



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACUDADE DE MEDICINA (CAMPUS-SOBRAL)**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**THALLES YURI LOIOLA VASCONCELOS**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA HESPERIDINA EM MODELO DE DOENÇA DE  
PARKINSON INDUZIDO POR INJEÇÃO INTRANIGRAL DE LPS EM RATOS**

**SOBRAL**  
**2019**

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)

---

V451e Vasconcelos, Thalles Yuri Loiola.

EFEITO NEUROPROTETOR DA HESPERIDINA EM MODELO DE DOENÇA DE  
PARKINSON INDUZIDO POR INJEÇÃO INTRANIGRAL DE LPS EM RATOS / Thalles Yuri  
Loiola Vasconcelos. – 2019.

77 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

1. Doença de Parkinson. 2. Lipopolissacarídeo. 3. Hesperidina. 4. Neuroproteção. I. Título.

CDD 660.6

---

**THALLES YURI LOIOLA VASCONCELOS**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA HESPERIDINA EM MODELO DE DOENÇA DE  
PARKINSON INDUZIDO POR INJEÇÃO INTRANIGRAL DE LPS EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – UFC/*Campus* Sobral, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Macromoléculas

Orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

**SOBRAL**

**2019**

**THALLES YURI LOIOLA VASCONCELOS**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA HESPERIDINA EM MODELO DE DOENÇA DE  
PARKINSON INDUZIDO POR INJEÇÃO INTRANIGRAL DE LPS EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – UFC/Campus Sobral, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Macromoléculas

Aprovada em: 26/02/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. **Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar**  
Universidade Federal do Ceará/*Campus* Sobral (UFC)

---

Prof. Dr. **Rodrigo Maranguape Silva da Cunha**  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof. Dr. **Tiago Sousa de Melo**  
Centro Universitário Instituto Superior de Teologia Aplicada (UNINTA)

---

Dra. **Cleane Gomes Moreira**  
Universidade Federal do Ceará/*Campus* Sobral (UFC)

---

*À minha família, pelo amor e apoio incondicional, pela minha formação moral e afetiva e por tudo que representam em minha vida. Meus modelos.*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me protege, me guia e faz pequenos milagres diariamente para que tudo dê certo no fim. Que este trabalho possa ser parte de sua obra na busca de melhorar a vida dos que sofrem.

Aos meus pais, **Francisco** e **Luzimirtes**, pelos ensinamentos tão valiosos, pelo apoio constante durante essa jornada e pela influência aos estudos desde criança. A minha irmã, **Monike**, pelo apoio e ajuda nesse período. Amo vocês, obrigado por tudo!

À minha orientadora, Profa. Dra. **Lissiana Magna Aguiar Vasconcelos**, por ter me apresentado a neurociência e pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Fisiologia e Neurofarmacologia. Obrigado por ajudar no desenvolvimento desse trabalho e de minha formação acadêmica, pela paciência nas orientações e pelas experiências e ensinamentos compartilhados.

Ao técnico do Laboratório de Fisiologia e Neurociência, **Francisco José Gomes** e a Dra. **Cleane**, por me ajudar em todos os momentos da realização dos experimentos, pelos nãoos que nunca me foram dados, por todo o tempo e esforço dedicados na execução deste trabalho, vocês foram meus braços direito e esquerdo. Muito obrigado por tornarem a jornada deste grande desafio mais leve e divertida, pelas palavras de apoio, pelos risos e momentos de descontração.

A todos que fazem parte da equipe do Laboratório de Fisiologia e Neurociência, em especial, meus amigos de laboratório e da vida, **Cristiane, Euriana, Eva, Feliphy, Lucas Diogo, Nayara, Paulo, Valéria** e aos alunos de Iniciação Científica, **Ana Clara, Carol, Emanuela, Gustavo, Jhonyson, Mateus, Joaquim, Kaio, Thomas Dominik, Sara, Paulo Miguel, Gabriel Torquato**, pela grande colaboração no desenvolvimento dessa pesquisa, por deixar suas horas de lazer e outras atividades de lado para que este trabalho se concretizasse.

Aos meus colegas da turma de 2017 do PPGB, **Erivan, Janaína, Jesús, Mariane e Pedro**, pelo companheirismo ao longo desses dois anos.

Aos meus amigos e sócios, **Ítalo** e **Ermeson**, que sempre torceram e torcem por mim, se entristecem comigo, vibram com cada vitória minha como se fosse sua. Obrigado por todo incentivo e paciência nesse período.

Aos todos os meus amigos pela ajuda durante os momentos tristes, pelas alegrias nos momentos bons e pela colaboração durante os percalços da vida cotidiana.

Aos professores, Dr. **Rodrigo Maranguape** e Dr. **Tiago Sousa de Melo**, por aceitarem participar da minha banca de defesa, contribuindo para a melhoria do meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), em especial ao Prof. Dr. **Igor Iuço**, coordenador do PPGB, pela compressão e ajuda inestimável que muito contribuíram em minha formação acadêmica.

À secretária da Pós-Graduação, **Edilda**, pela paciência com os alunos e dedicação ao trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado (código 001) e pelo apoio financeiro na modalidade de taxa de bancada, ambos fundamentais para a execução desta pesquisa.

Aos animais, que sem escolha, tiveram suas vidas sacrificadas em prol da pesquisa e do desenvolvimento científico.

À todos que colaboraram e enriqueceram essa etapa da minha vida! Muito Obrigado!

*“A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda.”*  
*(Albert Einstein)*



## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela destruição progressiva dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos. Embora a fisiopatologia da DP ainda não esteja bem estabelecida, existem alguns mecanismos implicados na sua progressão que incluem o estresse oxidativo, a neuroinflamação, a disfunção mitocondrial, agregação protéica, excitotoxicidade e apoptose. O tratamento atual está restrito ao alívio sintomático, pois até o momento não existem agentes capazes de impedir a degeneração neuronal. Portanto, é de suma importância a descoberta de novas substâncias que possam impedir a progressão da doença e reduzir os efeitos adversos das drogas convencionais. A hesperidina (HSP) é um flavonóide presente na maioria das frutas cítricas, que apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Dentro desse contexto, este estudo objetivou-se investigar os efeitos da hesperidina no modelo experimental de DP induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Para isso, ratos lesionados com LPS (2 µg/ animal) unilateralmente no corpo estriado direito foram tratados com HSP (50, 100 e 200 mg/kg) durante 14 dias, com início um dia pós-cirurgia. No 15º dia pós cirurgia, os animais foram submetidos a ensaios comportamentais específicos (Teste do Campo aberto, *Rotarod* e Teste do Cilindro). Os resultados demonstram que o tratamento com hesperidina (100 mg/kg i.p) foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de *groomings* em relação ao grupo LPS. Também foi possível observar um efeito neuroprotetor *in vivo* na recuperação dos danos motores, como aumento do tempo de latência e do tempo de permanência, parâmetros avaliados no teste do *rotarod*. Contudo, o tratamento com HSP não alterou o comportamento dos animais no teste do cilindro. O composto também foi capaz de prevenir as alterações neuroquímicas induzidas pela neurotoxina reduzindo os níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado, córtex pré-frontal e hipocampo, além de reduzir os níveis de MDA no corpo estriado ipsilateral e no córtex pré-frontal. Estes achados demonstram um efeito antioxidante e neuroprotetor da hesperidina, que possivelmente atua na captura de radicais livres, atenuando injúrias neurotóxicas causadas por moléculas reativas, com importantes implicações para estudos futuros e sua aplicação para desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, Lipopolissacarídeo, Hesperidina, Neuroproteção.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive destruction of dopaminergic nigrostriatal neurons. Although the pathophysiology of PD is still not well established, there are some mechanisms involved in its progression that include oxidative stress, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, protein aggregation, excitotoxicity and apoptosis. Current treatment is restricted to symptomatic relief, as there are no agents to prevent neuronal degeneration. Therefore, the discovery of new substances that could prevent the progression of the disease and reduce the adverse effects of conventional drugs is of paramount importance. Hesperidin (HSP) is a flavonoid present in most citrus fruits, which has antioxidant and anti-inflammatory properties. In this context, this study aimed to investigate the effects of hesperidin on the experimental model of PD induced by lipopolysaccharide (LPS). For this, LPS-injured rats (2 µg / animal) unilaterally in the right striatum were treated with HSP (50, 100 and 200 mg / kg) for 14 days, starting one day after surgery. On the 15th day after surgery, the animals were submitted to specific behavioral tests (Open Field Test, Rotarod and Cylinder Test). The results demonstrate that treatment with hesperidin (100 mg / kg i.p) was able to significantly increase the amount of groomings compared to the LPS group. It was also possible to observe a neuroprotective effect *in vivo* in the recovery of motor damage, such as increased latency time and residence time, parameters evaluated in the rotarod test. However, treatment with HSP did not alter the behavior of the animals in the cylinder test. The compound was also able to prevent neurotoxin-induced neurochemical changes by reducing nitrite/nitrate levels in the striatum, prefrontal cortex and hippocampus, and reduced levels of MDA in the ipsilateral striatum and prefrontal cortex. These findings demonstrate an antioxidant and neuroprotective effect of hesperidin, possibly acting on the capture of free radicals, attenuating neurotoxic injuries caused by reactive molecules, with important implications for future studies and its application for the development of new therapeutic strategies for PD.

**Keywords:** Parkinson's Disease, Lipopolysaccharide, Hesperidin, Neuroprotection.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>6-OHDA</b>	6-Hidroxidopamina
<b>a.C.</b>	Antes de Cristo
<b>AP</b>	Antero-posterior
<b>BDNF</b>	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>cm</b>	Centímetros
<b>col.</b>	Colaboradores
<b>COX</b>	Ciclo-oxigenase
<b>DA</b>	Dopamina
<b>Da</b>	Daltons
<b>DAINES</b>	Anti-inflamatórios Não Esteróides
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DTNB</b>	5,5'-dithio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)
<b>DV</b>	Dorso-ventral
<b>ERNs</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>G</b>	Gravidade
<b>g</b>	Gramas
<b>GSH</b>	Glutationa
<b>h</b>	Horas
<b>HSP</b>	Hesperidina
<b>HSP50</b>	Grupo de animais tratados com hesperidina 50 mg/kg
<b>HSP100</b>	Grupo de animais tratados com hesperidina 100 mg/kg
<b>HSP200</b>	Grupo de animais tratados com hesperidina 200 mg/kg
<b>i.p.</b>	Intra-peritoneal
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Indutiva

<b>KCI</b>	Cloreto de Potássio
<b>Kg</b>	Quilogramas
<b>L-DOPA</b>	Levodopa
<b>LL</b>	Látero-lateral
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MFB</b>	Feixe medial do prosencéfalo
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMP-3</b>	Metaloproteinases de Matriz 3
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>n</b>	Número de amostra
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NEED</b>	N-naftil-etilenodiamina
<b>NF-kB</b>	Fator Nuclear kB
<b>nm</b>	Nanometros
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Óxido Nítrico Sintase
<b>NOSn</b>	Óxido Nítrico Sintase Neural
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SBCAL</b>	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNpc</b>	Substantia Nigra Pars Compacta
<b>TBARS</b>	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral Alfa
<b>UFC</b>	Universidade Federal do Ceará
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramas
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b><math>\mu</math>M</b>	Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representação da morte neuronal da DP. A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. B) Representação esquemática da via nigroestriatal de um paciente com DP.	<b>21</b>
<b>Figura 2.</b>	Mecanismos da neurotoxicidade seletiva aos neurônios dopaminérgicos.	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática do dano ao neurônio dopaminérgico através da administração de LPS.	<b>24</b>
<b>Figura 4.</b>	Estrutura química da hesperidina.	<b>27</b>
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática temporal do procedimento de indução do parkinsonismo até o sacrifício dos animais.	<b>32</b>
<b>Figura 6.</b>	Esquema com os procedimentos cirúrgicos realizados com os animais.	<b>33</b>
<b>Figura 7.</b>	Teste de Campo aberto para ratos.	<b>34</b>
<b>Figura 8.</b>	Teste de <i>Rota rod</i> para ratos.	<b>35</b>
<b>Figura 9.</b>	Teste do Cilindro para ratos.	<b>36</b>
<b>Figura 10.</b>	Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos.	<b>36</b>
<b>Figura 11.</b>	Ilustração da Reação de Griess.	<b>37</b>
<b>Figura 12.</b>	Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (Cruzamentos).	<b>40</b>
<b>Figura 13.</b>	Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto ( <i>Groomings</i> ).	<b>41</b>
<b>Figura 14.</b>	Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto ( <i>Rearings</i> ).	<b>42</b>
<b>Figura 15.</b>	Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (Tempo de Imobilidade).	<b>43</b>

<b>Figura 16.</b>	Análise da atividade motora no Teste do <i>Rotarod</i> (Tempo de Latência).	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b>	Análise da atividade motora no Teste do <i>Rotarod</i> (Tempo de Permanência).	<b>45</b>
<b>Figura 18.</b>	Teste do Cilindro. Avaliação da assimetria por 5 minutos do membro anterior contralateral de ratos lesionados com LPS e tratados com hesperidina após 14 dias de tratamento (Fonte: Autor).	<b>46</b>
<b>Figura 19.</b>	Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Corpo Estriado Ipsilateral.	<b>47</b>
<b>Figura 20.</b>	Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Corpo Estriado Contralateral.	<b>48</b>
<b>Figura 21.</b>	Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Córtex Pré-frontal.	<b>49</b>
<b>Figura 22.</b>	Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Hipocampo.	<b>50</b>
<b>Figura 23.</b>	Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Vermis Cerebelar.	<b>51</b>
<b>Figura 24.</b>	Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Corpo Estriado Contralateral.	<b>52</b>
<b>Figura 25.</b>	Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Corpo Estriado Ipsilateral.	<b>53</b>
<b>Figura 26.</b>	Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Córtex Pré-frontal.	<b>54</b>
<b>Figura 27.</b>	Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Hipocampo.	<b>55</b>
<b>Figura 28.</b>	Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Vermis Cerebelar.	<b>56</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Epidemiologia da Doença de Parkinson	16
1.2	Fisiopatologia da Doença de Parkinson	17
1.3	Envolvimento do estresse oxidativo e estresse nitrosativo na neurodegeneração	19
1.4	Envolvimento da inflamação na Neurodegeneração	21
1.5	Modelo Experimental de Doença de Parkinson com lipopolissacarídeo (LPS)	22
1.6	Atividade neuroprotetora dos Flavonóides	25
1.7	Hesperidina e bases para a sua atividade neuroprotetora	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos	30
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>31</b>
3.1	Animais	31
3.2	Aspectos éticos	31
3.3	Treinamento	31
3.4	Tratamento	31
3.5	Protocolo Experimental	32
3.6	Dissecação das Áreas Cerebrais	33
3.7	Testes comportamentais	33
3.7.1	Teste do Campo Aberto	33
3.7.2	Teste do Rota rod	34
3.7.3	Teste do cilindro	35
3.8	Análise Neuroquímicas	36
3.8.1	Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)	36
3.8.2	Determinação da Concentração de Nitrito	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>39</b>
4.1	Avaliação dos testes comportamentais	39
4.1.1	Teste do Campo Aberto	39
4.1.2	Teste do Rota rod	43

4.1.3	Teste do cilindro	45
<b>4.2</b>	<b>Avaliação das Dosagens Neuroquímicas</b>	<b>46</b>
4.2.1	Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)	46
4.2.2	Determinação da Concentração de Nitrito	51
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Epidemiologia da Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita como uma síndrome neurológica em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, em sua obra intitulada *Essay on the Shaking Palsy*, na qual foi nomeada como Paralisia Agitante (GOETZ, 2011). No entanto, relatos médicos indianos datados de 600 anos a.C. descrevem uma síndrome com sintomas semelhantes a DP, sugerindo que a DP já existia muitos anos antes de sua descrição por James Parkinson (OVALLATH; DEEPA, 2013).

Aproximadamente seis décadas depois da publicação da obra de James Parkinson, o neurologista francês Jean-Martin Charcot descreveu mais precisamente os sintomas da DP e sugeriu o termo Doença de Parkinson, rejeitando a designação inicial de paralisia agitante. Seus estudos contribuíram para diferenciar a DP de outras doenças também caracterizadas por tremor, especialmente da esclerose múltipla (DONALDSON, 2015; GOETZ, 2011).

A DP é um dos distúrbios do movimento mais comuns do sistema nervoso. Estima-se que afete cerca de 1% da população acima de 65 anos de idade e em torno de 4-5% das pessoas acima de 85 anos. A DP é o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum, estando atrás apenas da Doença de Alzheimer (SUBRAMANIAN; CHESSELET, 2013; LEE; GILBERT, 2016).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que 1% da população acima dos 65 anos sofre com a Doença de Parkinson (ONU, 2016). No Brasil, segundo a Associação Parkinson Brasília, a estimativa é de que pelo menos 200 mil pessoas tenham a doença (BRASIL, 2014). Mais de 10 milhões de pessoas em todo o mundo vivem com a Doença de Parkinson (PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2016). A incidência de doenças crônicas, como a DP, deverá crescer substancialmente nas próximas décadas à medida que o tamanho da população idosa crescer. Estima-se que aproximadamente 630.000 pessoas nos Estados Unidos tenham sido diagnosticadas com DP em 2010, com uma prevalência provavelmente dobrando até 2040 (KOWAL et al., 2013).

De acordo com a OMS, a expectativa de vida mundial vem crescendo consideravelmente nos últimos anos. Dados recentes indicam que do ano 2000 até o ano de 2015 houve um aumento de 5 anos na expectativa de vida média da população

(ONU, 2016). No Brasil a situação é semelhante. O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) afirma que no ano de 2015, a expectativa de vida do brasileiro foi de 75.5 anos, enquanto que, em 2011, era de 74.3 anos (IBGE, 2016).

Portanto, fica clara a relação entre o envelhecimento e maior a taxa de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Estima-se que o número de doentes irá dobrar nas duas próximas décadas, de modo que o conhecimento sobre as patologias, bem como sobre métodos de prevenção e tratamento, tornem-se cada vez mais necessários (SHARMA et al., 2013).

## 1.2 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma das desordens neurodegenerativas relacionadas com a idade mais comuns, caracterizada pela morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância *nigra pars compacta* no sistema nervoso central. Esses neurônios são produtores do neurotransmissor dopamina, e estão envolvidos na coordenação no sistema motor (STANDAERT; GALANTER, 2014; MAZZETTI et al., 2015).

