



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

ALBERT LAYO COSTA DE ASSIS

**EXTRATO ETANÓLICO DE *BYRSONIMA SERICEA* PROTEGE CÉLULAS PC12
DA TOXICIDADE INDUZIDA PELA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM UM
MODELO *IN VITRO* DE PARKINSONISMO EXPERIMENTAL**

FORTALEZA

2018

ALBERT LAYO COSTA ASSIS

**EXTRATO ETANÓLICO DE *BYRSONIMA SERICEA* PROTEGE CÉLULAS PC12
DA TOXICIDADE INDUZIDA PELA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM UM
MODELO *IN VITRO* DE PARKINSONISMO EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas do Departamento de Medicina Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Crônicas Degenerativas

Orientador: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A865e Assis, Albert Layo Costa de.
EXTRATO ETANÓLICO DE BYRSONIMA SERICEA PROTEGE CÉLULAS PC12 DA TOXICIDADE
INDUZIDA PELA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM UM MODELO IN VITRO DE
PARKINSONISMO / Albert Layo Costa de Assis. – 2018.
80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade..

1. Byrsonima sericea. 2. Doença de Parkinson. 3. antioxidante. 4. Citoproteção. 5. 6-OHDA. I. Título.
CDD 610

ALBERT LAYO COSTA DE ASSIS

EXTRATO ETANÓLICO DE *BYRSONIMA SERICEA* PROTEGE CÉLULAS PC12 DA
TOXICIDADE INDUZIDA PELA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM UM MODELO
IN VITRO DE PARKINSONISMO EXPERIMENTAL

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas do Departamento de Medicina Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Crônicas Degenerativas

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Dedico este trabalho a meu pai e minha mãe que sempre me deram força e incentivo aos estudos e a pesquisa, deixando como maior herança, o conhecimento e a humildade.

AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho foi necessária à presença de várias pessoas que ao longo desta pesquisa estiveram direta ou indiretamente contribuindo para a sua realização. É com enorme prazer que aqui expresso toda minha gratidão para com todas elas.

A minha família, em especial meu pai, **Francisco Nathan Santos de Assis** e minha mãe, **Benedita Aurea da Costa**, por sempre incentivarem o meu conhecimento, pelo carinho, pelos ensinamentos que levarei eternamente em minha vida e por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida. Sem vocês nunca teria conseguido chegar até aqui.

Aos meus Irmãos **Alehff Eistein** e **Lean Hamedd** por todos os momentos de alegria e discussões filosóficas que temos no dia a dia.

A **Janaiane Nobre**, minha namorada, pela paciência que tem comigo todos os dias, pelo companherismo, pelo incentivo para que consiga realizar meus sonhos e por todos os momentos que compartilhamos.

A Dra. **Patricia de Araujo Rodrigues** pela paciência em me explicar muito do que eu sei hoje, pela confiança e orientação no decorrer desta dissertação. Um agradecimento sincero e grato por todo o tempo que despendeu comigo durante o trabalho laboratorial.

A todos os integrantes do Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC), em especial, **Tyciane Souza** pelos momentos de muita risada e pelas conversas ricas de conhecimento sobre ciência e sobre a vida, a **Amanda Aragão** por toda a ajuda na parte prática deste trabalho e pelos momentos divertidos do laboratório, a **Priscila Caracas**, a **Marta Regina** e a **Jessica Rabelo** por todo o conhecimento compartilhado ao longo desta jornada, ao Nuno machado pela paciência de ir buscar nitrogênio quase todo mês para que a pesquisa continuasse. A todos gostaria de expressar minha gratidão e respeito pelos ensinamentos diários. É uma imensa felicidade fazer parte desse grupo de pesquisa e trabalhar com amigos tão maravilhosos, a presença de vocês transforma qualquer trabalho laboratorial em um momento de alegria e boas recordações.

A Professora Dra. **Geanne Matos de Andrade** por me aceitar ainda IC no seu laboratório e pela orientação durante todo o trabalho. Obrigado pelos conhecimentos transmitidos, permitindo desenvolver não só a minha capacidade crítica, como também

aumentar o meu interesse e conhecimento nesta área. É uma enorme honra poder terminar não só a graduação como também o mestrado contando com a sua presença.

A professora Dra. **Selene Maia de Moraes** por permitir que trabalhasse com seu extrato e por me receber e permitir trabalhar no Laboratório de Química de Produtos Naturais

A **Livia** do Laboratório de Química de Produtos Naturais por me ajudar em toda a parte química do trabalho e pela paciência de me explicar os procedimentos.

A todos, integrantes e funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)

A todos os meus sinceros agradecimentos...

RESUMO

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* e o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos que levam à morte celular. Estudos anteriores mostraram uma alta atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Byrsonima sericea*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade citoprotetora do extrato etanólico da folha de *B. sericea* (EEBS) em modelo de degeneração celular induzida pela 6-OHDA em cultura de células PC12, um modelo *in vitro* de parkinsonismo. A quantificação dos compostos fenólicos do extrato por HPLC-DAD revelou a presença de geraniina, rutina, isoquercetina, Kaempferol-3-O- β -rutinosídeo e quercetina nas concentrações de 8,50; 7,83; 9,08; 29,98, 2,12 mg/g extrato respectivamente. O extrato na concentração de 75 μ g/mL protegeu as células PC12 da toxicidade induzida pela 6-OHDA (25 μ g/mL) nos testes de viabilidade MTT e LDH, protegeu a integridade de membrana celular avaliada por iodeto de propídio e nos testes do DPPH e ABTS a concentração efetiva (CE₅₀) foi 5,06 e 2,80 μ g/mL respectivamente, mostrando um bom potencial antioxidante. O EEBS foi capaz de diminuir os níveis de nitrito induzido por 6-OHDA em 50% e diminuir a depleção de GSH, mantendo os níveis 2 vezes mais elevados quando comparados a toxicidade induzida por 6-OHDA. O EEBS também foi capaz de diminuir o número de células apoptóticas de 81,41% para 59,10 % no teste da anexin-V/7AAD. Deste modo, sugerimos que o extrato etanólico da *B. sericea* pode ser explorado como possível agente neuroprotetor para doença de Parkinson devido a sua alta capacidade de antioxidante e ação antiapoptótica.

Palavras-chave: *Byrsonima sericea*, Doença de Parkinson, antioxidante, Citoproteção, 6-OHDA.

ABSTRACT

Parkinson's disease is characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons in the *pars compacta* substantia and oxidative stress is one of the main mechanisms that lead to cell death. Previous studies have shown a high antioxidant activity of the leaf extracts of *Byrsonima sericea*. The aim of the present study was to evaluate the cytoprotective activity of *B. sericea* leaf extract (EEBS) in a model of cell degeneration induced by 6-OHDA in culture of PC12 cells, an in vitro model of parkinsonism. The quantification of the phenolic compounds of the extract by HPLC-DAD revealed the presence of geraniin, rutin, isoquercetin, Kaempferol-3-O- β -rutinoside and quercetin at concentrations of 8.50; 7.83; 9.08; 29.98, 2.12 mg/g extract respectively. The 75 μ g/mL concentration extract protected PC12 cells from the toxicity induced by 6-OHDA (25 μ g/mL) in the MTT and LDH viability tests, protected cell membrane integrity assessed by propidium iodide and in the DPPH tests and ABTS the effective concentration (CE_{50}) was 5.06 and 2.80 μ g / mL respectively, showing a good antioxidant potential. EEBS was able to decrease 6-OHDA-induced nitrite levels by 50 % and decrease GSH depletion, maintaining levels 2-fold higher when compared to 6-OHDA-induced toxicity. EEBS was also able to decrease the number of apoptotic cells from 81.41 % to 59.10 % in the annexin-V / 7AAD test. In this way, we suggest that the ethanolic extract of *B. sericea* can be explored as a possible neuroprotective agent for Parkinson's disease due to its high antioxidant capacity and antiapoptotic action.

Keywords: *Byrsonima sericea*, Parkinson Disease, Antioxidant, citoprotective, 6-OHDA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Morte celular por estresse oxidativo induzido por MPTP..... | 21 |
| Figura 2 – Esquema de reações de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio..... | 22 |
| Figura 3 – Via intrínseca e extrínseca da apoptose..... | 24 |
| Figura 4 – Mecanismos de ação dos diversos modelos utilizados para DP..... | 28 |
| Figura 5 – Neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA..... | 31 |
| Figura 6 – Vista de um indivíduo adulto de <i>Byrsonima sericea</i> e suas flores e seus frutos..... | 33 |
| Figura 7 – Estrutura base dos flavonoides..... | 35 |
| Figura 8 – Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência representativa de extrato etanólico da <i>B. sericea</i> | 47 |
| Figura 9 – Estrutura química dos compostos fenólicos encontrados no EEBS..... | 48 |
| Figura 10 – Efeito citotóxico da 6-OHDA sobre a viabilidade em cultura de células PC12..... | 49 |
| Figura 11 – Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a viabilidade mitocondrial de células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 50 |
| Figura 12 – Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a viabilidade de células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 51 |
| Figura 13 – Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a integridade de membrana em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 52 |
| Figura 14 – Curva padrão do Extrato etanólico da <i>B. crassifolia</i> (DPPH)..... | 53 |
| Figura 15 – Curva padrão do Extrato etanólico da <i>B. sericea</i> (ABTS)..... | 53 |
| Figura 16 – Curva padrão da quercetina (DPPH)..... | 54 |
| Figura 17 – Curva padrão da quercetina (ABTS)..... | 54 |
| Figura 18 – Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a produção de nitrito em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 55 |
| Figura 19 – Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 56 |
| Figura 20 – Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a expressão de SOD em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 57 |
| Figura 21 – Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre padrão de morte em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 58 |

LISTA DE TABELA

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Componentes do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> | 47 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|---|
| 6-OHDA | 6-hidroxi-dopamina |
| ABTS | ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) |
| ANOVA | Análise de Variância |
| APAF-1 | fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1 |
| ARE | Elemento de resposta anti-oxidante |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| COMT | catecol-O-metil transferase |
| DAT | Transportador de dopamina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DP | Doença de Parkinson |
| DPPH | 1,1-difenil-2-picril-hidrazil |
| EEBS | Extrato etanólico de <i>Byrsonima sericea</i> |
| eNOS | Óxido nítrico sintase endotélial |
| EROS | Espécies reativas de oxigênio |
| GPx | glutathion peroxidase |
| GSH | Glutathion reduzida |
| GSSH | Glutathion oxidada |
| H₂O₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HO-1 | hemoxigenase 1 |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzido |
| LDH | Lactato desidrogenase |
| L-DOPA | L-3,4 dihidroxifenilalanina |
| LUHMES | Lund Human Mesencephalic cells |
| MAO | Monoamina oxidase |
| MPP | 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina |
| MPTP | 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetrahidropiridina |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolío |
| NF-E2 | Fator nuclear eritroide 2 |
| nNOS | Óxido nítrico sintase neuronal |
| NQO1 | Quinona oxiredutase 1 |
| Nrf2 | Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 |
| Prx | peroxirredoxina |
| TNFα | Fator de necrose tumoral alfa |

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| Trx | tiorredoxina |
| rTNF | Receptor do Fator de necrose tumoral |
| SNpc | Substância nigra <i>pars compacta</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 | Doença de Parkinson..... | 16 |
| 1.1.1 | Epidemiologia..... | 16 |
| 1.1.2 | Fisiopatologia..... | 17 |
| 1.1.3 | Fatores genéticos..... | 18 |
| 1.1.4 | Fatores ambientais..... | 18 |
| 1.1.5 | Estresse oxidativo na Doença de Parkinson..... | 20 |
| 1.1.6 | Inflamação na Doença de Parkinson..... | 22 |
| 1.1.7 | Disfunção mitocondrial e apoptose na Doença de Parkinson..... | 23 |
| 1.2 | Farmacoterapia..... | 25 |
| 1.3 | Modelos Experimentais para o Estudo para DP..... | 26 |
| 1.3.1 | 6-Hidroxidopamina..... | 30 |
| 1.4 | Plantas medicinais e Doença de Parkinson..... | 31 |
| 1.5 | <i>Byrsonima sericea</i> | 32 |
| 1.6 | Flavonóides..... | 34 |
| 1.7 | Justificativa e relevância..... | 36 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 37 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 37 |
| 2.2 | Objetivos específicos..... | 37 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 38 |
| 3.1 | Extrato..... | 38 |
| 3.2 | Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)..... | 38 |
| 3.3 | Cultura de células PC12..... | 39 |
| 3.4 | Toxicidade da 6-OHDA em células PC12..... | 39 |
| 3.5 | Ensaio de viabilidade e citotoxicidade – MTT..... | 40 |
| 3.6 | Ensaio de viabilidade celular- Lactado desidrogenase..... | 41 |
| 3.7 | Ensaio de viabilidade por determinação da integridade da membrana por citometria de fluxo..... | 41 |
| 3.8 | Avaliação da atividade Antioxidante pelo método ABTS..... | 42 |
| 3.9 | Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH..... | 43 |
| 3.10 | Determinação da concentração de nitrito..... | 43 |
| 3.11 | Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)..... | 44 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.12 | Quantificação de SOD por Western Blot..... | 44 |
| 3.13 | Determinação do Padrão de Morte celular pela PE Anexina-v por citometria de fluxo..... | 45 |
| 3.14 | Análises Estatística..... | 46 |
| 4. | RESULTADOS..... | 47 |
| 4.1 | Análise do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)..... | 47 |
| 4.2 | Efeito citotóxico da 6-OHDA sobre a viabilidade de células PC12 - Teste do MTT..... | 49 |
| 4.3 | Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a viabilidade mitocondrial de células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL - teste do MTT..... | 50 |
| 4.4 | Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a viabilidade celular em PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL - teste do LDH..... | 51 |
| 4.5 | Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a integridade da membrana de células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 52 |
| 4.6 | Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH e pelo método ABTS..... | 53 |
| 4.7 | Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a formação de nitrito em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 55 |
| 4.8 | Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre as de concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 56 |
| 4.9 | Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre a expressão de SOD em células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 57 |
| 4.10 | Efeito do extrato etanólico da <i>B. sericea</i> sobre o padrão de morte em células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL..... | 58 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 59 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 67 |
| 7. | REFERÊNCIAS..... | 68 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

1.1.1 Epidemiologia

O impacto global das doenças neurodegenerativas está aumentando rapidamente, com uma estimativa de 8,67 milhões de pessoas afetadas no mundo em 2030 devido ao aumento da expectativa de vida da população sendo previsto que este número quase dobre a cada 20 anos (DORSEY *et al.*, 2007).

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda maior desordem neurodegenerativa, estando atrás somente da doença de Alzheimer e a segunda mais comum entre as desordens de movimento, atrás apenas do tremor essencial e sua incidência aumenta com a idade. A DP atinge principalmente homens, em uma proporção de 1,5 homem: 1 mulher (KLEINMAN; FRANK, 2013).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 1% da população mundial com idade superior a 65 anos tem a doença e segundo a Parkinson's Foundation (2017), aproximadamente cerca de 10 milhões de pessoas no mundo tem a DP e 60 mil americanos são diagnosticados com esta desordem.

No Brasil, existem poucas estatísticas, mas estima-se que 200 mil pessoas acima de 65 anos sofram da doença e a prevalência em pessoas com idade entre 60 e 69 anos é de 700/100.000, e entre 70 e 79 anos é de 1500/100.000, no entanto, 10% dos doentes têm menos de 50 anos e 5% têm menos de 40 anos. Além disso, 36 mil novos casos surgem por ano no país (SOUZA *et al.*, 2011).

A causa da DP ainda permanece desconhecida, porém alguns fatores parecem contribuir para o surgimento da doença como: fatores genéticos, entre estas, as mutações nos genes da α -sinucleína, parkina, ubiquitina hidrolase carboxiterminal L1 (UCH-L1), PINK1, DJ1, LRRK2 e Omi (ELBAZ *et al.*, 2007), fatores ambientais como inseticidas (permetrina e beta-hexaclorociclohexano), herbicidas (paraquat e ácido 2,4-diclorofenoacético) e fungicida (maneb), estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e traumas na cabeça também estão entre as principais causas da DP (PARKINSON FOUNDATION, 2017; ZHIGAO; FUENTE; STOESSL, 2003; DI MONTE, 2003).

Os custos diretos e indiretos combinados de Parkinson, incluindo tratamento, pagamentos de segurança social e perda de renda, são estimados em quase US\$ 25 bilhões por ano apenas nos Estados Unidos. Os medicamentos sozinhos custam uma média de US \$ 2.500 por ano e a cirurgia terapêutica pode custar até US\$ 100.000 por pessoa (PARKINSON'S FOUNDATION, 2017). No Brasil são gastos, anualmente, cerca de R\$ 40 milhões na aquisição de medicamentos no mercado internacional para a distribuição em toda a rede pública de saúde brasileira (FAPEMAT, 2011).

1.1.2 Fisiopatologia

A Doença de Parkinson (DP) é uma afecção crônica e progressiva do sistema nervoso, caracterizada pela acinesia, bradicinesia, tremor de repouso, rigidez e instabilidade postural e, embora apresentem uma etiologia idiopática, acredita-se que os seus surgimentos provem de fatores ambientais e genéticos, podendo interagir e contribuir para o desenvolvimento neurodegenerativo da DP (PEREIRA; GARRETT, 2010). Afirma-se ainda que o processo de envelhecimento esteja intimamente interligado a DP devido à aceleração da perda de neurônios dopaminérgicos com o passar dos anos.

A DP não apresenta somente sintomas motores, atualmente vários sintomas pré-motores foram descobertos nos pacientes. Segundo Lo e Tanner (2014), os sintomas motores podem ser precedidos ou acompanhados por manifestações não motoras como anosmia, constipação, fadiga, disfunção cardíaca autonômica, distúrbio comportamental do sono REM, e depressão.

A DP podem ter causas genéticas ou idiopáticas, porem ambas se caracterizam patologicamente por uma degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra pars compacta (SNpc) que se projetam para o axônios ao estriado (núcleo caudado e putâmen) onde facilitam o movimento voluntário. Estas aferências usam a dopamina como neurotransmissor, que normalmente facilitam a alça motora direta, ativando células no putâmen que libera o núcleo ventrolateral da inibição induzida pelo globo pálido interno (BEAR *et al.*, 2008). A substância nigra, junto com a área tegmentar ventral, no mesencéfalo, são as regiões onde se encontram cerca de 80% das populações de neurônios dopaminérgicos do encéfalo (KANDEL, 2014).

Diversos estudos mostram que existem fatores genéticos e fatores ambientais como toxinas que causam danos seletivos às células da substância nigra, além de estresse oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial.

1.1.3 Fatores genéticos

Embora a maioria dos casos de Doença de Parkinson seja esporádica, entre 6% e 41% dos pacientes com a doença apresentam um parente também afetado (CUBO; GOETZ, 2014). Foram identificados 18 *loci* do gene relacionados com a DP sendo até agora identificado mutações em 7 genes que causam doenças, incluindo alfa-sinucleína (SNCA), quinase 2 rica em leucina (LRRK2), Parkin, PINK1, DJ-1, ATPase tipo 13A2 (ATP3A2) e glucocerebrosidase (LEE; GILBERT, 2016).

As mutações desses genes foram identificadas como a causa de formas familiares raras de DP. Estima-se que a DP monogênica é responsável por cerca de 5% de todos os casos de DP em um padrão de herança autossômica ou autossômica recessiva. As mutações do LRRK2 são as mais comuns e foram associadas a 1% dos casos de DP esporádicos e representam 4% dos casos de parkinsonismo hereditário (LEE; GILBERT, 2016)..

