 7$) ou salina 1 mL/kg, v.o. ($n = 7$), em relação aos níveis basais. Diferença significativa comparada com os valores basais (** $p < 0,01$). ANOVA de dois fatores com medidas repetidas e teste *post-hoc* de Tukey.

Em estudos envolvendo microdiálise cerebral e a administração de antidepressivos sintéticos, observou-se para a bupropiona, um inibidor seletivo da recaptação de DA, dados semelhantes aos obtidos com *H. caprifoliatum*. Pelo menos agudamente, este fármaco não foi capaz de alterar os níveis de DA na fenda sináptica (ASCHER *et al.*, 1995). Porém, com outros antidepressivos, com mecanismos de ação diferenciados, a visualização do efeito sobre os níveis extracelulares das monoaminas, principalmente NA e 5-HT, ocorre após o tratamento agudo. O antidepressivo tricíclico (ATC) amineptina é capaz de alterar os níveis basais de DA no estriado, núcleo acumbens e córtex pré-frontal (GARATTINI, 1997); outro ATC, milnacipran, altera agudamente os níveis extracelulares de NA, e só com o tratamento crônico é visto o aumento de DA (KITAICHI *et al.*, 2005). Já o inibidor seletivo da recaptação de serotonina duloxetine é capaz de alterar os níveis de 5-HT no hipotálamo após tratamento agudo em ratos (ENGLEMAN *et al.*, 1995). O mesmo acontece com a reboxetina, um fármaco inibidor seletivo da recaptação de NA (PAGE; LUCKI, 2002).

A não observação do aumento dos níveis extracelulares de dopamina pode estar relacionada ao perfil farmacocinético das substâncias ativas de *H. caprifoliatum*. No trabalho de VIANA e colaboradores (2005) uma mistura tautomérica de floroglucinóis, derivados do ácido filicínico é sugerida como responsável pela atividade com CI_{50} de 85 ± 19 ng/mL. É possível que a administração aguda não tenha permitido concentrações cerebrais equivalentes à ativa *in vitro*. A avaliação de outros regimes de tratamento e de outras regiões cerebrais, como estriado e córtex pré-frontal fazem parte das perspectivas de continuação deste trabalho. Amostras de dialisados obtidos no estriado de animais tratados com esta mesma dose já foram coletadas e estão congeladas para posterior análise.

6. CONCLUSÃO

A administração aguda de um extrato ciclohexânico purificado das partes aéreas de *Hypericum caprifoliatum* (270 mg/kg, v.o.) não foi capaz de alterar os níveis intersticiais de dopamina, ácido 3,4 - diidroxifenilacético e ácido homovanílico no núcleo acumbens de ratos conscientes.

Não foi possível quantificar os níveis extracelulares do metabólito 3-MT, pois estes ficaram abaixo do limite de detecção do método cromatográfico aplicado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo deste trabalho foi implementar no programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS a técnica de microdiálise cerebral em animais conscientes, como uma ferramenta para o estudo farmacodinâmico e farmacocinético de fármacos ou substâncias que possam originar fármacos. De forma imediata, objetivávamos um aprofundamento no estudo farmacodinâmico de *H. caprifoliatum*, cuja farmacologia pré-clínica vem sendo desenvolvida neste Programa há alguns anos.

Para esta avaliação foi escolhida a região do núcleo acumbens, pois embora o estriado seja uma região cerebral maior e mais rica em terminais dopaminérgicos e, por isso, utilizado na validação com anfetamina, o núcleo accumbens, além de também rico em terminais dopaminérgicos, tem sido implicado na neurobiologia da depressão (DAILLY *et al.*, 2004; NESTLER; CARLEZON, 2006).

Embora a microdiálise cerebral não seja uma técnica inovadora em termos globais, ela representa um avanço nas nossas possibilidades institucionais na busca de substâncias ativas sobre o sistema nervoso central, possibilitando estudos de mecanismo de ação *in situ*, bem como estudos de penetração cerebral de drogas e/ou fármacos. No Brasil, não existem muitos grupos com esta técnica implantada e validada em seus laboratórios. Isto provavelmente retrata o fato de que, apesar do seu princípio físico-químico simples, a microdiálise cerebral é uma técnica de difícil rotina, principalmente em função das dificuldades analíticas e de manutenção dos animais em boas condições experimentais e do custo dos insumos e equipamentos.

Quando se trata da análise de substâncias endógenas, como neurotransmissores, as quantidades analisadas são ínfimas exigindo grande sensibilidade da técnica analítica. No caso das aminas biogênicas, a própria característica química dos compostos torna os métodos analíticos fotométricos bastante limitados para o seu doseamento (ZHANG *et al.*, 2003), além do pequeno volume de amostra obtido com o microdialisado. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada

a detector eletroquímico é a técnica de escolha em se tratando de análise das monoaminas (RAGGI *et al.*, 1999).

A técnica analítica foi validada seguindo as recomendações da ANVISA para amostras em matriz biológica e todos os parâmetros exigidos ficaram dentro de valores aceitáveis. Portanto, a técnica foi validada para o doseamento de dopamina, DOPAC, HVA e 3-MT. No entanto, se considerarmos que o detector eletroquímico possui alta sensibilidade podendo detectar compostos em concentrações realmente muito baixas, os LIQ encontrados foram um pouco altos.

Uma das razões para não se ter alcançado LIQ mais baixos, sobretudo para 3-MT, pode ter sido porque o cromatógrafo não era exclusivo para nossas análises sendo utilizado por outros pesquisadores para analisar amostras com características completamente diferentes. Devido a isso, o detector eletroquímico, que deveria ficar permanentemente ligado para que a linha de base se encontrasse no máximo possível de estabilização no momento das análises, tinha que ser desligado pela necessidade de utilização de outros detectores. Dessa forma, num segundo momento de análise das amostras, o detector eletroquímico era religado, implicando num novo processo de estabilização da linha de base, que nem sempre alcançava os mesmos valores da vez anterior.

O tempo requerido para o procedimento de microdiálise é longo, dependendo da substância testada, podendo estender-se por mais de oito horas, o que faz com que o estudo seja demorado. Além dos ratos precisarem de, pelo menos, 48 horas de recuperação da cirurgia, eles são avaliados individualmente em um equipamento e o número de animais necessários para uma boa avaliação estatística é em torno de doze, em função da grande variabilidade biológica na resposta e das perdas inerentes ao processo. No caso deste trabalho optamos por um tempo máximo de diálise de 240 minutos, baseados nos dados de literatura para anfetamina e também porque somando com o tempo de adaptação do animal à sala de experimentação e ao sistema de MD, conseguiríamos microdialisar dois animais por dia, sem que houvesse interferência nos níveis cerebrais de DA causadas por mudanças no ciclo circadiano do animal (CASTANEDA *et al.*, 2004; PUPPALA *et al.*, 2004). A taxa de perdas de animais e/ou

dialisados ficou em torno de 50%, um pouco acima da taxa apresentada pelos raros trabalhos que a mencionam.

Se considerarmos o custo dos equipamentos, o custo das sondas e o custo dos animais, a MD cerebral constitui uma técnica cara. Por exemplo, os fabricantes recomendam a utilização da sonda (valor aproximado de uma sonda com a guia: U\$ 80,00) para um único animal. Nas condições deste trabalho, isso seria inviável e, portanto, uma sonda era reutilizada por, no máximo cinco vezes. Mesmo assim, a eficiência das sondas não foi muito discrepante dos dados de literatura.

Com relação à validação da técnica de microdiálise cerebral no estriado de ratos, o aumento encontrado nos níveis extracelulares de dopamina e o decréscimo nos níveis extracelulares de DOPAC e HVA após a administração de anfetamina demonstram que a técnica mostrou-se capaz de detectar drogas/fármacos que atuam sobre o sistema dopaminérgico promovendo aumento de DA no meio extracelular, nas condições ambientais e analíticas dos nossos laboratórios.

No entanto, o aumento encontrado nos níveis extracelulares de dopamina (160%) foi inferior ao encontrado por estudos semelhantes (500-2000%). Isso pode ter acontecido devido à concentração do íon cálcio no líquido de perfusão, que na maioria dos estudos pesquisados era quase o dobro da utilizada na composição do LCA utilizado neste trabalho. De maneira a explorar melhor os resultados obtidos e validar definitivamente a técnica, seria necessário realizar a administração de diferentes doses de anfetamina, a fim de se obter uma curva dose-resposta, bem como avaliar o efeito em outras regiões ricas em terminais dopaminérgicos, como o núcleo acumbens. Como forma de complementar o processo de validação, poderia se perfundir, juntamente com o LCA, tetrodotoxina ou se retirar o íon cálcio do líquido de perfusão, para provar a origem neuronal de liberação deste neurotransmissor. Mas, a origem extraneuronal da dopamina medida por MD após tratamento com anfetamina é classicamente reconhecida (ZETTERSTRÖM *et al.*, 1983; BUTCHER *et al.*, 1988; WESTERINK *et al.*, 1989).

O tratamento agudo com um extrato ciclohexânico purificado das partes aéreas de *H. caprifoliatum* (270 mg/kg, v.o.) não foi capaz de alterar as concentrações de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA no núcleo acumbens. No entanto, percebe-se uma grande variação nos dados, principalmente nos animais tratados com HCP, o que pode ter dificultado a localização de diferenças e aponta para necessidade de refinamento do experimento em trabalhos futuros. A variação das medidas é, de certa forma, esperada na fase inicial de implementação de uma técnica tão refinada e dependente de variáveis ambientais e experimentais. Além das dificuldades analíticas já relatadas, a técnica de microdiálise cerebral em animais acordados pressupõe um biotério em condições de permitir a recuperação pós-cirúrgica dos animais sem estresse ambiental e mínima possibilidade de infecção, além de uma sala de experimentação exclusiva e também isolada de estresse ambiental, como ruídos, odores estranhos, alteração de luminosidade e temperatura. Isto é necessário para que não ocorram alterações neuroquímicas devidas a esses estressores, mascarando o efeito farmacológico investigado (WESTERINK, 1995).

A não verificação de mudanças nos níveis de DA pode estar relacionado com o perfil farmacocinético das substâncias ativas, das quais não se tem nenhum dado de literatura até o momento. Antidepressivos sintéticos e também *H. perforatum* mostraram-se capazes de alterar os níveis extracelulares das monoaminas mesmo quando administrados agudamente (PAGE; LUCKI, 2002; KITAICHI *et al.*, 2005). Porém, com inibidores seletivos da recaptção de DA, como a bupropiona, o efeito agudo não é observado assim como o relatado para *H. caprifoliatum*, sugerindo que as mudanças neuroquímicas no sistema dopaminérgico possam ocorrer de maneira mais demorada do que com as outras monoaminas (ASCHER *et al.*, 1995). Além do mais, sabe-se que em se tratando de antidepressivos as alterações adaptativas é que são responsáveis pela melhora clínica e não o efeito agudo imediato (GRAEFF *et al.*, 2000).