A destruição dos neurônios dopaminérgicos está diretamente implicada nos principais sinais e sintomas da doença: disfunção motora, incluindo a lentidão dos movimentos, tremor de repouso, rigidez, distúrbios da marcha e instabilidade postural. A extensão da perda é profunda, com destruição de pelo menos 70% dos neurônios quando aparecem pela primeira vez os sintomas e com frequência, observa-se uma perda de cerca 95% dos neurônios em estudos *post mortem* de pacientes com DP (STANDAERT; GALANTER, 2014; WU; HALLETT; CHAN, 2015).

Inicialmente a DP costuma afetar principalmente um lado do corpo antes de se propagar e envolver o outro lado. Trata-se de uma doença neurodegenerativa progressiva que pode levar à deficiência com imobilidade severa. Embora os sintomas motores da DP dominem o quadro clínico, e até mesmo definam a síndrome parkinsoniana, muitos pacientes com DP têm outras queixas que são classificados como não-motoras. Estes sintomas não-motores incluem fadiga, depressão, ansiedade, distúrbios do sono, prisão de ventre, bexiga e outros distúrbios autonômicos (sexual, gastrointestinais), queixas sensoriais, diminuição da motivação e apatia, lentidão no pensamento, e um declínio cognitivo que pode evoluir para demência (OU et al., 2016).

Apesar de décadas de estudo intensivo, a etiologia do mal de Parkinson, permanece desconhecida. Vários mecanismos podem estar envolvidos na morte dos neurônios dopaminérgicos, que incluem estresse oxidativo, disfunção mitocondrial com formação de radicais livres, processos inflamatórios, excitotoxicidade, produção alterada de fatores neurotróficos, ação tóxica do óxido nítrico, além de fatores hereditários e ambientais (SULZER; SURMEIER, 2013). Estes múltiplos fatores interagem mutuamente e induzem um ciclo vicioso de toxicidade que faz com que ocorra alteração na plasticidade sináptica, causando alterações morfológicas que culminam com morte celular (CALABRESI et al., 2015).

Os neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* são responsáveis pela produção do neurotransmissor dopamina (DA). A dopamina é um neurotransmissor chave no movimento e na aprendizagem motora, emoção e recompensa, memória e cognição. A DA regula a atividade dos gânglios basais, e a perda de DA pela morte dos neurônios dopaminérgicos leva à disfunção dos gânglios basais e aos consequentes déficits motores da doença de Parkinson (RICE; PATEL, 2015).

O tratamento atual para esta doença está restrito ao alívio sintomático porque, até o presente momento, não existem agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. Esses tratamentos levam a uma melhora inicial dramática enquanto a doença progride, e com o passar do tempo sua eficácia diminui bastante. Outra limitação desses medicamentos consiste nos seus efeitos colaterais, como o desenvolvimento das discinesias que acabam por impossibilitar a continuação do tratamento (SULZER; SURMEIER, 2013).

O desenvolvimento de novos tratamentos que melhorem a sintomatologia da Doença de Parkinson com menos efeitos colaterais é importante em curto prazo, mas o tratamento ideal seria aquele o qual se pudesse aliar a essa terapêutica convencional drogas que impedissem a progressão da doença. Essas estratégias neuroprotetoras estão sendo propostas à medida que o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese da Doença de Parkinson estão sendo elucidados. As estratégias que podem ser consideradas para neuroproteção podem incluir alvos farmacológicos como receptores de fatores neurotróficos, redução de fatores pró-inflamatórios, proteínas apoptóticas, fatores de transcrição, radicais livres, toxinas mitocondriais e desregulação proteossomal (SCHAPIRA et al., 2014).

### 1.3 Envolvimento do estresse oxidativo e estresse nitrosativo na neurodegeneração

Substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas. Algumas dessas substâncias incluem as chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio livre ( $O_2$ ), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), os radicais hidroxil, os radicais peróxil, o peróxido de hidrogênio; e as espécies reativas do nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico e o peroxinitrito. Essas substâncias são capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como lipídeos, proteínas e DNA, causando danos às células, inclusive morte celular (GUPTA et al., 2014).

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula inorgânica que está envolvida em diversas funções fisiológicas e patológicas. O óxido nítrico é sintetizado a partir de um aminoácido L-arginina semi-essencial em uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que está presente em três formas principais: a NOS neural (NOS<sub>n</sub>), a NOS endotelial, e a indutiva (iNOS) geralmente envolvida em processos patológicos, como na inflamação. Alterações na homeostasia do NO estão presentes em muitas doenças agudas e crônicas, que incluem distúrbios do sistema nervoso central, doenças inflamatórias, deficiências reprodutivas, câncer e anomalias cardiovasculares. Devido à natureza muito instável, o NO é convertido em nitrito, peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio que podem levar ao estresse nitrosativo no sistema nigroestriatal na DP (COBB; COLE, 2015).

Sabe-se que o NO está envolvido na degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, embora ainda não tenha sido esclarecida a exata contribuição dos mecanismos dependentes de NO nesse processo. Inicialmente foram observadas alterações na liberação de NO dos neutrófilos obtidos de pacientes com doença de Parkinson e aumento na expressão de iNOS foram verificadas em modelos experimentais de doença de Parkinson induzida por LPS e 6-OHDA. Superexpressão de NOS<sub>n</sub> e formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) em pacientes com DP também tem sido relatados, enfatizando um importante papel do NO na fisiopatologia da DP (SINGH; DIKSHIT, 2007; COBB; COLE, 2015).

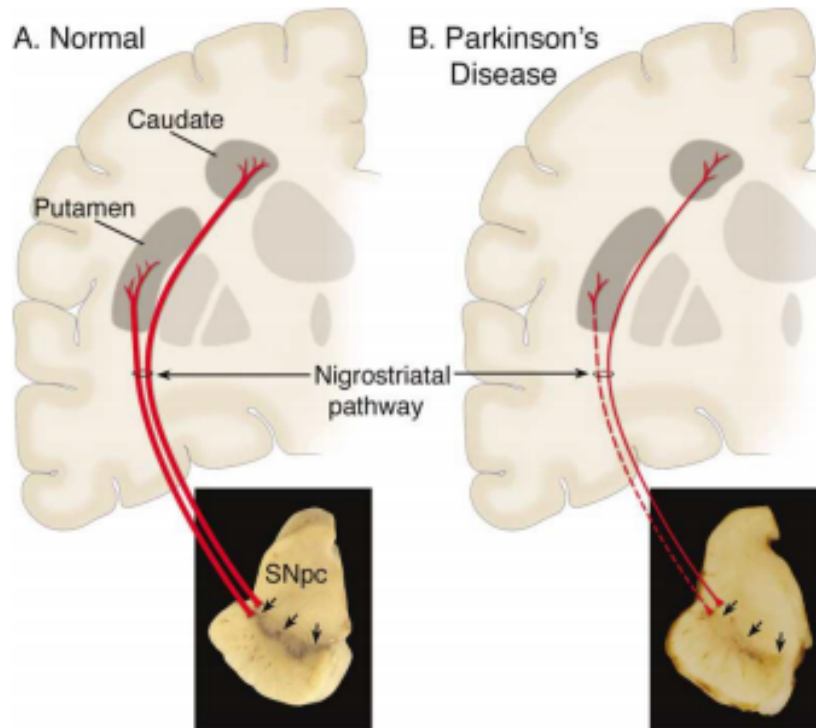
A manutenção da homeostase redox é essencial para a sobrevivência das células nervosas, pois apresentam uma alta requisição do metabolismo energético para manter os gradientes eletroquímicos, a liberação dos neurotransmissores e a

estabilidade da membrana lipídica e isso faz com que elas sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo/nitrosativo. Além disso, os níveis de antioxidantes no cérebro são limitados quando comparado a outros órgãos e devido à alta demanda, são menos capazes de compensar a geração das EROs e ERNs, contribuindo para o estresse oxidativo/nitrosativo (BARBOSA et al., 2008; MAZZETTI et al., 2015).

O desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode afetar o aparecimento e/ou o curso de um grande número de doenças comuns como aterosclerose, diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, artrite reumatoide e doenças neurodegenerativas, incluindo a DP. Essa doença é considerada uma patologia multifatorial e uma série de eventos pode ocorrer simultaneamente após a ação dos EROs/ERNs incluindo disfunção mitocondrial, a acúmulo de mutações no DNA, diminuição do reparo do DNA, alteração da glutatona reduzida (GSH) e do metabolismo da glutatona. A GSH e os sistemas antioxidantes à base de GSH são importantes reguladores de neurodegeneração associada à DP (ADEHIHETTY; BEAL, 2008; SILVA et al., 2013).

A lesão anatômica mais característica da DP é a perda de neurônios dopaminérgicos localizados na parte compacta da substância negra (SNpc), como é possível visualizar na Figura 1. Esta região é particularmente sensível a EROs/ERNs, provavelmente por causa da presença da dopamina endógena, ferro e neuromelanina que estão envolvidos na geração de radicais livres. Além disso, é evidente que, nesta área o sistema de defesa antioxidante e desintoxicante é fraco devido aos baixos níveis de GSH (MAZZETTI et al., 2015).

**Figura 1.** Representação da morte neuronal da DP. A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. B) Representação esquemática da via nigroestriatal de um paciente com DP.



**Fonte:** DAEUR; PRZEDBORSKI, 2003.

#### 1.4 Envolvimento da inflamação na Neurodegeneração

A neuroinflamação é um componente-chave na indução e progressão de processos degenerativos no SNC. Estudos demonstram que a neuroinflamação é um importante mecanismo fisiopatológico das doenças neurodegenerativas no SNC, principalmente através do aumento da expressão de genes relacionados à produção de mediadores inflamatórios e neurotóxicos, que contribuem para a cascata de eventos que levam a lesão e morte celular (FRANK-CANNON et al., 2009; TAYLOR et al., 2013).

Durante a inflamação, ocorre a liberação de mediadores inflamatórios, como: a prostaglandina E2 (PGE2) e citocinas, como a interleucina 1 beta (IL1 $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). A literatura descreve uma regulação positiva do gene da ciclo-oxigenase tipo 2, que possui papel importante na produção de PGE2, um importante mediador inflamatório, e atualmente associado ao desenvolvimento de

doenças neurodegenerativas como as doenças de Alzheimer, Huntington e Parkinson (BARTELS; LEENDERS, 2009).

Diversos estudos têm confirmado a regulação de outros genes pró-inflamatórios responsáveis pela presença de citocinas comumente encontrados em processos inflamatórios, como IL1 $\beta$  e TNF $\alpha$ , ambos atuando como mediadores e quando em excesso, como fatores neurotóxicos associados com o início de processos de degeneração neural (VIVIANI et al., 2015).

Durante a neuroinflamação, as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$ ) induzem ao aumento da expressão e da liberação de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em astrócitos e micróglias, resultando na elevação do óxido nítrico e seus derivados que em excesso induz a citotoxicidade e morte celular por apoptose (SHARMA et al., 2013). Além disso, a expressão da iNOS está sob controle transcricional do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), o qual é inibido por níveis fisiológicos de NO. A inibição da NOS constitutiva dependente de ácido araquidônico nas fases iniciais da resposta inflamatória leva à ativação do NF $\kappa$ B, e assim a expressão de iNOS. Algumas citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 pode modular a expressão de iNOS por meio da supressão da atividade do NF $\kappa$ B (SCHWENKGRUB et al., 2013). Portanto, a análise da correlação entre neuroinflamação e a via do óxido nítrico se torna uma ferramenta importante para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas doenças neurodegenerativas e para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas (SHARMA et al., 2013).

### **1.5 Modelo Experimental de Doença de Parkinson com lipopolissacarídeo (LPS)**

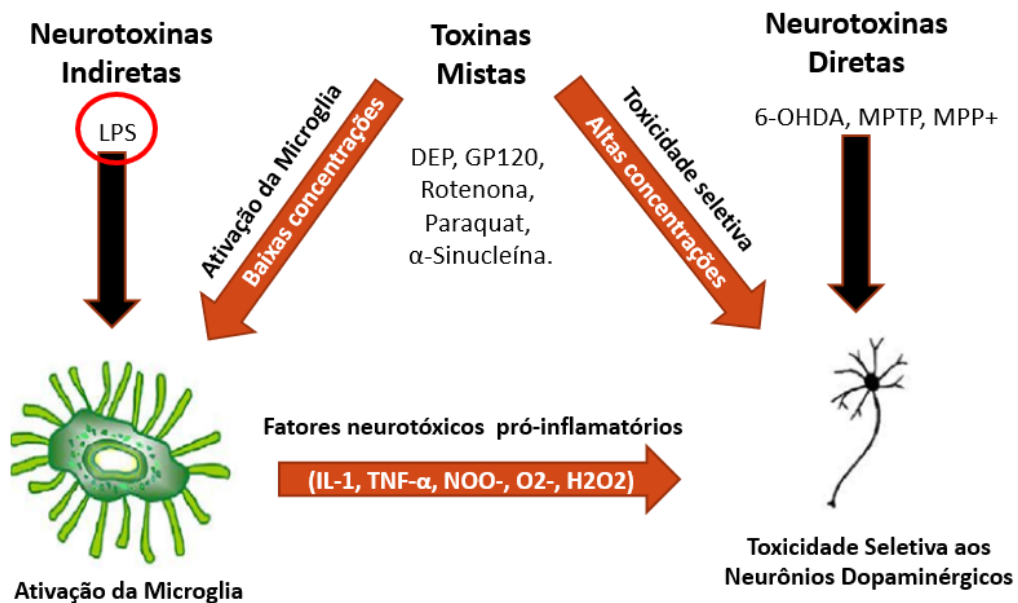
Ao longo dos últimos anos, vários modelos animais de DP têm sido desenvolvidos e têm contribuído extensivamente para a expansão do conhecimento da DP. O uso de drogas como 6-OHDA, rotenona, MPTP e recentemente a endotoxina encontrada na membrana externa de bactérias gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS) tem se mostrado eficaz para modelar diferentes aspectos da DP em roedores (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014; CASTAÑO et al., 2002; IRAVANI et al., 2005; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).

O modelo de DP induzido por LPS pode fornecer uma importante ferramenta para identificar a precisa contribuição de vários fatores pro-inflamatórios e neurotóxicos na neurodegeneração dopaminérgica (SHARMA; NEHRU 2015). A

administração de LPS na *substantia nigra pars compacta* (SNpc) resulta em ativação microglial com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias, principalmente  $TNF\alpha$  e  $IL-1\beta$ , e fatores neurotóxicos, como as espécies reativas do oxigênio e as espécies reativas do nitrogênio. Esse processo, como pode ser visualizado na Figura 2, vai desencadear crescente processo inflamatório e estresse oxidativo nessa área cerebral, ocasionando o dano e/ou morte neuronal (TANAKA et al., 2006).

A geração do estresse oxidativo deflagrada pelo LPS está relacionada com a NADPH oxidase, uma enzima ligada à membrana celular cuja expressão está aumentada em pacientes com doença de Parkinson. O estresse oxidativo gerado é extremamente deletério para os neurônios, resultando em um ciclo de auto-perpetuação de ativação microglial levando a neuroinflamação e geração de radicais livres e consequente neurotoxicidade, como é possível observar na Figura 3 (HU et al., 2010; CHUNG et al., 2012).

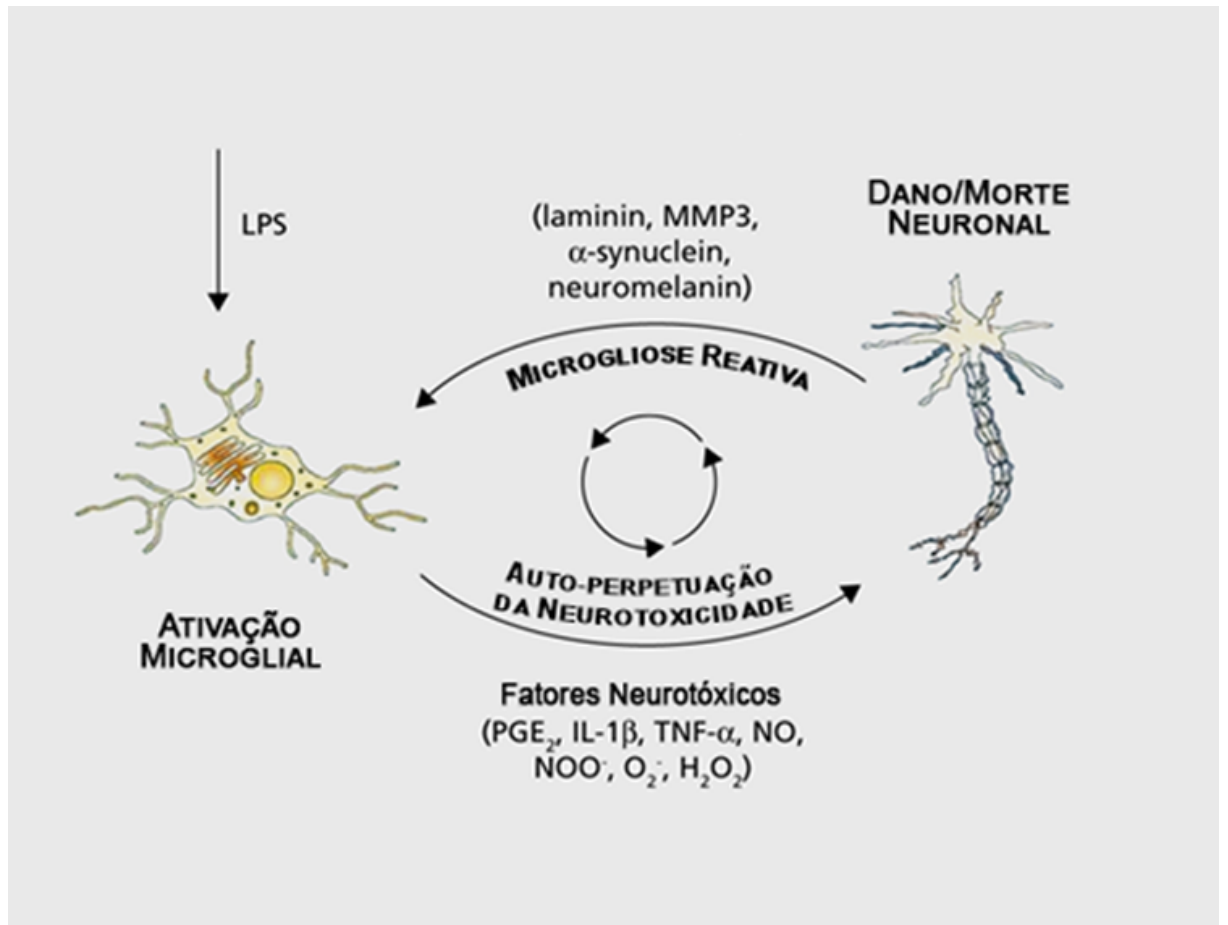
**Figura 2.** Mecanismos da neurotoxicidade seletiva aos neurônios dopaminérgicos.