As mutações de LRRK2 geralmente dão origem a um fenótipo de doença predominante de tremor benigno que se assemelha a DP esporádica (GASSER. HARDY; MIZUNO, 2011). Mutações em 4 genes (Parkin, DJ-1, PINK1 e ATP13A2) causam parkinsonismo de início precoce com idade de início antes dos 40 anos (LEE; GILBERT, 2016).

1.1.4 Fatores Ambientais

Sabe-se que apenas 10 % dos casos de Doença de Parkinson (DP) possui causas genéticas e que a maioria dos casos é de forma esporádicas, então isso levou diversos pesquisadores a investigar se o ambiente pode desencadear o parkinsonismo. De acordo com alguns autores, fatores não genéticos, como por exemplo, exposição a agentes tóxicos ambientais (pesticidas e metais) estariam envolvidos tanto quanto fatores genéticos na gênese da DP (COLLINS; NEAFSEY, 2002). A combinação de fatores ambientais e genéticos pode contribuir para o aparecimento da doença, havendo um sinergismo (LEE; GILBERT, 2016).

Evidências apontam que o ambiente rural e exposição a pesticidas estão associados à DP, pois a vida rural expõe os sujeitos a elementos identificados como promotores dos sintomas da doença tais como utilização de água advinda de poços, exposição a pesticidas e demais produtos agrícolas, além de intoxicação por contato com metais e outros descartes industriais (KORELL;TANNER, 2004). No entanto, não se sabe a taxa de exposição que pode levar a doença. (MIGLIORE; COPPEDE, 2009).

Várias substâncias foram identificadas como sendo tóxicas para a região da substância negra no mesencéfalo, sendo que a maior parte dos estudos parece concordar no papel da exposição a neurotoxinas, como pesticidas (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, rotenona), herbicidas (agente laranja), plásticos, resinas, químicos e metais, como fatores de risco da DP (ZHIGAO; FUENTE; STOESSL, 2003, DI MONTE, 2003).

A observação de que a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), um subproduto acidental da fabricação do opióide sintético 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP) poderia causar um fenótipo de DP aumentou o interesse na possibilidade de que outras toxinas ambientais também possam matar as células dopaminérgicas (BROWN; RUMSBY; CAPLETON, 2006). O MPTP age, através do seu metabolito MPP+, bloqueando o complexo I da cadeia respiratória, interrompendo a transferência de elétrons para a ubiquinona. Essa desregulação aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e diminui a síntese de adenosina trifosfato (ATP), portanto, comprometendo o aporte energético da célula (MOURA, 2012).

Os pesticidas e herbicidas como, por exemplo, a rotenona e o paraquat, alteram o metabolismo mitocondrial, levando a disfunção no complexo I da cadeia respiratória e a morte celular (HERNÁNDEZ-MONTIEL, 2006). A rotenona é uma substância química que pertence à família das isoflavonas, utilizada como um inseticida de amplo espectro (CICCHETTI *et al.*, 2009). Altamente lipofílica e não depende do transportador de dopamina (DAT), uma vez dentro da célula, acumula-se no complexo mitocondrial onde inibe a transferência de elétrons de ferro-enxofre aumentando a produção de EROs, que podem interagir com óxido nítrico, especialmente oxigênio e radical hidroxila (HO-) levando à formação de peroxinitrito (ONOO-), resultando em danos aos neurônios dopaminérgicos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; MOURA, 2012). A rotenona liga-se no mesmo local que o MPP+ e inibe o complexo I mitocondrial (CICCHETTI *et al.*, 2009).

A lesão cerebral traumática pode predispor uma pessoa a desenvolver DP em uma idade mais avançada. Esta associação foi inicialmente reconhecida entre os boxeadores em 1960 e uma análise epidemiológica sobre traumatismo craniano e DP mostrou uma maior correlação entre lesão na cabeça e um diagnóstico de DP em pacientes que sofreram uma lesão na cabeça no prazo de 1 ano após o diagnóstico, já para os pacientes que sofreram lesão na cabeça até 9 anos antes do diagnóstico de DP, houve uma associação pequena, mas ainda estatisticamente significativa (FANG *et al.*, 2012).

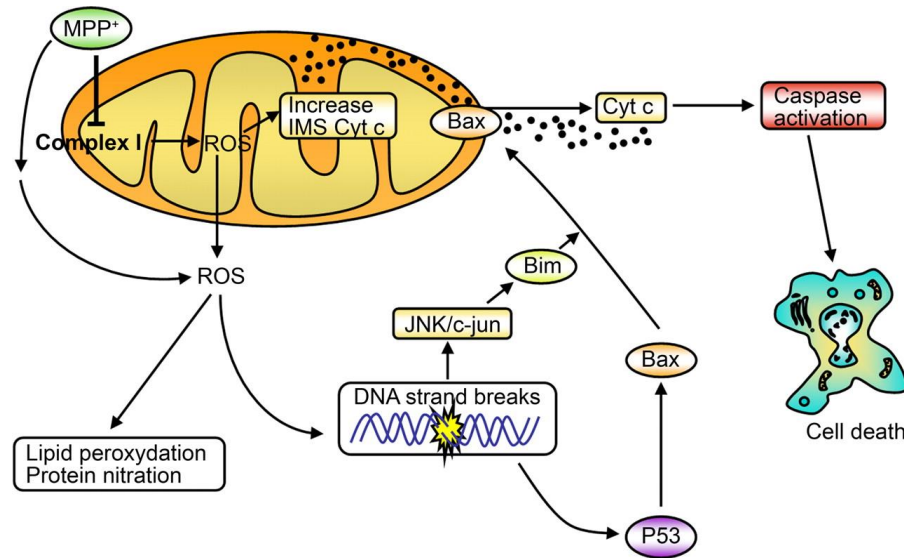
1.1.5 Estresse oxidativo na doença de Parkinson

O estresse oxidativo tem sido apontado como um dos principais fatores moleculares na fisiopatologia da Doença de Parkinson e de outras doenças neurodegenerativas. Estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre os radicais livres e os antioxidantes presentes nas células, ocasionadas por diversos fatores como dano mitocondrial ou toxinas como a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a à morte por apoptose ou necrose (Souza, *et al.*, 2011).

Radicais livres são moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, são instáveis e tem vida muito curta devido à natureza livre de seus elétrons que os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons (HALLIWELL, 1994; MOURA, 2012;).

Estudos anteriores encontraram a atividade reduzida no complexo I da cadeia respiratória no córtex frontal, fibroblastos e plaquetas sanguíneas de pacientes com DP, o que pode contribuir para a geração de EROs e, por sua vez, induzem a apoptose (KIM *et al.*, 2015). Além disso, a relação entre a disfunção mitocondrial e a DP é suportada pelos achados de que os inibidores do complexo I, como o MPTP e seu metabolito 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺) (Figura 1) podem exercer citotoxicidade nos neurônios dopaminérgicos, resultando no fenótipo parkinsoniano e induz degeneração nigral com α -sinucleína citoplasmática (LIN; BEAL, 2006)

Figura 1: Morte celular por estresse oxidativo induzido por MPTP



Fonte: Perier et al, 2007.

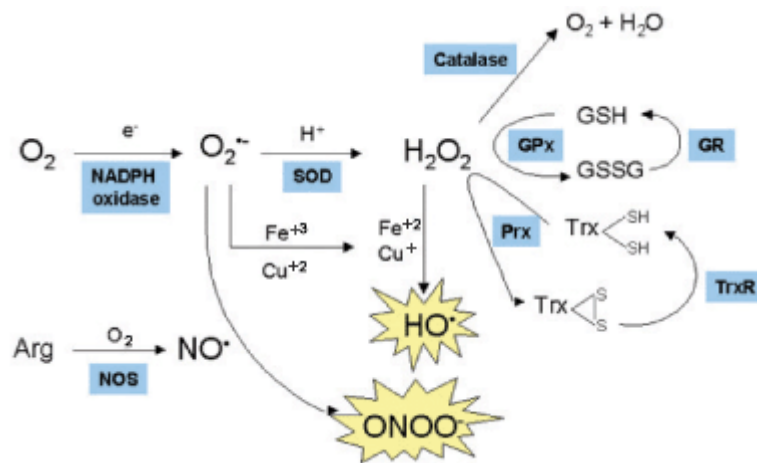
As membranas neuronais contêm ácidos graxos altamente insaturados, especialmente ácido docosaenoico que são extremamente susceptíveis à peroxidação lipídica, a qual resulta no acúmulo de hidroperóxidos de lipídio (LOOH) devido ao estresse oxidativo (MOURA, 2012). Estes podem ser degradados na presença de íons de ferro ou cobre gerando radicais alcoxila (LO•) e peroxila (LOO•). Estes radicais podem danificar proteínas de membrana e atacar outras moléculas de lipídio, propagando a peroxidação lipídica. Os produtos finais da decomposição de LOOH são inúmeros e incluem aldeídos altamente citotóxicos, como malondialdeído, acroleína, 4-hidroxi-2-trans-nonanal e trans,trans-2,4-decadienal (MOURA, 2012).

Muitas áreas do cérebro possuem grande quantidade de íons ferro sendo a maior parte deste estocado como ferritina e, em menor quantidade, no sítio ativo de enzimas as quais previnem ou minimizam as reações de oxidação catalisadas por estes minerais. Níveis mais elevados de ferro foram observados na SNpc da DP em comparação com a dos controles, que podem surgir do transporte disfuncional de ferro para a mitocôndria em neurônios dopaminérgicos em pacientes com DP (DEXTER *et al.*, 1989; OAKLEY *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2015) e também foi relatado que os níveis de ferro estavam aumentados nos neurônios dopaminérgicos na PD (KIM *et al.*, 2015). Íons de ferro e cobre são muito ativos em reações de óxido-redução e níveis elevados de H₂O₂ podem liberar íons de ferro de heme proteínas,

como hemoglobina e citocromo (MOURA, 2012). O ferro ferroso (Fe^{2+}) reduz H_2O_2 a $\text{HO}\cdot$ (reação de Fenton) e catalisa a formação de $\text{HO}\cdot$ pela reação de Haber-Weiss. O $\text{HO}\cdot$ é o radical mais reativo encontrado *in vivo* (BARBOSA, 2006) capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA.

Os níveis EROs intracelular podem ser reduzido através dos mecanismos de defesa de enzimas antioxidantes e de pequenas moléculas antioxidantes (KIM, 2015; GANDHI; ABRAMOV, 2012). O radical superóxido (O_2^-) pode ser inativado pela enzima superóxido dismutase (SOD) para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, o H_2O_2 pode ainda ser removido pela ação das glutathiona peroxidases, das catalases e das peroxirredoxinas (KIM, 2015; POWER; BLUMBERGS 2009).

Figura 2: Esquema de reações de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio



Fonte: Barbosa et al., 2006.

1.1.6 Inflamação na Doença de Parkinson

Embora a neuroinflamação não seja específica para a DP, pois também está implicada na patogênese de outros distúrbios cerebrais, há uma indicação crescente de que os mecanismos neuroinflamatórios podem contribuir para a cascata de eventos que levam à degeneração neuronal na DP. Análises *post mortem* no cérebro de indivíduos parkinsonianos revelaram uma ativação microglial e astrocítica na região estriatal e nigral do cérebro

(MCGEER *et al.*, 1988) e uma alta concentração de fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e interleucinas IL-1b, IL-2, IL-4, e IL-6 no corpo estriado (MOGI *et al.*, 1994; NAGATSU *et al.*, 2000; TRISTÃO *et al.*, 2015).

Estudos usando modelos experimentais mostram que a ativação microglial induzida por LPS, com aumento na expressão de iNOS, levam a uma degeneração dopaminérgica (ARIMOTO; BING, 2003). Além disso, outros trabalhos evidenciaram uma diminuição dos riscos de desenvolvimento da DP em usuários regulares de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (CHEN *et al.*, 2003; MENEZES, 2012). A neuroinflamação desempenha um papel importante na degeneração dopaminérgica e a compreensão dos mecanismos envolvidos pode ser útil para projetar e desenvolver novas estratégias terapêuticas para o tratamento da DP.

1.1.7 Disfunção mitocondrial e apoptose na Doença de Parkinson

A descoberta em 1983 de pessoas que desenvolvam sinais típicos de DP após a injeção intravenosa de drogas contaminadas com MPTP e que esta substância causa danos a função da mitocôndria levaram a hipótese de que a disfunção mitocondrial estaria envolvida na DP (ONYANGO, 2008; MOURA, 2012).

Estudos *post mortem* mostram que a atividade do complexo I está reduzida em 35–40 % na SNpc de pacientes com DP (SCHAPIRA *et al.*, 1990) e foi relatada a ocorrência de uma mutação no DNA mitocondrial na forma idiopática da DP (PARKER JR; PARKS, 2005) e uma redução associada da atividade do complexo I nas mitocôndrias do córtex frontal (PATHAK; DAVEY, 2008).

A deficiência energética relacionada à mitocôndria pode levar ao rompimento de vesículas que armazenam a dopamina, aumentando sua concentração no citosol ocasionando danos celular e provocando apoptose (SCHAPIRA *et al.*, 1998; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

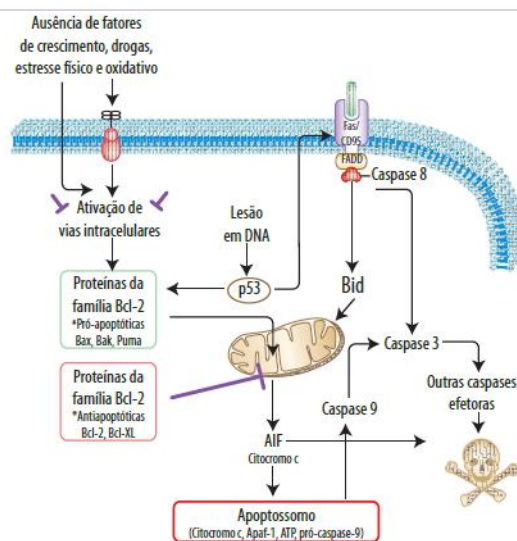
O processo apoptótico é causado por uma cascata de eventos na qual a família de cisteína proteases conhecida como caspases levam a quebra de múltiplos substratos, com especificidade para o ácido aspártico (EBERHARDT; SCHULZ, 2003; LEV *et al.*, 2003) e sua ativação pode ser observada em várias doenças neurodegenerativas como na DP (caspase-

3) e na doença de Alzheimer (caspase-3 e caspase-9). Alguns inibidores das caspases podem agir como neuroprotetores em alguns modelos celulares e animais de doenças neurodegenerativas (WALDMEIER; TATTON, 2004).

A ativação da apoptose pode ser iniciada pela via extrínseca, citoplasmática, ou pela via intrínseca, mitocondrial (GRIVICICH; REGNE; ROCHA, 2007) (Figura 3). A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral. Esta ligação é capaz de ativar a cascata das caspases (MOURA, 2012). A mitocôndria tem um papel fundamental na integração e propagação dos sinais de morte originados intrinsecamente por danos ao DNA, por estresse oxidativo, extravasamentos de proteínas e outros (WALDMEIER; TATTON, 2004), além disso, também pode amplificar e mediar a via extrínseca (MOURA, 2012).

Quando ocorrem danos na membrana mitocondrial o citocromo c é liberado no citosol formando um complexo com o fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1 (APAF-1) e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa. Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004; RUPNARAIN *et al.*, 2004; MOURA, 2012).

Figura 3 – Via intrínseca e extrínseca da apoptose.



Fonte: Carvalho; Reco-Pimentel, 2013.

A apoptose dos neurônios dopaminérgicos da SNpc é um evento envolvido no processo de neurodegeneração na DP (BATTISTI *et al.*, 2008). Essa hipótese foi demonstrada em estudos de modelos animais e de modelos *in vitro* (MLADENOVIC *et al.*, 2004; NOVIKOVA *et al.*, 2006). O mecanismo apoptótico é rigidamente controlado por proteínas, que aumentam o processo apoptótico como a bax e bcl-xl e outros que inibem a morte celular como a bcl-2 e bcl-xL. A ativação das proteínas pro-apoptótica leva à ativação de várias caspases, resultando em condensação e fragmentação cromatínica e formação de corpos apoptóticos na superfície celular (ISRAELS; ISRAELS, 1999; ELMORE, 2007).

1.2 Farmacoterapia

Segundo o protocolo clínico do Ministério da Saúde (2010), na década de 60, após a identificação das alterações patológicas e bioquímicas no cérebro de pacientes com DP, surgiu o primeiro tratamento com sucesso, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas terapias efetivas com a introdução de L-DOPA, que representou o maior avanço terapêutico na DP, produzindo benefícios clínicos para praticamente todos os pacientes e reduzindo a mortalidade por esta doença. No entanto foi observado que o tratamento por longo prazo era complicado pelo desenvolvimento de efeitos adversos, que incluem flutuações motoras, discinesia e complicações neuropsiquiátricas. Além disto, com a progressão da doença, os pacientes passam a apresentar manifestações que não respondem adequadamente à terapia com levodopa, tais como episódios de congelamento, instabilidade postural, disfunções autonômicas e demência (OLANOW *et al.*, 2009).

Inibidores da MAO-B foram investigados e se mostraram melhores do que placebo na fase inicial da doença e sua introdução na fase mais tardia melhorou o desempenho motor, o que poderia sugerir um efeito neuroprotetor. Entretanto, quando comparados com entacapona, um inibidor de catecol-O-metil transferase (COMT), não mostraram diferença significativa quanto à melhora dos sintomas (RASCOL, 2005). Outras drogas que são prescritas atualmente no tratamento da DP incluem agonistas dos receptores de DA, tais como, pramipexol e ropinirol, que são seletivos para D2/3 e mais bem tolerados, não mostrando flutuações na eficácia associada à levodopa, selegilina, um inibidor de MAO-B, amantadina (anti-viral com influência na síntese da DA), inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT) e anticolinérgicos (NAGATSU & SAWADA, 2009).

Os anticolinérgicos podem ser úteis para o tremor e podem aliviar a distonia associada ao efeito de perda ou dose máxima de L-DOPA. Eles têm pouco efeito sobre outros sintomas da DP. Os medicamentos desta classe incluem o triexifenidil, o mesilato de benzotropina e a prociclidina. Eles não agem diretamente no sistema dopaminérgico, em vez disso, eles diminuem a atividade da acetilcolina, um neurotransmissor que regula o movimento, no entanto, potenciais efeitos adversos incluem visão turva, boca seca, constipação e retenção urinária. Devido a indivíduos mais velhos serem suscetíveis a confusão e alucinações sob o uso de anticolinérgicos, esses agentes devem ser evitados em pessoas com mais de 70 anos (PARKINSON FOUNDATION, 2018).

Uma nova abordagem terapêutica seria com os agentes neuroprotetores, cuja importância está nas suas propriedades antioxidantes que poderiam barrar a neurodegeneração dopaminérgica. Muitos agentes potencialmente neuroprotetores tem sido identificados e requerem testes clínicos (HART et al., 2009; SCHAPIRA et al., 2006). A vitamina E, o deprenil e a nicotina vêm sendo bastante estudados (AGUIAR et al., 2006). Agentes anti-inflamatórios, melatonina, coenzima Q10, ácido fólico, selênio, vitaminas A, C e E são algumas substâncias promissoras e que podem contribuir para o tratamento da DP (SINGH et al., 2007; KLIVENYI & VECSEI, 2009).

Além do tratamento farmacológico, uso de intervenção cirúrgica, mostraram-se benéficas para alguns sintomas refratários, no entanto, estas cirurgias apresentam indicações específicas e um papel limitado devido ao custo elevado e sua eficácia em longo prazo também é limitada (SCHAPIRA et al., 2006; SINGH et al., 2007).