Finalizando, é importante ressaltar que este é o primeiro trabalho de MD cerebral nessa instituição e que, portanto, os resultados aqui obtidos têm o valor de expressar o aprendizado de técnica e a implementação das bases para o desenvolvimento e refinamento futuro da mesma, independente do seu valor farmacológico intrínseco. Da

mesma forma, também marca o início dos estudos envolvendo microdiálise cerebral e *H. caprifoliatum*, na tentativa de adicionar elementos para a elucidação do mecanismo de ação envolvido com seu efeito antidepressivo observado em estudos em animais. Portanto, como perspectivas de continuação deste trabalho, estão sendo estudados novos regimes de tratamento: administração de 270 mg/kg/dia, v.o., divididos em três doses diárias e administração de 90 mg/kg, v.o. administrado por três dias consecutivos. Também será avaliado o efeito de *H. caprifoliatum* sobre outras regiões dopaminérgicas, como estriado e córtex pré-frontal.

REFERÊNCIAS

ABEKAWA, T.; OHMORI, T.; ITO, K.; KOYAMA, T. D1 dopamine receptor activation reduces extracellular glutamate and GABA concentrations in the medial prefrontal cortex. **Brain Research**, v.867, p.250-254, 2000.

ABERCROMBIE, E. D.; DE BOER, P. Substantia nigra D1 receptors and stimulation of striatal cholinergic interneurons by dopamine: a proposed circuit mechanism. **The Journal of Neuroscience**, v.17, p.498-505, 1997.

ACQUAS, E.; WILSON, C.; FIBIGER, H. C. Nonstriatal dopamine D1 receptors regulate striatal acetylcholine release in vivo. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 281, p.360-368, 1997.

ACQUAS, E.; WILSON, C.; FIBIGER, H. C. Pharmacology of sensory stimulation-evoked increases in frontal cortical acetylcholine release. **Neuroscience**, v.85, p.73-83, 1998.

ADELL, A.; ARTIGAS, F. Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study. **Naunyn – Schmiedebergs's Archives of Pharmacology**, v.343, p.237-244, 1991. Resumo.

ANAND, B. S.; ATLURI, H.; MITRA, K. Validation of an ocular microdialysis technique in rabbits with permanently implanted vitreous probes: systemic and intravitreal pharmacokinetics of fluorescein. **International Journal of Pharmaceutics**, v.281, p.79-88, 2004.

ANGLISTER, L.; STILES, J. R.; SALPETER, M. M. Acetylcholinesterase density and turnover number at frog neuromuscular junctions, with modeling of their role in synaptic function. **Neuron**, v.12, p.783–794, 1994.

ANTONIOU, K.; KEHR, J.; SNITT, K.; OGREN, S. O. Differential effects of the neuropeptide galanin on striatal acetylcholine release in anaesthetized and awake rats. **British Journal of Pharmacology**, v.121, p.1180-1186, 1997.

APPELL, M.; BERFIELD, J. L.; WANG, L. C.; DUNN III, W. J.; CHEN, N.; REITH, M. E. A. Structure-activity relationships for substrate recognition by the human dopamine transporter. **Biochemical Pharmacology**, v.67, p.293-302, 2004.

ASCHER, J. A.; COLE, J. O.; COLIN, J. N.; FEIGHNER, J. P.; FERRIS, R. M.; FIBIGER, H. C.; GOLDEN, R. N.; MARTIN, P.; POTTER, W. Z.; RICHELSON, E. Bupropion: a review of its mechanism of antidepressant activity. **The Journal of Clinical Psychiatry**, v.56, p.395-401, 1995.

- AULT, J. M.; RILEY, C. M.; MELTZER, N. M.; LUNTE, C. E. Dermal microdialysis sampling in vivo. **Pharmaceutical Research**, v.11, p.1631-39, 1994.
- BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.583-600, 2001.
- BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthonones from Guttiferae. **Phytochemistry**, v.28, n.4, p.967-998, 1989.
- BENVENISTE, H.; HANSEN, A. J.; OTTOSEN, N. S. Determination of Brain Interstitial Concentrations by Microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.52, p.1741-1750, 1989.
- BENVENISTE, H.; HUTTEMEIER, P. C. Microdialysis-theory and application. **Progress in Neurobiology**, v.35, p.195-215, 1990.
- BERGQUIST, J.; SCIUBISZ, A.; KACZOR, A.; SILBERRING, J. Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids. **Journal of Neuroscience Methods**, v.113, p.1-13, 2002.
- BERNARDI, AP.; FERRAZ, A. B. F.; ALBRING, D.; BORDIGNON, S.; SCHRIPEMA, J.; BRIDI, R.; DUTRA-FILHO, C. S.; HENRIQUES, A. T.; von POSER, G. L. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. **Journal of Natural Products**, v.68, p.784-786, 2005.
- BERT, L.; FAVALE, D.; JEGO, G.; GREVE, P.; GUILLOUX, J. P.; GUIARD, B. P.; GARDIER, A. M.; SUAUD-CHAGNY, M. F.; LESTAGE P. Rapid and precise method to locate microdialysis probe implantation in the rodent brain. **Journal of Neuroscience Methods**, v.140, p.53-57, 2004.
- BHATTACHARYA, S.; CHAKRABARTI, A.; CHATTERJEE S. Activity profiles of two hyperforin containing *Hypericum* extracts in behavioral models. **Pharmacopsychiatry**, v.31, p.22-29, 1998.
- BIANCHI, L.; BALLINI, C.; COLIVICCHI, M. A.; DELLA CORTE, L.; GIOVANNINI, M. G.; PEPEU, G. Investigation on acetylcholine, aspartate, glutamate and GABA extracellular levels from ventral hippocampus during repeated exploratory activity in the rat. **Neurochemical Research**, v.28, p.565-573, 2003.
- BIGGS, C. S.; FOWLER, L. J.; WHITTON, P. S.; STARR, M. S. Impulse-dependent and tetrodotoxin-sensitive release of GABA in the rat's substantia nigra measured by microdialysis. **Brain Research**, v.684, p.172-178, 1995.
- BLANCO-LEZCANO, L.; PAVÓN-FUENTES, N.; BLANCO-LEZCANO, V. Microdialysis cerebral. Principales aplicaciones de la técnica. **Revista de Neurologia**, v.33, p.464-470, 2001.

BLANDINA, P.; GIORGETTI, M.; BARTOLINI, L.; CECCHI, M.; TIMMERMAN, H.; LEURS, R.; PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Inhibition of cortical acetylcholine release and cognitive performance by histamine H3 receptor activation in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.119, p.1656-1664, 1996.

BLATER, K.; SCHULTZ, W. Rewarding properties of visual stimuli. **Experimental Brain Research**, v.168, p.541-546, 2006.

BOURIN, M.; DAVID, D. J.; JOLLIET, P.; GARDIER, A. Mechanism of action of antidepressants and therapeutic perspectives. **Thérapie**, v.57, p.385-396, 2002.

BOURNE, J. A. Intracerebral microdialysis: 30 years as a tool for the neuroscientist. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v.30, p.16-24, 2003.

BOUW, M. R.; HAMMARLUND-UDENAES, M. Methodological aspects of the use of a calibrator in in vivo microdialysis – further development of the retrodialysis method. **Pharmaceutical Research**, v.15, p.1673-1679, 1998.

BOWERS JR, M. B.; VAN WOERT, M.; DAVIS, L. Sexual behavior during L-dopa treatment for Parkinsonism. **American Journal of Psychiatry**, v.127, p.1691– 1693, 1971. Resumo.

BRASIL. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução RE nº. 714, de 20 de junho de 2002. Dispõem sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 21 de junho de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos; fica revogada a Resolução RE nº 475, de 19 de março de 2002. ; **Diário Oficial da União**, Poder Executivo de 02 de junho de 2003.

BROWN, E. E.; DAMSMA, G.; CUMMING, P.; FIBIGER, H. C. Interstitial 3-methoxytyramine reflects striatal dopamine release: an in vivo microdialysis study. **Journal of Neurochemistry**, v.57, p.701-707, 1991.

BRUNNER, M.; JOUKHADAR, C.; SCHMID, R.; EROVIC, B.; EICHLER, H. G.; MULLER, M. Validation of urea as an endogenous reference compound for the in vivo calibration of microdialysis probes. **Life Sciences**, v.67, p.977-984, 2000.

BUCHHOLZER, M. L.; DVORAK, C.; CHATTERJEE, S.; KLEIN, J. Dual modulation of striatal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's wort. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.301, p.714-719, 2002.

BUERGER, C.; JOUKHADAR, C.; MULLER, M.; KLOFT, C. Development of a liquid chromatography method for the determination of linezolid and its application to in vitro and human microdialysis samples. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies and Biomedical Life Sciences**, v.25, p.155-164, 2003.

- BUTCHER, S. P.; FAIRBROTHER, I. S.; KELLY, J. S.; ARBUTHNOTT, G. W. Amphetamine-induced dopamine release in the rat striatum: an *in vivo* microdialysis study. **Journal of Neurochemistry**, v.50, p.346-355, 1988.
- BUTTERWECK, V.; WALL, A.; LIEFLANDER-WULF, U.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A. Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry**, v.30, p.117-124, 1997.
- BUTTERWECK, V.; PETEREIT, F.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**, v.64, p.291-294, 1998.
- BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**, v.66, p.3-6, 2000.
- BUTTERWECK, V.; NAHRSTEDT, A.; EVANS, J.; HUFSEISEN, S.; RAUSER, L.; SAVAGE, J.; POPADAK, B.; ERNSBERGER, P.; ROTH, B. L. *In vitro* receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. **Psychopharmacology**, v.162, p.193-202, 2002.
- BUTTERWECK, V.; HEGGER, M.; WINTERHOFF, H. Flavonoids of St. John's wort reduce HPA axis function in the rat. **Planta Medica**, v.70, p.1008-1011, 2004.
- CACCIA, S. Antidepressant-like components of *Hypericum perforatum* extracts: an overview of their pharmacokinetics and metabolism. **Current Drug Metabolism**, v.6, p.531-543, 2005.
- CADOGAN, A. K.; MARSDEN, C. A. Measurement of neurotransmitters and their associated second messengers *in vivo*. In: TURNER, A.J.; BACHELARD, H. S. **Neurochemistry - a practical approach**. 2. ed. New York: IRL PRESS. 1997. p.175.
- CADONI, C.; SOLINAS, M.; PISANU, A.; ZERNIG, G.; ACQUAS, E.; DI CHIARA, G. Effect of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on dopamine transmission in the nucleus accumbens shell and core. **Brain Research**, v.1055, p.143-148, 2005.
- CALAPAI, G.; CRUPI, A.; FIRENZUOLI, F.; CONSTANTINO, G.; INFERRERA, G.; CAMPO, G. M.; CAPUTI, A. P. Effects of *Hypericum perforatum* on levels of 5-hydroxytryptamin, noradrenalin and dopamine in the cortex, diencephalons and brainstem of the rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, p.723-728, 1998.
- CANNAZZA, G.; DI STEFANO, A.; MOSCIATTI, B.; BRAGHIROLI, D.; BARALDI, M.; PINNEN, F.; SOZIO, P.; BENATTI, C.; PARENTI, C. Detection of levodopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of L-DOPA products by mean of HPLC-EC. **Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis**, v.36, p.1079-1084, 2005.

CASTANEDA, T. R.; DE PRADO, B. M.; PRIETO, D.; MORA, F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. **Journal of Pineal Research**, v.36, p.177-185, 2004.

CARBONI, E.; IMPERATO, A.; PEREZZANI, L.; DI CHIARA, G. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. **Neuroscience**, v.28, p.653-661, 1989. Resumo.