**Fonte:** Adaptado de SUNDARAM et al., 2012.



**Figura 3.** Representação esquemática do dano ao neurônio dopaminérgico através da administração de LPS.



**Fonte:** Adaptado de SUNDARAM et al., 2012.

Moléculas como a MMP-3, a sinucleína e a neuromelanina, liberadas após o dano/morte de neurônios dopaminérgicos, formam ciclos viciosos auto-perpetuantes da degeneração neuronal, aumentando a ativação da microglia e, eventualmente, levando à neuroinflamação crônica. (KIM; JOH, 2006)

A literatura tem demonstrado através de estudos clínicos e com animais que compostos com atividade anti-inflamatória (DAINES, inibidores da COX-2, inibidores da iNOS) e antioxidante têm mostrado capacidade de proteger contra a morte de neurônios dopaminérgicos em vários modelos da doença de Parkinson, inclusive o modelo com LPS (HINES et al., 2013). Portanto compostos com atividade antioxidante e anti-inflamatória poderiam ser testados quanto a sua capacidade neuroprotetora no modelo de LPS.

## 1.6 Atividade neuroprotetora dos Flavonóides

Vários estudos demonstram atividades neuroprotetoras dos flavonóides, principalmente devido à sua capacidade antioxidante, incluindo sua ação de remoção direta de radicais livres e suas propriedades quelante de metais, porém, alguns estudos também tem demonstrado a atividade pró-oxidante dos flavonóides, principalmente em altas doses. A silimarina, um flavonóide polifenólico derivado das sementes e frutos de *Silybum marianum*, melhorou os efeitos motores induzidos pela 6-OHDA em ratos, diminuiu o nível da citocina pró-inflamatória IL1-beta e a peroxidação lipídica (HADDADI et al., 2014).

Outro estudo realizado com MPP+ como neurotoxina, a silimarina atenuou o nível de moléculas inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , iNOS e TNF- $\alpha$  (JUNG et al., 2014). A silimarina também diminuiu o número de células apoptóticas e protegeu os neurônios dopaminérgicos da neurotoxina MPTP (PEREZ-H et al., 2014).

Naringenina é um glicosídeo encontrando em laranjas e frutas cítricas (JAGETIA; REDDY, 2002). Os efeitos biológicos e farmacológicos da naringina incluem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e hipolipemiantes (CHANET et al., 2012). Além disso, Sachdeva et al. (2014) demonstraram que o tratamento crônico com naringenina restaurou de forma dependente da dose os déficits cognitivos no modelo animal de Doença de Alzheimer (induzido por estreptozotocina) com a mitigação do estresse oxidativo/nitrosativo mediada por disfunção mitocondrial e liberação de citocinas.

A quercetina é um flavonóide que apresenta atividade protetora contra o dano oxidativo, atenuando a toxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio nas culturas de células gliais obtidas do cérebro de ratos (KABADERE et al., 2011). Além disso, estudos relatam que a quercetina tem potencial antioxidante contra produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e protege contra a peroxidação lipídica, inibindo a neurotoxicidade induzida pela oxaliplatina (AZEVEDO et al., 2013).

A quercetina tem a capacidade de estimular a regulação mitocondrial da atividade do complexo I em neurônios dopaminérgicos lesionados e de eliminar o radical OH $\cdot$  gerado no modelo de ratos lesionados com rotenona (KARUPPAGOUNDER et al., 2013).

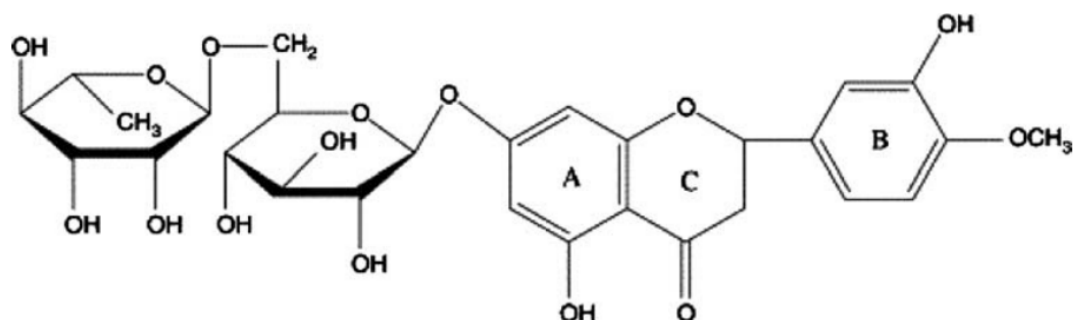
## 1.7 Hesperidina e bases para a sua atividade neuroprotetora

Entre os compostos naturais com possível atividade neuroprotetora, destaca-se um bioflavonóide, a hesperidina, um glicosídeo encontrado em frutas cítricas como limões e laranjas. A hesperidina apresenta atividade antioxidante, antiinflamatória, analgésica, hipolipêmica, antihipertensiva e diurética (JAVED et al., 2015). Segundo Tripoli e colaboradores (2007) a hesperidina pode contribuir para melhorar o sistema de defesa antioxidante intracelular, agindo como um potente agente contra o ânion superóxido, oxigênio *singlet* ( $^1\text{O}_2$ ) e radicais hidroxilas. Além disso, esse composto apresenta importantes propriedades neuroprotetoras relacionadas a diversos danos neuronais como a isquemia, lesões induzidas pelo estresse oxidativo e neurotoxicidade induzida por dopamina (JAVED et al., 2015).

A hesperidina (3,5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglicosida) (HSP), conforme demonstrado, é um bioflavonoide farmacologicamente ativo encontrado em frutas cítricas (GARG et al., 2001; PARHIZ et al., 2015), especialmente as frutas de uva, a casca de laranja amarga e laranja doce, com boa eliminação de radicais livres (CROZIER et al., 2009). A HSP é um subproduto abundante de citrinos e isolada da laranja originária *Citrus aurantium* e de outras espécies do gênero *Citrus* (KAKADIYA et al., 2010). Os tipos mais comuns de flavonoides encontrados nos citrinos são hesperidina, naringenina, narirutina, eriocitrina e tangeritina (SUN et al., 2013).

A fórmula molecular de hesperidina é  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$ , o seu peso molecular é 610,57 Da e sua estrutura pode ser observada na Figura 4. (KALPANA et al., 2009). Vários estudos mostraram que a HSP neutralizou as espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo ânions superóxido, radicais hidroxila, peroxinitrito e radicais de óxido nítrico (GARG et al., 2001, WILMSEN et al., 2005). A atividade antioxidante e as propriedades de eliminação de radicais da HSP, além do seu efeito inibitório sobre a reação de Fenton derivada de superóxido e, mais importante, a sua capacidade de penetrar na barreira hematoencefálica (SAID et al., 2012), fazem da hesperidina um fármaco de grande interesse científico.

**Figura 4.** Estrutura química da hesperidina.



**Fonte:** Adaptado de KALPANA et al., 2009.

O potencial antioxidante da hesperidina depende do número e da disposição dos grupos hidroxilas e a extensão da estrutura de conjugação (ROBAK et al., 1988). Eles podem doar o átomo de hidrogênio de seus grupos hidroxila e estabilizar o radical fenoxi formado pela deslocalização do elétron desemparelhado dentro da estrutura aromática. Os compostos aromáticos que contêm grupos hidroxila, especialmente os que têm um grupo O-di-hidroxi no anel B, são importantes agentes sequestrantes de radicais livres (FAUCONNEAU et al., 1997; KALPANA et al., 2009).

Recentemente têm sido atribuídas a hesperidina diversas propriedades importantes, como ação anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antiviral e anticâncer. Além disso, também foi verificado que a hesperidina contribui significativamente para o sistema de defesa antioxidante intracelular, consistindo de um poderoso agente contra radicais superóxido e hidroxila (NONES et al., 2011).

Os efeitos da hesperidina sobre o sistema nervoso central têm sido um tema de pesquisa durante a última década, visto que não havia estudos anteriores nesse sentido. Foi verificado que no sistema nervoso central a hesperidina apresenta ações sedativas e indutoras do sono (MARDER et al., 2003; LI et al., 2013). Além disso, esse composto apresenta importantes propriedades neuroprotetoras relacionadas a diversos mecanismos lesivos como a isquemia, dano oxidativo, neurotoxicidade induzida por dopamina e anti-amiloidogênica (BASTIANETTO et al., 2006; RAINEY-SMITH et al., 2008; VAUZOUR et al., 2008; ROOHBAKHSH et al., 2014).

Tamilselvam e colaboradores (2013) verificaram efeito neuroprotetor da hesperidina contra rotenona, um pesticida amplamente utilizado que inibe o complexo mitocondrial I, utilizado para investigar a fisiopatologia da DP tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudos têm mostrado que a neurotoxicidade de rotenona pode estar relacionada com a sua capacidade para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a apoptose dos neurônios dopaminérgicos. A atividade da hesperidina foi atribuída à sua atividade antioxidante, a manutenção da função mitocondrial, e propriedades anti-apoptóticas em uma linhagem de células de neuroblastoma.

Muitos esforços têm sido empreendidos no sentido de elucidar os mecanismos de ação da hesperidina. Elavarasan e col. (2012) verificaram que a atividade antioxidante da hesperidina não está limitada apenas a sua capacidade de sequestrar radicais livres, mas também de aumentar as defesas celulares antioxidantes através do sistema de sinalização da via ERK/Nrf2. Estudos recentes mostraram que os flavonoides, incluindo a hesperidina são capazes de melhorar o aprendizado e a memória através de vários mecanismos, como a elevação dos níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e reverter o déficit de memória na isquemia/reperfusão cerebral global (GAUR; KUMAR, 2010; DONATO et al., 2014).

Os estudos que mostram efeitos neuroprotetores da hesperidina em modelos de isquemia, doença de Alzheimer e depressão relatam que esses efeitos estão em grande parte relacionados com as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. No entanto, outros efeitos biológicos também podem estar envolvidos como a modulação da expressão gênica de proteínas importantes no processo neurodegenerativo, redução da atividade da caspase-3, a regulação do íon cálcio, a regulação do metabolismo energético neuronal e a reversão da disfunção mitocondrial (ROOHBAKSH et al., 2014).

Portanto, todos estes fatores conduziram esta pesquisa a analisar se a hesperidina de fato apresenta efeito tipo neuroprotetor, em tratamento por via intraperitoneal, em um modelo animal de DP induzido pelo LPS. Assim, se tal efeito farmacológico for confirmado, esta pesquisa representará uma valiosa contribuição para a comunidade científica, uma vez que fornecerá evidências para um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da DP e acerca das possíveis atividades terapêuticas da substância em questão, além de também contribuir para a população, já que haverá comprovação do efeito da hesperidina em estudo pré-

clínico, fato que pode vir a estimular a realização de ensaios clínicos com emprego dessa substância e futuramente, gerar uma nova opção terapêutica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito neuroprotetor da hesperidina através de análises comportamentais e neuroquímicas no modelo de doença de Parkinson induzida por LPS em ratos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da hesperidina nas alterações comportamentais e locomotoras através dos testes de campo aberto, *rotarod* e teste do cilindro no modelo de DP induzido por LPS em ratos;
- Analisar o efeito da hesperidina no estresse oxidativo/nitrosativo (TBARS e nitrito/nitrato) e nas alterações da atividade enzimática dos sistemas antioxidantes (GSH) em córtex pré-frontal, vermis cerebelares, corpo estriado e hipocampo de ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson induzido por LPS.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados 60 ratos Wistar, machos, com peso variando entre 250-300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará - UFC. Os animais foram mantidos em caixas grandes de armazenamento padrão para ratos, de prolipropileno e com armazenamento máximo de 6 animais por caixa. Os mesmos acondicionados à temperatura média de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água á vontade.

#### **3.2 Aspectos éticos**

O protocolo experimental foi elaborado de acordo com o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC *Campus Sobral* com número de protocolo 07/17 (Anexo A).

#### **3.3 Treinamento**

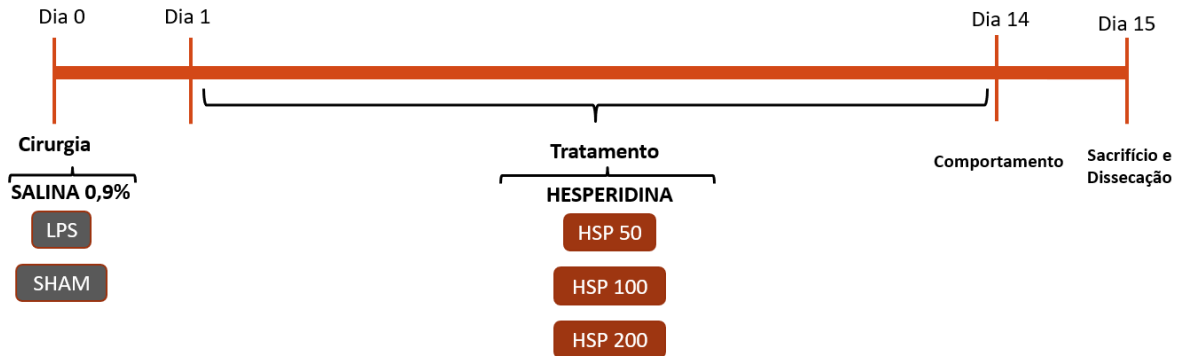
Antes de realizar o protocolo experimental, foi realizado um treinamento utilizando ratos Wistar fêmeas ( $n = 15$ ). O treinamento visa a otimização dos procedimentos praticados no Protocolo Experimental. No grupo para treinamento, os animais foram submetidos a uma lesão intranigral por azul de metileno e foi administrado durante 14 dias com solução salina 0,9%.

#### **3.4 Tratamento**

Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos (6 animais por grupo) e tratados com hesperidina (50, 100 e 200 mg/kg, i.p.) ou Salina (0,9%, 0,3 mL via i.p.; grupos Sham e LPS), durante um período de 14 dias. No 14º dia, 1h após o tratamento, os animais foram submetidos a ensaios comportamentais e um dia depois eutanasiados e seus cérebros dissecados para as determinações neuroquímicas, conforme é possível observar na Figura 5.



**Figura 5.** Representação esquemática temporal do procedimento de indução do parkinsonismo até o sacrifício dos animais.

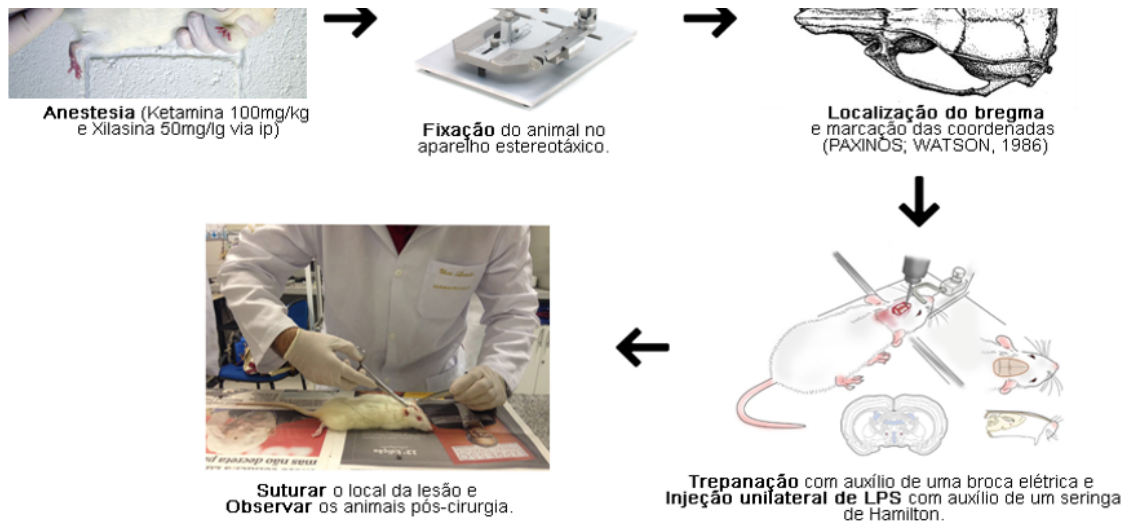


**Fonte:** Próprio autor.

### 3.5 Protocolo Experimental

Para a avaliação dos potenciais efeitos neuroprotetores da hesperidina, os animais foram submetidos a lesão intranigral unilateral com LPS, como é possível observar no esquema ilustrado na Figura 6. Para a cirurgia, os animais foram previamente anestesiados através da administração de ketamina (100 mg/kg, i.p.) e xilasina (50 mg/kg, i.p.) e, logo em seguida, submetidos à injeção intranigral de LPS (2 µg/animal), para indução da lesão de neurônios dopaminérgicos com auxílio de coordenadas estereotáticas (AP, -5,3; LL, -2,0 a partir do bregma, DV, -7,2 abaixo da dura), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 1986), usando uma seringa Hamilton de 5 µL. A seringa foi mantida no local de aplicação por 3 minutos para assegurar que o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente e depois a mesma foi retirada cuidadosamente (FU et al., 2015). Os controles (grupos sham e LPS) receberam 0,3 mL de solução salina (0,9%) nas mesmas condições. Os animais foram tratados 24 horas após o procedimento cirúrgico, diariamente até completar um período de 14 dias.

**Figura 6.** Esquema com os procedimentos cirúrgicos realizados com os animais.



**Fonte:** Próprio autor.

### 3.6 Dissecação das Áreas Cerebrais

Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram devidamente eutanasiados por decaptação e, logo em seguida, os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo. Em seguida, o corpo estriado esquerdo e direito (caudado, putâmen e globo pálido), o córtex pré-frontal, o hipocampo e os vermes cerebelares, foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação após o rebatimento lateral do córtex. Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio, sob gelo, pesada e armazenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para uso posterior.