1.3 Modelos Experimentais para o Estudo para DP

Com o avanço do conhecimento sobre a fisiopatologia da DP diversos modelos animais e de cultura de células foram desenvolvidos para melhor entender os mecanismos de morte neuronal e identificar possíveis alvos para uma farmacoterapia cada vez mais seletiva e eficaz (PANOV *et al.*, 2002; HANROTT *et al.*, 2006).

Um modelo ideal de DP deve refletir uma perda neuronal progressiva e dependente da idade da doença, com sintomas motores e não motores importantes. Patologicamente, o modelo deve incluir perda de neurônios dopaminérgicos no SNpc e redução do conteúdo de dopamina no corpo estriado, bem como neuroinflamação e

agregados de proteína que lembram os corpos de Lewy. Esses critérios raramente são totalmente cumpridos, mas existe uma infinidade de diferentes modelos de DP, que vão desde o uso das moscas *Drosophila* até primatas não humanos. No entanto, os roedores são frequentemente preferidos devido ao seu ciclo de reprodução relativamente rápido e ao genoma dos mamíferos (VINGILL *et al.*, 2017).

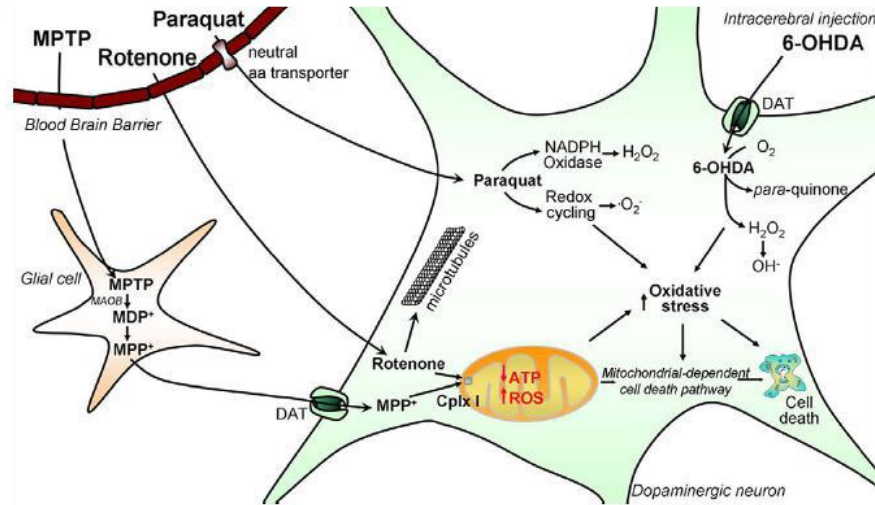
Deste modo foram desenvolvidos modelos de DP utilizando-se neurotoxinas dopaminérgicas e modelos de linhagens genéticas com deleção gênica para a doença. A utilização de substâncias capazes de destruir seletivamente neurônios dopaminérgicos, principalmente, da indução de estresse oxidativo tem sido muito útil no estudo da DP (BOVÉ *et al.*, 2005) como o MPTP, paraquat, rotenona e 6-OHDA. Presumivelmente, todas essas toxinas levam a formação de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (DAUER;PRZEDBORSKI, 2003).

Em algumas linhagens de camundongos, o tratamento com MPTP resulta em perda de células dopaminérgicas acompanhadas de reduções na dopamina do estriado (MEREDITH *et al.*, 2011). Além disso, efeitos transitórios no sono (LALOUX *et al.*, 2008) e na motilidade do cólon (ANDERSON *et al.*, 2007), bem como distúrbios cognitivos (TANILA *et al.*, 1998), foram encontrados no modelo agudo do MPTP.

A rotenona é um composto amplamente utilizado como pesticida (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, 2008). Essa toxina facilmente atravessa a barreira hematoencefálica e membranas biológicas e age como potente inibidora do Complexo I. A exposição sistêmica de ratos à rotenona reproduz características da DP, incluindo degeneração nigroestriatal seletiva e inclusões citoplasmáticas positivas para α -sinucleína (BETARBET, 2000).

O paraquat, outra substância utilizada na indução de modelos animais de DP, atua de forma semelhante à rotenona para induzir morte neuronal: inibindo o processo de respiração celular e facilitando a produção de espécies reativas de oxigênio (SHIMIZU *et al.*, 2001). O paraquat também gera a formação de inclusões citoplasmáticas, contribuindo para a caracterização da DP (UVERSKY, 2004).

Figura 4- Mecanismos de ação dos diversos modelos utilizados para DP.



Fonte: Bové; Perier, 2012.

Com o objetivo de simplificar as variáveis experimentais presentes no organismo e permitir uma manipulação mais precisa de genes específicos e fatores ambientais, evitando, ao mesmo tempo, questões éticas complexas associadas ao uso de modelos de mamíferos ou estudos em humanos várias linhagens celulares bem estabelecidas foram utilizadas como modelos para DP (LAZARO, 2017).

Entre as vantagens específicas temos a possibilidade de gerar culturas de células homogêneas que podem ser expandidas indefinidamente para gerar o número de células necessárias para qualquer experimento, como a avaliação da agregação α -Syn, avaliação dos estágio metabólico das células ou das vias bioquímicas como estresse oxidativo e apoptose (LAZARO, 2017).

Ao longo dos anos, várias linhagens de células neuronais humanas e de camundongos têm sido amplamente utilizadas, tais como células SH-SY5Y, células PC12, *Lund Human Mesencephalic cells* (LUHMES). Células dopaminérgicas primárias e células-tronco pluripotentes induzidas também são amplamente utilizadas (LAZARO, 2017).

As células dopaminérgicas primárias são geralmente preparadas a partir do mesencéfalo ventral de embriões de camundongos ou ratos entre o 12º e o 15º dia embrionário. Estas culturas produzem apenas cerca de 5-10% de neurónios dopaminérgicos (SCHULZ; FALKENBURGER, 2006). Embora a porcentagem de células TH positivas em

relação à população total de células neuronais seja bastante pequena, essas células têm sido amplamente utilizadas no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos na DP (AKSENOVA et al., 2005; BHANU et al., 2010).

SH-SY5Y são células de neuroblastoma humanas amplamente utilizadas na pesquisa da DP. Essa linhagem celular pode ser diferenciada em células semelhantes a neurônios, exibindo fenótipos colinérgicos, dopaminérgicos ou noradrenérgicos, usando agentes como ácido retinóico, ésteres de forbol, monofosfato de adenosina cíclico dibutrílico (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013). As vantagens de usar o as células SH-SY5Y são de que estas permitem a geração de uma maior percentagem de células dopaminérgicas do que a obtida numa cultura mesencéfalo primária, em que apenas 5-15% das células positivas para TH estão presentes e como as células têm origem humana, elas expressam várias proteínas específicas de humanos que podem não estar presentes em culturas primárias preparadas a partir de cérebros de roedores (KOVALEVICH; LANGFORD, 2013; LAZARO, 2017). As células SH-SY5Y são amplamente utilizadas como modelo para mimetizar a homeostase da dopamina prejudicada e para estudar os mecanismos de neurotoxicidade induzida por MPP +, uma vez que as células expressam receptores e transportadores de dopamina (DAT) (LAZARO, 2017). As células são vulneráveis ao estresse oxidativo, de maneira similar àquela observada nos neurônios dopaminérgicos.

As células PC12 são uma linhagem de células do feocromocitoma de rato, que, quando mantidas em um meio de cultura adequado, sintetizam, liberam e armazenam catecolaminas como dopamina e norepinefrina, assim como outras células cromafins (GREENE; REIN, 1977; LAZARO, 2017). No entanto, as células PC12 possuem uma maior expressão de dopamina, caracterizando-as como um bom modelo dopaminérgico (GREENE; REIN, 1977). As células PC12 são particularmente úteis na pesquisa de Parkinson, uma vez que são sensíveis a toxinas, como 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (WALKINSHAW E WATERS, 1994), 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP +) (NAKAMURA *et al.*, 2000), rotenona (Hirata e NAGATSU, 2005), e paraquat (YANG E SUN, 1998), expressarem DAT na membrana plasmática, além de crescerem mais rápido e serem mais resistentes.

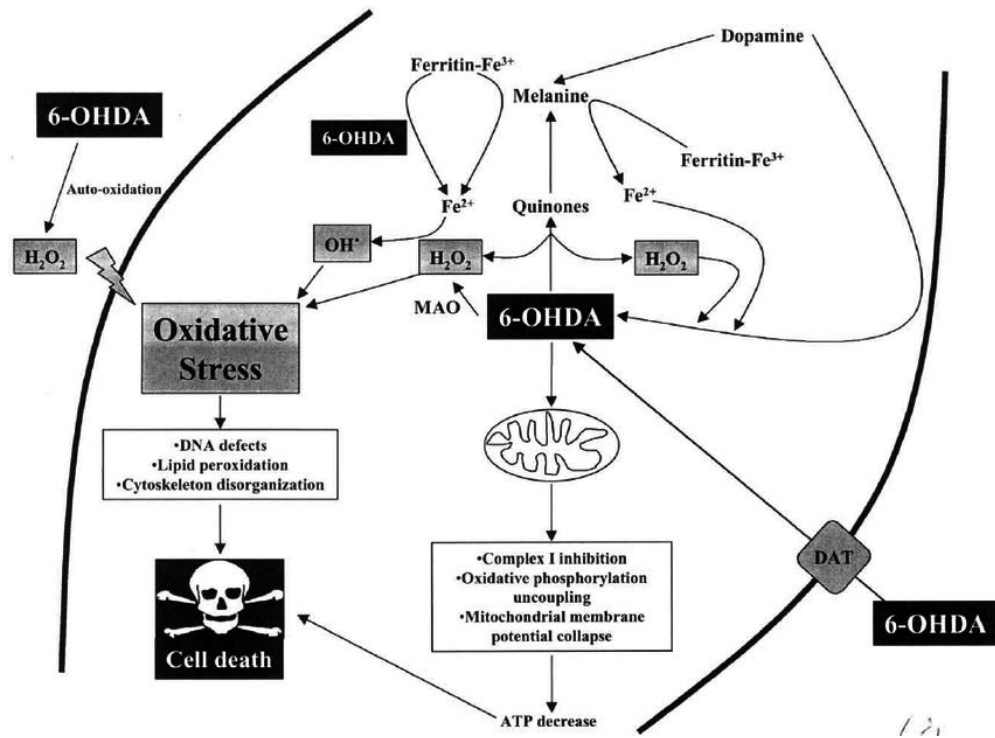
1.3.1 6-Hidroxi-dopamina

Neurotoxinas que são capazes de destruir seletivamente neurônios dopaminérgicos são muito importantes para mimetizar os mecanismos de morte neuronal envolvidos na DP. Dentre essas substâncias temos a 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), uma substância encontrada na urina de pacientes com DP (NEVES, 2014) e que é capaz de levar a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A 6-OHDA é uma das neurotoxinas mais frequentemente utilizadas em modelos de degeneração da substância negra, tanto *in vitro* como *in vivo* (SCHOBER, 2004). Esta apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos. O armazenamento intracelular de 6-OHDA é mediado pelos transportadores de membrana de dopamina e noradrenalina, a DAT, que reconhecem e captam a 6-OHDA devido à sua similaridade estrutural com as catecolaminas endógenas (TADAIESKY, 2010; BOVÉ; PERIER, 2012).

Uma vez dentro da célula, a 6-OHDA produz espécies citotóxicas através da oxidação de 6-OHDA pela monoamina oxidase (MAO) que gera peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual, além de ser citotóxico, induz a produção de outros radicais de oxigênio (Figura 5). Além disso, a 6-OHDA sofre um processo de auto oxidação, gerando H_2O_2 , EROs e quinonas (KABUTO; YAMANUSHI, 2011). Aumentos nos níveis de EROs, e outras espécies reativas resultam na rápida depleção das enzimas antioxidantes, amplificando a neurotoxicidade no metabolismo e estrutura celular resultando, assim, em dano neuronal (BLUM *et al.*, 2001). A 6-OHDA pode também induzir a neurotoxicidade alterando a função mitocondrial inibindo seu complexo I levando a morte por apoptose (BLUM *et al.*, 2001; MILLER *et al.*, 2009).

Figura 5 - Neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA.



Fonte: Modificado de Blum *et al.*, 2001.

1.4 Plantas medicinais e Doença de Parkinson

A disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e a inflamação são considerados os possíveis mecanismos que levam à morte das células neuronais na DP e com isso, abordagens terapêuticas que otimizam EROs e melhoram a função mitocondrial estão sendo amplamente consideradas no cenário atual (SRIVASTAV *et al.*, 2017). As plantas medicinais se destacam como grandes fontes de novos recursos terapêuticos, assim o interesse em todo o mundo em torno dos produtos naturais vem aumentando consideravelmente e é a partir destas que a indústria farmacêutica desenvolve os medicamentos (SCHENKEL *et al.*, 2001; RODRIGUES, 2008). Nesse cenário, várias abordagens estão sendo investigadas e a abordagem farmacológica envolvendo um extrato natural de plantas medicinais tem mostrado efeito benéfico na DP, sendo a otimização da produção de EROs, um alvo principal desses produtos vegetais (SRIVASTAV *et al.*, 2017).

Nobre Junior e colaboradores (2008) mostrou que uma fração enriquecida com chalconas isolada da casca do caule da *Myracrodruon urundeuva*, uma planta medicinal brasileira, foi capaz de proteger células neuronais mesencefálicas de rato da toxicidade

induzida por 6-OHDA através de mecanismos antioxidante, anti-inflamatórios e antiapoptóticos. Teixeira e colaboradores (2013) também mostrou a eficácia da catequina, um composto presente no chá verde da *Camellia sinensis*, em proteger ratos lesionados com 6-OHDA devido a sua ação antioxidante, indicando que poderia ser útil como uma terapia adjuvante para o tratamento da DP.

Menezes (2012) estudando o efeito da curcumina, um polifenol utilizado como tempero indiano derivado do rizoma da planta *Curcuma longa* que tem sido utilizada na medicina Ayurvédica, e do resveratrol, fitoalexina encontrado em grande quantidade na casca de uva, sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela 6-OHDA em ratos mostrou que ambos melhoraram a assimetria motora no teste do cilindro e a memória aversiva no teste da esQUIVA passiva. Um resultado similar foi observado no teste do nado forçado, onde ambos os antioxidantes reverteram o comportamento depressivo, assim como preveniram a redução do conteúdo de dopamina e serotonina. Entretanto, somente o Resveratrol preveniu os déficits apresentados pelos animais em uma versão com pistas do water maze, o aumento das rotações contralaterais no teste da apomorfina e a perda de neurônios dopaminérgicos no estriado e substância negra.

1.5 *Byrsonima sericea*

A *Byrsonima sericea* DC. pertence a família da Malpighiaceae (a mesma família da acerola), conhecida popularmente como murici da praia ou murici do brejo, é uma espécie de ampla distribuição geográfica e que ocorre em ambientes de matas, sendo predominante nas áreas mais ensolaradas. Sua altura média é de 6 a 10 metros, suas flores são amareladas formando cachos de 1 a 15 centímetros e seus pequenos frutos têm gosto ácido, são bacáceos e comestíveis, sendo bastante consumido principalmente entre as populações de baixa renda. e é geralmente encontrada no litoral em uma faixa que se inicia no Ceará e se estende até o Acre (BOSCOLO *et al.*, 2007).

Figura 6: Vista de um indivíduo adulto de *Byrsonima sericea* DC.e suas flores e seus frutos



Fonte: Pablito Augusto Travassos Ferreira

No Nordeste brasileiro, ocorrem várias espécies do gênero *Byrsonima* que são principalmente conhecidas pela utilização dos seus frutos na alimentação e pelo emprego com fins medicinais (RODRIGUES, 2008). As folhas, a casca, as sementes e os frutos de algumas espécies de *Byrsonima* são utilizados pelas populações locais no tratamento de inflamações gastrointestinais e ginecológicas, infecções cutâneas e mordidas de cobras (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011). As espécies do gênero *Byrsonima* têm sido predominantemente investigadas quanto a sua ação contra microrganismos, entre diversas espécies de bactérias, enterobactérias, micobactérias, protozoários e fungos implicados na etiologia de doenças gastrointestinais e de pele, com resultados positivos na maioria dos estudos (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

Estudos experimentais com *Byrsonima crassifolia* mostraram propriedades antioxidantes para os extratos hidroalcoólicos de sua casca e folhas (SILVA, 2006), efeitos espasmogênicos (BEJAR; MALONE, 1933; BEJAR *et al.*, 1995), atividade antimicrobiana para raízes e extratos orgânicos de hastes (CACERES *et al.*, 1990; MARTINEZ-VASQUEZ *et al.*, 1995), atividades antiprotozoárias para a casca e folhas de álcool extratos (BERGER *et al.*, 1998; PERAZA-SÁNCHEZ *et al.*, 2007) e atividade depressora do sistema nervoso central para folhas e extratos aquosos de casca (MORALES *et al.*, 2001) sendo a presença de compostos fenólicos a explicação para estas atividades.

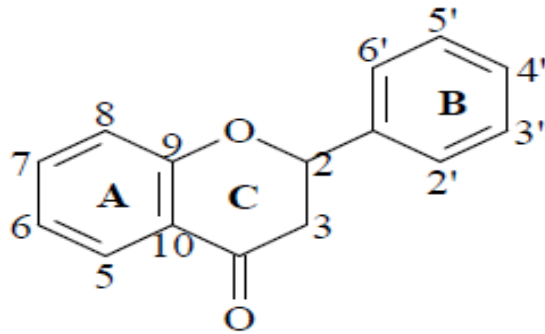
Estas espécies são relatadas como ricas em ácidos galoilquínicos, sulfonoglicolipídios, triterpenos, esteróides e flavonóides como proantocianidinas e catequinas (SANNOMIYA *et al.*, 2005). A presença de compostos fenólicos nas plantas pode estar associada a bons efeitos à saúde, como proteção contra o câncer e doenças degenerativas e cardiovasculares, devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Aboul-ENEINA *et al.*, 2013; QUIÑONES *et al.*, 2013).

B. sericea cresce abundantemente nos estados do Nordeste do Brasil e é tradicionalmente usada para tratar a disfunção gastrointestinal. Uma atividade antioxidante do extrato metanólico de *B. sericea* foi recentemente descrita, usando o ensaio DPPH (BOSCOLO *et al.* 2007; RODRIGUES *et al.*, 2012). Dentre os compostos encontrados nos extratos metanólicos das folhas de *B. sericea* temos ácido quínico, proantocianidina, catequina, galoilquercetina, Kaempferol-O-hexosídeo (FRAIGE *et al.*, 2017) e nos extratos etanólico de suas folhas revelou a presença de rutina, isoquercitrina, kaempferol 3-O-rutinosídeo e quercetina.

1.6 Flavonoides

Os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários de plantas, que derivam da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três grupos malonil-CoA₂. Os flavonóides são pigmentos naturais presentes nos vegetais que desempenham um papel de antioxidantes primários reagindo com os radicais livres, e também como quelantes de metais, fundamental na proteção contra agentes oxidantes, como por exemplo, os raios ultravioleta, e poluição ambiental e atuam também como agentes terapêuticos em um elevado número de patologias (MELO; GUERRA, 2002). A estrutura química de um flavonóide apresenta as unidades C6-C3-C6, sendo dois anéis fenil – A e B – ligados através de um anel pirano – C (Figura 7).

Figura 7 – Estrutura base dos flavonoides



Fonte: Rodrigues, 2008

Existem, no mínimo, seis possíveis diferentes mecanismos antioxidantes dos flavonoides como sequestrador direto de radicais, regulação descendente da produção de radicais, eliminação dos precursores dos radicais (i.e., peróxido de hidrogênio), quelação de metais, inibição da xantina oxidase e elevação dos antioxidantes endógenos (MELO; GUERRA, 2002).