CARBONI, E.; SPIELEWOY, C.; VACCA, C.; NOSTEN-BERTRAND, M.; GIROS, B.; DI CHIARA, G. Cocaine and amphetamine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens of mice lacking the dopamine transporter gene. **The Journal of Neuroscience**, v.21, p.1-4, 2001.

CARBONI, E.; SILVAGNI, A.; VACCA, C.; DI CHIARA, G. Cumulative effect of norepinephrine and dopamine carrier blockade on extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell, bed nucleus of stria terminalis and prefrontal cortex. **Journal of Neurochemistry**, v.96, p.473-481, 2006.

CHEN, K. C. Evidence on extracellular dopamine level in rat striatum: implications for the validity of quantitative microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.92, p.46-58, 2005.

CHATTERJEE, S. S.; BHATTACHARYA, S. K.; WONNEMANN, M.; SINGER, A.; MÜLLER, W. E. Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. **Life Sciences**, v.63, p.499-510, 1998a.

CHATTERJEE, S. S.; NÖLDNER, M.; KOCH, E.; ERDELMEIER, C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. **Pharmacopsychiatry**, v.31, p.7-15, 1998b.

CHENG, F. C.; KUO, J. S. High-performance liquid chromatographic analysis with electrochemical detection of biogenic amines using microbore columns. **Journal of Chromatography B. Biomedical Applications**, v.665, p.1-13, 1995.

CHUNG, Y. C.; LI, Z.; DAI, J.; MELTZER, H. Y.; ICHIKAWA, J. Clozapine increases both acetylcholine and dopamine release in rat ventral hippocampus: role of 5-HT_{1A} receptor agonism. **Brain Research**, v.1023, p.54-63, 2004.

CENTRE National de la Recherche Scientifique (CNRS). Éthique en Sciences de la Vie, Guide Pratique, v.3, 2000.

COLADO, M. I.; CAMARERO, J.; MECHAN, A. O.; SANCHEZ, V.; ESTEBAN, B.; ELLIOTT, J. M.; GREEN, A. R. A study of the mechanisms involved in the neurotoxic action of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') on dopamine neurones in mouse brain. **British Journal of Pharmacology**, v.134, p.1711-1723, 2001.

COMMISSIONG, J. W. Monoamine metabolites: their relationship and lack of relationship to monoaminergic neuronal activity. **Biochemical Pharmacology**, v.34, p.1127-1131, 1985.

CONSELHO Canadense de Cuidados com os Animais (CCAC). Disponível na Internet: < <http://www.cac.ca/english/gdlines/wildlife/Wildlife.pdf>>.

CONSOLO, S.; ARNABOLDI, S.; GIORGI, S.; RUSSI, G.; LADINSKY, H. 5-HT₄ receptor stimulation facilitates acetylcholine release in rat frontal cortex. **Neuroreport**, v.5, p.1230-1232, 1994. Resumo.

CONSOLO, S.; ARNABOLDI, S.; RAMPONI, S.; NANNINI, L.; LADINSKY, H.; BALDI, G. Endogenous serotonin facilitates in vivo acetylcholine release in rat frontal cortex through 5-HT_{1B} receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.277, p.823-830, 1996.

COOLEY, R. K; VANDERWOLF, C. H. **Stereotaxic surgery in the rat: a photographic series**. Canada: A. J. Kirby CO., 1990.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, 7. ed. New York: Oxford University Press, 1996.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia Univ. Press, 1981.

CROUZIER, D.; BAUBICHON, D.; BOURBON, F.; TESTYLIER, G. Acetylcholine release, EEG spectral analysis, sleep staging and body temperature studies: a multiparametric approach on freely moving rats. **Journal of Neuroscience Methods**, v.151, p.159-167, 2006.

DAILLY, E.; CHENU, F.; RENARD, C.; BOURIN, M. Dopamine, depression and antidepressants. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.18, p.601-607, 2004;

DALL' AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, AP.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; von POSER, G.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v.10, p.511-516, 2003.

DALLEY, J. W.; STANFORD, S. C. Incremental changes in extracellular noradrenaline availability in the frontal cortex induced by naturalistic environmental stimuli: A microdialysis study in the freely moving rat. **Journal of Neurochemistry**, v.65, p.2644-2651, 1995.

DAUDT, R.; von POSER, G.; NEVES, G.; RATES, S. M. K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. **Phytoterapy Research**, v.14, p.344-346, 2000.

- DAVIES, M. J.; LUNTE, C. E. Microdialysis sampling for hepatic metabolism studies. Impact of microdialysis probe design and implantation technique on liver tissue. **Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals**, v.23, p.1072-1079, 1995.
- DAY, J. C.; FIBIGER, H. C. Dopaminergic regulation of cortical acetylcholine release: effects of dopamine receptor agonists. **Neuroscience**, v.54, p.643-648, 1993.
- DAY, J. C.; FIBIGER, H. C. Dopaminergic regulation of septohippocampal cholinergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v.63, p.2086-2092, 1994.
- DAY, J. C.; PIAZZA, P. V.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Cocaine-induced increase in cortical acetylcholine release: interaction with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **European Journal of Neuroscience**, v.9, p.1130-1136, 1997. Resumo.
- DAY, J. C.; KORNECOOK, T. J.; QUIRION, R. Application of in vivo microdialysis to the study of cholinergic systems. **Methods**, v.23, p.21-39, 2001.
- DE BOER, P.; HEERINGA, M. J.; ABERCROMBIE, E. D. Spontaneous release of acetylcholine in striatum is preferentially regulated by inhibitory dopamine D2 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v.19, p.257-262, 1996.
- DÉCOSTERD, L.; STOECKLI-EVAN, H.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. A new antifungal chromene and a related dichromene from *Hypericum revolutum*. **Planta Medica**, v.55, p.429, 1986.
- DÉCOSTERD, L. A.; HOFFMANN, E.; KYBURZ, R.; BRAY, D.; HOSTETTMANN, K. A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and *in vitro* antimalarial activity. **Planta Medica**, v.57, p.548-551, 1991.
- DE LANGE, E. C.; MARCHAND, S.; van den BERG, D.; van der SANDT, I. C.; DE BOER, A. G.; DELON, A.; BOUQUET, S.; COUET, W. In vitro e in vivo investigations on fluoroquinolones; effects of the P-glycoprotein efflux transporter on brain distribution of sparfloxacin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.12, p.85-93, 2000.
- DEL ARCO, A.; SEGOVIA, G.; FUXE, K.; MORA, F. Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions? **Journal of Neurochemistry**, v.85, p.23-33, 2003.
- DEL ARCO, A.; MORA, F. Glutamate-dopamine in vivo interaction in the prefrontal cortex modulates the release of dopamine and acetylcholine in the nucleus accumbens of the awake rat. **Journal of Neural Transmission**, v.112, p.97-109, 2005.
- DI CHIARA, G.; TANDA, G.; FRAU, R.; CARBONI, E. On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted dialysis probes. **Psychopharmacology**, v.112, p.398-402, 1993.

DI CHIARA, G.; BASSAREO, V.; FENU, S.; DE LUCA, M. A.; SPINA, L.; CADONI, C.; ACQUAS, E.; CARBONI, E.; VALENTINI, V.; LECCA, D. Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. **Neuropharmacology**, v.47, p.227-241, 2004.

DI MATTEO, V.; DI GIOVANNI, G.; DI MASCIIO, M.; ESPOSITO, E. Effect of acute administration of hypericum perforatum-CO₂ extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system. **Pharmacopsychiatry**, v.33, 14-8, 2000.

DOGGRELL, S. A. After the failure of citalopram for depression, what next? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.7, p.1515-1518, 2006.

DOMINGUEZ, J. M.; HULL, E. M. Dopamine, the medial preoptic area, and male sexual behavior. **Physiology & Behaviour**, v.86, p.356-368, 2005.

DREW, K. L.; PEHEK, E. A.; RASLEY, B. T.; MA, Y. L.; GREEN, T. K. Sampling glutamate and GABA with microdialysis: suggestions on how to get the dialysis membrane closer to the synapse. **Journal of Neuroscience Methods**, v.140, p.127-131, 2004.

DYKSTRA, K. H.; HSIAO, J. K.; MORRISON, P. F.; BUNGAY, P. M.; MEFFORD, I. N.; SCULLY, M. M.; DEDRICK, R. L. Quantitative examination of tissue concentration profiles associated with microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.58, p.931-940, 1992.

ECKERT, G. P.; MÜLLER, W. E. Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes. **Pharmacopsychiatry**, v.34, p.22-25, 2001.

ECKERT, G. P.; KELLER, J. H.; JOURDAN, C.; KARAS, M.; VOLMER, D. A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; MÜLLER W.E. Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. **Neuroscience Letters**, v.367, p.139-143, 2004.

ELMQUIST, W. F.; SAWCHUK, R. J. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. **Pharmaceutical Research**, v.14, p.267-288, 1997.

ELVERFORS, A.; JONASON, J.; JONASON, G.; NISSBRANDT, H. Effects of drugs interfering with sodium channels and calcium channels on the release of endogenous dopamine from superfused substantia nigra slices. **Synapse**, v.26, p.359-369, 1997.

EMMERTSEN, K. J.; WARA, P.; SOERENSEN, F. B.; STOLLE, L. B. Intestinal microdialysis--applicability, reproducibility and local tissue response in a pig model. **Scandinavian Journal of Surgery**, v.94, p.46-51, 2005. Resumo.

ENGLEMAN, E. A.; PERRY, K. W.; MAYLE, D. A.; WONG, D. T. Simultaneous increases of extracellular monoamines in microdialysates from hypothalamus of conscious rats by duloxetine, a dual serotonin and norepinephrine uptake inhibitor. **Neuropsychopharmacology**, v.12, p.287-295, 1995.

- ESPOSITO, E. Serotonin-dopamine interaction as a focus of novel antidepressant drugs. **Current Drug Targets**, v.7, p.177-85, 2006.
- FEENSTRA, M. G.; BOTTERBLOM, M. H. Rapid sampling of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex during food consumption, handling and exposure to novelty. **Brain Research**, v.742, p.17-24, 1996.
- FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S. M. K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; von POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v.12, p.236-240, 2005.
- FERGUSON, S. A.; GOUGH, B. J.; CADA, A. M. In vivo basal and amphetamine-induced striatal dopamine and metabolite levels are similar in the spontaneously hypertensive, Wistar–Kyoto and Sprague–Dawley male rats. **Physiology and Behavior**, v.80, p.109– 114, 2003.
- FERRAZ, A. B. F.; BORDIGNON, S. A. L.; STAATS, C.; SCHRIPSEMA, J.; von POSER, G. L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v.57, p.1227-1230, 2001.
- FERRAZ, A. B. F.; SCHRIPSEMA, J.; POHLMANN, A. R.; von POSER, G. L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum* Cham. & Schltdl. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.989-991, 2002a.
- FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D. R. A.; SCHMITT, A. C.; RAVAZOLLO, A. P.; von POSER, G. Screening for the presence of hypericins in southern Brazilian species of *Hypericum*. **Pharmaceutical Biology**, v.40, p.294-297, 2002b.
- FERRAZ, A. B. F.; LIMBERGER, R. P.; BORDIGNON, S. A. L.; von POSER, G. L.; HENRIQUES, A. T. Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, p.335-339, 2005a.
- FERRAZ, A.; FARIA, D. H.; BENNETI, M. N.; DA ROCHA, A.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A.; von POSER, G. L. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, v.12, p.112-115, 2005b.
- FERRAZ, A. B. F.; GRIVICICH, I.; von POSER, G. L.; FARIA, D. H.; KAYSER, G. B.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A. T.; DA ROCHA, A. B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. **Fitoterapia**, v.76, p.210-215, 2005c.
- FILLENZ, M. In vivo neurochemical monitoring and the study of behaviour. **Neuroscience Behavior**, v.29, p.949-962, 2005.
- FINK-JENSEN, A. Novel pharmacological approaches to the treatment of schizophrenia. **Danish Medical Bulletin**, v.47, p.151-167, 2000.