### 3.7 Testes comportamentais

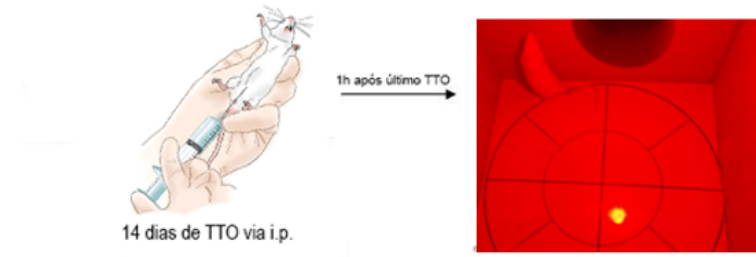
#### 3.7.1 Teste do Campo Aberto

Este teste, é baseado na metodologia descrita por Sielgel (1946) e validada por Archer (1973), foi utilizado para analisar a atividade exploratória do animal. Os seguintes parâmetros foram avaliados: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de levantamentos sob as patas traseiras (*rearing*) e número de comportamentos de auto-limpeza (*grooming*), adicionalmente o

tempo que os animais permaneceram parados, conforme ilustrado na Figura 7 (HSIAO et al., 2012). Os animais foram observados por um período de 5 minutos.

**Figura 7.** Teste de Campo aberto para ratos.

## Campo Aberto



### Parâmetros avaliados:

*Número de cruzamentos*

*Rearing*

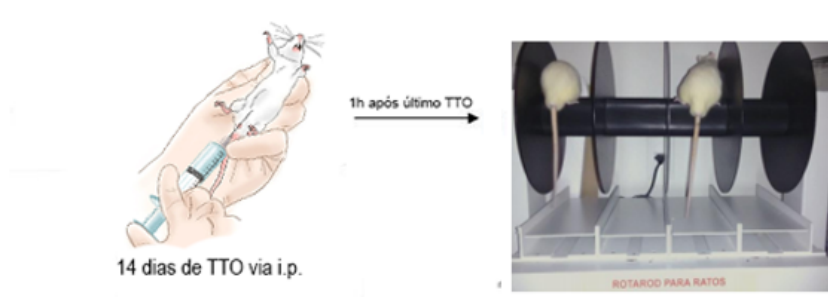
*Grooming*

**Fonte:** Próprio autor.

### 3.7.2 Teste do Rota Rod

Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm, por um período de 5 minutos. Os seguintes parâmetros foram registrados: tempo de latência (segundos) e tempo de permanência na barra giratória (segundos), conforme ilustrado na Figura 8 (DUNHAM; MIYA, 1957). Os animais foram adaptados ao equipamento antes da avaliação. A adaptação foi realizada no 11º dia (5-15 RPM, durante 5 minutos) e no 13º dia (5-15 RPM, durante 5 minutos) após a cirurgia.

**Figura 8.** Teste de *Rota rod* para ratos.



### **Parâmetros avaliados:**

*Tempo de latência*

*Tempo de permanência*

*Número de quedas*

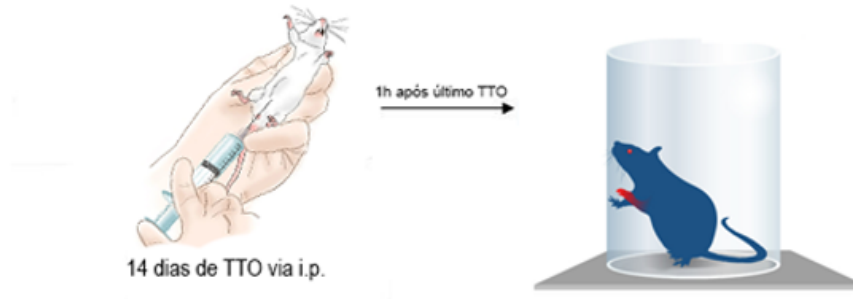
**Fonte:** Próprio autor.

#### **3.7.3 Teste do cilindro**

O teste do cilindro avaliou o grau de assimetria das patas dianteiras. Os ratos foram colocados num cilindro transparente (diâmetro: 20 cm, altura: 30 cm) e durante 5 minutos foram contados o número de contatos das patas dianteiras com a parede do cilindro, conforme ilustrado na Figura 9 (SCHALLERT et al., 2000). O resultado do teste do cilindro neste estudo foi representada de maneira percentual, em relação ao número total de toques das patas no cilindro.

Figura 9. Teste do Cilindro para ratos.

## Teste do Cilindro



### Parâmetros avaliados:

Número de contatos das patas dianteiras com a parede do cilindro.

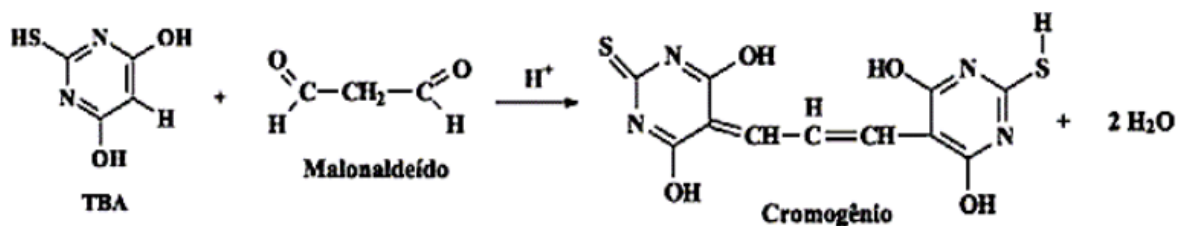
Fonte: Próprio autor.

## 3.8 Análises Neuroquímicas

### 3.8.1 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

Teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído (MDA) (Figura 10).

Figura 10. Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos (Fonte: Google Imagens, 2019).



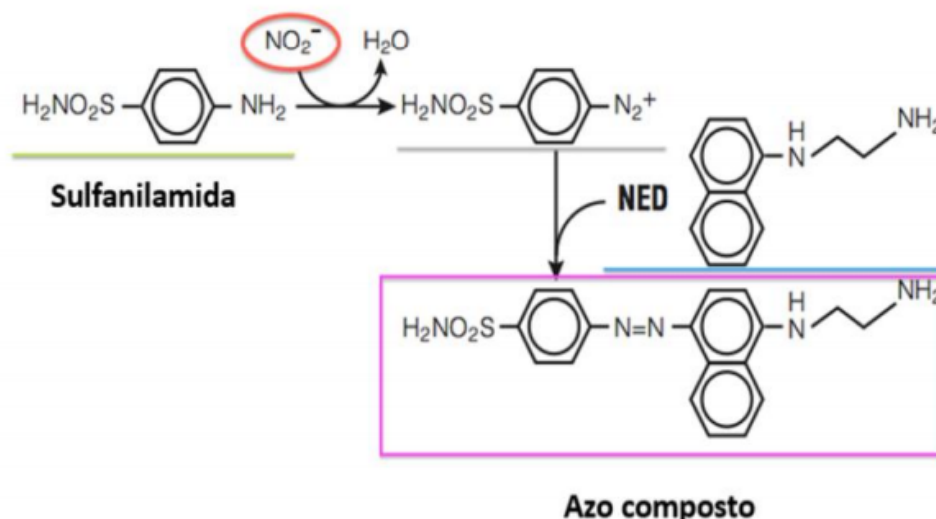
Fonte: Google Imagens, 2019.

O grau de lipoperoxidação em corpo estriado de ratos foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método descrito por Draper e Hadley (1990). Os homogenatos das áreas cerebrais foram preparados a 10% em tampão fosfato. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado colocado em banho maria por 1 hora a 37°C, em seguida precipitado com 0,4 mL de ácido perclórico a 37% e centrifugado (14000 G/15 min/4°C), o sobrenadante é transferido e adicionado 0,2 mL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100 °C) por 30 min. O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados estão expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por grama de tecido, tendo por base uma curva padrão.

### 3.8.2 Determinação da Concentração de Nitrito

Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Esse composto, em seguida, reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorvância em 540 nm (Figura 11).

**Figura 11.** Ilustração da Reação de Griess.



**Fonte:** Google Imagens, 2019.

Para a determinação da produção de nitrito, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesadas 6,9 mg de  $\text{NaNO}_2$  e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10 mM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 mM, 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ , 0,625  $\mu\text{M}$ , 0,312  $\mu\text{M}$ . Uma equação da reta foi construída para cálculo das concentrações do teste (GREEN; TANNEMBAUN; GOLDMAN, 1981). Para a determinação da concentração de nitrito em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% em tampão fosfato. Após a centrifugação (11000 x G, 15 min) os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi incubada com 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 %/*N*-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/ $\text{H}_3\text{PO}_4$  1 % / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A concentração de nitrito esta expressa em  $\mu\text{M}$  de nitrito/g de tecido, conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1968).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação dos testes comportamentais

#### 4.1.1 Teste de Campo Aberto

No teste de campo aberto foi observado o número de linhas cruzadas com as patas traseiras, o número de *rearings* que significa o ato de levantar, ou seja, apoio apenas pelas patas traseiras de cada animal; o número de *groomings*; e o tempo de imobilidade. As análises desses parâmetros ocorreram durante os cinco minutos de teste.

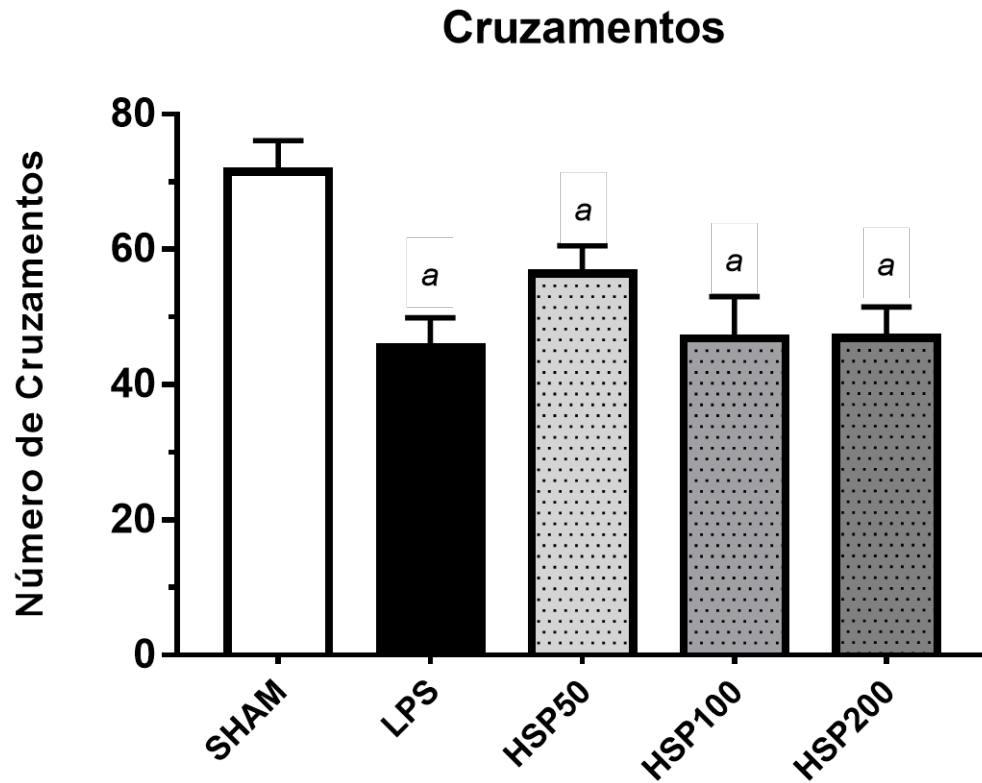
Como é possível observar na Figura 12, os animais lesionados com LPS apresentaram diminuição da atividade locomotora horizontal em 36% ( $45,5 \pm 4,3$  cruzamentos) em relação ao grupo Sham ( $71,5 \pm 4,6$  cruzamentos). Em relação ao número de linhas cruzadas, foi verificado que os animais do grupo HSP50 ( $56,4 \pm 4,1$  cruzamentos;  $p \leq 0,05$ ) e os animais dos grupos HSP100 e HSP200 (HSP100:  $46,8 \pm 6,2$  cruzamentos; HSP200:  $46,8 \pm 4,5$  cruzamentos;  $p \leq 0,01$ ) tiveram menor número de linhas cruzadas quando comparadas ao grupo Sham. Os resultados dos grupos tratados com hesperidina, em todas as concentrações não diferiram significativamente do grupo LPS.

Os animais tratados com hesperidina nas concentrações 100 mg/kg e 200 mg/kg apresentaram uma elevação no número de *groomings*, como é possível observar na Figura 13. O grupo HSP200 ( $10,8 \pm 1,1$ ) teve um aumento de 74,1% em relação ao grupo Sham ( $6,2 \pm 1,4$  *rearings*), um aumento de mais de 270% em relação ao grupo LPS ( $2,9 \pm 0,7$  *rearings*) e de 151,1% em relação ao grupo HSP50 ( $4,3 \pm 1,3$  *rearings*). O grupo HSP100 ( $9,8 \pm 1$  *rearings*) apresentou um aumento de 237,9% em relação ao grupo LPS ( $2,9 \pm 0,7$  *rearings*) e de 127,9% em relação ao grupo HSP50.

Em relação a atividade exploratória vertical (número de *rearings*) e o tempo de imobilidade dos animais, não foram identificadas alterações significantes entre os grupos (Figura 14 e Figura 15).



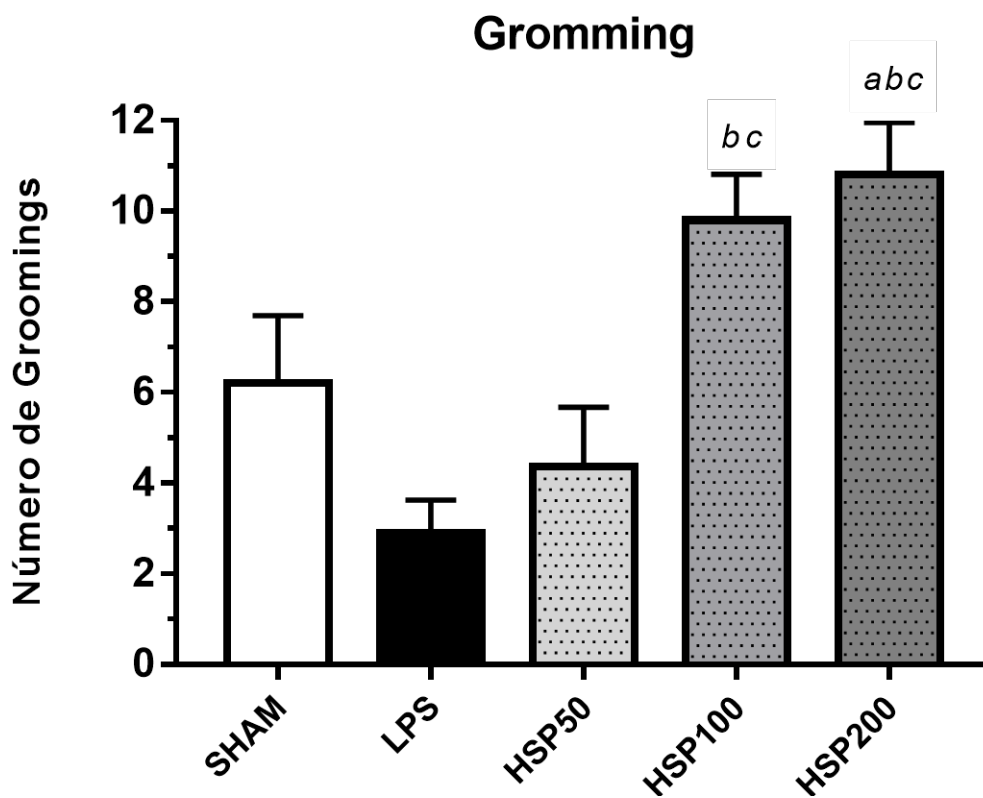
Figura 12. Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (Cruzamentos).



**Legenda:** Os ratos (n=06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg) ou Salina (0,9%) durante 14 dias. No 15º dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em campo aberto. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM. Considerou-se estatisticamente signicante  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

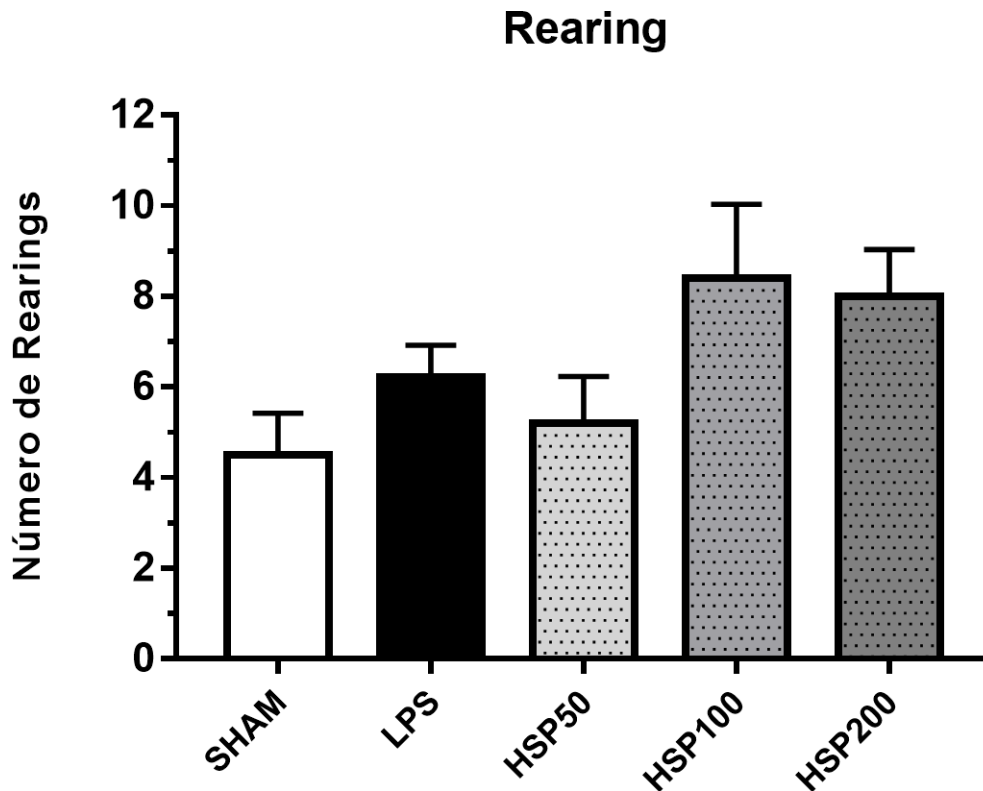
Figura 13. Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (*Groomings*).