Existem três requisitos na estrutura química dos flavonóides possivelmente responsáveis pela atividade de neutralização de radicais exercida por esta classe de componentes, sendo a presença do grupo orto-dihidroxi ou grupo catecol no anel B, o que confere uma maior estabilidade à forma radicalar, pois contribui para o deslocamento dos elétrons, a ligação dupla conjugada com a função 4-oxo que aumenta o deslocamento eletrônico a partir do anel B e os grupos hidroxil nas posições 3 e 5 com função oxo, que promove o deslocamento eletrônico do grupo 4-oxo para estes dois substituintes (MELO; GUERRA, 2002).

Flavonas e flavonóis são as duas principais classes de flavonóides encontradas universalmente na natureza. Os mais comuns flavonóis antioxidantes são canferol, quercetina e miricetina (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). A rutina, 3-O-rutinosídeo da quercetina, é largamente utilizada em fitoterápicos para fragilidade capilar prevenindo varizes e derrames de retina. Quercitrina, (3-O-glicosídeo de quercetina) apresenta atividade antiinflamatória em colite experimental, associada com ação antioxidante e melhoramento da absorção de água *in vivo* (SÁNCHEZ et al., 2002). Quercetina, o principal flavonóide presente em vegetais e frutas, exerce potenciais efeitos anticarcinogênicos em modelos de animais e culturas de células (SALUCCI, 2002). kaempferol-3-O- β -rutinosídeo, um flavonóide glicosídeo extraído de *Carthamus tinctorius* demonstrou efeitos protetores contra lesão cerebral em um modelo de

demência com múltiplos infartos (XIE *et al.*, 2007), melhora a lesão cerebral isquêmica após isquemia cerebral focal transitória (LI *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2007).

1.7 Justificativa e relevância

Os tratamentos disponíveis atualmente para a DP não impedem a morte dos neurônios dopaminérgicos sendo capazes apenas de controlar os sintomas motores através do aumento dos níveis de dopamina no cérebro ou imitando os efeitos da dopamina como é o caso da levodopa, no entanto, com o tratamento prolongado, os pacientes tendem a desenvolver discinesia. Outra opção terapêutica que está sendo muito investigada são os agentes neuroprotetores, cuja importância está nas suas propriedades antioxidantes que poderiam ser capazes de mudar o curso da doença, barrando a neurodegeneração dopaminérgica, aumentando a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes com DP.

Assim, por apresentar propriedades antioxidante e modulador do sistema nervoso central, o extrato etanólico da *B. sericea* foi escolhido para este estudo para se investigar um papel citoprotetor em um modelo de DP em células PC12 submetidas à citotoxicidade da 6-OHDA.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citoprotetora do extrato etanólico da folha da *Byrsonima sericea* em modelo de toxicidade celular induzida pela 6-OHDA em células PC12.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a viabilidade mitocondrial em células PC12 submetidas a toxicidade induzida pela 6-OHDA através do método de MTT;
- Avaliar os efeitos do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a viabilidade celular em células PC12 submetidas a toxicidade induzida pela 6-OHDA através do método da lactado desidrogenase (LDH);
- Analisar os efeitos do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a integridade da membrana celular em células PC12 expostas a 6-OHDA através do marcador iodeto de propídio;
- Avaliar o potencial antioxidante do extrato etanólico da *B. sericea* pelo teste do ABTS e DPPH;
- Verificar a ação do extrato etanólico da *B. sericea* sobre o estresse oxidativo induzido pela 6-OHDA em células PC12 analisando os níveis de nitrito e de GSH;
- Determinar os efeitos do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a expressão de SOD por Western Blot.
- Avaliar o padrão de morte celular por Anexina V em células PC12 expostas a 6-OHDA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extrato

O extrato etanólico da *B. sericea* (EEBS) foi obtido do Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Estadual do Ceará, coordenado pela professora Doutora Selene Maia de Moraes. As folhas frescas de *Byrsonima sericea* foram coletadas em outubro de 2016 no Campus Itaperi da Universidade Estadual do Ceará após a identificação pelo Dr. Afrânio G. Fernandes, botânico da Universidade Federal do Ceará. Um exemplar de comprovante da planta foi depositado no Herbário Prisco Bezerra (UFC), sob o número 39.451. As folhas frescas de *B. sericea* (1,24 kg) foram maceradas com etanol a 70% à temperatura ambiente por 7 dias. A solução etanólica resultante foi filtrada com papel de filtro utilizando um funil de *buchner* sob vácuo e evaporado até à secura a 50 ° C num evaporador rotativo para produzir 153 g de extrato etanólico bruto.

3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

Os padrões analíticos rutina, geranina, isoquercitrina, kaempferol 3-O- β -rutinosídeo, quercetina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os solventes utilizados para extração foram de grau analítico (Vetec®), e em HPLC foram utilizados solventes de grau de HPLC (J.T. BAKER®). A água foi purificada com um sistema Milli-Q (UV Direct3). Todas as amostras e soluções preparadas para análises por HPLC foram filtradas através de uma membrana de nylon de 0,45 μ m e filtro de membrana de 0,22 μ m (Millipore), respectivamente, antes da utilização.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) foi realizada com um sistema Shimadzu proeminência Auto Sampler (SIL-20A) HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com bombas de êmbolo Shimadzu LC-20AT ligados a um DGU 20A5 degaseificador com um CBM 20A integrador, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software LC 1.22 SP1. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de fase reversa (Phenomenex®) Luna C18 (4,6X250mm, 5 μ m). As fases móveis C e D eram de acetonitrilo e água Milli-Q, acidificou-se para pH 2,8 com ácido fosfórico, correspondentemente, gradiente de solvente foi utilizado como segue: 0-12 min, uma eluição isocrática com C: D (20:80 v / v) ; 17-23min, variação linear até C: D (40:60 v / v); 25-40

min, uma eluição isocrática com C: D (20:80 v / v). A taxa de fluxo foi de 1,0 mL / min, com um volume de injeção de 20 μ L e os comprimentos de onda de 350nm. Soluções stock de referências de padrões foram preparadas no metanol de HPLC em concentrações de 0,00032-1,0 mg/ml para a rutina; 0,000064-0,2 mg/mL para a quercetina; 0,008-1,0 mg/mL para isoquercetrina; 0,032 a 0,5 mg/mL para geranina e 0,008 a 1,0 mg/mL de 3-O- β -rutinosídeo de kaempferol.

Os picos de cromatografia foram confirmados pela comparação do tempo de retenção com os padrões de referência e pelo espectro DAD (200 a 400nm). A curva de calibração para a rutina foi $y = 4,10^{-8}x + 0,005$ ($r = 0,9996$); quercetina: $Y = 2,10^{-8}x - 2,10^{-5}$ ($r = 0,9999$); isoquercetrina $y = 4,10^{-8}x + 0,0118$ ($r = 0,9996$); geranina $Y = 6,10^{-7}x - 0,0031$ ($r = 0,9971$) e kaempferol 3-O- β -rutinosídeo $Y = 2,10^{-7}x + 0,0038$ ($r = 0,9999$). O extrato etanólico da *B. sericea* foi analisado por dissolução em metanol a uma concentração de 20 μ g/mL. A amostra foi analisada em três réplicas e as áreas médias dos picos foram medidas.

3.3 Cultura de células PC12

A linhagem celular PC12 foi obtida do banco de células (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ, BRA). Foram cultivadas em garrafas de plástico para cultura (75 cm², volume de 250 mL) crescendo no meio HAM: F12 suplementado com 15 % de soro equino, 2,5 % de soro bovino fetal e 1% de antibiótico (estreptomicina e penicilina).

As células foram incubadas em estufa a temperatura de 37°C numa atmosfera com 5 % de CO₂. Após 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e posteriormente subcultivadas em placas multi-wells de 96 poços em uma concentração de $2,5 \times 10^4$ células/poço ou em placas de 24 poços numa concentração de 1×10^5 células/poço. Após um período de 24 horas do plaqueamento foram feitos os experimentos.

3.4 Toxicidade com 6-OHDA em células PC12 – MTT (MOSMANN, 1983)

Para avaliar a citotoxicidade foi usado o ensaio do MTT (MOSMANN, 1983), que se baseia na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de krebs ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazolium (brometo de 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor púrpura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade (DENIZOT; LANG, 1986).

Foram realizadas curvas com as concentrações de 6-OHDA a 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100µg/mL para determinar a concentração que reduzisse a viabilidade celular significativamente em cerca de 50% das células. Foi utilizada a absorbância média do controle como 100%, e então calculada a porcentagem da viabilidade celular de todas as amostras testes usando-se a absorbância média de cada amostra. As soluções de 6-OHDA foram diluídas em salina sendo todas preparadas na hora da experimentação, visto que se trata de uma substância extremamente fotossensível e termossensível.

3.5 Ensaio de viabilidade e citotoxicidade mitocondrial – MTT (MOSMANN, 1983)

O extrato etanólico da *B. sericea* foi diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), não ultrapassando 0,01% e posteriormente foram preparados nas concentrações de 300, 150 100, 75 e 50 µg/mL, para avaliar a viabilidade celular e a 6-OHDA foi utilizada 15 minutos após a adição do extrato etanólico da *B. sericea* e então as células foram incubadas por 24 horas em estufa 5% de CO₂. Após esse período, as células foram utilizadas nos experimentos.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e decorridas 24h de incubação das células, 100µL do meio foram retirados para a dosagem dos níveis de nitrito e os outros 100µL do meio foram descartados. Então as células foram incubadas, por 3 horas, com um novo meio (200µL) contendo MTT (0,5 mg/mL em meio HAM F12) em cada poço. Após este período, o sobrenadante foi descartado e em seguida adicionado 150 µL de dimetilsufóxido (DMSO) puro, para a lise das células e solubilização do formazan, logo após as placas foram colocadas em agitador de placas por 15 minutos, e a absorbância medida em leitor de microplacas e lido a 540 nm. A inibição da redução do MTT indica a diminuição da viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos em três diferentes dias.

3.6 Ensaio de viabilidade celular- Lactado desidrogenase (LDH)

O dano na membrana celular foi avaliado pela mensuração da quantidade da lactato desidrogenase citoplasmática (LDH) liberada no meio. A atividade da LDH é determinada de acordo com a conversão do piruvato a lactato, catalisada pela LDH, na presença de NADH. O decréscimo da absorvância em 340 nm devido a oxidação do NADH é proporcional à atividade da LDH na amostra

Após o período de incubação com as drogas, 20 µL do sobrenadante foi recolhido para a mensuração da quantidade de LDH. A análise enzimática foi realizada em triplicata de acordo com as instruções do kit (Kit LDH Liquiform).

3.7 Ensaio de viabilidade por determinação da integridade da membrana por citometria de fluxo (MACKLIS e MADISON, 1990)

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular. O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo (IP), que é hidrofílico, de penetrar apenas nas células cuja membrana esta rompida. Após a ligação ao DNA, o IP emite alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio (488nm). A célula com membrana integra emite, portanto, baixa fluorescência (MACKLIS;MADISON, 1990).

As células PC12 foram plaqueadas em placas de 24 poços e foram incubadas com as drogas. Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas e foi adicionado 500 µL de meio HAM:F12. Então, foi retirada uma alíquota de 100 µL e incubada com 100 µL de uma solução de Iodeto de Propídeo (IP) na concentração de 50µg/mL (diluídos com PBS) na ausência de luz. Após 5 minutos, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (EasyCyte, Guava Technologies, EUA) foram obtidas informações sobre a porcentagem de células viáveis (membranas integras) utilizando-se o filtro para espectro do vermelho. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8 Avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS (RE *et al.*, 1999)

A técnica de captura do cátion radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS•+) foi empregada para determinar a atividade antioxidante das amostras medida através da sua capacidade em estabilizar o cátion radicalar ABTS presente na solução, que volta à forma de composto neutro ABTS. O deslocamento do equilíbrio entre as duas formas do ABTS ocasiona a descoloração da solução verde escura do ABTS•+ e a diminuição da absorvância em 734nm . Nesta técnica, proposta por RE *et al.* (1999) o cátion radicalar ABTS foi preparado a partir da reação de 5,0 mL da solução estoque ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). Esta mistura foi deixada em repouso, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, por 16 h antes do uso. Em seguida, 1,0mL da mesma foi diluído em etanol (aproximadamente 99 mL) até ser obtida uma absorvância de 0,715 em 734 nm. Os extratos tiveram suas atividades testadas pelo monitoramento da absorvância da mistura reacional contendo 3 mL de solução etanólica de ABTS•+ e 30 µL de solução etanólica dos extratos ou do controle positivo (rutina) nas concentrações de 10.000, 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5 µg/mL.

Após um período de 6 minutos, ao abrigo da luz, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV-vis em 734 nm. Uma medida do branco foi obtida através da solução etanólica de ABTS•+. Para avaliar a atividade captadora de radical foi obtida a porcentagem de inibição conforme a equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{[(\text{Absorvância do ABTS} - \text{Absorvância da amostra})/\text{Absorvância do ABTS}] \times 100}{1}$$

A concentração efetiva (CE₅₀), quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de ABTS em 50%, foi calculada através de uma curva de regressão linear feita no programa Excel. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das medias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH (YEPEZ *et al.*, 2002)

O teste da atividade utiliza o desaparecimento do radical estável 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) para avaliar a atividade de retirada de radical. Nesse teste, os extratos que contêm espécies antioxidantes reduzem o radical estável DPPH• (cor púrpura) à 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (cor amarelada). O método é baseado na redução do DPPH na presença de inibidores de radicais livres, resultando na formação de uma espécie não-radical.

Em um tubo de ensaio, foi colocado 3,9ml de uma solução metanólica de radical livre DPPH $6,5 \times 10^{-5}$ M. Em seguida foi adicionado ao tubo 0,1 ml de solução metanólica do extrato etanólico da *B. sericea* nas concentrações de 12,5; 2,5; 1,25; 0,250 e 0,125. Após 60 min determine a absorvância no espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda 515nm. A inibição do radical livre DPPH em porcentagem foi calculada da seguinte maneira:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = (\text{Abs(DPPH)} - \text{Abs(amostra)}) / (\text{Abs(DPPH)}) \times 100$$

A leitura foi realizada em triplicata, na 1ª cubeta com o branco (MeOH) e na 2ª cubeta a solução DPPH. A concentração efetiva (CE₅₀), quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, foi calculada através de uma curva de regressão linear feita no programa Excel. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das medias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes

3.10 Determinação da concentração de nitrito (GREEN *et al.*, 1982)

Após o período de incubação, a concentração de nitrito foi determinada segundo o método de GREEN e colaboradores (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual e sobrenadante celular) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm.

Para este experimento 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)- etilenediamina 0.1% / H₃PO₄ em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foram adicionados à 100 µL do sobrenadante da cultura de célula e incubado a temperatura ambiente por 10 min, após esse tempo, a leitura da absorvância das amostras foi realizada. Foi elaborada uma curva padrão com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 à 100 µM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100

μL do reativo de Griess à 100 μL do meio de cultura e a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.11 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968)

Foi plaqueado 7×10^6 céls/poço e após o período de incubação, as células foram transferidas para eppendorfs e centrifugadas por 5 minutos a 400 g. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e precipitado foi resuspendido em 400 μL de tampão de lise (0,2% Triton X-100). Posteriormente foram retirados 100 μL para a dosagem de proteínas e adicionado 75 μL de ácido perclórico 0,5 μM aos 300 μL do lisado e centrifugado por 5 minutos a 500 g. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 75 μL da amostra (sobrenadante resultante da ultima centrifugação), 75 μL de tampão fosfato-EDTA e 37,5 μL de DTNB 2 mM e a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 412nm.

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Bradford em uma placa de 96 poços onde foram adicionados 38,5 μL de tampão fosfato-EDTA, 1,5 μL das amostras (solução com 0,2% Triton X-100) e 200 μL da solução de Bradford. Após os 5 minutos a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 595 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.12 Quantificação de SOD por Western Blot

A determinação da SOD em células PC12 foi determinada pela técnica de western blot. Para preparar o lisado, foi retirado o meio da garrafa e as células foram lavadas com PBS. Depois de lavadas, foi acrescentado 1 mL de PBS, e raspado as células do fundo da garrafa. Em seguida, foi aspirado para um eppendorf e centrifugado por 3min a 300 g em temperatura ambiente.

Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e em seguida, foi colocado 50 μL de tampão de ripa (0,1% SDS, 1% deoxicalato de sódio, 10mM de Tris-HCL pH 7,5, 150mM NaCl, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinina, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 de PMSF e 0,5 mM EDTA), com inibidor de protease e foi deixado 20 min no gelo. Passado os 20 minutos, o

lisado foi centrifugado por 15 min a 14000 g a 4 °C e do sobrenadante foi determinado a concentração de proteína usando o método de Lowry.

As amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos (25µg/por poço) e foram separados por SDS-PAGE (12%) e transferido eletricamente para a membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA). A membrana foi bloqueada com 5 % de leite desnatado em TBS, com 0,1% de tween 20 a 4 °C, e incubado com anticorpo primário adequado diluído em TBS-Tween (anti-SOD 1:100, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti- α tubulina 1:4000 (Sigma ST Louis Missoure USA). Após lavagens sucessivas com tampão TBS- Tween as membranas foram incubadas com anticorpos secundários (1:2000 Sigma ST Louis Missoure, USA) conjugado a uma enzima horseradish peroxidase adequado por uma hora.

A revelação foi realizada utilizando o kit de quimioluminescência ECL (Clarity Western, Bio-Rad) por cerca de 2 minutos e foram analisadas e quantificadas pelo ChemiDoc Imager (Bio Rad) e pelo softwares molecular Image Studio lite 4.0 (LI-COR, EUA).

3.13 Determinação do Padrão de Morte celular pela PE Anexina-v por citometria de fluxo

PE Annexin V é usado para determinar quantitativamente a porcentagem de células dentro de uma população que está passando ativamente pela apoptose. Ele depende da propriedade das células para perder a assimetria da membrana nas fases iniciais da apoptose. Nas células apoptóticas, a fosfolípido fosfatidilserina da membrana (PS) é translocada do folheto interno da membrana plasmática para o folheto externo, expondo assim a PS ao ambiente externo. Amino-Actinomycin (7-AAD) é um marcador de viabilidade de citometria de fluxo padrão e é usado para distinguir células viáveis de células não viáveis.

As células PC12 foram plaqueadas em placas de 24 poços e foram incubadas com as drogas. Após o período de incubação, as células foram tripsinizadas e foi adicionado 500 µL de meio HAM:F12 e as células foram centrifugadas a 1500 rpm e resuspendida em 100 µl no tampão de ligação da Anexina-V presente no kit (Kit I BD Pharmingen) e foi acrescentado Add 5 µl de PE Annexina V e 5 µl de 7-AAD e incubou-se por 15 minutos no escuro. Após o tempo de incubação, acrescentou-se 400 µl do tampão e foi realizada a leitura no citômetro de fluxo.

As células que marcam positivas para PE Annexin V e negativas para 7-AAD estão passando por apoptose. As células que mancham positivamente tanto para PE Annexin V quanto para 7-AAD estão no estágio final da apoptose, estão passando por necrose ou já estão mortas. As células que mancham negativas tanto para PE Annexin V quanto para 7-AAD estão vivas e não passam por apoptose mensurável. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.14 Análises Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0. Para comparação entre as médias foi feita uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnet ou Teste de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os valores foram expressos como Média \pm EPM.