FOSBRAEY, P. Amphetamine-evoked dopamine release from guinea-pig striatum is potentiated by environmental stress: A need for habituation with microdialysis equipment. **Journal of Psychopharmacology**, v.7, p.190-194, 1993.

FRANKLIN, M.; COWEN, P. J. Researching the antidepressant actions of *Hypericum perforatum* in animals and man. **Pharmacopsychiatry**, v.34, p.29-37, 2001.

FRANKLIN, M.; REED, A.; MURCK, H. Sub-chronic treatment with an extract of *Hypericum perforatum* significantly reduces cortisol and corticosterone in the rat brain. **European Neuropsychopharmacology**, v.14, p.7-10, 2004.

FUCHS, H.; NAGEL, J.; HAUBER, W. Effects of physiological and pharmacological stimuli on dopamine release in the rat globus pallidus. **Neurochemistry International**, v.47, p.474-481, 2005.

FUJII, T.; YOSHIZAWA, M.; NAKAI, K.; FUJIMOTO, K.; SUZUKI, T.; KAWASHIMA, K. Demonstration of the facilitatory role of 8-OH-DPAT on cholinergic transmission in the rat hippocampus using in vivo microdialysis. **Brain Research**, v.761, p.244-249, 1997.

GADDUM, J. H. Push-pull cannulae. **Journal of Physiology**, v.159, p.1P-2P, 1961. Resumo.

GAGNAIRE, F.; MICILLINO, J. C. Effects of triadimefon on extracellular dopamine, DOPAC, HVA and 5-HIAA in adult rat striatum. **Toxicology**, v.217, p.91-104, 2006.

GALINEAU, L.; BELZUNG, C.; KODAS, E.; BODARD, S.; GUILLOTEAU, D.; CHALON, S. Prenatal 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) exposure induces long-term alterations in the dopaminergic and serotonergic functions in the rat. **Brain Research. Development of Brain Research**, v.154, p.165-176, 2005.

GARATTINI, S. Pharmacology of amineptine, an antidepressant agent acting on the dopaminergic system: a review. **International Clinical Psychopharmacology**, v.12, p.15-9, 1997.

GASTPAR, M.; SINGER, A.; ZELLER, K. Comparative efficacy and safety of a once-daily dosage of hypericum extract STW3-VI and citalopram in patients with moderate depression: a double-blind, randomised, multicentre, placebo-controlled study. **Pharmacopsychiatry**, v.39, p.66-75, 2006.

GEORGIEVA, J.; LUTTMAN, J.; MOHRINGE, B.; MAGNUSSON, O. Tissue and microdialysate changes after repeated and permanent probe implantation in the striatum of freely moving rats. **Brain Research**, v.31, p.463-470, 1993.

GERHARDT, G. A.; MALONEY, R. E. JR. Microdialysis studies of basal levels and stimulus-evoked overflow of dopamine and metabolites in the striatum of young and aged Fischer 344 rats. **Brain Research**, v.816, p.68-77, 1999.

- GESSA, G. L.; CASU, M. A.; CARTA, G.; MASCIA, M. S. Cannabinoids decrease acetylcholine release in the medial-prefrontal cortex and hippocampus, reversal by SR 141716A. **European Journal of Pharmacology**, v.355, p.119-124, 1998.
- GIOVANNINI, M. G.; MUTOLO, D.; BIANCHI, L.; MICHELASSI, A.; PEPEU, G. NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: a microdialysis study. **Journal of Neuroscience**, v.14, p.1358-1365, 1994.
- GLAVIN, G.; TANAKA, M.; TSUDA, A.; KOHNO, Y.; HOAKI, Y.; NAGASAKI, N. regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. **Pharmacology, Biochemistry, and Behaviour**, v.19, p.287-290, 1983.
- GLICK, S. D.; DONG, N.; KELLER, R. W. JR.; CARLSON, J. N. Estimating extracellular concentrations of dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in nucleus accumbens and striatum using microdialysis: relationships between in vitro and in vivo recoveries. **Journal of Neurochemistry**, v.62, p.2017-2021, 1994.
- GNERRE, C.; von POSER, G. L.; FERRAZ, A.; VIANA, A.; TESTA, B.; RATES, S. M. K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.1273-1279, 2001.
- GOBBI, M.; MOIA, M.; PIRONA, L.; MORIZZONI, P.; MENNINI, T. In vitro binding studies with two hypericum perforatum extracts--hyperforin, hypericin and biapigenin--on 5-HT₆, 5-HT₇, GABA(A)/benzodiazepine, sigma, NPY-Y₁/Y₂ receptors and dopamine transporters. **Pharmacopsychiatry**, v.34, p.45-48, 2001.
- GOLDEN, P. L.; BROUWER, K. R.; POLLACK, G. M. Assessment of valproic acid serum-cerebrospinal fluid transport by microdialysis. **Pharmaceutical Research**, v.10, p.1765-1771, 1993.
- GOLDIM, J. R. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995.
- GOUGH, B.; IMAM, S. Z.; BLOUGH, B.; SLIKKER, W. JR.; ALI, S. F. Comparative effects of substituted amphetamines (PMA, MDMA, and METH) on monoamines in rat caudate: a microdialysis study. **Annals of the New York Academy Science**, v.965, p.410-420, 2002. Resumo.
- GRAEFF, F. G.; BRANDÃO, M. L.; TOMAZ, C. A. B.; GUIMARÃES, F. S. **Neurobiologia das Doenças Mentais**. São Paulo: Lemos Editora e Gráficos, 2^a. ed, 2000.
- GROOTHUIS, D. R.; WARD, S.; SCHLAGETER, K. E.; ITSKOVICH, A. C.; SCHWERIN, S. C.; ALLEN, C. V.; DILLS, C. e LEVY, R. M. Changes in blood-brain barrier permeability associated with insertion of brain cannulas and microdialysis probes. **Brain Research**, v.24, p.218-30, 1998.

GRUSS, M.; BREDEKOTTER, M.; BRAUN, K. N-methyl-D-aspartate receptor-mediated modulation of monoaminergic metabolites and amino acids in the chick forebrain: an in vivo microdialysis and electrophysiology study. **Journal of Neurobiology**, v.40, p.116-135, 1999.

HAJOS KORCSOK, E.; ROBINSON, D. D.; YU, J.; FITCH, C. S.; WALKER, E.; MERCHANT, K. M. Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. **Pharmacology, Biochemistry, and Behaviour**, v. 74, p.609-616, 2003.

HALLADAY, A. K.; WAGNER, G. C.; SEKOWSKI, A.; ROTHMAN, R. B.; BAUMANN, M. H.; FISHER, H. Alterations in alcohol consumption, withdrawal seizures, and monoamine transmission in rats treated with phentermine and 5-hydroxy-L-tryptophan. **Synapse**, v.59, p.277-289, 2006.

HAMILTON, M. E.; MELE, A.; PERT, A. Striatal extracellular dopamine in conscious vs. anesthetized rats: effects of chloral hydrate anesthetic on responses to drugs of different classes. **Brain Research**, v.597, p.1-7, 1992.

HARDINGHAM, G. E.; BADING, H. The Yin and Yang of NMDA receptor signaling. **Trends in Neurosciences**, v.26, p.81-89, 2003.

HEERINGA, M.; ABERCROMBIE, E. Biochemistry of somatodendritic dopamine release in substantia nigra: an in vivo comparison with striatal dopamine release. **Journal of Neurochemistry**, v.65, p.192-200, 1995.

HERNANDEZ, L. F.; SEGOVIA, G.; MORA, F. Effects of activation of NMDA and AMPA glutamate receptors on the extracellular concentrations of dopamine, acetylcholine, and GABA in striatum of the awake rat: a microdialysis study. **Neurochemical Research**, v.28, p.1819-1827, 2003.

HERY, F.; TERNAUX, J. P. Regulation of release processes in central serotonergic neurons. **Journal de Physiologie (Paris)**, v.77, p.287-301, 1981.

HILLERED, L.; PERSSON, L.; PONTÉN, U.; UNGERSTEDT, U. Neurometabolic monitoring of the ischaemic human brain using microdialysis. **Acta Neurochirurgica**, v.102, p.91-97, 1990.

HILLERED, L.; PERSSON, L. Microdialysis for neurochemical monitoring of the human brain. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v.37, p.13-17, 2003.

HIRAMATSU, M.; MURASAWA, H.; MORI, H.; KAMEYAMA, T. Reversion of muscarinic autoreceptor agonist-induced acetylcholine decrease and learning impairment by dynorphin a (1-13), an endogenous kappa-opioid receptor agonist. **British Journal of Pharmacology**, v.123, p.920-926, 1998.

HIRANO, H.; DAY, J.; FIBIGER, H. C. Serotonergic regulation of acetylcholine release in rat frontal cortex. **Journal of Neurochemistry**, v.65, p.1139-1145, 1995.

HJORTH, S.; BENGTSSON, H. J.; KULLBERG, A.; CARLZON, D.; PEILOT, H.; AUERBACH, S. B. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. **Journal of Psychopharmacology**, v.14, p.177-185, 2000.

HOFFMAN, B. B. Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Gilman, A. G. (Ed.). **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill. 2001. Cap.2, p.236.

HORAL, M.; UNGERSTEDT, U.; PERSSON, B.; WESTGREN, M.; MARCUS, C. Metabolic adaptation in IUGR neonates determined with microdialysis - a pilot study. **Early Human Development**, v.42, p.1-14, 1995.

HOUNSGAARD, J.; NEDERGAARD, S.; GREENFIELD, S. Electrophysiological localization of distinct calcium potentials at selective somatodendritic sites in the substantia nigra. **Neuroscience**, v.50, p.513-518, 1992.

HUFF, J. K.; BRESNAHAN, J. F.; DAVIES, M. I. Preliminary evaluation of several disinfection/sterilization techniques for use with microdialysis probes. **Life Sciences**, v.6, p.275-287, 2003.

HUTCHINSON, P. J.; O'CONNELL, M. T.; KIRKPATRICK, P. J.; PICKARD, J. D. How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain? **Physiological Measurement**, v.23, p.75-109, 2002.

ICHIKAWA, J.; DAI, J.; MELZER, H. Y. Acetylcholinesterase inhibitors are neither necessary nor desirable for microdialysis studies of brain acetylcholine. **Current Separations**, v.19, p.37-43, 2000.

IMPERATO, A.; DI CHIARA, G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.239, p.219-228, 1986. Resumo.

IMPERATO, A.; PUGLISI-ALLEGRA, S.; CASOLINI, P.; ZOCCHI, A.; ANGELUCCI, L. Stress-induced enhancement of dopamine and acetylcholine release in limbic structures: role of corticosterone. **European Journal of Pharmacology**, v.165, p.337-338, 1989.