**Legenda:** Os ratos (n=06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias. No 15º dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em campo aberto. Os dados estão expressos em médias ± EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-); c vs HSP50. Considerou-se estatisticamente signicante  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

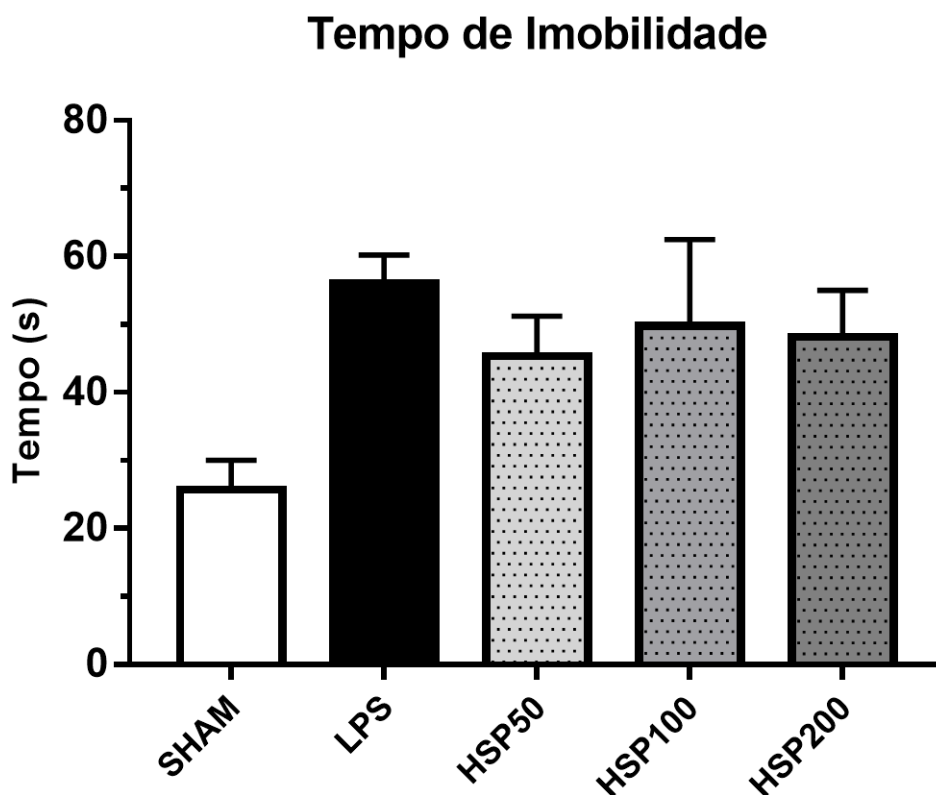
Figura 14. Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (*Rearings*).



**Legenda:** Os ratos (n=06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias. No 15° dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em campo aberto. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-); c vs HSP50. Considerou-se estatisticamente signicante  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 15.** Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (Tempo de Imobilidade).



**Legenda:** Os ratos (n=06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias. No 15º dia, após 1h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em campo aberto. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls.

**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.1.2 Teste *Rotarod*

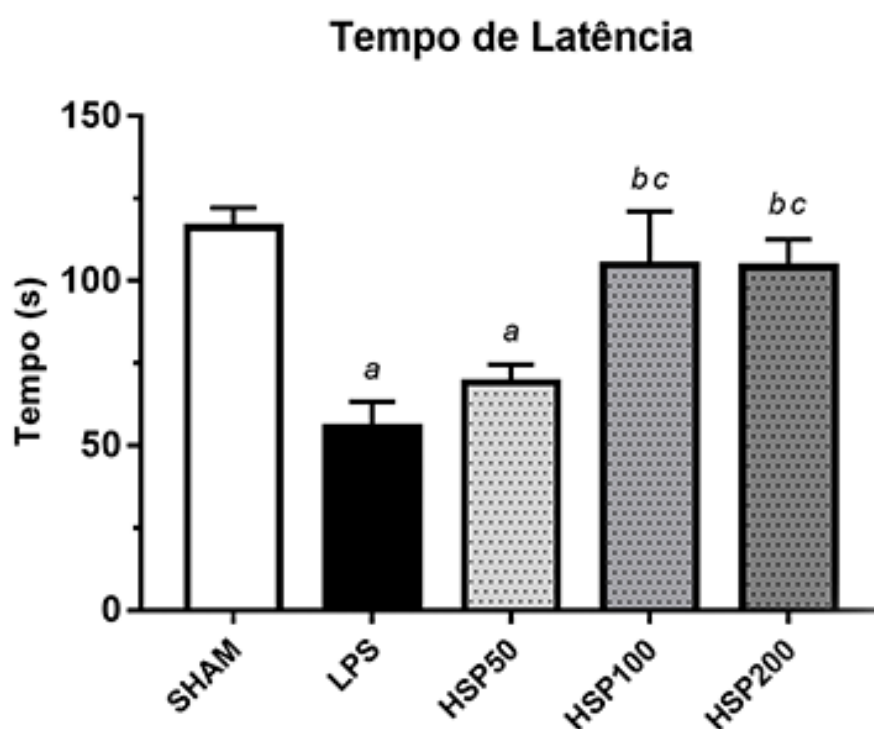
Para maior análise da ação do hesperidina na atividade locomotora de ratos submetidos a lesão nigroestriatal de LPS, os animais também foram submetidos à um teste mais refinado do que o teste de campo aberto, o teste do *rotarod*. Os resultados nesse teste demonstraram diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ) entre o grupo LPS e o grupo SHAM no tempo de latência (SHAM:  $116,2 \pm 6$  s; LPS:  $55,3 \pm 7,9$  s) e no tempo de permanência (SHAM:  $174,4 \pm 9,3$  s; LPS:  $107 \pm 10,2$  s)

Os resultados no teste do *rotarod*, observados na Figura 16, mostraram que o grupo HSP200 (latência:  $104,2 \pm 8,4$  s) elevou em mais de 89% o tempo de latência no equipamento em comparação com o grupo LPS (latência:  $55,38 \pm 7,9$  s). Além

disso, os animais tratados com HSP200 permaneceram mais no equipamento (permanência:  $150,4 \pm 11,5$  s), quando comparado com o grupo LPS (permanência:  $107 \pm 10,2$  s).

A dose testada de HSP100 (latência:  $104,8 \pm 16,2$  s) também aumentou significamente o tempo de latência dos animais, em relação ao grupo LPS (latência:  $55,3 \pm 7,9$  s), porém, não apresentou diferença significativa no tempo de permanência. Apesar disso, todas as outras doses conseguiram reduzir o número de tempo total dos animais no aparelho (permanência: HSP50:  $119,7 \pm 11,2$  s; HSP100:  $139,5 \pm 4,6$  s) em relação ao grupo LPS ( $107 \pm 10,2$  s) (Figura 17).

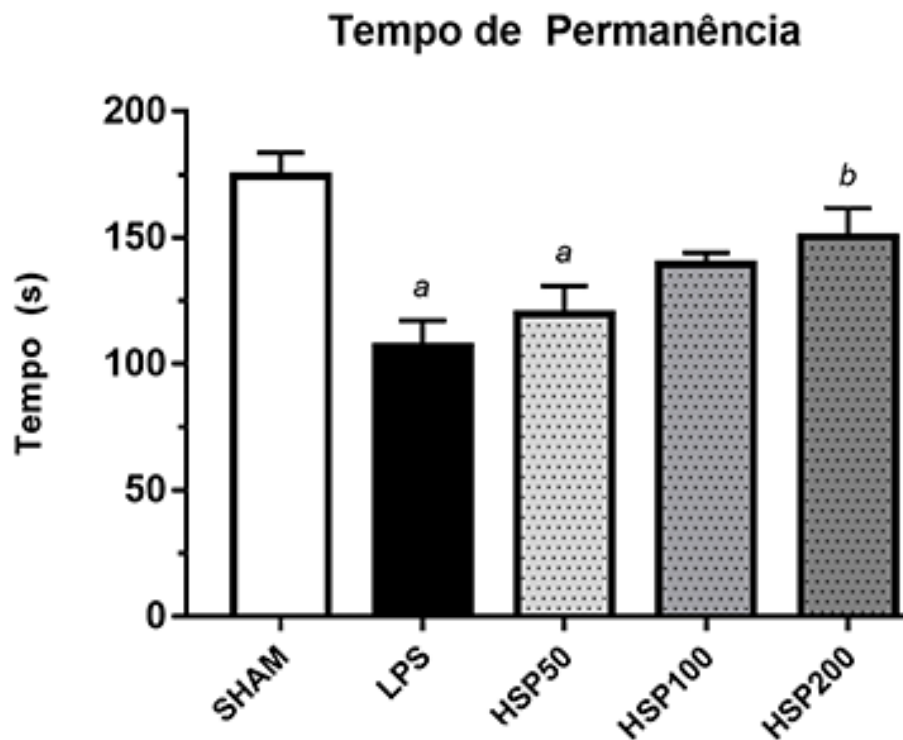
**Figura 16.** Análise da atividade motora no Teste do *Rotarod* (Tempo de Latência).



**Legenda:** Os ratos (n=06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 15º dia, após 1h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste do Rotarod, sendo avaliado o Tempo de Latência. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-); c vs HSP50. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 17.** Análise da atividade motora no Teste do *Rotarod* (Tempo de Permanência).



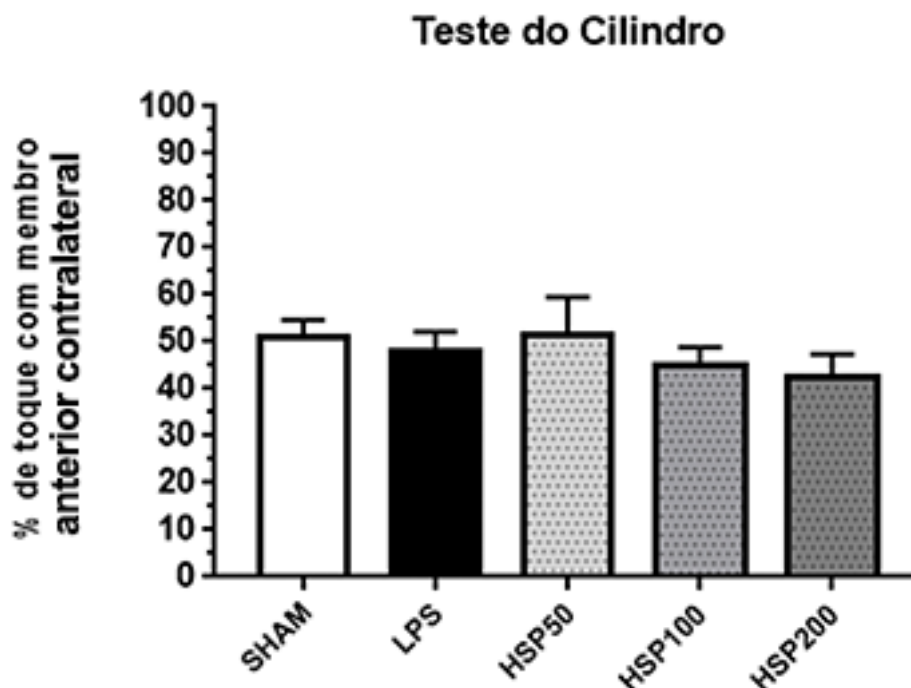
**Legenda:** Os ratos (n=06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 15º dia, após 1h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste do Rotarod, sendo avaliado o **Tempo de Permanência**. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-); c vs HSP50. Considerou-se estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.1.3 Teste do Cilindro

O teste do cilindro foi realizado no 15º dia pós-cirurgia e não foi encontrado alterações significativas entre os grupos, em relação a utilização das patas anteriores ipsilateral ao local da lesão por LPS, como é possível observar na Figura 18.

**Figura 18. Teste do Cilindro.** Avaliação da assimetria por 5 minutos do membro anterior contralateral de ratos lesionados com LPS e tratados com hesperidina após 14 dias de tratamento (Fonte: Autor).



## 4.2 Avaliação das Dosagens Neuroquímicas

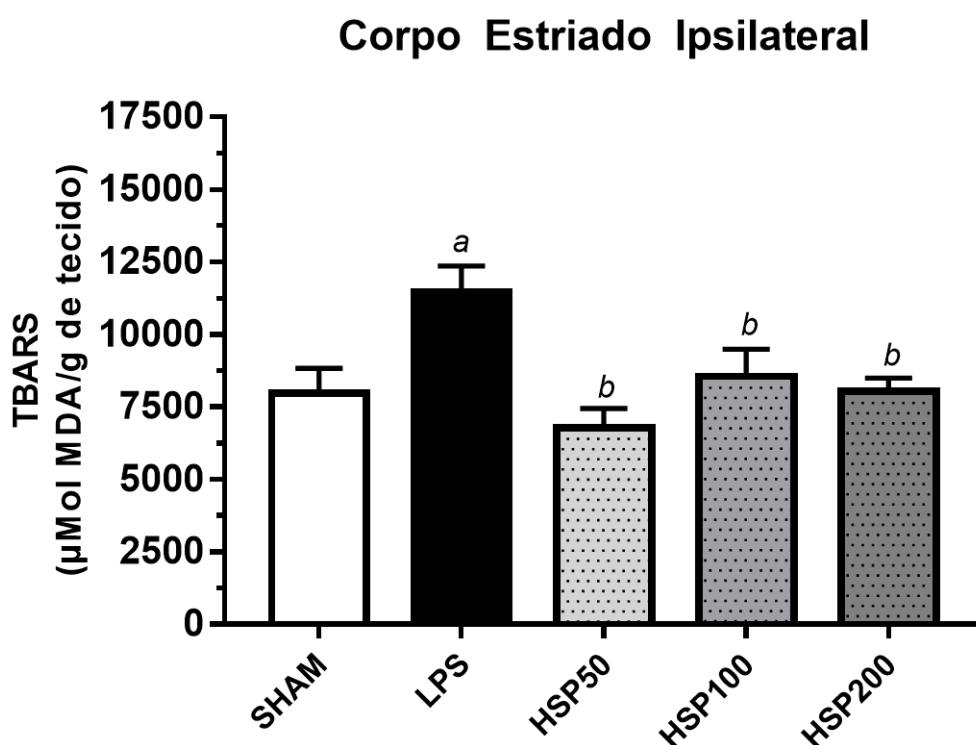
### 4.2.1 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

Para determinar uma possível ação antioxidante da hesperidina em modelo animal de DP induzido pelo LPS, utilizou-se o teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. O teste detectou elevação dos níveis de malondialdeído, um dos principais produtos da peroxidação lipídica, em todas as áreas analisadas de animais lesionados com LPS em relação ao grupo SHAM, porém, houve aumento significativo ( $p > 0,05$ ) apenas no hipocampo (Figura 22) e no corpo estriado direito (Figura 19).

As doses de hesperidina avaliadas no respectivo teste conseguiu reverter significativamente os níveis de peroxidação lipídica induzidos pelo LPS no corpo estriado direito. Os animais tratados com hesperidina 50 mg/kg também tiveram uma redução significativa dos níveis de MDA em relação ao grupo LPS de 34% córtex pré-frontal e de 39% no corpo estriado ipsilateral (Figura 19 e Figura 21).

Os animais do grupo HSP100 tiveram uma redução de 25% dos níveis de MDA em relação ao grupo LPS, e os animais do grupo HSP200 tiveram uma redução de 30% dos níveis de MDA, no corpo estriado ipsilateral (Figura 19) e no córtex pré-frontal (Figura 21).

**Figura 19.** Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Corpo Estriado Ipsilateral.

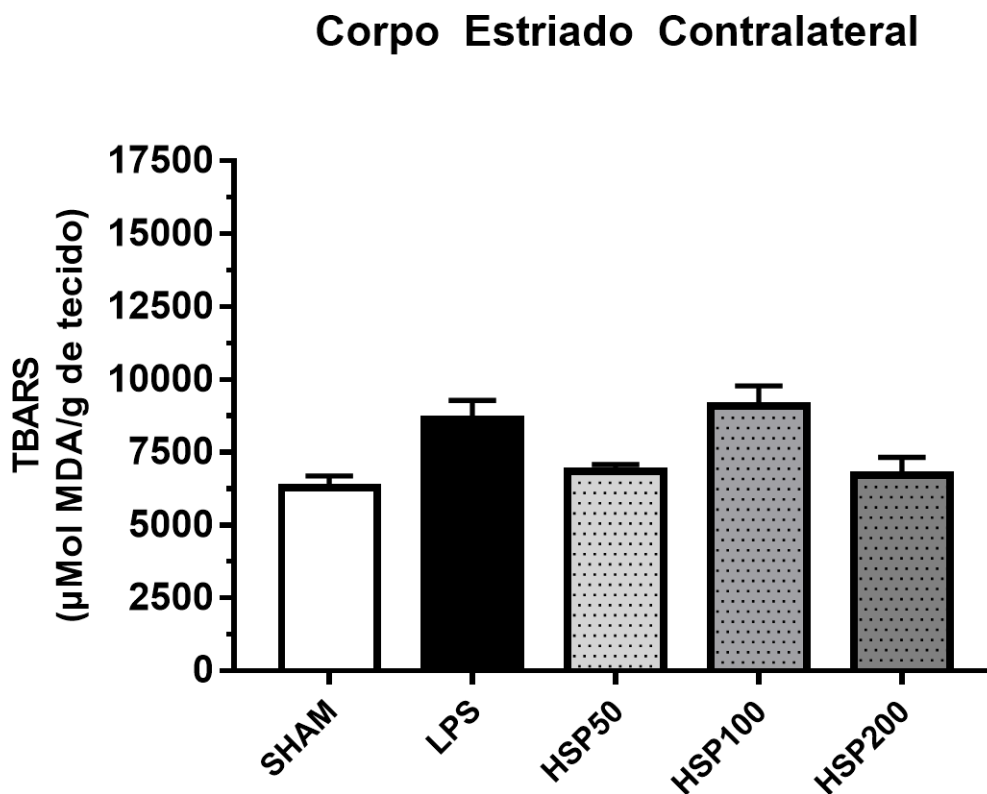


**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50;100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de TBARS. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-). Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.