4. RESULTADOS

4.1 Análise do extrato etanólico da *B. sericea* pela cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD)

Foi analisado o EEBS por HPLC para detecção e quantificação dos principais constituintes do extrato ativo. A Figura 8 mostra o perfil de HPLC do extrato etanólico da *B. sericea* onde foram detectadas presença de pico 1 a pico 5. A Tabela 1 mostra os compostos presentes no extrato etanólico da *B. sericea* Geraniina (tempo de retenção-Tr = 3,91min, pico 1) Rutina (Tr = 6,12min, pico 2), isoquercetina (Tr = 7,53min, pico 3), kaempferol 3-O- β -rutinosídeo (Tr = 9,90 min, pico 4), quercetina (Tr = 22,35 min, pico 5).

Figura 8 - Perfil de cromatografia líquida de alta eficiência representativa do EEBS.

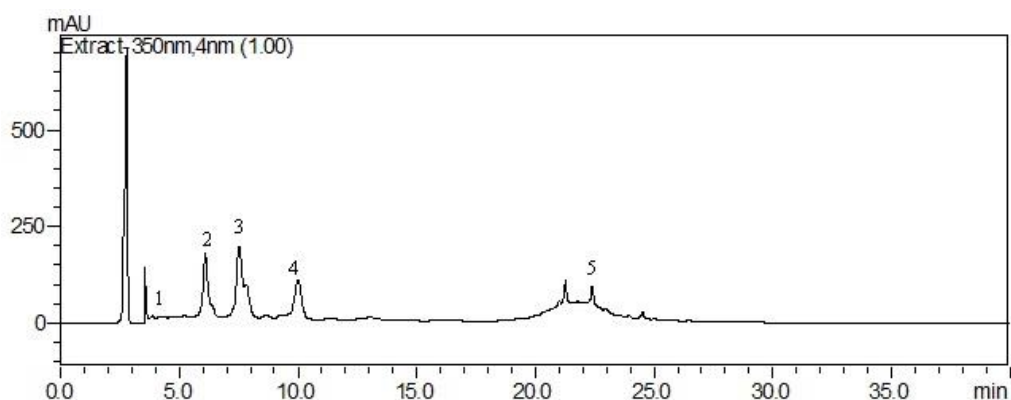
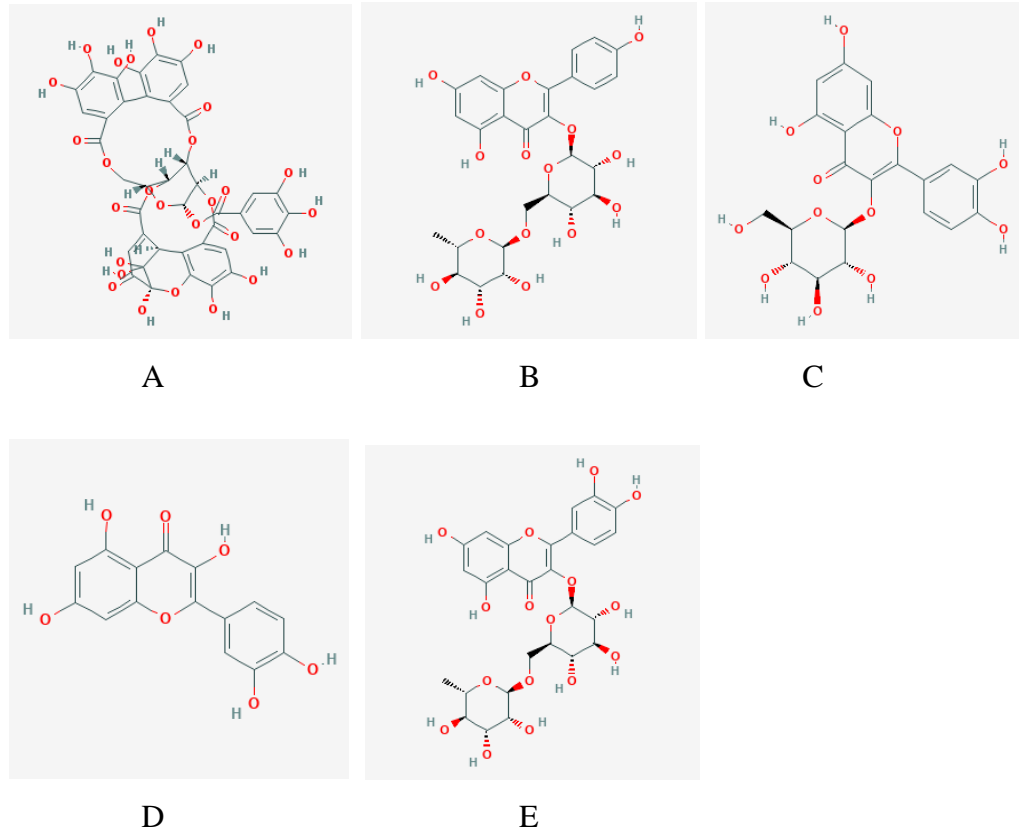


Tabela 1- Componentes do extrato etanólico da *B. sericea*.

| Picos | Compostos | mg/g extrato | Tr (min) | % no extrato |
|--------|--|--------------------|-------------|-----------------|
| Pico 1 | Geraniina | 8,503 \pm 0,082 | 3,91 | 0,85 |
| Pico 2 | Rutina | 7.836 \pm 0,133 | 6.31 | 0,78 |
| Pico 3 | Isoquercetina | 9.080 \pm 0,145 | 7.53 | 0,90 |
| Pico 4 | Kaempferol 3-O- β - rutinosídeo | 29,98 \pm 0,542 | 9.90 | 2,99 |
| Pico 5 | quercetina | 2,125 \pm 0,0113 | 22.36 | 0,21 |

Figura 9: Estrutura química dos compostos fenólicos encontrados no EEBS

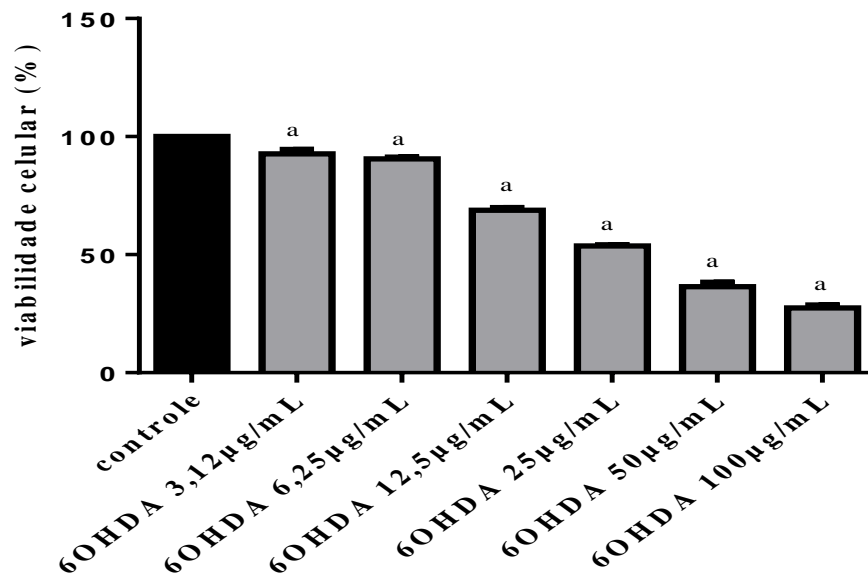


A, geraniina; B, kaempferol 3-O-β-rutinosídeo; C, isoquercetina; D, quercetina; E, rutina. Fonte: Pubchem, 2018.

4.2 Efeito citotóxico da 6-OHDA sobre a viabilidade de células PC12 - Teste do MTT

A Figura 10 mostra o efeito da 6-OHDA nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados mostram que a 6-OHDA diminui significativamente de maneira concentração-dependente a viabilidade celular em todas as concentrações quando comparadas ao controle (porcentagem de viabilidade celular pelo MTT: Controle = 100,0; 6-OHDA 3,12 $\mu\text{g/mL}$ = $92,63 \pm 2,04$; 6-OHDA 6,25 $\mu\text{g/mL}$ = $90,51 \pm 2,04$; 6-OHDA 12,5 $\mu\text{g/mL}$ = $68,78 \pm 1,91$; 6-OHDA 25 $\mu\text{g/mL}$ = $53,68 \pm 2,04$; 6-OHDA 50 $\mu\text{g/mL}$ = $36,46 \pm 1,91$; 6-OHDA 100 $\mu\text{g/mL}$ = $27,38 \pm 1,91\%$). A concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ foi a escolhida para ser utilizada nos testes subsequentes devido levar a uma redução da viabilidade celular significativa, em torno de 50% das células.

Figura 10 - Efeito citotóxico da 6-OHDA sobre a viabilidade em cultura de células PC12.

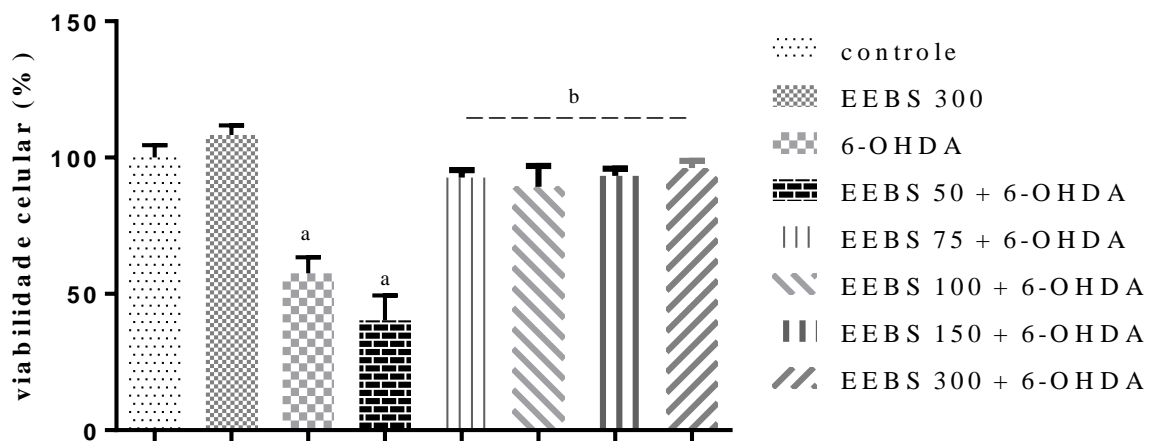


A 6-OHDA (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado e incubado por 24 h. após o tratamento a viabilidade mitocondrial foi avaliada pelo MTT. Os valores estão expressos como média \pm EPM de 3 experimentos, a $p < 0,05$ vs controle (ANOVA e Teste de Dunnet).

4.3 Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a viabilidade mitocondrial de células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL - teste do MTT

A Figura 11 apresenta o efeito do EEBS nas células PC12 na presença ou não de 6-OHDA 25 µg/mL. Pode-se observar que o extrato etanólico da *B. sericea* não apresentou toxicidade as mitocôndrias das células em relação ao controle (Controle = $100 \pm 2,29$ %; EEBS 300 µg/mL = $108,31 \pm 3,55$ %) e, quando as células foram expostas a toxicidade da 6-OHDA 25 µg/mL 24 horas após o tratamento, observou-se que o extrato foi capaz de proteger a PC12 dos efeitos tóxicos da 6-OHDA a partir da concentração de 75 µg/mL. Como a concentração 75 µg/mL foi a menor concentração do EEBS que apresentou citoproteção, esta foi a utilizada em experimentos posteriores (6-OHDA 25 µg/mL = $57,52\% \pm 3,39$ %; EEBS 50 µg/mL + 6-OHDA = $40,28 \pm 5,25$; EEBS 75 µg/mL + 6-OHDA = $92,64 \pm 1,58$; EEBS 100 µg/mL + 6-OHDA = $89,32 \pm 4,37$; EEBS 150 µg/mL + 6-OHDA = $93,32 \pm 1,31$; EEBS 300 µg/mL + 6-OHDA = $96,24 \pm 1,13$).

Figura 11 – Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a viabilidade mitocondrial de células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL.

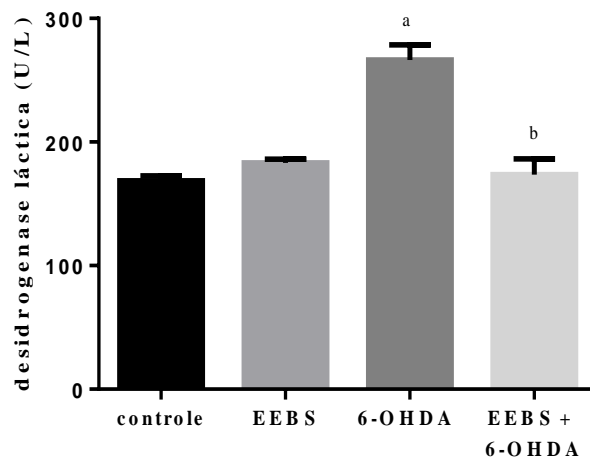


O EEBS 300 foi adicionado sozinho para determinar a toxicidade e o EEBS (50, 75, 100,150,300 µg/mL) foi adicionado 15 minutos antes da 6-OHDA e incubado por 24 h. Após o tratamento a viabilidade mitocondrial foi avaliada pelo teste do MTT. Os valores estão expressos como média \pm EPM de 3 experimentos, a $p < 0,05$ vs controle, b $p < 0,05$ vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

4.4 Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a viabilidade celular em PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL - teste do LDH

A desidrogenase láctica é um marcador biológico de lesão celular. Quando as células PC12 foram expostas a 6-OHDA 25 µg/mL os níveis de LDH aumentaram significativamente em relação ao controle (Controle = $168,74 \pm 8,45$ U/L; 6-OHDA 25 µg/mL = $266,45 \pm 8,46$ U/L), já quando as células foram pré-tratadas com o EEBS, os níveis foram mantidos próximo do controle (EEBS 75 µg/mL + 6-OHDA 25 µg/mL = $173,73 \pm 8,45$ U/L) conforme pode ser observado na Figura 12, demonstrando uma citoproteção.

Figura 12 – Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a viabilidade de células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL.

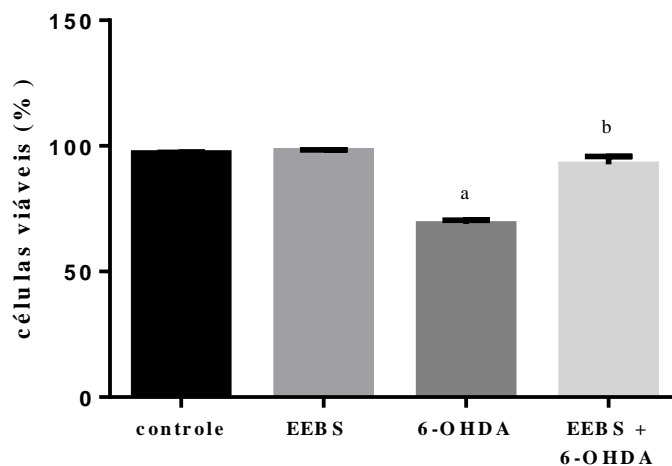


O EEBS 75 µg/mL foi adicionado sozinho ou 15 minutos antes da 6-OHDA e incubado por 24 h. Após o tratamento a viabilidade foi avaliada pelo teste do LDH. Os valores estão expressos como média \pm EPM de 3 experimentos, a $p < 0,05$ vs controle, b $p < 0,05$ vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

4.5 Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a integridade da membrana de células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL

Como pode ser observado na Figura 13 a 6-OHDA na concentração de 25 µg/mL foi capaz de causar danos na membrana plasmática das células PC12 (Controle = 100 %; 6-OHDA 25 µg/mL = $68,8 \pm 1,7$ %), reduzindo assim a viabilidade das células, porém, quando estas foram expostas ao EEBS, houve uma diminuição significativa da perda de integridade da membrana em relação a 6-OHDA (EEBS 75 µg/mL + 6-OHDA 25 µg/mL = $79,6 \pm 1,8$ %).

Figura 13 - Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a integridade de membrana em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL



O EEBS 75 µg/mL foi adicionado sozinho ou 15 minutos antes da 6-OHDA e incubado por 24 h. Após o tratamento a integridade da membrana foi avaliada por iodeto de propídio. Os valores estão expressos como média ± EPM de 3 experimentos, a $p < 0,05$ vs controle, b $p < 0,05$ vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

4.6 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH e pelo método ABTS

A Figura 14 mostra a atividade antioxidante do EEBS pelo teste do DPPH e a Figura 15 pelo teste do ABTS. A curva padrão da quercetina empregada para o experimento e que foram avaliada quanto à linearidade estão apresentadas na Figura 16 (DPPH) e na Figura 17 (ABTS) (DPPH: CE_{50} EEBS = $5,06 \pm 0,23 \mu\text{g/mL}$, CE_{50} quercetina = $5 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$; ABTS: CE_{50} EEBS = $2,8 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$, CE_{50} quercetina = $1,8 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$)

Figura 14 - Curva padrão do Extrato etanólico da *B. sericea* (DPPH).

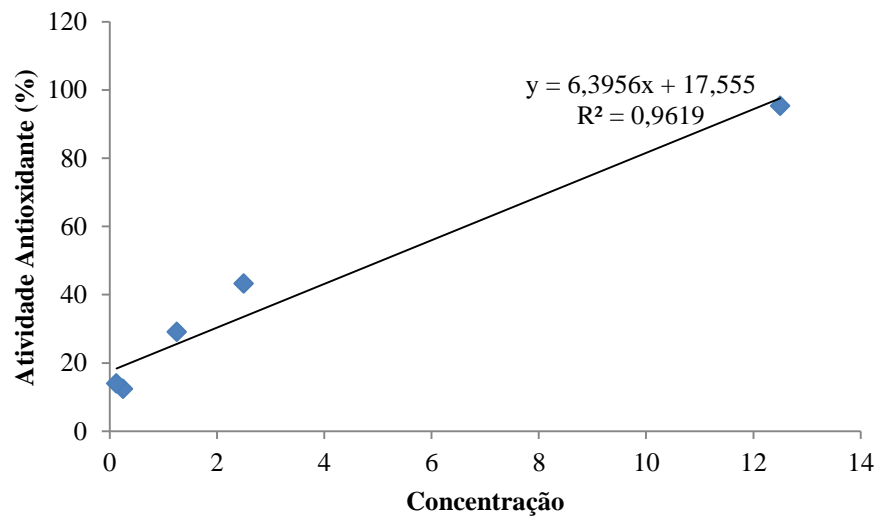


Figura 15 - Curva padrão do Extrato etanólico da *B. sericea* (ABTS).

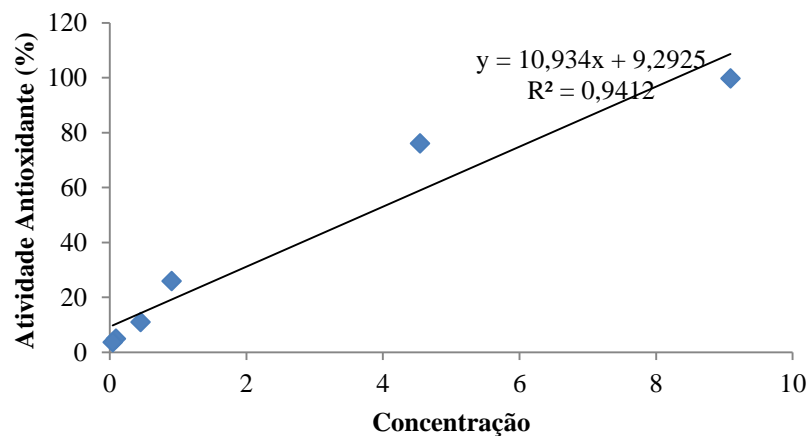


Figura 16 - Curva padrão da quercetina (DPPH).