IMPERATO, A.; DAZZI, L.; OBINU, M. C.; GESSA, G. L.; BIGGIO, G. Inhibition of hippocampal acetylcholine release by benzodiazepines: antagonism by flumazenil. **European Journal of Pharmacology**, v.238, p.135-137, 1993a. Resumo.

IMPERATO, A.; OBINU, M. C.; GESSA, G. L. Effects of cocaine and amphetamine on acetylcholine release in the hippocampus and caudate nucleus. **European Journal of Pharmacology**, v.238, p.377-381, 1993b.

INOUE, T.; NAKAGAWA, S.; KITAICHI, Y.; IZUMI, T.; TANAKA, T.; MASUI, T.; KUSUMI, I.; DENDA, K.; KOYAMA, T. Long-term outcome of antidepressant-refractory depression: The relevance of unrecognized bipolarity. **Journal of Affective Disorders**, v.95, p.61-67, 2006.

INVERNIZZI, R. W.; GARATTINI, S. Role of presynaptic alpha2-adrenoceptors in antidepressant action: recent findings from microdialysis studies. **Progress and Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.28, p.819-827, 2004.

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S. Sarothralen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica**, v.52, p.288-290, 1986.

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S.; ISOI, K. A chromone from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v.29, p.1010, 1990.

JACOBSON, L.; SANDBERG, M.; HAMBERGER, A. Mass transfer in brain dialysis devices-a new method for the estimation of extracellular amino acids concentration. **Journal of Neuroscience Methods**, v.15, p.263-268, 1985.

JANHUNEN, S.; MIELIKAINEN, P.; PALDANIUS, P.; TUOMINEN, R. K.; AHTEE, L.; KAAKKOLA, S. The effect of nicotine in combination with various dopaminergic drugs on nigrostriatal dopamine in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.371, p.480-491, 2005. Resumo.

JAYASURIYA, H.; MCCHESENEY, J. D. Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**, v.52, p.325-331, 1989.

JAYASURIYA, H.; CLARK, A. M.; MCCHESENEY, J. D. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**, v.54, p.1314-1320, 1991.

JENKINS, W. J.; BECKER, J. B. Dynamic increases in dopamine during paced copulation in the female rat. **European Journal of Neuroscience**, v.18, p.1997-2001, 2003.

JENSEN, A. G.; HANSEN, S. H.; NIELSEN, E. O. Adhyperforin as contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. **Life Sciences**, v.68, p.1593-1605, 2001.

JOHANSEN, M. J.; NEWMAN, R. A.; MADDEN, T. The use of microdialysis in Pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacotherapy**, v.17, p.461-481, 1997.

KAEHLER, S. T.; SINNER, C.; CHATTERJEE, S. S.; PHILIPPU, A. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. **Neuroscience Letters**, v.262, p.199-202, 1999.

KALIVAS, P. W.; DUFFY, P. A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using dialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.56, p.961-967, 1991.

KARTNIG, T.; GRUBER, A.; SAUER, H. Comparative phytochemical investigations of *Hypericum* species. **Planta Medica**, v.55, p.215, 1989.

KARTNIG, T.; GÖBEL, I. Hypericin and pseudohypericin in cell cultures of various *Hypericum* species and chemotypes. **Planta Medica**, v.58, p.579, 1992.

KARTNIG, T.; GÖBEL, I.; HEYDEL, B. Production of hypericin, pseudohypericin and flavonoids in cell cultures of various *Hypericum* species and their chemotypes. **Planta Medica**, v.62, p.51-53, 1996.

KASPER, S.; ANGHELESCU, I.; SZEGEDI, A.; DIENEL, A.; KIESER, M. Superior efficacy of St Johns wort extract WS(R) 5570 compared to placebo in patients with major depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center trial [ISRCTN77277298]. **BMC Medicine**, v.23, p.14, 2006.

KEHR, J. Microdialysis/HPLC On-Line Dopamine and Metabolites. Disponível na Internet: <http://www.microdialysis.se/PDFfiler/Application_notes/Appnot12www.pdf>.

KEYS, A. S.; MARK, G. P. D1 and D2 dopamine receptor mediation of amphetamine-induced acetylcholine release in nucleus accumbens. **Neuroscience**, v.86, p.521-531, 1998.

KIEWERT, C.; BUCHHOLZER, M. L.; HARTMANN, J.; CHATTERJEE, S. S.; KLEIN, J. Stimulation of hippocampal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's Wort. **Neuroscience Letters**, v.364, p.195-198, 2004.

KISSINGER, P. T.; HART, J. B.; ADAMS, R. N. Voltammetry in brain tissue: a new physiological measurement. **Brain Research**, v.55, p.209-213, 1973.

KITAICHI, Y.; INOUE, T.; IZUMI, T.; NAKAGAWA, S.; KATO, A.; KOYAMA, T. Subchronic milnacipran treatment increases basal extracellular noradrenaline concentrations in the medial prefrontal cortex of rats. **European Journal of Pharmacology**, v.520, p.37-42, 2005.

KITANOV, G. M.; NEDIALKOV, P. T. Benzophenone O-glucoside, a biogenic precursor of 1,3,7-trioxygenated xanthenes in *Hypericum annulatum*. **Phytochemistry**, v. 57, p.1237-1243, 2001.

KOELTZOW, T. E.; XU, M.; COOPER, D. C.; HU, X. T.; TONEGAWA, S.; WOLF, M. E.; WHITE, F. J. Alterations in dopamine release but not dopamine autoreceptor function in dopamine D3 receptor mutant mice. **Neuroscience**, v.18, p.2231-2238, 1998.

KOPF, S. R.; BUCHHOLZER, M. L.; HILGERT, M.; LOFFELHOLZ, K.; KLEIN, J. Glucose plus choline improve passive avoidance behaviour and increase hippocampal acetylcholine release in mice. **Neuroscience**, v.103, p.365-371, 2001.

KUCZENSKI, R.; SEGAL, D. S.; ALZENSTEIN, M. Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. **The Journal of Neuroscience**, v.11, p.2703-2712, 1991.

KUMAR, V.; SING, P. N.; MURUGANANDAM, A. V.; BHATTACHARYA, S. K. Effect of Indian *Hypericum perforatum* L. on animal models of cognitive dysfunction. **Journal of Ethnopharmacology**, v.72, p.119-128, 2000.

KUMAZAWA, E.; HIROTANI, K.; BURFORD, S. C.; KAWAGOE, K.; MIWA, T.; MITSUI, I.; EJIMA, A. Synthesis and antitumor activity of novel benzophenone derivatives. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.45, p.1470-1474, 1997. Resumo.

KUROKAWA, M.; SHIOZAKI, S.; NONAKA, H.; KASE, H.; NAKAMURA, J.; KUWANA, Y. In vivo regulation of acetylcholine release via adenosine A1 receptor in rat cerebral cortex. **Neuroscience Letters**, v.209, p.181-184, 1996.

LA PEÑA, A.; LIU, P.; DERENDORF, H. Microdialysis in peripheral tissues. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, p.189-216, 2000.

LARSSON, C. I. The use of an "internal standard" for control of the recovery in microdialysis. **Life Sciences**, v.49, p.L73-L78, 1991.

LEONARD, T. O.; LYDIC, R. Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation, and respiratory rate. **Journal of Neurosciences**, v.17, p.774-785, 1997.

LINDE, K.; MULROW, C. D.; BERNER, M.; EGGER, M. St John's wort for depression. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.18, p.CD000448, 2005.

LIU, Y. L.; CHENG, A. T. A.; CHEN, H. R.; HSU, Y. P. P. Simultaneous HPLC of twelve monoamines and metabolites shows neuroblastoma cell line releases HVA and HIAA. **Biomedical Chromatography**, v.14, p.544-548, 2000.

LIU, P.; FUHRHERR, R.; WEBB, A. I.; OBERMANN, B.; DERENDORF, H. Tissue penetration of cefpodoxime into the skeletal muscle and lung in rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.25, p.439-444, 2005.

LONNROTH, P.; JANSSON, P. A.; SMITH, U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. **The American Journal of Physiology**, v.253, p.228-31, 1987.

MACHA, S.; MITRA, A. Ocular pharmacokinetics in rabbits using a novel dual probe microdialysis technique. **Experimental Eye Research**, v.,72, p.89-99, 2001.

MÁRTONFI, P.; REPCÁK, M.; CICCARELLI, D.; GARBARI, F. *Hypericum perforatum* L. - chemotype without rutin from Italy. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.659-661, 2001.

MATHEWS, T. A.; JOHN, C. E.; LAPA, G. B.; BUDYGIN, E. A.; JONES, S. R. No role of the dopamine transporter in acute ethanol effects on Striatal dopamine dynamics. **Synapse**, v.60, p.288-294, 2006.

MATHY, F. X.; DENET, A. R.; VROMAN, B.; CLARYS, P.; BAREL, A.; VERBEECK, R. K.; PREAT, V. In vivo tolerance assessment of skin after insertion of subcutaneous and cutaneous microdialysis probes in the rat. **Skin Pharmacology and applied Skin Physiology**, v.16, p.18-27, 2003. Resumo.

MATSUMOTO, M.; INAGAKI, M.; KIUCHI, Y.; IZUMI, J.; YAMAZAKI, Y.; OGUCHI, K. Role of calcium ions in dopamine release induced by sodium cyanide perfusion in rat striatum. **Neuropharmacology**, v.32, p.681-688, 1993.

MATSUMOTO, M.; KANNOB, M.; TOGASHIA, H.; UENOA, K.; OTANIA, H.; MANOB, Y.; YOSHIOKAA, M. Involvement of GABAA receptors in the regulation of the prefrontal cortex on dopamine release in the rat dorsolateral striatum. **European Journal of Pharmacology**, v.482, p.177– 184, 2003.

MCNAY, E. C.; SHERWIN, R. S. From artificial cerebro-spinal fluid (aCSF) to artificial extracellular fluid (aECF): microdialysis perfusate composition effects on in vivo brain ECF glucose measurements. **Neuroscience Methods**, v.132, p.35-43, 2004.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Neurotransmitters and their receptors in the basal ganglia. **Advances in Neurology**, v.60, p.93-101, 1993. Resumo.

MCQUADE, R.; CRETON, D.; STANFORD, S. C. Effect of novel environmental stimuli on rat behaviour and central noradrenaline function measured by in vivo microdialysis. **Psychopharmacology**, v.145, p.393-400, 1999.

MEDINA, M. A.; MARTINEZ-POVEDA, B.; AMORES-SANCHEZ, M. I.; QUESADA, A. R. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? **Life Sciences**, v.79, p.105-111, 2006.

MELLENDEZ, R. I.; RODD, Z. A.; MCBRIDE, W. J.; MURPHY, J. M. Dopamine receptor regulation of ethanol intake and extracellular dopamine levels in the ventral pallidum of alcohol preferring (P) rats. **Drug and Alcohol Dependence**, v.77, p.293-301, 2005.

MENACHERRY, S.; HUBERT, W.; JUSTICE, J. B. Jr. *In vivo* calibration of microdialysis probes for exogenous compounds. **Analytical Chemistry**, v.64, p.577-583, 1992.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. L. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v.73, p.462-471, 2002.

MENNINI, T.; GOBBI, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. **Life Sciences**, v.75, p.1021-1027, 2004.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL, E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Avila (1910). **Caderno de Farmácia**, v.15, p.25-47, 1997.