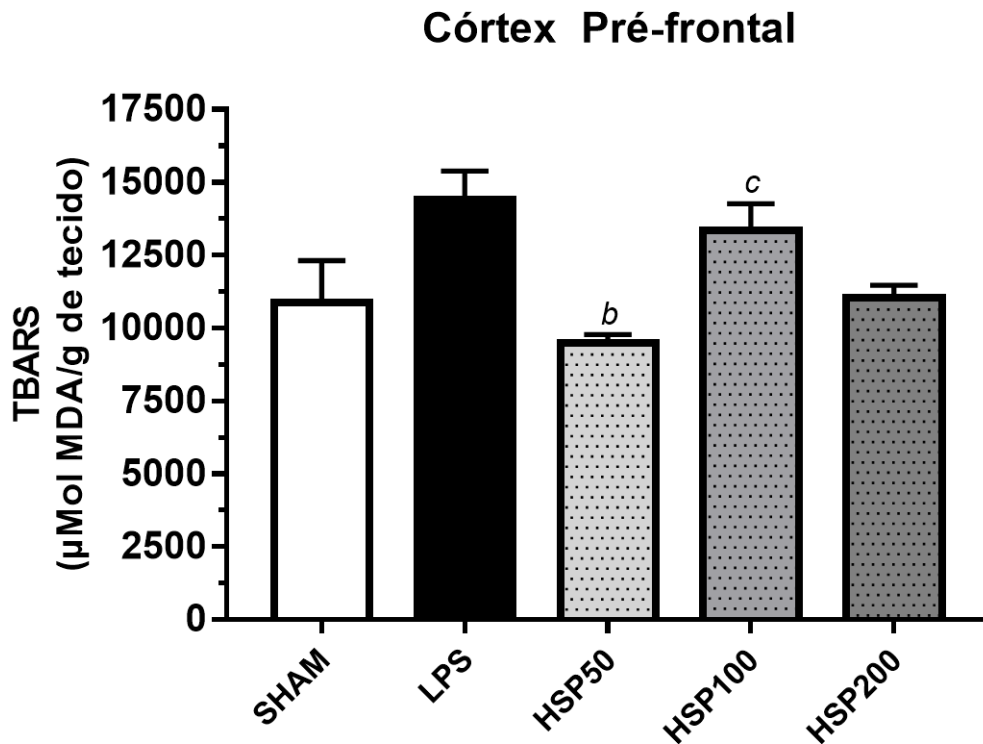
**Figura 20.** Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Corpo Estriado Contralateral.



**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50;100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de TBARS. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls.

**Fonte:** Próprio autor.

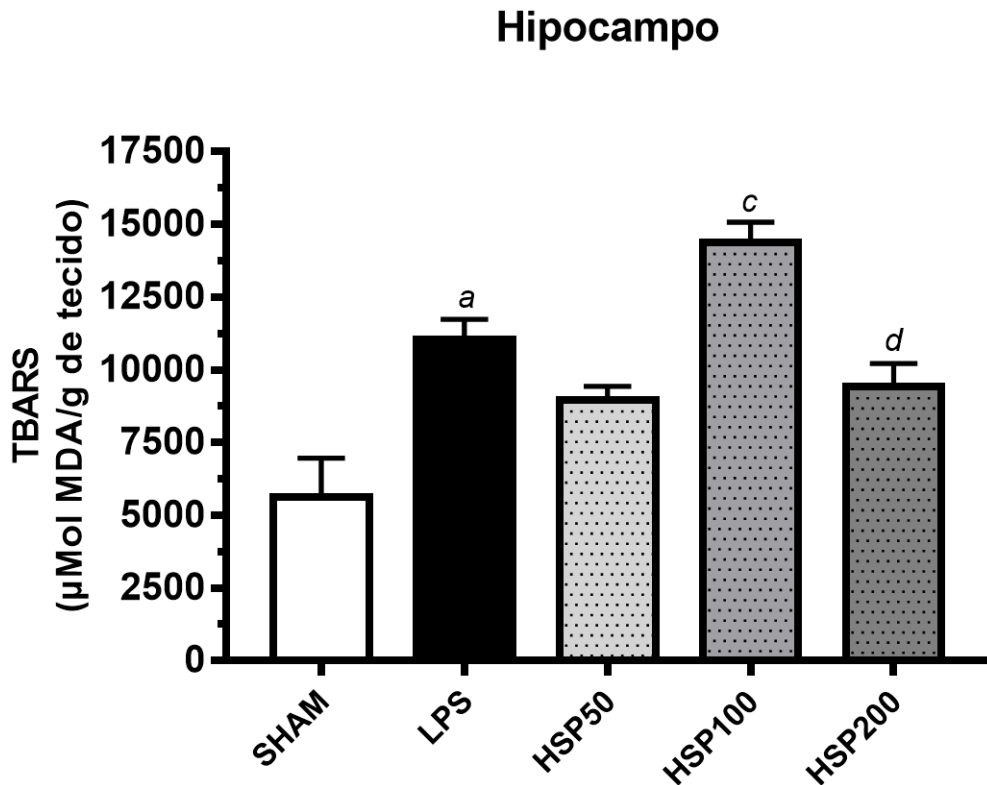
**Figura 21.** Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Córtex Pré-frontal.



**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50;100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de TBARS. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-). Considerou-se estatisticamente significativo  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

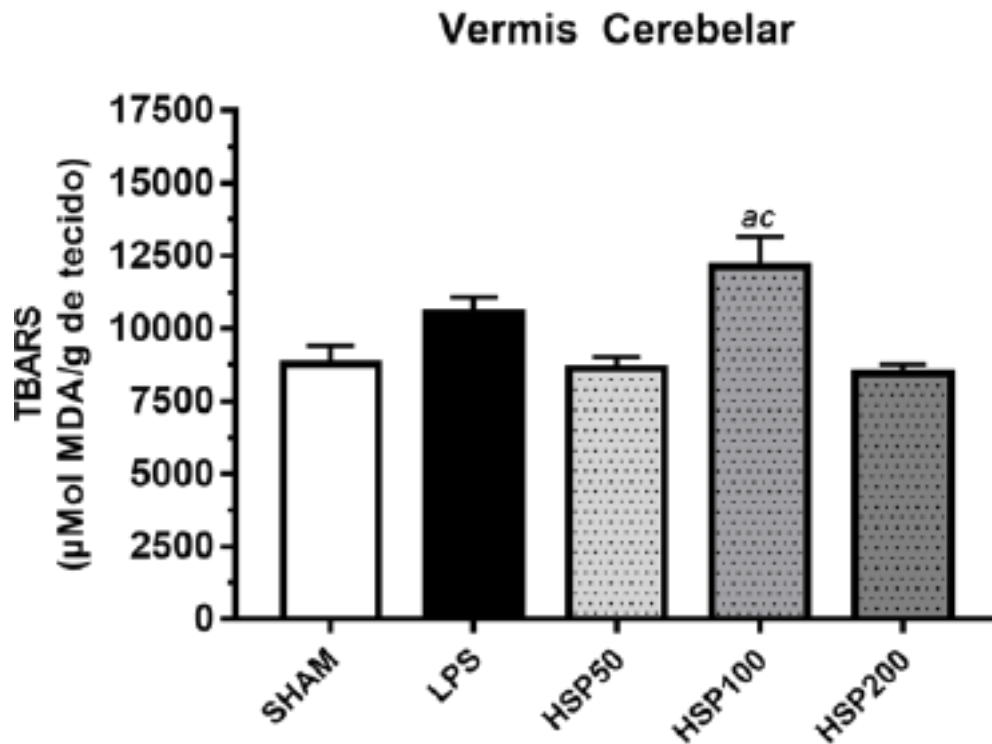
Figura 22. Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Hipocampo.



**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50;100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de TBARS. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; c vs HSP50; d vs HSP100. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

**Figura 23.** Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) no Vermis Cerebelar.



**Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50;100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de TBARS. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; c vs HSP50; d vs HSP200. Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

#### 4.2.2 Determinação de nitrito/nitrato

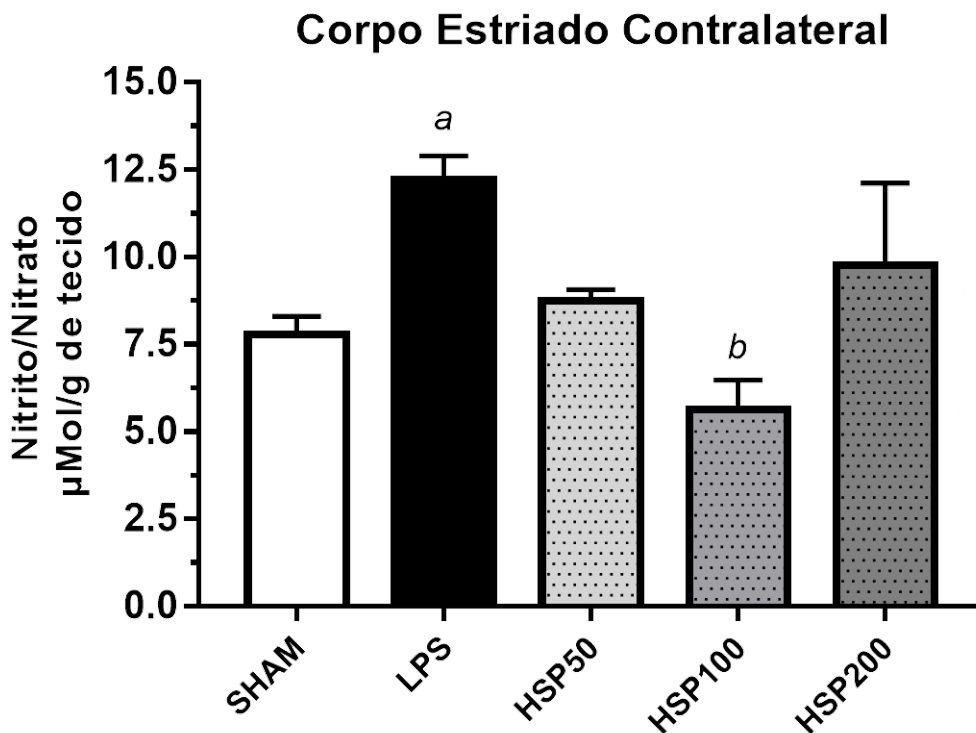
Os resultados da análise dos níveis de nitrito indicaram um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) nos níveis de nitrito/nitrato no grupo lesionado com LPS em todas as áreas avaliadas em relação ao grupo Sham (Figura 24, Figura 25, Figura 26 e Figura 27), exceto nos vermis cerebelares (Figura 28).

Os animais tratados com hesperidina na dose 50 mg/kg reduziram os níveis de nitrito/nitrato em 47% no córtex pré-frontal (Figura 26;  $5,2 \pm 0,4$  µMol/g) e em 48% no corpo estriado ipsilateral (Figura 25;  $4,5 \pm 0,6$  µMol/g) em relação ao grupo LPS (CPF:  $9,8 \pm 0,4$  µMol/g; CED:  $8,7 \pm 1$  µMol/g). Os animais do grupo HSP100 reduziram os

níveis de nitrito/nitrato em 42% no hipocampo (Figura 27;  $5,5 \pm 0,8 \mu\text{Mol/g}$ ), 54% no corpo estriado contralateral (Figura 24;  $5,6 \pm 0,8 \mu\text{Mol/g}$ ), 66% no corpo estriado ipsilateral (Figura 25;  $2,9 \pm 0,6 \mu\text{Mol/g}$ ) e 23% no córtex pré-frontal (Figura 26;  $7,5 \pm 0,7 \mu\text{Mol/g}$ ) em relação ao grupo LPS (HC:  $9,7 \pm 1,3 \mu\text{Mol/g}$ ; CEE:  $12,2 \pm 0,6 \mu\text{Mol/g}$ ; CED:  $8,7 \pm 1 \mu\text{Mol/g}$ ; CPF:  $9,8 \pm 0,4 \mu\text{Mol/g}$ ).

Com relação a dose de 200 mg/kg, houve redução dos níveis de nitrito/nitrato em 49% apenas no corpo estriado ipsilateral ( $4,4 \pm 1,8 \mu\text{Mol/g}$ ) em relação ao grupo LPS (Figura 25;  $8,7 \pm 1 \mu\text{Mol/g}$ ).

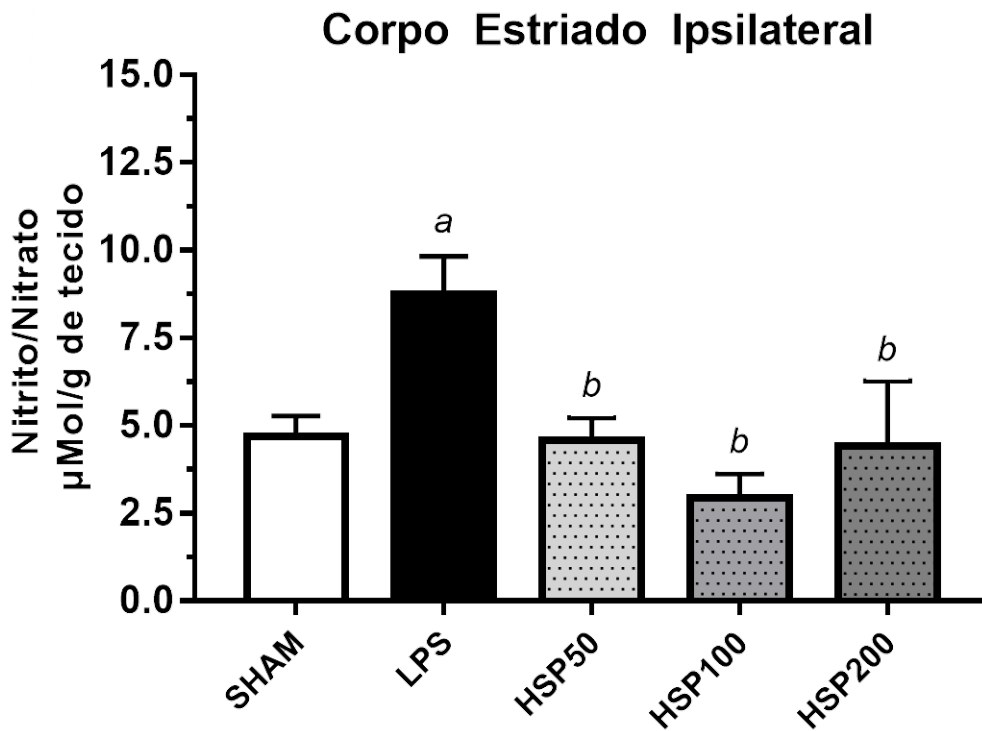
**Figura 24.** Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Corpo Estriado Contralateral.



**Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. Os dados referente ao **Corpo Estriado Contralateral** estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-). Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$

**Fonte:** Próprio autor.

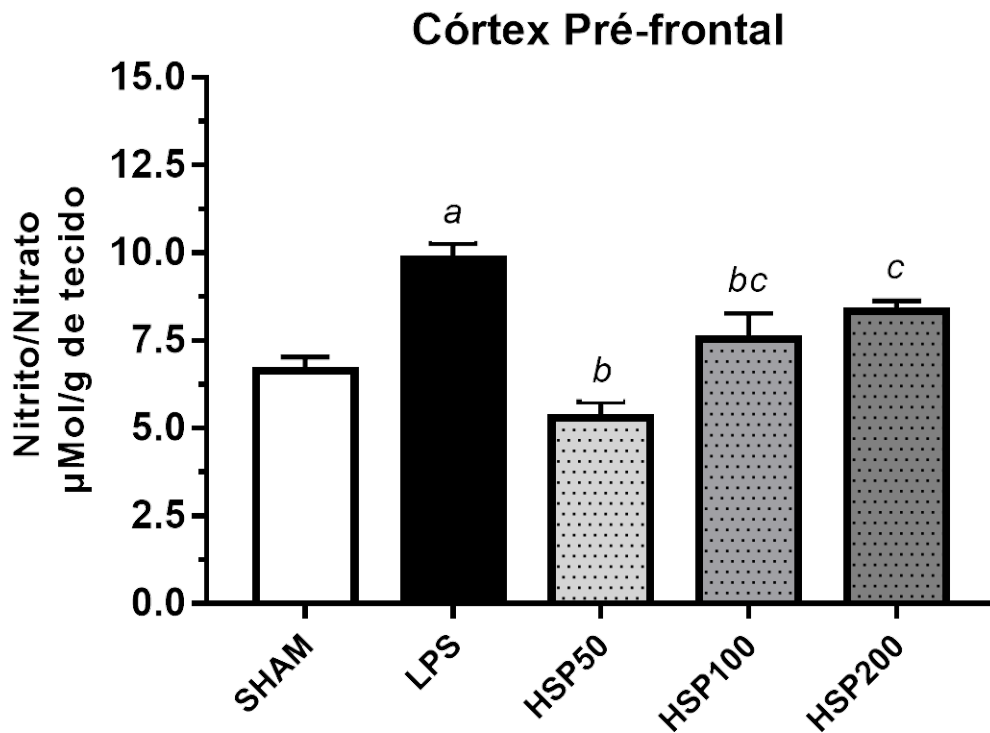
Figura 25. Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Corpo Estriado Ipsilateral.



**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-). Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

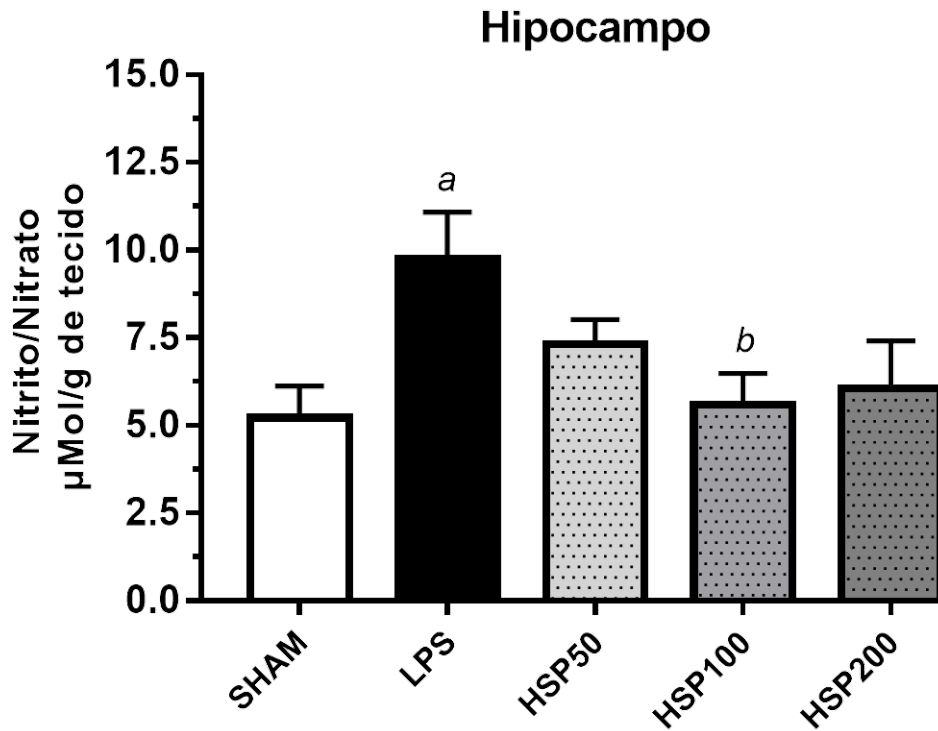
Figura 26. Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Córtex Pré-frontal.