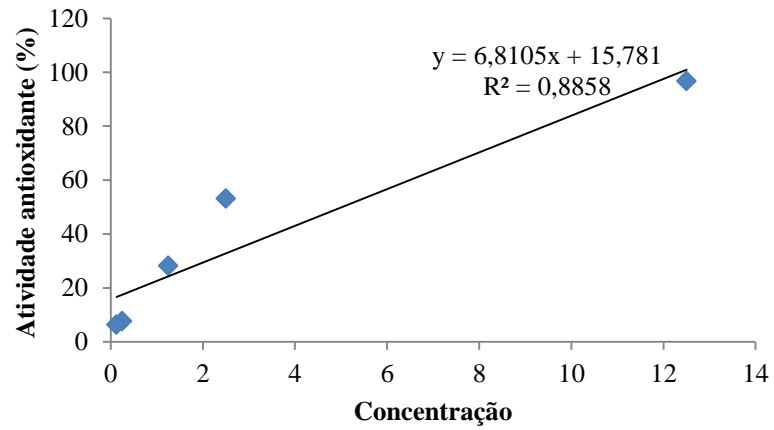
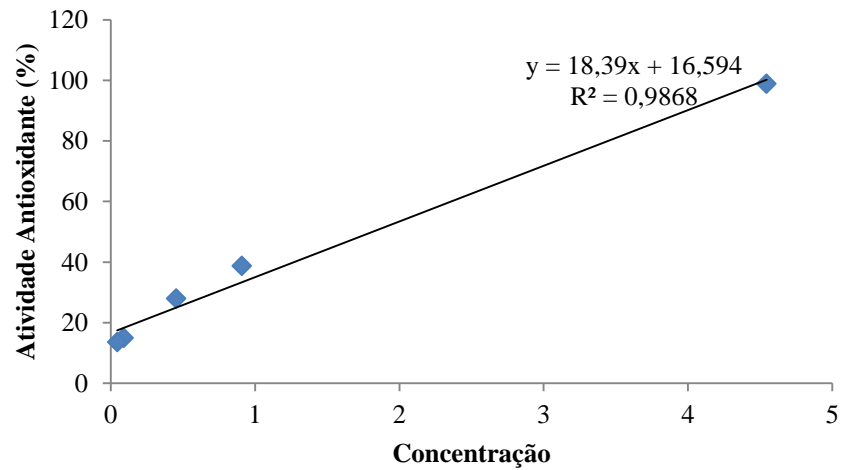


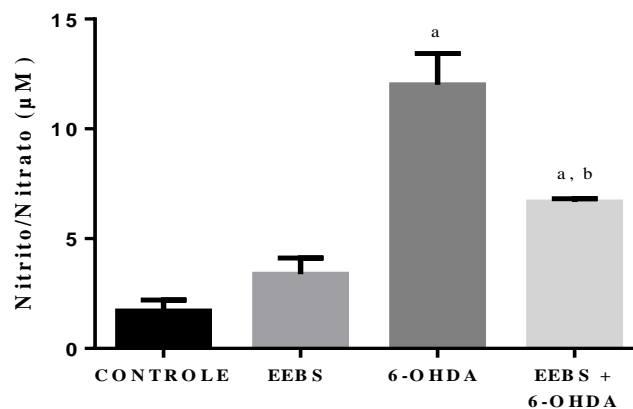
Figura 17 - Curva padrão da quercetina (ABTS).



4.7 Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a formação de nitrito em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL

Em condições normais, a concentração de nitrito em células PC12 é geralmente muito baixa. No entanto, na presença de estresse oxidativo como ocorre após exposição das células PC12 a 6-OHDA, a concentração de nitrito aumenta. Na Figura 18 pode-se observar que a exposição das células a 6-OHDA 25 µg/mL elevou significativamente as concentrações de nitrito quando comparados ao controle (Controle = 1,7 µM; 6-OHDA 25 µg/mL = 12,01 ± 0,8 µM). O EEBS na concentração de 75 µg/mL conseguiu inibir o aumento nos níveis de nitrito produzidos pela PC12 sob estresse induzido por 6-OHDA 25 µg/mL (EEBS 75 µg/mL + 6-OHDA 25 µg/mL = 6,66 ± 0,8 µM).

Figura 18 - Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a produção de nitrito em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL.

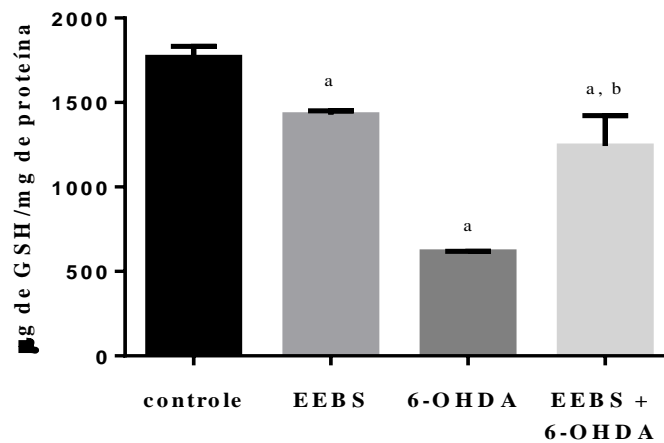


O EEBS 75 µg/mL foi adicionado sozinho ou 15 minutos antes da 6-OHDA e incubado por 24 h. Após o tratamento os níveis de nitrito foram avaliados. Os valores estão expressos como média ± EPM de 3 experimentos. a p < 0,05 vs controle, b p < 0,05 vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

4.8 Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre as de concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL

Como pode ser observada na Figura 19, a exposição das células a 6-OHDA causou uma redução nos níveis de GSH quando comparadas ao grupo controle (Controle = 2001,26 µg de GSH/mg de proteína; 6-OHDA 25 µg/mL = 615,02 µg de GSH/mg de proteína) e o EEBS, na concentração de 75 µg/mL, aumentou significativamente as concentrações de GSH em relação ao grupo tratado com 6-OHDA 25 µg/mL (EEBS 75 µg/mL + 6-OHDA 25 µg/mL = 1394,52 µg de GSH/mg de proteína).

Figura 19 - Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre as concentrações de glutathiona reduzida (GSH) em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL.

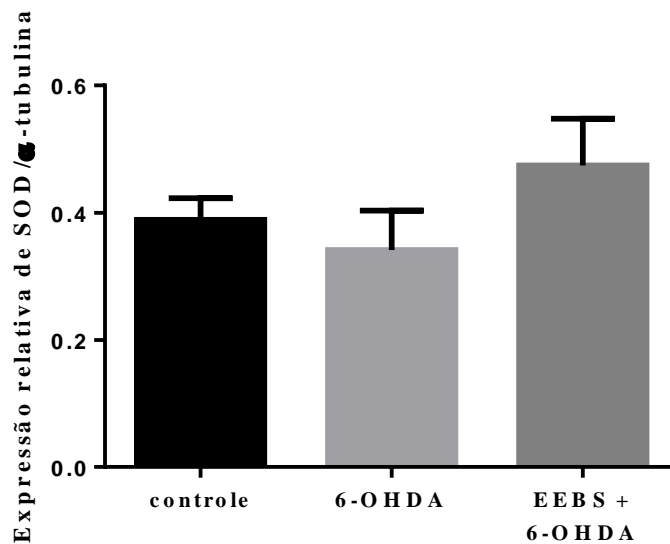


O EEBS 75 µg/mL foi adicionado sozinho ou 15 minutos antes da 6-OHDA e incubado por 24 h. Após o tratamento os níveis de GSH foram avaliados. Os valores estão expressos como média ± EPM de 3 experimentos. a p< 0,05 vs controle, b p< 0,05 vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

4.9 Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a expressão de SOD em células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL

Pode-se observar na Figura 20 que não houve uma diminuição da expressão de SOD a exposição das células a 6-OHDA em relação ao controle e também não houve diferença significativa quando o EEBS foi adicionado 15 minutos antes as células PC12 (expressão relativa de SOD/ α -Tubulin: Controle = $0,388 \pm 0,03$; 6-OHDA 25 µg/mL = $0,341 \pm 0,03$; EEBS 75 µg/mL + 6-OHDA = $0,474 \pm 0,04$).

Figura 20 - Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a expressão de SOD/ α -Tubulin em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL.

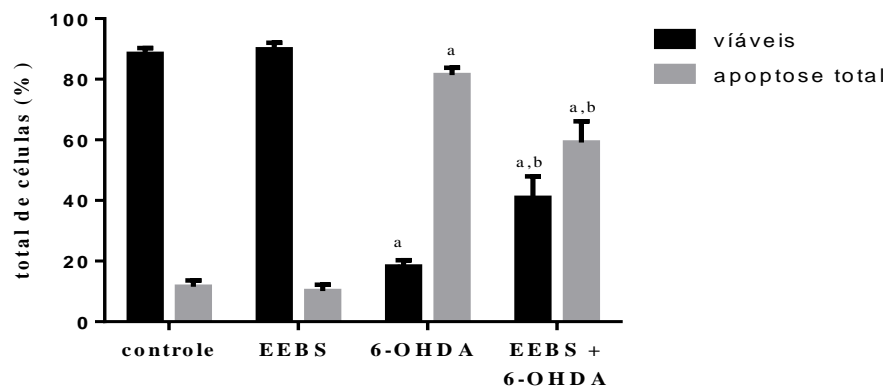


O EEBS 75 µg/mL foi adicionado 15 minutos antes da 6-OHDA e incubado por 24 h. Após o tratamento a expressão relativa de SOD/ α -tubulina foi avaliada por western blot. Os valores estão expressos como média \pm EPM de 3 experimentos. (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

4.10 Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a apoptose em células PC12 expostas a 6-OHDA 25 µg/mL

Pode-se observar na Figura 21 que o mecanismo de morte da 6-OHDA é principalmente por apoptose e que a exposição das células a 6-OHDA 25 µg/mL aumentou consideravelmente o número de células em apoptose em relação ao controle. Já quando as células foram pré tratadas com o extrato o número de células apoptóticas diminuiu (Controle: viáveis = 88,34 %, apoptose = 11,5%; 6-OHDA 25 µg/mL viáveis = 18,23 %, apoptose = 81,41%; EEBS 75 µg/mL + 6-OHDA 25 µg/mL viáveis = 40,9 %, apoptose = 59,1 %). O EEBS isoladamente não alterou a quantidade de células em apoptose (EEBS 75 µg/mL viáveis = 89,9 %, apoptose = 10,09 %).

Figura 21 - Efeito do extrato etanólico da *B. sericea* sobre a apoptose em células PC12 exposta a 6-OHDA 25 µg/mL.



O EEBS 75 µg/mL foi adicionado sozinho ou 15 minutos antes da 6-OHDA e incubado por 24 h. Após o tratamento o número de células apoptóticas foi avaliado por anexina – V/7AAD. Os valores estão expressos como média ± EPM de 3 experimentos. a $p < 0,05$ vs controle, b $p < 0,05$ vs 6-OHDA (ANOVA e Teste de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho podemos observar que o EEBS foi capaz de proteger as células PC12 da toxicidade induzida por 6-OHDA, aumentando tanto a viabilidade mitocondrial e celular nos testes do MTT e LDH, respectivamente e diminuiu a perda de integridade da membrana no teste do iodeto de propídio. O EEBS também foi capaz de diminuir os níveis de nitrito, manter os níveis de GSH e diminuir o número de células em apoptose.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD) do extrato mostrou a presença de diversos polifenóis com alto potencial antioxidante como quercetina, isoquercetina, rutina, geraniina e kaempferol 3-O- β -rutinosídeo, como os principais metabolitos secundários, e embora Rodrigues e colaboradores (2012) tenha identificado estes compostos previamente, a geraniina, um elagitanino, foi identificada pela primeira vez nas folhas de *B. sericea*. O EEBS mostrou um bom potencial antioxidante, próximo ao da quercetina no teste do DPPH e ABTS e devido ao forte impacto do estresse oxidativo na apoptose dos neurônios da substância nigra *pars compacta* na doença de Parkinson muitos estudos (ALVES, 2016; FONTELES, 2017; MENEZES, 2012) tem sido realizado na tentativa de descobrir uma nova droga neuroprotetora que possa ser utilizada na clínica a fim de diminuir a perda neuronal na DP e conseqüentemente os efeitos da discinesia causada pelo uso prolongado de L-Dopa, o que torna o EEBS um produto derivado promissor como auxiliar ao tratamento com Levodopa.

A 6-OHDA é metabólito natural da dopamina e uma neurotoxina utilizada para induzir parkinsonismo que ao entrar na célula causa danos de estresse oxidativo ocasionando a apoptose celular. Seu mecanismo de toxicidade consiste na sua entrada nos neurônios catecolaminérgicos, onde é rapidamente oxidada e produz peróxido de hidrogênio e quinonas, que são altamente tóxicos, além de inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (MEREDITH; SONSALLA; CHESSELET, et al., 2008). Essa neurotoxicidade foi confirmada através do teste do MTT, onde a 6-OHDA foi capaz de matar a célula PC12 de maneira dose-dependente. A concentração escolhida para o estudo foi a de 25 $\mu\text{g/mL}$ pois foi a concentração onde houve uma redução de cerca de 50% das células. Esta concentração foi a mesma encontrada por Alves (2016).

Neste estudo analisamos quais seriam as concentrações de EEBS a serem utilizadas nos testes, e conforme foi mostrado, o extrato não foi tóxico mesmo em concentrações elevadas como de 300 $\mu\text{g/mL}$ e que na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ o EEBS foi

capaz de proteger as células do dano induzido por 6-OHDA no teste do MTT, sendo esta a concentração utilizada nos testes devido a menor concentração com efeito neuroprotetor. Rodrigues *et al.* (2012) mostraram que a administração oral do extrato etanólico das folhas de *Byrsonima sericea* nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/kg não apresentou toxicidade nas células estomacais de camundongo

A integridade física das membranas biológicas é um pré-requisito indispensável para a regulação de muitos processos celulares. Alterações de importantes parâmetros celulares como a fluidez, a permeabilidade, o potencial elétrico e o transporte controlado através da membrana é um evento comum no dano celular (CUI et al.,2004). A 6-OHDA foi capaz de aumentar os níveis de LDH liberado no meio extracelular e de aumentar a permeabilidade da membrana ao iodeto de propídio, já quando as células foram pré tratadas com EEBS na concentração de 75 µg/mL, este foi capaz de manter não somente a viabilidade e a atividade metabólica mitocondrial no MTT, mas também protegeu a membrana das células PC12, tanto na permeabilidade ao LDH, quanto na permeabilidade ao iodeto de propídio da toxicidade induzida por 6-OHDA. Rodrigues e colaboradores (2012), utilizando um modelo sistêmico de lesão gástrica induzida por etanol em camundongos mostrou que o extrato etanólico das folhas de *B. sericea* foi capaz de proteger as células estomacais de camundongo devido à presença de rutina, quercetina, isoquercetina e kaempferol 3-O-β-rutinosídeo no extrato.

Wang e colaboradores (2014) mostraram que a geraniina na concentração de 20 µM protegeu as células HepG2 do dano causado por H₂O₂. Um estudo liderado por Li e colaboradores (2016) e por Huang e colaboradores (2007) mostrou que o kaempferol 3-O-β-rutinosídeo, um flavonol pertencente ao grupo dos flavonoides, nas concentrações de 10 mg/kg e 30 mg/kg, , teve efeitos protetores contra danos isquêmicos cerebrais e demência por múltiplos infartos respectivamente. Magalingam e colaboradores (2016), estudando a rutina e a isoquercetina em um modelo celular de parkinsonismo em células PC12, mostraram que ambos os compostos, nas doses de 50 e 100 µM respectivamente, foram capazes de proteger a célula frente ao dano induzido por 6-OHDA. Estes dados mostram que o EEBS protegeu as células PC12 provavelmente devido ao potencial antioxidante dos diferentes compostos fenólicos presentes no extrato como geraniina, rutina, isoquercetina e kaempferol 3-O-β-rutinosídeo

A presença destes antioxidantes (quercetina, isoquercetina, rutina, geraniina e kaempferol 3-O- β -rutinosídeo) foram os responsáveis pela forte capacidade de reduzir os radicais nos testes do DPPH e ABTS sendo semelhante ao potencial antioxidante da quercetina pura, composto esse com elevada capacidade antioxidante devido ao número de grupos hidroxila livres (LESJAK et al., 2018). Esse enorme potencial antioxidante corroborou com os dados de Boscolo e colaboradores (2006) que avaliaram o potencial antioxidante do extrato etanólico de folhas de 12 espécies de plantas medicinais através do ensaio com DPPH e encontrou que a da *B. sericea* era a que apresentava a menor atividade antioxidante ($CE_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$) e com os dados de Freige e colaboradores (2017) que mostraram que o extrato metanólico da folha de *B. sericea* foi capaz de sequestrar o radical peroxil (ROO^\cdot) ($CE_{50} = 1,6 \mu\text{g/mL}$) no teste baseado em piranina, que consiste no decaimento da fluorescência da piranina quando é submetida à oxidação por radicais peroxil derivados da 2,20-azobis (2-metilpropionamidina). Estes dados mostram que o EEBS possui uma atividade antioxidante próximo da quercetina pura, porém com uma concentração de flavonoides bem menor, mostrando a importância do sinergismo entre antioxidantes.

Importantes evidências têm demonstrado o envolvimento do óxido nítrico na degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (DUNCAN; HEALES, 2005; ZHANG et al., 2006). O óxido nítrico é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, ou seja, nitrito e nitrato, na maioria dos fluidos do corpo, inclusive no plasma. Quando em presença de O_2 forma ONOO^- , que promove diferentes efeitos biológicos a partir de três reações: reação redox direta, reação com CO_2 formando CO_3 e homólise de ácido peroxinitroso (VASCONCELOS, et al., 2007).

Shih e colaboradores (2009) utilizando a linhagem celular PC12, demonstraram que a 6-OHDA aumenta a expressão de óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e do Fator Nuclear kappa B (NF- κ B), molécula responsável pela transcrição de vários genes, dentre eles iNOS. Neste trabalho, a 6-OHDA aumentou os níveis de nitrito presente nas células PC12, confirmando o seu poder de gerar radicais livres como as espécies reativas de nitrogênio. Resultado este corroborado por Moura (2012) e Alves (2016) onde viram que a 6-OHDA, nas concentrações de $25 \mu\text{g/mL}$, aumentou os níveis de nitrito nas células SH-SY5Y e PC12, respectivamente. Quando as células foram pré-tratadas com extrato etanólico da *B. sericea* os níveis de nitritos foram diminuídos de forma significativa. Essa ação pode ter ocorrido por uma regulação na expressão dos genes que codificam a NOS, como por exemplo, via NF- κ B

e/ou pela sua atividade sequestradora de radicais livres que culminaram na redução de NO (LUO; FAN, 2011; MOURA, 2012).

O mecanismo de captura de ONOO⁻ por compostos fenólicos é influenciado por sua estrutura e ocorre via nitração ou doação de elétrons. Devido à presença de compostos antioxidantes com hidroxilas livres permite que o EEBS doe elétron para as espécies reativas de nitrogênio sendo este o mecanismo pelo qual o EEBS reduziu os níveis de nitrito (LESJAK *et al.*, 2018).

A atividade sequestradora de radicais livres da quercetina foi bem documentada, em que se observou que a quercetina exibe efeitos protetores contra danos neuronais mediados pelo estresse oxidativo por modulação da expressão de NRF-2 e atenuação da neuroinflamação suprimindo NF-κB e transdutor de sinal e ativador da transcrição-1 (STAT-1) (SUGANTHY *et al.*, 2016). Em macrófagos peritoneais de ratos, descobriu-se que a isoquercitina e quercetina (100 μM) atenua a expressão do óxido nítrico (iNOS) induzida por lipopolissacarídeos por supressão da fosforilação, induzida por LPS, das quinases p44/42 MAPK, p38 MAPK e JNK (Lee *et al.*, 2008) e na linhagem de mastócitos humanos HMC-1, a quercetina inibe a NF-κB e a p38 MAPK e, portanto, inibe a expressão de citocinas inflamatórias (Min *et al.*, 2007).