MERUELO, D.; LAVIE, G.; LAVIE, D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.85, p.5230-5234, 1988.

MESHUL, C. K.; KAMEL, D.; MOORE, C.; KAY, T. S.; KRENTZ, L. Nicotine alters striatal glutamate function and decreases the apomorphine-induced contralateral rotations in 6-OHDA-lesioned rats. **Experimental Neurology**, v.175, p.257-274, 2002.

MIELE, M.; BOUTELE, M. G.; FILLENZ, M. The source of physiologically stimulated glutamate efflux from the striatum of conscious rats. **The Journal of Physiology**, v.497, p.745-751, 1996a.

MIELE, M.; BERNERS, M.; BOUTELE, M. G.; KUSAKABE, H.; FILLENZ, M. The determination of the extracellular concentration of brain glutamate using quantitative microdialysis. **Brain Research**, v.707, p.131-133, 1996b.

MIELE, M.; MURA, M. A.; ENRICO, P.; ESPOSITO, G.; SERRA, P. A.; MIGHELI, R.; ZANGANI, D.; MIELE, E.; DESOLE, M. S. On the mechanism of d-amphetamine-induced changes in glutamate, ascorbic acid and uric acid release in the striatum of freely moving rats. **British Journal of Pharmacology**, v.129, p.582-588, 2000.

MIGNON, L. J.; WOLF, W. A. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin reduces striatal glutamate in an animal model of Parkinson's disease. **Neuroreport**, v.16, p.699-703, 2005.

MINDERMAN, T.; ZIMMERLI, W.; GRATZL, O. Rifampicin Concentrations in Various Compartments of the Human Brain: A Novel Method for Determining Drug Levels in the Cerebral Extracellular Space. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2626-2629, 1998.

MITUSHIMA, D.; MIZUNO, T.; KIMURA, F. Age-related changes in diurnal acetylcholine release in the prefrontal cortex of male rats as measured by microdialysis. **Neuroscience**, v.72, p.429-434, 1996.

MIZUNO, T.; ENDO, Y.; ARITA, J.; KIMURA, F. Acetylcholine release in the rat hippocampus as measured by the microdialysis method correlates with motor activity and exhibits a diurnal variation. **Neuroscience**, v.44, p.607-612, 1991.

MOGENSEN, G. J.; YANG, C. R. E.; YIM, C. Y.; Influence of dopamine limbic inputs to the nucleus accumbens. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.537, p.86-100, 1988. Resumo.

MOGHADDAM, B.; BUNNEY, B. S. Ionic composition of microdialysis perfusing solution alters the pharmacological responsiveness and basal outflow of striatal dopamine. **Journal of Neurochemistry**, v.53, p.652-654, 1989. Resumo.

MOGHADDAM, B. Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. **Journal of Neurochemistry**, v.60, p.1650-1657, 1993. Resumo.

MOOR, E.; DE BOER, P.; WESTERINK, B. H. GABA receptors and benzodiazepine binding sites modulate hippocampal acetylcholine release in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v.359, p.119-26, 1998. Resumo.

MORGAN, M. E.; SINGHAL, D.; DERSON, D. Quantitative assessment of blood-brain barrier damage during microdialysis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.277, p.1167-1176, 1996.

MORTAZAVI, S.; THOMPSON, J.; BAGHDOYAN, H. A.; LYDIC, R. Fentanyl and morphine, but not remifentanyl, inhibit acetylcholine release in pontine regions modulating arousal. **Anesthesiology**, v.90, p.1070-7, 1999.

MÜLLER, M.; HAAG, O.; BURGDORFF, T.; GEOGOPOULOS, A.; WENINGER, W.; JANSEN, B.; STANEK, G.; PEHAMBERGER, H.; AGNETER, E.; EICHLER, H. Characterization of Peripheral-Compartment Kinetics of Antibiotics by In Vivo Microdialysis in Humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, p.2703-2709, 1996.

MÜLLER, M. Microdialysis in clinical drug delivery studies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, p.255-269, 2000.

MÜLLER, W. E.; SINGER, A.; WONNEMANN, W.; HAFNER, U.; ROLLI, M.; SCHAFFER, C. Hyperforin represents the neurotransmitters reuptake inhibiting constituent of *Hypericum* extract. **Pharmacopsychiatry**, v.31, p.16-21, 1998.

MÜLLER, W. E.; SINGER, A.; WONNEMANN, M. Hyperforin – Antidepressant Activity by a Novel Mechanism of Action. **Pharmacopsychiatry**, v.34, p.S98-S102, 2001.

MÜLLER, W. E. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. **Pharmacological Research**, v.47, p.101-109, 2003.

MURCK, H.; UHR, M.; SCHAFFLER, K.; SEIBEL, K. Effects of *Hypericum* extract (LI160) on the change of auditory evoked potentials by cortisol administration. **Neuropsychobiology**, v.50, p.128-133, 2004

NAIR, S. G.; GUDELSKY, G. A. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) enhances the release of acetylcholine by 5-HT₄ and D1 receptor mechanisms in the rat prefrontal cortex. **Synapse**, 58, p.229-235, 2005.

- NESTLER, E. J.; CARLEZON, A. JR. The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. **Biological Psychiatry**, v.59, p.1151-1159, 2006.
- NIEOULLON, A.; CHÉRAMY, A.; GLOWINSKI, J. Release of dopamine in vivo from cat substantia nigra. **Nature**, v.266, p.375-377, 1977.
- NILSSON, O. G.; LEANZA, G.; BJORKLUND, A. Acetylcholine release in the hippocampus: regulation by monoaminergic afferents as assessed by in vivo microdialysis. **Brain Research**, v.584, p.132-40, 1992.
- NÖR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ, A. B. F.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILLAUME, D.; von POSER, G. L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the Trigynobrathys section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.517-519, 2004.
- NUSSER, Z.; MULVIHILL, E.; STREIT, P.; SOMOGYI, P. Subsynaptic segregation of metabotropic and ionotropic glutamate receptors as revealed by immunogold localization. **Neuroscience**, v.61, p.421-427, 1994.
- OGREN, S. O.; KEHR, J.; SCHOTT, P. A. Effects of ventral hippocampal galanin on spatial learning and on in vivo acetylcholine release in the rat. **Neuroscience**, v.75, p.1127-1140, 1996.
- OLSON, R. J.; JUSTICE, J. B. JR. Quantitative microdialysis under transient conditions. **Analytical Chemistry**, v.15, p.1017-1022, 1993.
- OROSCO, M.; MORET, C.; BRILEY, M.; NICOLAIDIS, S. Effect of mefenorex on 5-HT release: studies in vitro on rat hypothalamic slices and in vivo by microdialysis. **Pharmacological Biochemical and Behaviour**, v.50, p.485-90, 1995.
- OXENKRUG, G. F.; LAPIN, I. P. Effect of dimethyl and monomethyl tricyclic antidepressants on central 5-hydroxytryptamine processes in the frog. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.23, p.971-2, 1971.
- PAGE, M. E.; LUCKI, I. Effects of acute and chronic reboxetine treatment on stress-induced monoamine efflux in the rat frontal cortex. **Neuropsychopharmacology**, v.27, p.237-47, 2002.
- PALLARES, M.; DARNAUDERY, M.; DAY, J.; LE MOAL, M.; MAYO, W. The neurosteroid pregnenolone sulfate infused into the nucleus basalis increases both acetylcholine release in the frontal cortex or amygdala and spatial memory. **Neuroscience**, v.87, p.551-8, 1998.
- PARSONS, L. H.; SMITH, A. D.; JUSTICE, J. B. JR. The in vivo microdialysis recovery of dopamine is altered independently of basal level by 6-hydroxydopamine lesions to the nucleus accumbens. **Neuroscience Methods**, v.40, p.139-47, 1991.

PARSONS, L. H.; JUSTICE, J. B. JR. Quantitative approaches to in vivo brain microdialysis. **Critical Reviews in Neurobiology**, v.8, p189-220, 1994.

PARSONS, L. H.; KERR, T. M.; WEISS, F. Simple microbore high-performance liquid chromatographic method for the determination of dopamine and cocaine from a single in vivo brain microdialysis sample. **Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications**, v.709, p.35-45, 1998.

PAULKE, A.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WURGLICS, M. Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies and Biomedical Life Sciences**, v.832, p.109-13, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates**. 4. ed. New York: Academic Press, 1998.

PECCHIO, M.; SOLIS, P. N.; LOPEZ-PEREZ, J. L.; VASQUEZ, Y.; RODRIGUEZ, N.; OLMEDO, D.; CORREA, M.; SAN FELICIANO, A.; GUPTA, M. P. Cytotoxic and antimicrobial benzophenones from the leaves of *Tovomita longifolia*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.410-3, 2006.

PERAHIA, D. G.; KAJDASZ, D. K.; WALKER, D. J.; RASKIN, J.; TYLEE, A. Duloxetine 60 mg once daily in the treatment of milder major depressive disorder. **International Journal of Clinical Practice**, v.60, p.613-620, 2006.

PEPEU, G.; GIOVANNINI, M. G. Changes in acetylcholine extracellular levels during cognitive processes. **Learning & Memory**, v.11, p.21-27, 2004.

PERSSON, L.; HILLERED, L. Chemical monitoring of neurosurgical intensive care patients using intracerebral microdialysis. **Journal of Neurosurgery**, v.76, p.72-80, 1992.

PFAUS, J. G.; DAMSMA, G.; NOMIKOS, G. G.; WENKSTERN, D. G.; BLAHA, C. D.; PHILLIPS, A. G.; FIBIGER, H. C. Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. **Brain Research**, v.530, p.345-348, 1990.

PIERCE, R.C.; KALIVAS, P.W. Amphetamine Produces Sensitized Increases in Locomotion and Extracellular Dopamine Preferentially in the Nucleus Accumbens Shell of Rats Administered Repeated Cocaine. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.275, p.1019-1029, 1995.

PISTIS, M.; FERRARO, L.; PIRA, L.; FLORE, G.; TANGANELLI, S.; GESSA, G. L.; DEVOTO, P. Delta(9)-tetrahydrocannabinol decreases extracellular GABA and increases extracellular glutamate and dopamine levels in the rat prefrontal cortex: an in vivo microdialysis study. **Brain Research**, v.948, p.155-158, 2002.

PLOCK, N.; KLOFT, C. Microdialysis – theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.25, p.1-24, 2005.

PORRAS, G.; DI MATTEO, V.; ESPOSITO, E.; SPAMPINATO, U. Central serotonin receptors selectively regulate the impulse dependent exocytosis of dopamine in the rat striatum: in vivo studies with morphine, amphetamine and cocaine. **Neuropharmacology**, v.43, p.1099-1109, 2002.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JAFRE, M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, v.47, p.379-391, 1978.

PUBMED. Disponível em <<http://www.pubmed.gov>>. Acesso em 11.7.2006.

PUDOVKINA, O.; KAWAHARA, Y.; de VRIES, J.; WESTERINK, B. The release of noradrenaline in the locus coeruleus and prefrontal cortex studied with dual-probe microdialysis. **Brain Research**, v.906, p.38-45, 2001.

PUPPALA, D.; MAASWINKEL, H.; MASON, B.; LEGAN, S. J.; LI, L. An in vivo microdialysis study of light/dark-modulation of vitreal dopamine release in zebrafish. **Journal of Neurocytology**, v.33, p.193-201, 2004.