**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-); c vs HSP50. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

**Fonte:** Próprio autor.

Figura 27. Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Hipocampo.

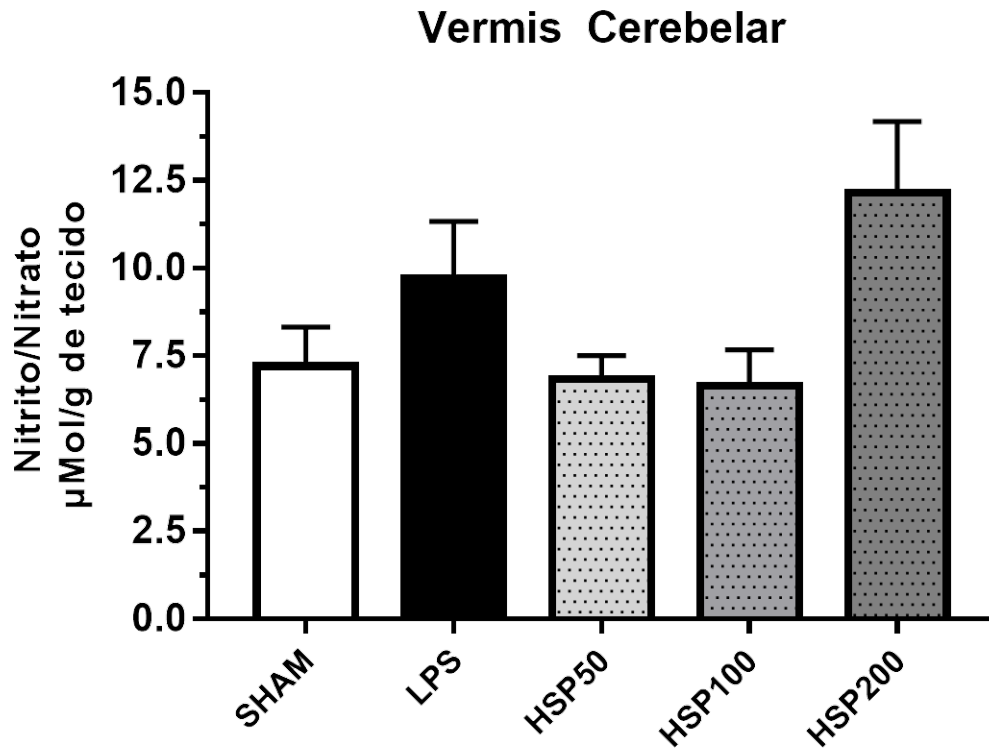


**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15º dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls.

**Fonte:** Próprio autor.



Figura 28. Análise dos níveis de nitrito/nitrato no Vermis Cerebelar.



**Legenda:** Os ratos (n = 06 per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com HSP (50; 100 e 200 mg/kg via i.p.) ou Salina (0,9%, via i.p.) durante 14 dias, com início um dia após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 15° dia pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Newman-Keuls. a vs SHAM; b vs LPS (-). Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$  (Fonte: Autor).

**Fonte:** Próprio autor.

## 5 DISCUSSÃO

A hesperidina é um flavonóide cuja suas atividades neuroprotetoras já foram relatadas em diversas pesquisas, que sugerem atividade neuroprotetora desta em vários modelos, inclusive outros modelos animais da Doença de Parkinson (ANTUNES et al., 2014; KIASALARI et al., 2016).

Neste estudo, os efeitos da hesperidina foram analisados em um modelo experimental de DP induzido pelo LPS. Para avaliação desse modelo diversos testes foram realizados, dentre eles, o teste do campo aberto, teste do cilindro e teste do *rotarod*. Além disso, os efeitos do tratamento com a hesperidina sobre o estresse oxidativo também foram avaliados, por meio da quantificação dos níveis de peroxidação lipídica, nitrato/nitrito e concentração de glutatona reduzida, no corpo estriado (ipsilateral e contralateral), hipocampo, córtex pré-frontal e vermis cerebelares dos animais.

Diversos estudos identificaram que o processo inflamatório desempenha um papel significativo na progressão da DP, especialmente a ativação microglial (LIMA et al., 2006; HALD; LOTHARIUS, 2005). O LPS, um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, é amplamente utilizado para induzir a inflamação através da ativação da célula glial (BEAL, 2003). Os modelos de DP induzidos por LPS tanto *in vitro* quanto *in vivo* são utilizados para investigar o papel da neuroinflamação na DP e também na pesquisa de novos tratamentos (REKSIDLER et al., 2009; ZAGER et al., 2009).

O teste de campo aberto é utilizado para avaliar a locomoção geral dos animais. A livre circulação é menos estressante para os animais, uma vez que eles vivem em uma condição "natural" com função de locomoção normal (ASAKAWA et al., 2016). Os nossos resultados, apontaram a redução da atividade exploratória horizontal induzida por LPS, porém, a hesperidina não foi capaz de retomar o comportamento normal do animal neste parâmetro.

No nosso trabalho foi observado um grande aumento na execução do comportamento de auto-limpeza (*grooming*) nos animais tratados com hesperidina na dose de 100 mg/kg e 200m mg/kg, em relação ao grupo Sham e LPS. Thenmozhi et al. (2017), utilizando um modelo de Doença de Alzheimer, também identificaram aumento no número de *groomings* do grupo tratado com hesperidina (50 mg/kg), em relação ao grupo lesionado com cloreto de alumínio. Além disso, em estudos

anteriores realizados por nosso grupo, também identificaram aumento expressivo na quantidade de *groomings* após o tratamento com Diosmin® (associação entre hesperidina e diosmina) nos animais lesionados com 6-OHDA (CEZARIO, 2017). Segundo Kagleueff e col. (2016) em roedores, a administração sistêmica de agonistas do receptor D1 da dopamina amplifica o complexo comportamental superestereotipada, levando à produção excessiva de *groomings*.

Isto pode sugerir que a hesperidina na concentração de 100 mg/kg e 200 mg/kg poderia funcionar como um agonista dos receptores do tipo D1 da dopamina, estimulando o funcionamento da via direta da dopamina e consequentemente aumentando o *grooming* dos animais. Outra possibilidade seria a recuperação parcial dos níveis de dopamina exercido pela hesperidina, através de um efeito possivelmente neuroprotetor exercido sob as células dopaminérgicas.

Em contraponto, não foram observadas diferenças no número de *groomings* entre o grupo LPS e o grupo falso operado. Ratos com lesões do pálido ventral (VP) apresentam menos comportamentos de higiene do que os ratos do controle, mas ratos com lesões do estriado dorsolateral anterior (DL) não apresentam esse déficit (KALUEFF et al; 2016; HE et al.; 2016).

A auto-higiene em animais é um comportamento inato que está envolvido na manutenção da higiene e outros processos fisiologicamente importantes, incluindo a termorregulação, a comunicação social e o despertar. Tornam-se patológicos, por exemplo, durante condições estressantes ou em certos distúrbios neuropsiquiátricos (KALUEFF et al., 2016).

Apesar de um aumento no tempo de imobilidade no grupo LPS, não houve alteração significativa do tempo de imobilidade e do número de *rearings* entre os grupos LPS e SHAM. O tempo de imobilidade, corresponde à acinesia observada em indivíduos acometidos pela Doença de Parkinson, em testes comportamentais para avaliações motoras em animais roedores é conveniente a observação desse parâmetro, pois os animais incorporam acinesia e rigidez, em vez de tremor e rigidez, que são difíceis de reproduzir para pesquisa em modelos de roedores (ASAKAWA et al., 2016).

No modelo de DP, induzido por injeção intranigral de LPS, pôde-se observar divergências entre os principais achados descritos na literatura sobre essa neurotoxina em ratos. He e colaboradores (2016), utilizaram injeção de 10 µg de LPS na SNpc e os animais apresentaram diminuição na atividade exploratória, redução no

comportamento de bipedestação (*rearings*) e aumento no tempo de imobilidade. Entretanto, Ariza et al. (2010), utilizaram 2 µL de LPS na SNpc, mesma concentração utilizada neste estudo, e os animais não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros observados no teste do campo aberto.

Juntamente com o teste do campo aberto, o teste do *rotarod* representa a principal abordagem na caracterização fenotípica motora em modelos animais, sendo inclusive considerado mais sensível por alguns autores. Este teste é bastante utilizado para avaliar os déficits comportamentais e o grau de lesão induzidos por neurotoxinas em modelos animais de DP, e tem se mostrado uma ferramenta útil para investigar a eficácia de novas drogas para o tratamento da DP (ROZAS; GARCIA, 1997; LINS et al., 2017).

O *rotarod* é utilizado para avaliar a coordenação motora e o equilíbrio de roedores quando os mesmos são colocados sobre um eixo de rotação com um protocolo de frequência fixa ou de aceleração. No presente estudo, utilizamos um protocolo de aceleração de 4 a 40rpm, que tem demonstrado ser eficaz para identificar ratos lesionados após a injeção unilateral no estriado (MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006; SOUZA et al., 2017).

Animais com lesão tendem a apresentar uma dificuldade de permanecer no aparato à medida que a frequência do eixo de rotação aumenta e, desta forma, eles apresentam uma latência menor para a queda quando comparados aos animais controles sem lesão (IANCU et al., 2005; MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006; DECRESSAC; MATTSSON; BJÖRKLUND, 2012).

Estas alterações foram observadas em nossos resultados, que apontaram uma maior dificuldade nos animais hemiparkinsonianos em se manter sobre a barra giratória, com diminuição considerável do tempo de latência da primeira queda e de permanência na barra giratória, em relação ao grupo falso operado, corroborando com os relatos da literatura e por sua vez, comprovando o estabelecimento da lesão unilateral induzida pelo LPS (HE et al. 2016; SHARMA; NEHRU, 2015). Contudo, os animais que receberam tratamento com a hesperidina (100 e 200 mg/kg), apresentaram melhora significativa nos parâmetros observados.

Resultados semelhantes foram observados por Thenmozhi e colaboradores (2018), que relataram recuperação motora de ratos submetidos a neuroinflamação crônica, através da administração de cloreto de alumínio, e tratados por via intraperitoneal com a hesperidina principalmente na dose de 100 mg/kg. Shabani e

Mirshekar (2018), utilizando um modelo de déficit cognitivo induzido por escopolamina, demonstraram que o tratamento com Diosmin nas doses de 50 e principalmente na dose de 100 mg/kg promoveu recuperação motora evidenciada pelo aumento da latência da primeira queda no rotarod. Além disso, em um outro estudo do nosso grupo utilizando modelo de DP induzido por 6-OHDA também foi observada melhora na função motora no rotarod em animais tratados com Diosmin®, (hesperidina e diosmina) (CEZARIO, 2017). Estes sugerem uma ação neuroprotetora da hesperidina, contra a toxicidade induzida por neurotoxinas, com importantes implicações para o tratamento da DP.

O teste do cilindro é um dos testes comportamentais mais utilizados para identificar lesão unilateral do MFB em roedores. Este teste é baseado no comportamento inato do animal de explorar o ambiente novo através do comportamento de *rearing*, no qual o animal toca as paredes do cilindro com as patas anteriores (SCHALLERT et al., 2000; TILLERSON et al., 2001). Animais com lesão no MFB apresentam uma redução do uso da pata anterior contralateral à lesão, caracterizando uma assimetria motora (BOIX; PADEL; PAUL, 2015; YUAN et al., 2005).

A redução do uso da pata anterior contralateral à lesão está correlacionada negativamente com o dano neuronal dopaminérgico na SNpc causado pela injeção unilateral de neurotoxina no feixe medial do prosencéfalo (MFB) (DECRESSAC; MATTSSON; BJÖRKLUND, 2012) sugerindo que compostos capazes de reduzir a assimetria motora no teste do cilindro podem também reduzir a degeneração neuronal na SNpc. Desta forma, este parâmetro comportamental pode ser utilizado para investigar o efeito neuroprotetor de novas abordagens terapêuticas em modelos de DP (GREALISH et al., 2010).

Como é possível observar na Figura 18, nossos resultados não demonstraram nenhuma redução significativa no percentual de uso da pata anterior contralateral ao lado da injeção de LPS, indicando que o LPS não foi capaz de produzir assimetria motora neste teste.

Os mecanismos pró-apoptóticos causados pela neurotoxina LPS estão relacionados a processos geradores de estresse oxidativo e nitrosativo, os quais envolvem o aumento dos níveis de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) e peroxidação lipídica em áreas cerebrais de roedores (DATTA et al., 2000; GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2001; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; ARAÚJO et al., 2013).

Uma produção excessiva de óxido nítrico (NO) na célula está associada ao aumento do estresse oxidativo e à redução da defesa antioxidante, o que torna as células mais vulneráveis. A administração intranigral de LPS induz a ativação microglial, principais produtoras de iNOS (óxido nítrico sintase indutível) levando à produção de citocinas e radicais livres em ratos, esgotando as células TH-positivas na substância negra e dopamina e seus metabólitos no estriado (GUPTA et al., 2014).

Em nossos resultados, a administração intranigral LPS elevou consideravelmente os níveis de nitrito no grupo LPS, em relação ao Sham. Esse aumento dos níveis de nitrito/nitrato foi revertido no grupo de animais tratados com hesperidina (100 mg/kg) à níveis semelhantes aos do grupo Sham em todas as áreas cerebrais analisadas.

Além disso, o LPS teve um impacto oxidativo acentuado, como evidenciado pelo aumento significativo dos produtos de peroxidação lipídica (aumento significativo do nível de MDA nos grupos LPS). Por outro lado, apenas a dose de 100 mg/kg de hesperidina foi capaz de reverter os elevados níveis de malondialdeído (MDA) provocados pela administração de LPS nos animais.

O MDA é um aldeído  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado mutagênico que é comumente utilizado como biomarcador para peroxidação lipídica através do ensaio TBARS, a produção excessiva de MDA tem sido associada a diferentes estados patológicos (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; GIERA; LINGEMAN; NIESSEN, 2012). Na literatura diversos trabalhos relatam o aumento dos níveis de MDA e nitrito/nitrato após administração intranigral de LPS (SHARMA et al., 2013, HE et al., 2016).

Diversos estudos identificaram que o estresse oxidativo está presente em diversas doenças neurodegenerativas (CHEN; GUO; KONG, 2012; SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD, 2013; KIM et al., 2015). Estudos já observaram o aumento da peroxidação lipídica e dos níveis de nitrito/nitrato em cérebros de pacientes com DA (MIRANDA et al., 2000). Esses dois parâmetros foram neutralizados pelo tratamento com hesperidina, indicando seu potencial como um antioxidante.

Nossos resultados corroboram com os achados na literatura, onde é possível observar o efeito neuroprotetor do tratamento com hesperidina, através da diminuição dos níveis de MDA e de nitrito/nitrato (SAHU et al., 2013; JANGRA et al., 2015; AKDEMIR et al., 2016; CEZARIO, 2017)

A hesperidina possui natureza lipofílica, podendo atravessar a barreira hematoencefálica facilmente, o que gera interesse na investigação de suas atividades

neuroprotetoras (NATHIYA; RAJARAM; ABRAHAM, 2016). Diversos estudos já comprovaram atividades farmacológicas, tais como atividade anti-carcinogênica (GARG et al., 2001; KAMARAJ et al., 2010), antidepressiva (SOUZA et al., 2013; FILHO et al., 2013; DONATO et al., 2014), anti-hipertensiva, anti-inflamatória (GARG et al., 2001.; ROSS; KASUM, 2002; KAMISLI et al., 2013), antimicrobiana, analgésica, (GARG et al., 2001) e antioxidante (ANTUNES et al., 2014; PARHIZ et al., 2015; ROOHBAKHSH et al., 2015).

Em relação a atividade neuroprotetora da hesperidina, Tamiselvam e colaboradores (2013) observaram que a hesperidina atenua os danos neuronais induzidos pela rotenona, reduzindo o estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial. Mais recentemente, Thenmozhi e colaboradores (2018) observaram que o tratamento com hesperidina atenuou o acúmulo de alumínio, o déficit colinérgico e a perda de memória, induzidas pela exposição ao cloreto de alumínio e eles correlacionaram esses efeitos a capacidade antioxidante da hesperidina.

Antunes et al. (2016) identificaram o efeito protetor da hesperidina sobre a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA em camundongos, através do aumento dos níveis de DA, da diminuição das espécies reativas e melhora dos parâmetros comportamentais, sugerindo que a hesperidina poderia ser útil como terapia para o tratamento da DP.

Corroborando com dados da literatura, os nossos resultados indicam que a hesperidina pode apresentar efeito neuroprotetor, impedindo algumas alterações neuroquímicas e comportamentais induzidas pela neurotoxina LPS e, portanto, apresenta-se como uma ferramenta farmacológica em potencial, fornecendo subsídios para a continuidade de estudos futuros e sua possível aplicação no desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras contra a DP.

## 6 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento com hesperidina via i.p., durante 14 dias foi efetivo em atenuar os seguintes danos provocados pela administração intranigral da neurotoxina LPS em ratos:

- Déficits motores induzidos pelo LPS no teste do teste do *Rotarod*;
- Aumento de nitrito/nitrato em determinadas áreas cerebrais;
- Aumento de MDA em determinadas áreas cerebrais.

Esses resultados sugerem um potencial terapêutico da hesperidina no tratamento da Doença de Parkinson. Dessa forma, estudos subsequentes empregando a hesperidina devem ser encorajados a fim de se aprofundar os conhecimentos acerca de suas propriedades farmacológicas e possíveis aplicações no tratamento DP.



## REFERÊNCIAS

ADHIHETTY, P. J.; BEAL, M. F. Creatine and its potential therapeutic value for targeting cellular energy impairment in neurodegenerative diseases.