As células possuem sistemas antioxidantes que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, sendo a glutatona (GSH) o principal composto antioxidante intracelular (VASCONCELOS, *et al.*, 2007). Uma das primeiras mudanças bioquímicas observadas no cérebro de pacientes da DP *post mortem* é o decréscimo nos níveis da GSH. A GSH é o mais importante componente das defesas antioxidantes celulares (DICKINSON *et al.*, 2003). Em geral, a SNpc é uma das estruturas onde o GSH se encontra em níveis mais baixos e na DP os níveis de GSH sofrem um decréscimo ainda maior (BHARATH *et al.*, 2002). Níveis baixos de GSH levam a um aumento do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e conseqüentemente morte celular (JHA *et al.*, 2000). O GSH reage com O₂⁻ e OH, para a remoção de ROS como também é o doador de elétrons para a redução de peróxidos (KIM *et al.*, 2015).

No presente estudo, a 6-OHDA foi capaz de diminuir os níveis de GSH nas células PC12 em até 4 vezes devido ao aumento do peróxido de hidrogênio e de EROs. Corroborando com Magalingam e colaboradores (2015), onde mostraram que a 6-OHDA (100 μM) foi capaz de diminuir os níveis de GSH pela metade. Quando as células foram pré

tratadas com EEBS 75 µg/mL, os níveis de GSH aumentaram 2 vezes em relação a toxicidade induzida por 6-OHDA. Wang, Tang e Zhang (2015) e Wang e colaboradores (2015) observaram que tanto o kaempferol 3-O-β-rutinosídeo e a geraniina também foram capazes de inibir a depleção de GSH em células CCl4 e HepG2 respectivamente.

A geraniina é um polifenol com atividades eficientes na remoção de radicais livres, incluindo atividade de remoção de radicais superóxidos, atividade de limpeza radicalar DPPH e o poder redutor (WU *et al.*, 2010). A geraniina e a quercetina atuam na indução da expressão, mediada por fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), das enzimas antioxidantes hemoxigenase 1 (HO-1), quinona oxiredutase 1 () e γ-glutamil-cisteina sintetase, presumivelmente através das vias de sinalização PI3K/AKT e ERK1/2, protegendo assim as células da morte celular oxidativa induzida por H₂O₂ (; ARREDONDO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014).

A proteína Nrf2, pertence à subfamília dos fator nuclear eritroide 2 (NF-E2), responsáveis por reconhecer especificamente xenobióticos e coordenar a transcrição genética. Em resposta ao estresse oxidativo, o Nrf2 está dissociado do Keap1 levando à translocação nuclear, que fornece sinais para a regulação transcricional de genes relacionados ao elemento de resposta anti-oxidante (ARE), incluindo γ-glutamil-cisteina sintetase, enzima limitante da velocidade na síntese de GSH (WANG *et al.*, 2014).

Isoquercetina é, juntamente com a rutina, uma das principais formas glicosídicas do flavonol natural quercetina. Kim e colaboradores (2013) demonstraram que a isoquercetina atenuar a produção de superóxido induzido por zimosan em células RAW264.7 de macrófagos de roedores e também foi mostrado que ela elimina os radicais superóxido produzidos por um sistema xantina / xantina oxidase e inibi a atividade da xantina oxidase em si (SALEM *et al.*, 2010).

Também pode ser observado que quando as células PC12 foram tratadas somente com o EEBS, houve uma redução, embora pequena mas significativa dos níveis de GSH. Este resultado deve-se provavelmente a uma atividade pró-oxidante existente em compostos fenólicos devido à capacidade de quelar metais. A atividade pró-oxidante dos flavonóides é diretamente proporcional ao número total de grupos hidroxila. No trabalho de Hanasaki e colaboradores (1994) uma série de mono e dihidroxiflavonóides demonstraram não possuir atividade pró-oxidante detectável, enquanto que múltiplos grupos hidroxila, especialmente

presentes no anel B, aumentaram significativamente a produção de radicais hidroxil no sistema de Fenton.

A SOD é uma enzima encontrada na maioria das células eucarióticas, incluindo as células neuronais. Existe na forma de CuZn-SOD e Mn-SOD e estas enzimas atuam na catalisação da quebra de O_2^- altamente reativo a H_2O_2 e oxigênio (KIM *et al.*, 2015). Magalingam e colaboradores (2016) mostraram que a 6-OHDA foi capaz de reduzir significativamente os níveis de SOD nas células PC12. Neste estudo não foi observado uma redução significativa da SOD quando as células PC12 foram expostas a toxicidade induzida por 6-OHDA e também não foi observada diferença significativa quando as células foram pré-tratadas com EEBS porem, observa-se uma leve diminuição dos níveis de SOD nas células tratadas somente com 6-OHDA e um leve aumento dos níveis quando as células foram pré-tratadas com EEBS e depois por 6-OHDA.

A apoptose dos neurônios dopaminérgicos da SNpc é um evento envolvido no processo de neurodegeneração na DP (BATTISTI *et al.*, 2008). Achados clínicos (JELLINGER, 2000) e estudos com modelos experimentais *in vitro* (BLUM *et al.*, 2006) e *in vivo* (HANROTT, 2006) da DP demonstram o envolvimento da apoptose na neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos. Células em apoptose compartilham um grande número de características semelhantes como diminuição do volume celular, presença de vacúolos na membrana, clivagem da cromatina, condensação nuclear e formação de corpos picnóticos de cromatina condensada, os corpos apoptóticos, por outro lado, células em necrose exibem perda da integridade de membrana e aumento do volume celular (BREDESEN, 2007).

Conforme mostrado no teste da anexina-V/7AAD, a 6-OHDA foi capaz de aumentar em cerca de 8 vezes o número de células apoptóticas. Alves (2016) mostrou através do método panótico, que a 6-OHDA induz a perda dos neuritos, redução do volume e fragmentação celular em células PC12 e, através do método Laranja de acridina/brometo de etídio, que o número de células em apoptose é maior do que o de células necróticas, mostrando que a morte induzida por 6-OHDA foi ocasionada principalmente por apoptose. Resultados semelhantes também foram encontrados em células SH-SY5Y após exposição a 6-OHDA, onde ocorreu formação de corpos apoptóticos, fragmentação celular, redução do volume e condensação nuclear (LU *et al.*, 2006, LIU *et al.*, 2009).

Quando o DNA é danificado, há uma ativação do fator de transcrição p53 que por sua vez, ativa o Bax, um membro da família Bcl-2. Normalmente, a proteína Bcl-2 funciona como um supressor da apoptose, enquanto Bax é uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, assim, a proporção de Bcl-2 para Bax é um ponto de verificação importante na ocorrência de apoptose (GROSS *et al.*, 1999). Estudos anteriores mostram que o H₂O₂ causou uma desregulação do balanço entre Bcl-2 e Bax, alterou a permeabilidade da membrana mitocondrial, ativou a caspase 3, um potencial efetor de apoptose e aumentou a expressão do supressor tumoral p53, um importante ativador da via apoptótica mediada por EROs, levando subsequentemente à apoptose (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; ALVES, 2016; BAO *et al.*, 2017).

Neste estudo, quando as células foram pré tratadas com EEBS o número de células em apoptose foi diminuído significativamente frente a toxicidade induzida pela 6-OHDA, provavelmente diminuindo a ativação das caspases 9 e 3. Bao e colaboradores (2017) observaram que a quercetina (500 µM) foi capaz de aumentar a Bcl-2, proteína antiapoptótica e diminuir a Bax, pró apoptótica, bem como diminuir a expressão de p53 em um modelo de parkinsonismo com células PC12. Um efeito antiapoptótico da isoquercetina (80 µg/mL) também foi observado por Wang e colaboradores, em um modelo de isquemia e reperfusão, onde a isoquercetina foi capaz de suprimir a ativação do receptor tool-like 4 (TRL4), do NF-κB e a fosforilação de ERK1 / 2, JNK1 / 2 e p38 MAPK, diminuindo assim ao aumento da Bax e ativação da caspase 3.

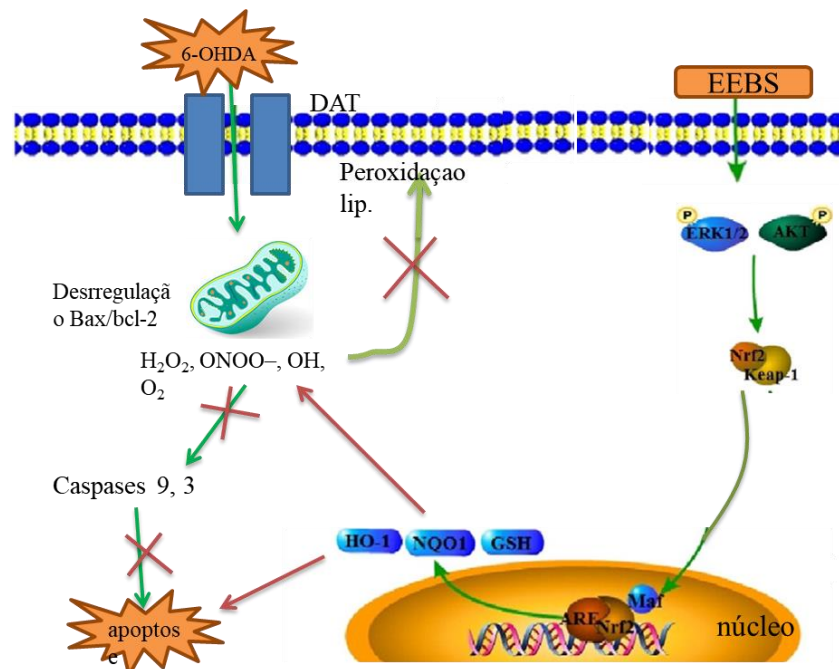
Hu e colaboradores (2017) também mostraram, em um modelo de isquemia/reperfusão, que o Kaempferol-3-O-β-rutinosídeo (10.0 mg/kg) diminuiu o número de células apoptóticas pela inibição da fosforilação da JAK2 e STAT3 e inibição da Bax e da caspase 3. Bing e colaboradores (2013), em um modelo de dano celular induzido por radiação em splenócitos e em células da cripta intestinal de camundongos, mostraram que a geraniina (100 µg/mL) inibiu a apoptose reduzindo o nível de expressão e imunorreatividade de p53 e Bax pró apoptóticos e aumentando os níveis de Bcl-2 anti-apoptótico.

Como podem ser observados neste estudo, os compostos geraniina, rutina, isoquercetina, kaempferol-3-O--rutinosídeo e quercetina foram capazes de proteger as células PC12 do dano oxidativo induzido pela 6-OHDA em baixíssimas concentrações em relação a estudos com estes compostos isolados (AHN; JEON, 2015; MAGALINGAM *et al.*, 2016;

LING *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016;) mostrando que o sinergismo entre os compostos antioxidantes é mais efetivo em relação aos compostos isolados.

Através deste estudo, pode-se afirmar que o extrato etanólico de *Byrsonima sericea* demonstrou exercer uma ação neuroprotetora no modelo celular experimental de DP, protegendo as células do dano causado por estresse oxidativo induzido pela 6-OHDA, uma neurotoxina presente em cérebros de pacientes afetados pela DP. Esta neuroproteção deve-se aos compostos fenólicos geraniina, rutina, isoquercetina, quercetina e Kaempferol 3-O- β -rutinosídeo presentes no extrato, capazes de sequestrar radicais livres, bem como induzir a ativação de proteínas antiapoptóticas, provavelmente pela ativação das vias mediadas por Nrf2, pela inibição da NF- κ B e pela fosforilação de ERK1/2, JNK1/2 e p38 MAPK, embora estudos futuros devam ser realizados a fim de confirmá-las. Deste modo, os resultados mostram que o extrato etanólico de *Byrsonima sericea* seja um forte candidato a uso como terapia adjuvante no tratamento da DP.

Figura 22: Via proposta para o efeito citoprotetor do EEBS



A 6-OHDA ataca o complexo I da mitocôndria induzindo a formação de EROs, levando a peroxidação lipídica e aumentando os níveis de Bax e das caspases induzindo apoptose. O EEBS ativa a fosforilação de ERK1/2 e AKT que induz a formação de ARE via Nrf2 que protege a célula do estresse oxidativo induzido por 6-OHDA. As setas verdes indicam ativação e a vermelha inibição. Fonte: elaborado pelo autor

6. CONCLUSÃO

- O Extrato etanólico de *Byrsonima sericea* protegeu as células PC12 da toxicidade induzida por 6-OHDA.

- A 6-OHDA induziu um estresse oxidativo com o aumento dos níveis de nitrito e diminuição de GSH, efeito este que foi revertido pelo Extrato etanólico de *Byrsonima sericea*.

- O extrato etanólico de *B. sericea* apresentou 5 compostos fenólicos (geraniina, quercetina, isoquercetina, rutina e Kaempferol-3-O- β -rutinosídeo) de alta capacidade antioxidativa, responsáveis pelo grande potencial antioxidante do extrato comprovados pelo teste do DPPH e ABTS.

- A 6-OHDA aumentou o número de células apoptóticas, que foi diminuído significativamente quando as células PC12 foram pré-tratadas com extrato etanólico de *B. sericea*.

A proteção observada pelo extrato pode ser atribuída aos mecanismos antioxidantes que podem estar relacionados com redução de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e antiapoptótico relacionados à diminuição da morte dos neurônios dopaminérgicos. Através desses achados podemos propor o extrato etanólico de *B. sericea* como um produto derivado promissor a ser explorado como agente neuroprotetor auxiliar ao tratamento com Levodopa para doença de Parkinson.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.; NOBRE, H.V. JR.; MACÊDO, D.S.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.; CUNHA, G.M.; SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** v. 84, n.3, p.415-419, 2006.
- AKSENOVA, M.V., AKSENOV, M.Y., MACTUTUS, C.F., BOOZE, R.M. Cell culture models of oxidative stress and injury in the central nervous system. **Curr Neurovasc Res.**, 2005.
- ALVES, A. A. **Efeito do ácido tânico sobre a toxicidade induzida pela 6-OHDA em células PC12, um modelo in vitro de doença de Parkinson.** 2016. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.
- ANDERSON, G., et al., Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, 2007.
- ARIMOTO, T.; BING, G. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. **Neurobiol Dis.** v. 12, p. 35-45, 2003.
- BAO, D. et al. Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Rat Pheochromocytoma (PC-12) Cells. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 1122, 2017
- BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes?. **Quím. Nova** v.29 n. 6, 2006.
- BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C.; GUERRA, H. L.; LIMA-COSTA, M. F.; CARDOSO, F. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Mov.Disord.**, v.21, p. 800-808, 2006.
- BATTISTI C., FORMICHI P., RADIC E., FEDERICO A. Oxidative-stress-induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson disease secondary to alpha-synuclein mutation. **J. Neurol. Sci.**, v. 267, p. 120-124, 2008.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso.** Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BEJAR, E.; MALONE, M. H. Pharmacological and chemical screening of *Byrsonima sericea*, a medicinal tree from Mexico, Part I, **J. Ethnopharmacol.**, 1993.
- BEJAR, E.; AMARQUAYE, A.; CHE, C.; MALONE, M.; FONG, H. Constituents of *Byrsonima sericea* and their spasmogenic activity, **Int. J. Pharmacogn.** 1995.
- BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CÁCERES, A.; HERNÁNDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C. M.; KULBELKA, W. Plants used in Guatemala for the treatment of

protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. **J. Ethnopharmacol.** 1998.

BHANU, M.U., MANDRAJU, R.K., BHASKAR, C., KONDAPI, A.K., Cultured cerebellar granule neurons as an in vitro aging model: topoisomerase IIbeta as an additional biomarker in DNA repair and aging. **Toxicol In Vitro**, 2010.

BHARATH, S.; HSU, M.; KAUR, D.; RAJAGOPALAN, S.; ANDERSEN, J.K. Glutathione, iron and Parkinson's disease. **Biochem Pharmacol.**, v.64, n.5-6, p.1037-1048. 2002.

BING, S. J. et al. Geraniin down regulates gamma radiation-induced apoptosis by suppressing DNA damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 147–153, 2013.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog.Neurobiol.**, v. 65, p. 135-172, 2001.

BOSCOLO, O.H.; MENDONÇA-FILHO, R.F.W.; MENEZES, F.S.; SENNA-VALLE L. 2007. Potencial antioxidante de algumas plantas de restingas citadas como medicinais. *Rev Bras Plant Med.* 2007.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience.** v. 211, p. 51-76, 2012.

BREDESEN, D. E. Key note lecture- Toward a mechanistic taxonomy for cell death programs.**Stroke.**, v. 38, p. 652-660, 2007.

BROWN, T. P.; RUMSBY, P. C.; CAPLETON, A. C. *et al.* Pesticides and Parkinson's disease—is there a link? **Environ Health Perspect.** 2006.

CACERES, A.; CANO, O.; SAMOYA, B.; AGUILLAR, L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders, 1. Screening of 84 plants against enterobacteria, **J. Ethnopharmacol.** 1990.

CHAKRABORTY, P. Herbal genomics as tools for dissecting new metabolic pathways of unexplored medicinal plants and drug discovery. **Biochimie Open**, 2018.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 2000.

CHEN, H.; ZHANG, S.M.; HERNAN, M.A.; SCHWARZSCHILD, M.A.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A., SPEIZER, F.E., ASCHERIO, A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson disease. **Arch Neurol.** V.60, p.1059-1064, 2003.

SCHULZ, J.B.; FALKENBURGER, B.H. Neuronal pathology in Parkinson's disease. **Cell. Tissue. Res.**, v. 318, p.135-147, 2004.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R. E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends Pharmacol.Sci.**, v. 30, p. 475-482, 2009.

COLLINS, M.A.; NEAFSEY, E. J. Potential neurotoxic “agents provocateurs” in Parkinson disease. **Neurotoxicol. Teratol.**, 2002

CUBO, E.; GOETZ, C. G. Parkinson's Disease. *In: Encyclopedia of the Neurological Sciences.* v. 3, Elsevier, 2014. P. 828 – 832.

CUI, H. S.; MATSUMOTO, K.; MURAKAMI, Y.; HORI, H.; ZHAO, Q.; OBI, R. Berberine Exerts Neuroprotective Actions against in Vitro Ischemia-Induced Neuronal Cell Damage in Organotypic Hippocampal Slice Cultures: Involvement of B-Cell Lymphoma 2 Phosphorylation Suppression. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32(1), p. 79-85, 2009.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanism and Models. **Neuron.**, v. 39, p.889-909, 2003.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods.**, v. 89, p. 271–277, 1986.

DEXTER DT, WELLS FR, LEES AJ, AGID F, AGID Y, JENNER P, MARSDEN CD Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. **J Neurochem.**, 1989.

DI MONTE, D. A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **Lancet Neurol.**, v. 2, p. 531-538, 2003.

DICKSON, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. **Parkinsonism and Related Disorders.** 2017.

DORSEY, E. R. *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology.** 2007.

DUNCAN, A. J.; HEALES, S. J. R. Nitric oxide and neurological disorders. **Mol Aspects Med.**, v. 26, p. 67-96, 2005.

EBERHARDT, O.; SCHULZ, J. B. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. **Toxicol.Letters.**, v. 139,p. 135-151, 2003.

ELBAZ, A.; DUFOUIL, C.; ALPÉROVITCH, A. Interaction between genes and environmental in neurodegenerative disease. **C. R. Biologies**, v. 330, p. 318- 328, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol.Pathol.**, v. 35, p. 495-516, 2007.