QU, Y.; van DER GUCHT, E.; MASSIE, A.; VANDENBUSSCHE, E.; VANDESANDE, F.; ARCKENS, L. In vivo microdialysis in the visual cortex of awake cat. III. Histological verification. **Brain Research Protocols**, v.7, p.52-60, 2001.

QUARTA, D.; CIRUELA, F.; PATKAR, K.; BORYCZ, J.; SOLINAS, M.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; WISE, R. A.; GOLDBERG, S. R.; HOPE, B. T.; WOODS, A. S.; FERRE, S. Heteromeric Nicotinic Acetylcholine-Dopamine Autoreceptor Complexes Modulate Striatal Dopamine Release. **Neuropsychopharmacology**, v.17, 2006. Epub ahead of print

RADA, P.; MARK, G. P.; VITEK, M. P.; MANGANO, R. M.; BLUME, A. J.; BEER, B.; HOEBEL, B. G. Interleukin-1 beta decreases acetylcholine measured by microdialysis in the hippocampus of freely moving rats. **Brain Research**, v.550, p.287-290, 1991. Resumo.

RAGGI, M. A.; SABBIONI, C.; CASAMENTI, G.; GERRA, G.; CALONGHI, N.; MASOTTI, L. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B. Biomedical Sciences and Applications**, v.730, p.201-211, 1999.

RAGOZZINO, M. E.; UNICK, K. E.; GOLD, P. E. Hippocampal acetylcholine release during memory testing in rats: augmentation by glucose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.4693-4698, 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Medicamentos usados nos distúrbios afetivos. In: **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p.457-460.

REDGATE, E. S.; BOGGS, S.; GRUDZIAK, A.; DEUTSCH, M. Polyamines in brain tumor therapy. **Journal of Neuro-oncology**, v.25, p.167-179, 1995.

REMBLIER, C.; PONTCHARRAUD, R.; VANDEL, B.; PIRIOU, A.; HUGUET, F. Origin of extracellular dopamine increase induced by lactic acid Striatal perfusion monitored by microdialysis in the awake rat. **Neuroreport**, v.23, p.1961-1964, 1999.

RHODES, M. E.; LI, P. K.; BURKE, A. M.; JOHNSON, D. A. Enhanced plasma DHEAS, brain acetylcholine and memory mediated by steroid sulfatase inhibition. **Brain Research**, v.773, p.28-32, 1997.

ROBSON, N. K. B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 1. Intrageneric classification. **Bulletin of the British Museum (Natural History)**. Botany series, v.5, p.293-355, 1977.

ROBSON, N. K. B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Seccions 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. **Bulletin of the British Museum (Natural History)**. Botany series, v.20, p.1-151, 1990.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v.36, p.1381-1385, 1994.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v.40, p.1447-1452, 1995.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A. C.; HOSTETTMANN, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v.42, p.185-188, 1996.

ROMINES, K. R.; FREEMAN, G. A.; SCHALLER, L. T.; COWAN, J. R.; GONZALES, S. S.; TIDWELL, J. H.; ANDREWS, C. W. 3RD; STAMMERS, D. K.; HAZEN, R. J.; FERRIS, R. G.; SHORT, S. A.; CHAN, J. H.; BOONE, L. R. Structure-activity relationship studies of novel benzophenones leading to the discovery of a potent, next generation HIV nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.727-739, 2006.

ROMMELSPACHER, H.; SIEMANOWITZ, B.; MANNEL, M. Acute and chronic actions of a dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and a hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurons in rat nucleus accumbens. **Pharmacopsychiatry**, v.34, p.119-126, 2001.

RONQUIST, G.; HUGOSSON, R.; SJOLANDER, U.; UNGERSTEDT, U. Treatment of malignant gliomas by a new therapeutic principle. **Acta Neurochirurgica**, v.114, p.8-11, 1992.

ROSSI, S.; SINGER, S.; SHEARMAN, E.; SERSHEN, H.; LAJTHA, A. The effects of cholinergic and dopaminergic antagonists on nicotine-induced cerebral neurotransmitter changes. **Neurochemical Research**, v.30, p.541-558, 2005.

RUETER, L. E.; FORNAL, C. A.; JACOBS, B. L. A critical review of 5-HT brain microdialysis and behavior. **Rev Neurosci.**, v.8, p.117-37, 1997. Resumo.

RUTTER, J. J.; GUNDLAH, C.; AUERBACH, S. B. Systemic uptake inhibition decreases serotonin release via somatodendritic autoreceptor activation. **Synapse**, v.20, p.225-233, 1995. Resumo.

SAIGUSA, T.; FUSA, K.; OKUTSU, H.; KOSHIKAWA, N. Monitoring of extracellular dopamine levels in the dorsal striatum and the nucleus accumbens with 5-minute on-line microdialysis in freely moving rats. **Journal of Oral Science**, v. 43, p.129-34, 2001.

SALORD, F.; KEITA, H.; LECHARNY, J. B.; HENZEL, D.; DESMONTS, J. M.; MANTZ, J. Halothane and isoflurane differentially affect the regulation of dopamine and gamma-aminobutyric acid release mediated by pré-synaptic acetylcholine receptors in the rat striatum. **Anesthesiology**, v.86, p.632-641, 1997.

SARRE, S.; HERREGODTS, P. ; DELEU, D. ; DEVRIEZE, A.; DE KLIPPEL, N. ; EBINGER; G. ; MICHOTTE Y. Biotransformation of L-dopa in striatum and substantia nigra of rats with a unilateral, nigrostriatal lesion: a microdialysis study. **Archives in Pharmacology**, v.346, p.277-285, 1992.

SARRE, S.; EBINGER, G.; MICOTE, Y. Levodopa biotransformation in hemi-Parkinson rats: effect of dopamine receptor agonists and antagonists. **European Journal of Pharmacology**, v.296, p.247-260, 1996.

SARRE, S.; SMOLDERS, I.; THORRE, K.; EBINGER. G.; MICOTE, Y. Biotransformation of locally applied precursors of dopamine, serotonin and noradrenaline in striatum and hippocampus: a microdialysis study. **Journal of Neural Transmission**, v.104, p.1215-1228, 1997.

SARRE, S.; VANDENEDE, D.; EBINGER, G.; MICOTE, Y. Biotransformation of L-DOPA to dopamine in the substantia nigra of freely moving rats: effect of dopamine receptor agonists and antagonists. **Journal of Neurochemistry**, v.70, p.1730-1739, 1998.

SARRE, S.; YUAN, H.; JONKERS, N.; VAN HEMELRIJCK, A.; EBINGER, G.; MICOTE, Y. In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, p.29-39, 2004.

SAWCHUK, R. J.; ELMQUIST, W. F. Microdialysis in the study of drug transporters in the CNS. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, p.295-307, 2000.

SCHECHTER, L. E.; SMITH, D. L.; ROSENZWEIG-LIPSON, S.; SUKOFF, S. J.; DAWSON, L. A.; MARQUIS, K.; JONES, D.; PIESLA, M.; ANDREE, T.; NAWOSCHIK, S.; HARDER, J. A.; WOMACK, M. D.; BUCCAFUSCO, J.; TERRY, A. V.; HOEBEL, B.; RADA, P.; KELLY, M.; ABOU-GHARBIA, M.; BARRETT, J. E.; CHILDERS, W. Lecozotan (SRA-333): A selective serotonin 1A receptor antagonist that enhances the stimulated release of glutamate and acetylcholine in the hippocampus and possesses cognitive-enhancing properties. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.314, p.1274-1289, 2005.

SCHEYER, R. D.; DURING, M. J.; HOCHHOLZER, J. M.; SPENCER, D. D.; CRAMER, J. A.; MATTSON, R. H. Phenytoin concentrations in the human brain: an in vivo microdialysis study. **Epilepsy Research**, v.18, p.227-32, 1994a.

SCHEYER, R. D.; DURING, M. J.; SPENCER, D. D.; CRAMER, J. A.; MATTSON, R. H. Measurement of carbamazepine and carbamazepine epoxide in the human brain using in vivo microdialysis. **Neurology**, v.44, p.1469-1472, 1994b.

SCHILDKRAUT, J. J.; KETY, S. S. Biogenic amines and emotion. **Science**, v.156, p.21-37, 1967. Resumo.

SCHULZ, V. Safety of St. John's Wort extract compared to synthetic antidepressants. **Phytomedicine**, v.13, p.199-204, 2006.

SCHWARTZ, J. C.; DIAZ, J.; PILON, C.; SOKOLOFF, P. Possible implications of the dopamine D(3) receptor in schizophrenia and in antipsychotic drug actions. **Brain Reseach. Brain Research Reviews**, v.31, p.277-287, 2000.

SEGOVIA, G.; MORA, F. Dopamine and GABA increases produced by activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens are decreased during aging. **Neurobiology of Aging**, v.26, p.91-101, 2005.

SHEARMAN, E.; ROSSI, S.; SERSHEN, H.; HASHIM, A.; LAJTHA, A. Locally administered low nicotine-induced neurotransmitter changes in areas of cognitive function. **Neurochemical Research**, v.30, p.1055-1066, 2005.

SCHMITT, A. C.; RAVAZZOLO, A. P.; von POSER, G. L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.239-245, 2001.

SIDDIQUI, M. M.; SHUAIB, A. Intracerebral Microdialysis and Its Clinical Application: A Review. **Methods**, v.23, p.83-94, 2001.

SIMMEN, U.; HIGELIN, J.; BERGER-BÜTER, K.; SCHAFFNER, W.; LUNDSTROM, K. Neurochemical studies with St. John' s wort *in vitro*. **Pharmacopsychiatry**, v.34S, p.137-142, 2001.

SIMMEN, U.; BOBIRNAC, I.; SCHOEFFTER P. Antagonist effect of pseudohypericin at CRF1 receptors. **European Journal Pharmacology**, v.5, p.251-256, 2003.

SINGER, M. S.; WONNEMANN, M.; MÜLLER, W. E. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.290, p.1363-1368, 1999.

SMITH, J. E.; CO, C.; YIN, X.; SIZEMORE, G. M.; LIGUORI, A.; JOHNSON, W. E.; MARTIN, T.J. Involvement of cholinergic neuronal systems in intravenous cocaine self-administration. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.27, p.841-850, 2004.

SMITH, J. E.; CO, C.; COLLIER, M. D.; HEMBY, S. E.; MARTIN, T. J. Self-administered heroin and cocaine combinations in the rat: additive reinforcing effects-supra-additive effects on nucleus accumbens extracellular dopamine. **Neuropsychopharmacology**, v.3, p.139-150, 2006.

SOMBOONTHUM, P.; MATSUDA, T.; ASANO, S.; SAKAUE, M.; BABA, A. MKC-242, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, facilitates cortical acetylcholine release by a mechanism different from that of 8-OH-DPAT in awake rats. **Neuropharmacology**, v.36, p.1733-1739, 1997, resumo.

STAHL, M.; BOUW, R.; JACKSON, A.; PAY, V. Humam microdialysis. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.3, p.165-178, 2002.

STAHL, S. M. **Essential Psychopharmacology – neuroscientific basis and practical applications**. 2. ed. EUA: Cambridge University Press, 2000. 575 p.

STAHL, L. Drug distribution studies with microdialysis. 1. Tissue dependent difference in recovery between caffeine and theophylline. **Life ScienceS**, v.49, p.135-1842, 1991.