ENVIRONMENTAL Factors and Parkinson's. **Parkinson Foundation**, Miami, 2015. Disponível em < <http://www.parkinson.org/understanding-parkinsons/what-is-parkinsons/Environmental-Factors-and-Parkinsons>>. Acesso em 10 dez. 2017.

FANG F, CHEN H, FELDMAN AL, et al. Head injury and Parkinson's disease: a population-based study. **Mov Disord.**, 2012.

FAPEMAT, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Mato Grosso. Brasil começa a produzir remédio contra mal de Parkinson. 2011. Disponível em: < <http://www.fapemat.mt.gov.br/-/brasil-comeca-a-produzir-remedio-contramal-de-parkinson>>. Acesso em: 10 de junho de 2018.

FONTELES, A. A. **O Brilliant blue G, antagonista do receptor P2x7, diminui a discinesia induzida por L-DOPA em animais submetidos a modelo experimental de doença de Parkinson.** 2017. 118 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

FRAIG, K. *et al.* Dereplication by HPLC-DAD-ESI-MS/MS and Screening for Biological Activities of Byrsonima Species (Malpighiaceae). **Phytochem. Anal.**, 2017.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, 2012.

GOES, A. T. R. **Efeito terapêutico do exercício aeróbico em um modelo da doença de parkinson induzida por 6-hidroxidopamina em camundongos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Pampa, Rio grande do Sul, 2013.

GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, J. G. S.; MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2011.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GREENE LA, REIN G. Release, storage and uptake of catecholamines by a clonal cell line of nerve growth factor (NGF) responsive pheochromocytoma cells. **Brain Res.** v. 129 p. 247–263, 1977.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53(3), p. 335-343, 2007.

GROSS, A., MCDONNELL, J.M., KORSMEYER, S.J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes and Development.*, 1999.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de Byrsonima (Malpighiaceae). **Química Nova**, 2011.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet.**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 845-850, 1994.

HANROTT, K.; GUDMUNSEN, L.; O'NEILL, M. J.; WONNACOTT, S. 6-hydroxydopamine-induced apoptosis is mediated via extracellular auto-oxidation and caspase 3-dependent activation of protein kinase Cdelta. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 5373-5382, 2006.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n.6, p. 481-504, 2000.

HART, R.G.; PEARCE, L.A.; RAVINA, B.M.; YALTHO, T.C.; MARLER, J.R. Neuroprotection Trials in Parkinson's Disease: Systematic Review. **Mov Disord.**, 2009.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, H. L. Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de Parkinson. **Bioquímica**, v. 31, p. 146-158, 2006.

HERRERA-RUIZ, M.; ZAMILPA, A.; GONZÁLEZ-CORTAZAR, M.; REYES-CHILPA, R.; LEÓN, E.; GARCÍA, M. P.; TORTORIELLO, J.; HUERTA-REYES, M. Antidepressant effect and pharmacological evaluation of standardized extract of flavonoids from *Byrsonima sericea*. **Phytomedicine**, 2011.

HIRATA, Y.; NAGATSU, T. Rotenone and CCCP inhibit tyrosine hydroxylation in rat striatal tissue slices. **Toxicology**, 2005.

HUANG, J. L.; FU, S. T.; JIANG, Y. Y.; CAO, Y. B.; GUO, M. L.; WANG, Y.; XU, Z. Protective effects of Nicotiflorin on reducing memory dysfunction, energy metabolism failure and oxidative stress in multi-infarct dementia model rats. **Pharmacol Biochem Behav**, 2007.

HU, G. Q. et al. Inhibition of cerebral ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis: Nicotiflorin and JAK2/STAT3 pathway. **Neural Regeneration Research**, v. 12, n. 1, p. 96-102, 2017.

JELLINGER, K.A. Cell death mechanisms in Parkinson's disease. **J. Neural Transm.**, v. 107, p. 1-29, 2000.

JHA, N.; JURMA, O.; LALLI, G.; LIU, Y.; PETTUSI, E.H.; GREENAMYRE, J.T.; LIU, R.M.; FORMAN, H.J.; ANDERSEN, J.K. Glutathione depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity: implications for Parkinson's disease. **J. Biol. Chem.** v. 275, p. 26096-27001. 2000.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**. v. 17, p. 306-313, 1999.

KABUTO, H., YAMANUSHI, T.T. Effects of zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone] and eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] on the pathological progress in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease mouse model. **Neurochem.**, 2011.

KANDEL, E. R. **Principios de neurociências**, Porto Alegre: Artmed, 5° ed, 2014.

KLEIMAN, M.; FRANK, S. Epidemiology and Clinical Diagnosis of Parkinson Disease. **PET Clinics**, v. 8, 2013.

KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp. Neurobiol.**, v. 24, p. 325-340, 2015.

KLIVENYI, P.; VECSEI, L. Novel therapeutic strategies in Parkinson's disease. **Eur J Clin Pharmacol.**, 2009.

KOPIN, I.J.; MARKEY, S.P. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. **Annu.Rev. Neurosci.**, v. 11, p. 81-96, 1988.

KORELL, M.; TANNER, C. M. **Epidemiology of Parkinson's Disease: an overview** In: EBADI, M.; PFEIFFER, R. F. (eds.). Parkinson's disease. New York: CRC Press, p.39-50, 2005.

KOVALEVICH, J., LANGFORD, D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. **Methods Mol Biol.**, 2013

LALOUX, C., *et al.*, Effect of dopaminergic substances on sleep/wakefulness in saline- and MPTP-treated mice. **J Sleep Res.**, 2008.

LAZARO, D.F., PAVLOU, M.A.S., OUTEIRO, T.F., Cellular models as tools for the study of the role of alpha-synuclein in Parkinson's disease. **Exp Neurol.**, 2017

LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurol. Clin.** 2016.

LEE, S., ET AL., Effects of hyperin, isoquercitrin and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitrite production in rat peritoneal macrophages. **Phytother. Res.** 2008.

LESJAK, M.; BEARA, I.; SIMIN, N.; PINTAĆ, D.; MAJKIĆ, T.; BEKVALAC, K.; MIMICA-DUKIĆ, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, 2018.

LEV, N.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Prog. Neuropsychopharmacol.**, v. 27, p. 245-250, 2003.

LI, J. W. H.; VEDERAS, J. C.; Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science.**, v. 325, p.161-165, 2009.

LI, M.; HU, G.; CHEN, Y. Evaluation of the antioxidant capacity of natural polyphenolic compounds using a macrocyclic Ni-(II) complex-catalysed Briggs-Rauscher reaction. **Food Chemistry**, v. 197, p. 987-991, 2016.

LI, R.; GUO, M.; ZHANG, G.; XU, X.; LI, Q. Nicotiflorin reduces cerebral ischemic damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in primarily cultured rat cerebral blood vessel endothelial cells. **J Ethnopharmacol**, 2006.

Lin, M. T.; Beal, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, 2006.

LING, L. T.; Saito, Y.; Palanisamy, U. D.; Cheng, H. M.; Noguchi, N. Cytoprotective effects of geraniin against peroxynitrite- and peroxy radical-induced cell death via free radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1899–1907, 2012.

LO, R. Y.; TANNER, C. M. Parkinson's Disease; Epidemiology. *In: Encyclopedia of the Neurological Sciences*. v. 3, Elsevier, 2014. P. 833 – 839.

LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P. S.; TANG, T.; ZHAO, B. Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, v. 48, p. 263–274, 2005.

LUO, A.; FAN, Y. Antioxidant activities of berberine hydrochloride. **J. Med. Plant. Res.**, v. 5(16), p. 3702-3707, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods.**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MALDINI, M.; MONTORO, P.; PZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima sericea* L. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011.

MAGALINGAM, B. K. RADHAKRISHNAN, A. HALEAGRAHARA, N. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercetrin against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, 2016.

MARIUTTI, L. R. B.; RODRIGUES, E.; CHISTÉ, R. C.; FERNANDES, E.; MERCADANTE, A. Z. The Amazonian fruit *Byrsonima sericea* effectively scavenges reactive oxygen and nitrogen species and protects human erythrocytes against oxidative damage. **Food Research International.**, 2014.

MARIUTTI, L. R. B.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids from *Byrsonima sericea*: Identification, quantification and in vitro scavenging capacity against peroxy radicals. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2013.

MARTINEZ-VASQUEZ, M.; GONZALEZ-ESQUINICA, A. R.; LUNA, M. C.; GUTIERREZ, M. N. M.; GARCIA, A. N. A. Antimicrobial activity of *Byrsonima sericea* (L.) H.B.K. **J. Ethnopharmacol.** 1999.

MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; AKIYAMA, H.; MCGEER, E. G. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. **Ann Neurol**, 1988.

MELO, A.E.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim SBCTA**, v.36, n.1, p 1-11. 2002.

MENEZES, A. P. F. **Efeitos da curcumina e do resveratrol em ratos com parkinsonismo experimental induzido por 6-hidroxidopamina: um estudo comportamental e neuroquímico**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P. K.; CHESSELET, M. F. Animal models of Parkinson's disease progression. **Acta Neuropathol.**, v.115, p.385-398. 2008.

MIGLIORE, L.; COPPEDE, F. Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases. **Mutat.Res.**, v. 667, p. 82-97, 2009.

MILLER, R. L.; JAMES-KRACKE, M.; SUN, G. Y.; SUN, A. Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. **Neurochem. Res.**, v. 34, p. 55-65, 2009.

MIN, Y. D. *et al.* Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. **Inflamm. Res.**, 2007.

MLADENOVIC, A.; PEROVIC, M.; RAICEVIC, N.; RAKIĆ, L.; RUZDIJIĆ, S. 6-Hydroxydopamine increases the level of TNF-alpha and bax mRNA in the striatum and induces apoptosis of dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. **Brain Res.**, v. 996, p. 237-45, 2004.

Mogi, M.; Harada, M.; Kondo, T.; Riederer, P.; Inagaki, H.; Minami, M.; Nagatsu, T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci Lett**. 1994.

MORALES, C.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P.; IGLESIAS, I.; VILLAR, A. M.; CÁCERES, A. Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala, **II Farmaco.**, 2001.

MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods.**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA, C. M. C. **Atividade citoprotetora da berberina, um alcaloide isoquinolínico, sobre a toxicidade celular induzida pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em células SH-SY5Y**. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

NAGATSU, T.; MOGI, M.; ICHINOSE, H.; TOGARI, A. Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. **J Neural Transm Suppl.**, 2000.

NAGATSU, T.; SAWADA, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future. **Parkinsonism Relat. Disord.**, v.15, n.1, p.3-8. 2009.

NAKAMURA, K., BINDOKAS, V.P., MARKS, J.D., WRIGHT, D.A., FRIM, D.M., MILLER, R.J., KANG, U.J. The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to

dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited. **Mol Pharmacol.**, 2000.

NEVES, K. R. T. **Avaliação dos efeitos da Pentoxifilina em um modelo experimental da doença de Parkinson: uma abordagem comportamental, neuroquímica e imunohistoquímica.** 2014. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

NOBRE JÚNIOR, H.V.; CUNHA, G.M.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, R.A.; MORAES, M.O.; RAO, V.S. Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** v.136, n.2, p.175-180. 2003.

NOBRE JÚNIOR, H.V., *et al.* Neuroprotective Effects of Chalcones from Myracrodruon urundeuva on 6-Hydroxydopamine-Induced Cytotoxicity in Rat Mesencephalic Cells. **Neurochem Res**, 2008.

NOVIKOVA, L.; HARRIS, B. L.; GARRIS, D. R.; LAU, Y. S. Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**,v. 140, p. 67-76, 2006.

OAKLEY AE, COLLINGWOOD JF, DOBSON J, LOVE G, PERROTT HR, EDWARDSON JA, ELSTNER M, MORRIS CM. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease. **Neurology.**, 2007.

ONYANGO, I.G. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Neurochem Res.**,v. 33, p. 589–597, 2008.

OLANOW CW, RASCOL O, HAUSER R, FEIGIN PD, JANKOVIC J, LANG A, *et al.* A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. **N Engl J Med.** 2009.

PANOV, A. V.; GUTEKUNST, C. A.; LEAVITT, B. R.; HAYDEN, M. R.; BURKE, J. R.; STRITTMATTER, W. J.; GREENAMYRE, J. T. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. **Nat. Neurosci.**, v. 5, p. 731–736, 2002.

PARILLAUD, V. R.; LORNET, G.; MONNET, Y.; PRIVAT, A. L.; HADDAD, A. T.; BROCHARD, V.; BEKAERT, A.; DE CHANVILLE, C. B.; HIRSCH, E. C.; COMBADIÈRE, C. *et al.* Analysis of monocyte infiltration in MPTP mice reveals that microglial CX3CR1 protects against neurotoxic over-induction of monocyte-attracting CCL2 by astrocytes. **Journal of neuroinflammation**, 2017.

PARKINSON'S FOUNDATION. Estimated Healthcare Costs Related to PD in the U.S. Disponível em: < <http://www.parkinson.org/Understanding-Parkinsons/Causes-and-Statistics/Statistics>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2017.

PATHAK, R.U.; DAVEY, G .P. Complex I and energy thresholds in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1777, p. 777–782. 2008.

PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; CEN-PACHECO, F.; NOH-CHIMAL, A.; MAY-PAT, F.; SIMÁ-POLANCO, P.; DUMONTEIL, E.; GARCÍA-MISS, M. R.; MUT-MARTÍN, M. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula, **Fitoterapia**. 2007.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; MUÑIZ-RAMIREZ, A.; GOMEZ, Y. G., RAMÍREZ, E. B. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation effects of *Byrsonima sericea* fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, 2010.

PEREIRA D, GARRETT C. Factores de risco da doença de Parkinson um estudo epidemiológico. **Acta Med Port**, 2010.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim.Biophys.Acta.**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PERIER, C. *et al.* Two molecular pathways initiate mitochondria-dependent dopaminergic neurodegeneration in experimental Parkinson's disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007.

POWER, J. H.; BLUMBERGS, P. C. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **Acta Neuropathol**, v. 117, p. 63-73, 2009.

RASCOL, O.; BROOKS, D.J.; MELAMES, E.; OERTEL, W.; POEWE, W.; STOCCHI, F.; *et al.* Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, Lasting effect in Adjunct therapy with Rasagiline Given Once daily, study): a randomised, double-blind, parallel-group trial. **Lancet**. 2005.

RASCOL O, GOETZ C, KOLLER W, POEWE W, SAMPAIO C. Treatment interventions for Parkinson's disease: an evidence based assessment. **Lancet**. 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation colorization assay. **Free Radical Biology Medical**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RODRIGUES, P. A. **atividade gastroprotetora e antioxidante de extratos e constituintes químicos de *Byrsonima sericea* dc. e *Plectranthus grandis* cramer (willensem)**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

RODRIGUES, P. A., *et al.* Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2012.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol Chem.**, v. 385, p. 449-64, 2004.

SALEM, J.H., HUMEAU, C., CHEVALOT, I., HARSCOAT-SCHIAVO, C., VANDERESSE, R., BLANCHARD, F., FICK, M. Effect of acyl donor chain length on isoquercitrin acylation and biological activities of corresponding esters. **Process Biochem**. 2010.

SALUCCI, M.; STIVALA, L. A.; MAIANI, G.; BUGIANESI, R.; VANNINI, V. Flavonoids uptake and their effect on cell cycle of human colon adenocarcinoma cells. **British Journal of Câncer**, v. 86, p.1645-1651, 2002.

SÁNCHEZ DE M, F.; VERA, B.; GÁLVEZ, J.; ZARZUELO, A. Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat, **Life Sciences**, v.70, p. 3097-3108, 2002.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G. Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia:da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC. Capítulo 15. p. 301-332, 2001.

SCHAPIRA, A. H.; GU, M.; TAANMAN, J. W.; TABRIZI, S. J.; SEATON, T.; CLEETER, M; COOPER, J. M. Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Ann Neurol.**, v. 44(3), p.89-98, 1998.

SCHAPIRA, A.H., COOPER, J.M., DEXTER, D., CLARK, J.B., JENNER, P. AND MARSDEN, C.D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.**J. Neurochem.**, v. 54, p. 823–827, 1990.

SEDLAK J., LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.** v. 25, p. 192-195. 1968.

SIEGEL, G.J.; ALBERS R.W.; BRADY S.T.; PRICE, D.L. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects**. 7. ed. Londres: Elsevier Academic Press, 2006, p. 1016.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, J. R. J. G.; FERNANDES, O. F. *et al.*. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. **Mycoses**, v. 48, 2005.

SINGH, N.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**. v. 81, p. 29–44. 2007.

SOUZA, C. F. M. *et al.* A doença de parkinson e o processo de envelhecimento motor: Uma revisão de literatura. **Revista Neurociencias**, v. 19, n. 4, p. 718–723, 2011.

SOUZA, R. O.; ALVES, G. A. D.; FORTE, A. L. S. A.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; SILVA, D. F.; ROGEZ, H.; FONSECA, M. J. V. *Byrsonima sericea* extract and fraction prevent UVB-induced oxidative stress in keratinocytes culture and increase antioxidant activity on skin. **Industrial Crops & Products**, 2017.

SRIVASTAV, S.; FATIMA, M.; MONDAL, A. C. Important medicinal herbs in Parkinson's disease pharmacotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2017.

STAAL, R. G.; MOSHAROV, E. V.; SULZER, D. Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. **Nat. neurosc.**, 2004

STATISTICS on Parkinson's. **Parkinson Disease Foundation**, New York, 2015. Disponível em < http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics>. Acesso em 10 dez. 2015.

SUGANTHY, N.; DEVI, K. P.; NABAVI, S. F.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. M. Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2016.

TADAIESKY, M.T. **A lesão dopaminérgica como modelo de estágio pré-motor da doença de Parkinson: efeitos do antagonismo do receptor CB1**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

TANILA, H., M. BJORKLUND, P. RIEKKINEN, JR., Cognitive changes in mice following moderate MPTP exposure. **Brain Res Bull**, 1998.

Teixeira, M. D. A., *et al.* Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 2013.

UVERSKY, V. N. Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. **Cell Tissue Res.**, v. 318(1), p. 225-241, 2004.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 5, 1323-1338, 2007

WALDMEIER, P. C.; TATTON, W. G. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? **Drug Discov. Today.**, v. 9, p. 210-218, 2004.

WALKINSHAW, G.; WATERS, C.M. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. **Neuroscience**.v.63, p.975-87, 1994.

WANG, P.; PENG, X.; WEI, Z.; WEI, F.; WANG, W.; MA, W.; YAO, L.; FU, Y.; ZU, Y. Geraniin exerts cytoprotective effect against cellular oxidative stress by upregulation of Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via PI3K/AKT and ERK1/2 pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2015.

WELCH, K.D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Deleterious ironmediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biol. Med.**, v. 32, p. 577-83, 2002.

WU, N.; ZU, Y.; YU, Y.; FU, J. Z. K.; XIAOJUAN, L.; JI, L.; MICHAEL, W.; THOMAS, E.; Antioxidant activities and xanthine oxidase inhibitory effects of extracts and main polyphenolic compounds obtained from *Geranium sibiricum* L, **J. Agric. Food Chem**. 2010.

Xie, H. F; Xu, R. X.; Wei, J. P.; Jiang, X. D.; Liu, Z. H. P-JAK2 and P-STAT3 protein expression and cell apoptosis following focal cerebral ischemia- reperfusion injury in rats. **Journal of Southern Medical University**. 2007.

YANG, W.L., SUN, A.Y. Paraquat-induced cell death in PC12 cells. **Neurochem** 1998.

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LÓPEZ, S.; BOLAÑOS, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. **Fluid Phase Equil.** v. 194, p. 879-884. 2002.

ZHIGAO, H.; FUENTE, F. R.; STOESSL, A. J. Etiology of Parkinson's Disease. **Can. J. Neurol.**, v. 1, p. 10-18, 2003.