STEINIGER, B.; KRETSCHMER, B. D. Glutamate and GABA modulate dopamine in the pedunculo pontine tegmental nucleus. **Experimental Brain Research**, v.149, p.422-430, 2003.

STENKEN, J. A. Methods and issues in microdialysis calibration. **Analytica Chimica Acta**, v.379, p.337-358, 1999.

STRINDBERG, L.; LONNROTH, P. Validation of an endogenous reference technique for the calibration of microdialysis catheters. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v.60, p.205-211, 2000.

TANAKA, M. Emotional stress and characteristics of brain noradrenaline release in the rat. **Industrial Health**, v.37, p.143-156, 1999.

TANDA, G.; PONTIERI, F. E.; DI CHIARA, G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu₁ opioid receptor mechanism. **Science**, v.276, p.2048-2050, 1997.

TANDA, G.; LODDO, P.; DI CHIARA, G. Dependence of mesolimbic dopamine transmission on delta9-tetrahydrocannabinol. **European Journal of Pharmacology**, v.376, p.23-26, 1999.

TANGANELLI, S.; SANDAGER NIELSEN, K.; FERRARO, L.; ANTONELLI, T.; KEHR, J.; FRANCO, R.; FERRE, S.; AGNATI, L. F.; FUXE, K.; SCHEEL-KRUGER, J. Striatal plasticity at the network level. Focus on adenosine A2A and D2 interactions in models of Parkinson's Disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v.10, p.273-280, 2004.

TELLEZ, S.; COLPAERT, F.; MARIEN, M. Alpha2-adrenoceptor modulation of cortical acetylcholine release in vivo. **Neuroscience**, v.89, p.1041-1050, 1999.

TIMMERMAN, W.; WESTERINK, B. H. Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? **Synapse**, v.27, p.242-261, 1997.

TREMBLAY, P.; BLIER, P. Catecholaminergic strategies for the treatment of major depression. **Current Drug Targets**, v.7, p.149-158, 2006.

TRIFUNOVIC, S.; VAJS, V.; MACURA, S.; JURANIC, N.; DJARMATI, Z.; JANKOV, R.; MILOSAVLJEVIC, S. Oxidation products of hyperforin from *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, v.49, p.1305-1310, 1998.

TSAI, T. Assaying protein unbound drugs using Microdialysis techniques. **Journal of Chromatography B**, v.797, p.161-173, 2003.

TSUKADA, H. Pre-clinical evaluation of effects of acetylcholinesterase inhibition on the cerebral cholinergic neuronal system and cognitive function: PET study in conscious monkeys. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v.124, p.153-161, 2004. Resumo.

UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiologica Scandinavica Suppl**, v.367, p.69-93, 1971. Resumo

UNGERSTEDT, U.; HALLSTRÖM, A. In Vivo Microdialysis – A New Approach to the Analysis of Neurotransmitters in the Brain. **Life Sciences**, v.41, p.861-864, 1987.

UNGERSTEDT, U.; PYCOCK, C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften**, v.30, p.44-55, 1974. Resumo.

VAHABZADEH, A; FILLENZ, M. Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotonergic neurons in the rat hippocampus using microdialysis. **The European Journal of Neuroscience**, v.6, p.1205-1212, 1994.

VIANA, A. Estudo da atividade psicofarmacológica de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul e toxicidade aguda de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltld. **Dissertação de Mestrado**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2002, 108 p.

- VIANA, A. F.; HECKLER, A. P.; FENNER, R.; RATES, S. M. K. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Brazilian Journal and Biological Research**, v.36, p.631-634, 2003.
- VIANA, A. F.; REGO, J.C.; von POSER, G. L.; FERRAZ, A. F.; HECKLER, A.P.; COSTENTIN, J.; RATES, S. M. K. The antidepressant like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake **Neuropharmacology**, v.49, p.1042-1052, 2005.
- VIGNY, M.; BON, S.; MASSOULIE, J.; LETERRIER, F. Active-site catalytic efficiency of acetylcholinesterase molecular forms in *Electrophorus*, *torpedo*, rat and chicken. **European Journal of Biochemistry**, v.85, p.317-323, 1978.
- VIRAG, L.; WHITTINGTON, R. A. Highly sensitive chromatographic assay for dopamine determination during in vivo cerebral microdialysis in the rat. **Journal of Chromatography B. Analytical Technologies and Biomedical Life Sciences**, v.772, p.267-272, 2002.
- VLIETINCK, A. J.; BRUYNE, T. D. E.; APERS, S.; PIETERS, L. A. Plant derived leading compounds chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV-1) infection. **Planta Medica**, v.64, p.97-109, 1998.
- von POSER, G. L. ; RECH, S.; RATES, S. M. K. Chemical and pharmacological aspects of Southern Brazilian *Hypericum* species. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**. Global Science Books, cap. 56, v. 4, p. 509 – 515, 2006.
- WAGA, J. Ganciclovir delivery through an intravitreal microdialysis probe in rabbit. **Acta Ophthalmologica Scandinavica**, v.78, p.369-371, 2000.
- WANG, C. T.; SHUI, H. A.; HUANG, R. L.; TAI, M. Y.; PENG, M. T.; TSAI, Y. F. Sexual motivation is demasculinized, but not feminized, in prenatally stressed male rats. **Neuroscience**, v.138, p.357-364, 2006.
- WANG, Y.; WELTY, D. F. The simultaneous estimation of the influx and efflux blood-brain barrier permeabilities of gabapentin using microdialysis-pharmacokinetic approach. **Pharmaceutical Research**, v.13, p.398-403, 1996.
- WATANABE, H.; SHIMIZU, H.; MATSUMOTO, K. Acetylcholine release detected by trans-striatal dialysis in freely moving rats correlates with spontaneous motor activity. **Life Sciences**, v.47, p.829-832, 1990.
- WEIKOP, P.; EGESTAD, B.; KEHR, J. Application of triple-probe microdialysis for fast pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of dopaminergic activity of drug candidates in the rat brain. **Journal of Neuroscience Methods**, v.140, p.59-65, 2004.
- WESTERINK, B. H. Sequence and significance of dopamine metabolism in the rat brain. **Neurochemistry International**, v.7, p.221-227, 1985.

WESTERINK, B. H.; HOFSTEEDE, R. M.; TUNTNER, J.; DE VRIES, J. B. Use of calcium antagonism for the characterization of drug-evoked dopamine release from the brain of conscious rats determined by microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v.52, p.722-729, 1989.

WESTERINK, B. H.; SANTIAGO, M.; DE VRIES, J. B. The release of dopamine from nerve terminals and dendrites of nigrostriatal neurons induced by excitatory amino acids in the conscious rat. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.345, p.523-529, 1992. Resumo.

WESTERINK, B. H. Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour. **Behavioural Brain Research**, v.70, p.103-124, 1995.

WHO, 2000. Disponível no endereço:
<http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/em/>.

WISE, R. A.; ROMPRE, P-P. Brain microdialysis and reward. **Annual Review of Psychology**, v.40, p.191-225, 1989.

WOOD, P. L.; KIM, H. S.; MARIEN, M. R. Intracerebral dialysis: direct evidence for the utility of 3-mt measurements as an index of dopamine release. **Life Sciences**, v.6, p.1-5, 1987.

WOOD, P. L.; KIM, H. S.; RAO, T. S. Dynamics of the striatal 3-MT pool in the rat and mouse: species differences as assessed by steady-state measurements and intracerebral dialysis. **Life Sciences**, v.42, p.2275-2281, 1988.

WURGLICS, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. Hypericum perforatum: a 'modern' herbal antidepressant: pharmacokinetics of active ingredients. **Clinical Pharmacokinetics**, v.45, p.449-468, 2006.

XI, Z. N.; RAMAMOORTHY, S.; SHEN, H.; LUKE, R.; SAMUVEL, D. J.; KALIVAS, P. W. GABA transmission in the nucleus accumbens is altered after withdrawal from repeated cocaine. **Journal of Neuroscience**, v.23, p.3498-3505, 2003.

YAMAGUCHI, T.; SUZUKI, M.; YAMAMOTO, M. Evidence for 5-HT4 receptor involvement in the enhancement of acetylcholine release by p-chloroamphetamine in rat frontal cortex. **Brain Research**, v.772, p.95-101, 1997.

YAMAKI, M.; ISHIGURO, K. Antimicrobial activity of naturally occurring and synthetic phloroglucinol against *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v.8, p.112-114, 1994.

YAMAMOTO, B. K.; PEHEK, E. A.; MELTZER, H. Y. Brain regions effects of clozapine on amino acid and monoamine transmission. **Journal of Clinical Psychiatry**, v.55, p.8-14, 1994.

YOSHIMOTO, K.; YAYAMA, K.; SORIMACHI, Y.; TANI, J.; UEMARA, K.; YOSHIDA, T.; OGATA, M.; NISHIMURA, A.; UEDA, S.; KOMURA, S. Effects of ion channel blockers on rapid postmortem changes in extracellular dopamine and serotonin levels in the rat nucleus accumbens. **Forensic Science International**, v.85, p.29-39, 1997.

YOSHITAKE, T.; IIZUKA, R.; YOSHITAKE, S.; WEIKPOP, P.; MÜLLER, W. E.; ÖGREN, S. O.; KEHR. Hypericum perforatum L. (St John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. **British Journal of Pharmacology**, v.142, p.414-418, 2004.

ZAPATA, A.; WITKIN, J. M.; SHIPPENBERG, T. S. Selective D3 receptor agonist effects of (+)-PD 128907 on dialysate dopamine at low doses. **Neuropharmacology**, v.41, p.351-359, 2001.

ZAPATA, A.; SHIPPENBERG, T. S. Lack of functional D2 receptors prevents the effects of the D3-preferring agonist (C)-PD 128907 on dialysate dopamine levels. **Neuropharmacology**, v.48, p.43-50, 2005.

ZETTERSTRÖM, T.; SHARP, T.; UNGERSTEDT, U. In vivo measurement of dopamine and its metabolites by Intracerebral dialysis: changes after d-amphetamine. **Journal of Neurochemistry**, v.41, p.1769-1773, 1983.

ZHANG, M. Y.; BEYER, C. E. Measurement of neurotransmitters from extracellular fluid in brain by in vivo microdialysis and chromatography-mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.24, p.492-499, 2006.

ZHANG, W.; WAN, F.; XIE, Y.; GU, J.; WANG, J.; YAMAMOTO, K.; JIN, L. Amperometric determination of (R)-N-methylsalsolinol and monoamine neurotransmitters with liquid chromatography using functionalized multi-wall carbon nanotube modified electrode in Parkinson's patient' cerebrospinal fluid. **Analytica Chimica Acta**, v.512, p.207-214, 2004.

ZHAO, J. L.; PERGOLA, P. E.; ROMAN, L. J.; KELLOGG, D. L. JR. Bioactive nitric oxide concentration does not increase during reactive hyperemia in human skin. **Journal of Applied Physiology**, v.96, p.628-632, 2004.

ZHELYAZKOVA-SAVOVA, M.; GIOVANNINI, M. G.; PEPEU, G. Increase of cortical acetylcholine release after systemic administration of chlorophenylpiperazine in the rat: an in vivo microdialysis study. **Neuroscience Letters**, v.236, p.151-154, 1997.

ANEXO 1

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