**Neuromolecular Medicine**, v. 10, n. 4, p. 275-290, 2008.

AKDEMIR, F. N. E.; GÜLÇİN, İ.; KARAGÖZ, B.; SOSLU, R.; ALWASEL, S. H. A comparative study on the antioxidant effects of hesperidin and ellagic acid against skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 31, n. sup4, p. 114-118, 2016.

ANTUNES, M. S.; GOES, A. T.; BOEIRA, S. P.; PRIGOL, M.; JESSE, C, R. Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. **Nutrition**, v. 30, n. 11-12, p. 1415-1422, 2014.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Animal Behavior**, v. 21, p. 205-235, 1973.

ARIZA, D.; LIMA, M. M.; MOREIRA, C. G.; DOMBROWSKI, P. A.; AVILA, T. V.; ALLEMAND, A. et al., Intranigral LPS administration produces dopamine, glutathione but not behavioral impairment in comparison to MPTP and 6-OHDA neurotoxin models of Parkinson's disease. **Neurochemical research**, v. 35, n. 10, p. 1620-1627, 2010.

ASAKAWA, T.; FANG, H.; SUGIYAMA, K.; NOZAKI, T.; HONG, Z.; YANG, Y. et al., Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 63-94, 2016.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, 2014.

AZEVEDO, M.; PEREIRA, A. F.; NOGUEIRA, R. B.; ROLIM, F. E.; BRITO, G. A. C.; WONG, D. V. T. et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, n. 1, p. 53, 2013.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 33, n. 2, p. 111-128, 2008.

BARTELS A.L.; LEENDERS, K.L. Parkinson's disease: The syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. **Cortex**, v. 45, p. 915-92, 2009.

BASTIANETTO, S.; YAO, Z.X.; PAPADOPOULOS, V. Neuroprotective effects of green and black teas and their catechin gallate esters against beta-amyloid-induced toxicity. **European Journal of Neuroscience**, v.23, p. 55–64, 2006.

BEAL, M. F. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 991, n. 1, p. 120-131, 2003.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 8, p. 155, 2014.

BOIX, J.; PADEL, T.; PAUL, G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. **Behavioural brain research**, v. 284, p. 196-206, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas da Saúde. Portal Brasil. **Conheça os Sintomas do Mal de Parkinson**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

CALABRESI, P.; GHIGLIERI, V.; MAZZOCCHETTI, P.; CORBELLI, I.; PICCONI, B. Levodopa-induced plasticity: a double-edged sword in Parkinson's disease. **The Royal Society**, p. 1-14, 2015.

CASTANO, A.; HERRERA, A. J.; CANO, J.; MACHADO, A. The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$ . **Journal of neurochemistry**, v. 81, n. 1, p. 150-157, 2002.

CEZARIO, N. A. **Associação de diosmina e hesperidina em modelo de Hemiparkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina em ratos**. 2017. 93f. Dissertação – Universidade Federal do Ceará. Sobral, 2015.

CHANET A, MILENKOVIC D, MANACH C, MAZUR A, MORAND C Citrus flavanones: what is their role in cardiovascular protection?. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8809-8822, 2012.

CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural regeneration research**, v. 7, n. 5, p. 376, 2012.

CHUNG, E. S.; BOK, E.; CHUNG, Y. C.; BAIK, H. H.; JIN, B. K. Cannabinoids prevent lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat substantia nigra in vivo through inhibition of microglial activation and NADPH oxidase. **Brain Research**, v. 1451, p. 110-116, 2012.

COBB, C. A.; COLE, M. P. Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration. **Neurobiology of Disorders**. v. 84, n. 1, p. 4-21, 2015.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural product reports**, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

DATTA, K.; SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, P. Reactive oxygen species in health and disease. **National Medical Journal of India**, v. 13, n. 6, p. 304-310, 2000.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DECRESSAC, M.; MATTSSON, B.; BJÖRKLUND, A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein rat models of Parkinson's disease. **Experimental neurology**, v. 235, n. 1, p. 306-315, 2012.

DONALDSON, I. James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 45, p. 84-6, 2015.

DONATO F, et al., Hesperidin exerts antidepressant-like effects in acute and chronic treatments in mice: possible role of L-arginine-NO-cGMP pathway and BDNF levels. **Brain Research Bulletin**, v. 104, p. 19-26, 2014.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation Original Research Article. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, n. 3, p. 208, 1957.

ELAVARASAN J, VELUSAMY P, GANESAN T, RAMAKRISHNAN SK, RAJASEKARAN D, PERIANDAVAN K. Hesperidin-mediated expression of Nrf2 and upregulation of antioxidant status in senescent rat heart. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 10, p. 1472–1482, 2012.

FAUCONNEAU, B.; WAFFO-TEGUO, P.; HUGUET, F.; BARRIER, L.; DECENDIT, A.; MERILLON, J. M. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. **Life Sciences**, v. 61, n. 21, p. 2103–2110, 1997.

FILHO, B. C.; DEL FABBRO, L.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T.; SOUZA, L. C.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. **European journal of pharmacology**, v. 698, n. 1-3, p. 286-291, 2013.

FRANK-CANNON, T. C.; ALTO, L. T.; F E MCALPINE, F. E.; Tansey, M. G. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? **Molecular Neurodegeneration**, v. 4, p. 47, 2009.

FU, S. P.; WANG, J. F.; XUE, W. J.; LIU, H. M.; LIU, B. R.; ZENG, Y. L. et al., Anti-inflammatory effects of BHBA in both in vivo and in vitro Parkinson's disease models are mediated by GPR109A-dependent mechanisms. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 9, 2015.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J.; SINGLA, A. K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.

GAUR V, KUMAR A. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. **Pharmacological Reports**, v. 62, n. 4, p. 635–48, 2010.

GIERA, G.; LINGEMAN, H.; NIESSEN, W. M. A. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. **Chromatographia**, v. 75, n. 9-10, p. 433-440, 2012.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 8, p. 959-975, 2001.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harb Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011.

GREALISH, S.; MATTSSON, B.; DRAXLER, P.; BJÖRKLUND, A. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6-hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 12, p. 2266-2278, 2010.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

GUPTA, S. P.; YADAV, S.; SINGHAL, N. K.; TIWARI, M. N.; MISHRA, S. K.; SINGH, M. P. Does Restraining Nitric Oxide Biosynthesis Rescue from Toxins-Induced Parkinsonism and Sporadic Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 49, p. 262-275, 2014.

HADDADI, R.; NAYEBI, A. M.; FARAJNIYA, S.; BROOSHGHALAN, S. E.; SHARIFI, H. Silymarin improved 6-OHDA-induced motor impairment in hemi-parkinsonian rats: behavioral and molecular study. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 38, 2014.

HADDADI, R.; NAYEBI, A.; FARAJNIYA, S.; BROOSHGHALAN, S.; SHARIFI, H. Silymarin improved 6-OHDA-induced motor impairment in hemi-parkinsonian rats: behavioral and molecular study. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 38, 2014.

HALD, A.; LOTHARIUS, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link?. **Experimental neurology**, v. 193, n. 2, p. 279-290, 2005.

HE, H.; GUO, W. W.; XU, R. R.; CHEN, X. Q.; ZHANG, N.; WU, X. et al., Alkaloids from piper longum protect dopaminergic neurons against inflammation-mediated damage induced by intranigral injection of lipopolysaccharide. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 412, 2016.

HINES, D.J.; CHOI, H.B.; HINES, R.M.; PHILLIPS, A.G.; MACVICAR, B.A. Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. **PLOS ONE** 8, e60388, 2013.

HSIAO, E. Y.; MCBRIDE, S. W.; CHOW, J.; MAZMANIAN, S. K.; Patterson, P. H. Modeling an autism risk factor in mice leads to permanent immune dysregulation.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 31, p. 12776–12781, 2012.

HU, L. F.; LU, M.; TIONG, C. X.; DAWE, G. S.; HU, G.; BIAN, J. S. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on Parkinson's disease rat models. **Aging Cell**, v. 9, n. 2, p. 135-46, 2010.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural brain research**, v. 162, n. 1, p. 1-10, 2005

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tábua completa de mortalidade para o Brasil – 2015**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Tabuas\\_Completas\\_de\\_Mortalidade/Tabuas\\_Completas\\_de\\_Mortalidade\\_2015/tabua\\_de\\_mortalidade\\_analise.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Tabuas_Completas_de_Mortalidade/Tabuas_Completas_de_Mortalidade_2015/tabua_de_mortalidade_analise.pdf)>. Acesso em 20 mar. 2018.

IRAVANI, M. M.; SYED, E.; JACKSON, M. J.; JOHNSTON, L. C.; SMITH, L. A.; JENNER, P. A modified MPTP treatment regime produces reproducible partial nigrostriatal lesions in common marmosets. **European Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 4, p. 841-854, 2005.

JAGETIA, G.; REDDY, T. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, n. 1, p. 37-48, 2002.

JANGRA, A.; KASBE, P.; PANDEY, S. N.; DWIVEDI, S.; GURJAR, S. S.; KWATRA, M. et al., Hesperidin and silibinin ameliorate aluminum-induced neurotoxicity: modulation of antioxidants and inflammatory cytokines level in mice hippocampus. **Biological trace element research**, v. 168, n. 2, p. 462-471, 2015.

JAVED, H.; VAIBHAV, K.; AHMED, M.E.; KHAN, A.; TABASSUM, R.; ISLAM, F.; SAFHI, M.M.; ISLAM, F. Effect of hesperidin on neurobehavioral, neuroinflammation, oxidative stress and lipid alteration in intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment in mice. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 348, p. 51-59, 2015.

JUNG, U.; JEON, M.; CHOI, M.; KIM, S. Silibinin attenuates MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in the substantia nigra in vivo. **Journal of medicinal food**, v. 17, n. 5, p. 599-605, 2014.

KABADERE, S.; OZTOPCU-VATAN, P.; UYAR, R.; DURMAZ, R. Quercetin both partially attenuates hydrogen peroxide-induced toxicity and decreases viability of rat glial cells. **Acta Biologica Hungarica**, v. 62, n. 3, p. 221-227, 2011.

KAKADIYA, J.; MULANI, H. SHAH, N. Protective effect of hesperidin on cardiovascular complication in experimentally induced myocardial infarction in diabetes in rats. **Journal of basic and clinical pharmacy**, v. 1, n. 2, p. 85, 2010.

KALPANA, K. B.; SRINIVASAN, M.; MENON, V, P. Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 323, n. 1-2, p. 21-29, 2009.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K.C.; ANN, M.; GRAYBIEL.; FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45, 2016.

KAMARAJ, S. A. P.; JAGAN, S.; RAMAKRISHNAN, G.; DEVAKI, T. Modulatory effect of hesperidin on benzo (a) pyrene induced experimental lung carcinogenesis with reference to COX-2, MMP-2 and MMP-9. **European journal of pharmacology**, v. 649, n. 1-3, p. 320-327, 2010.

KAMISLI S.; CIFTCI O.; KAYA K.; CETIN A.; KAMISLI O.; OZCAN C. Hesperidin protects brain and sciatic nerve tissues against cisplatin-induced oxidative, histological and electromyographical side effects in rats. **Toxicology and industrial health**, v. 31, n. 9, p. 841-851, 2015.

KARUPPAGOUNDER. S.; MADATHIL, S.; PANDEY, M.; HAOBAM, R.; RAJAMMA, U.; MOHANAKUMAR, K. Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. **Neuroscience**, v. 236, p. 136-148, 2013.

KIASALARI, Z.; KHALILI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M. Protective Effect of Oral Hesperetin Against Unilateral Striatal 6-Hydroxydopamine Damage in the Rat. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 5, p. 1065-1072, 2016.

KIM G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Experimental neurobiology**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015.

KIM, Y. S.; JOH, T. H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Experimental & molecular medicine**, v. 38, n. 4, p. 333, 2006.

KOWAL, S. L.; DALL, T. M.; CHAKRABARTI, R.; STORM, M. V.; JAIN, A. The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. **Movement Disorders**, v. 28, n. 3, p. 311-318, 2013.

LEE, A.; GILBERT, R. M.; 2016. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 955-965

LI, X.; ZHANG, S.; LIU, S.; LU, F. Recent advances in herbal medicines treating Parkinson's disease. **Fitoterapia**, v.84, p. 273-285, 2013

LIMA, M. D. M. S.; REKSIDLER, A. B.; ZANATA, S. M.; MACHADO, H. B.; TUFIK, S., VITAL, M. A. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain research**, v. 1101, n. 1, p. 117-125, 2006.

LINS, Livia Cristina Rodrigues Ferreira et al., **Efeito neuroprotetor do Carvacrol em dois modelos experimentais da Doença de Parkinson: evidências comportamentais e imunohistoquímicas**. 2017

MARDER, M.; VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; FERNÁNDEZ, S.; MEDINA, J. H.; PALADINI, A. C. 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacology Biochemical and Behavior**, v. 75, n. 3, p. 537-545, 2003.

MAZZETTI, A. P.; FIORILE, M. C.; PRIMAVERA, A.; BELLO, M. L. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10-18, 2015.

MIRANDA, M. D.; BRUIN, V. M.; VALE, M. R.; VIANA, G. S. Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissue from patients with Alzheimer's disease. **Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 179-184, 2000.

MONVILLE, C.; TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. **Journal of neuroscience methods**, v. 158, n. 2, p. 219- 223, 2006.



NATHIYA, S.; RAJARAM, S.; ABRAHAM, P. Hesperidin alleviates antitubercular drug induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver. **International Journal of Biomedical Research**, v. 7, p. 439-446, 2016.

NONES, J. SPOHR, T. C. L. S.; GOMES, F. C. A. Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 1, p. 1776-1784, 2011.

ONU. **ONU BR - Nações Unidas do Brasil**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-expectativa-de-vida-sobe-5-anos-de-2000-a-2015-no-mundo-mas-desigualdades-persistem/>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

OU, R.; YANG, J.; CAO, B.; WEI, Q.; CHEN, K.; CHEN, X.; ZHAO, B.; WU, Y.; SONG, W.; SHANG, H. Progression of non motor symptoms in Parkinson's disease among different age populations: A two-year follow-up study. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 360, p. 72-77, 2016.

OVALATH, S.; DEEPA, P. The history of parkinsonism: Descriptions in ancient Indian medical literature. **Movement Disorders**, v. 28, n. 5, p. 566–568, 2013.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytotherapy research**, v. 29, n. 3, p. 323-331, 2015.

PARKINSON'S DISEASE FOUNDATION, 2016. **Statistics on Parkinson's**. Disponível em: <[http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics)>. Acesso em: 15 mar. 2018.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **New York: Academic Press**, 2dn Edn, 1986.

PEREZ-H, J.; CARRILLO-S, C.; GARCÍA, E.; RUIZ-MAR, G.; PÉREZ-TAMAYO, R.; CHAVARRÍA, A. Neuroprotective effect of silymarin in a MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Toxicology**, v. 319, p. 38-43, 2014.

RAINEY-SMITH, S.; SCHROETKE, L. W.; BAHIA, P.; FAHMI, A.; SKILTON, R.; SPENCER, J. P.; et al., Neuroprotective effects of hesperetin in mouse primary

neurones are independent of CREB activation. **Neuroscience Letters**. v. 438, n. 1, p. 29-33, 2008.

REKSIDLER A. B.; LIMA M. M. S.; DOMBROWSKI, P.; BARNABE, G. F.; ANDERSEN, M. L.; TUFIK, S. et al., Distinct effects of intranigral L-DOPA infusion in the MPTP rat model of Parkinson's disease. In: **Birth, Life and Death of Dopaminergic Neurons in the Substantia Nigra**. Springer, Vienna, 2009. p. 259-268.

RICE, M. E.; PATEL, J. C.: Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1672, 2015.

ROBAK, J.; SHRIDI, F.; WOLBIS, M.; KROLIKOWSKA, M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. **Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy**, v. 40, n. 5, p. 451–458, 1988.

ROOHBAKHSH, A.; PARHIZ, H.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin — A mini-review. **Life Sciences**, v. 113, p. 1-6, 2014.

ROOHBAKHSH, A.; PARHIZ, H.; SOLTANI, F.; REZAEI, R.; IRANSHAHI, M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. **Life sciences**, v. 124, p. 64-74, 2015.

ROSS J. A.; KASUM C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annual review of nutrition**, v. 22, n. 1, p. 19-34, 2002.

ROZAS, G.; GARCÍA, L. J. L. Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. **Brain Research**, v. 749, n. 2, p. 188-99, 1997.

SACHDEVA, A.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Naringin ameliorates memory deficits in experimental paradigm of Alzheimer's disease by attenuating mitochondrial dysfunction. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 127, p. 101-110, 2014.

SAHU, B. D.; KUNCHA, M.; SINDHURA, G. J.; SISTLA, R. Hesperidin attenuates cisplatin-induced acute renal injury by decreasing oxidative stress, inflammation and DNA damage. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 453-460, 2013.

SAID, U. Z.; SAADA, H. N.; ABD-ALLA, M. S.; ELSAYED, M. E.; AMIN, A. M. Hesperidin attenuates brain biochemical changes of irradiated rats. **International Journal Of Radiation Biology**, v. 88, n. 8, p. 613-618, 2012.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L.; BLAND, S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 777-787, 2000.

SCHAPIRA, A. H.; OLANOW, C. W.; GREENAMYRE, J. T.; BEZARD, E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. **The Lancet**. v.9, n. 9942, p. 545-555, 2014.

SCHWENKGRUB, J.; JONIEC-MACIEJAK, I.; SZNEJDER-PACHOLEK, A.; WAWER, A.; CIESIELSKA, A.; BANKIEWICZ, K.; CZŁONKOWSKA, A.; CZŁONKOWSKI, A. Effect of human interleukin-10 on the expression of nitric oxide synthases in the MPTP-based model of Parkinson's disease. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 44-49, 2013.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHARMA, N.; NEHRU, B. Characterization of the lipopolysaccharide induced model of Parkinson's disease: Role of oxidative stress and neuroinflammation. **Neurochemistry International** v. 87, p. 92-105, 2015.

SHARMA, S.; MOON, C.S.; KHOGALI, A.; HAIDOUS, A.; CHABENNE, A.; et al., Biomarkers in Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 63, p. 201-229, 2013.

SELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **The Journal of Psychology**, v. 21, p. 227-236, 1946.

SILVA, L. A.; BOM, K. F.; TROMM, C. B.; ROSA, G. L.; MARIANO, I.; POZZI, B. G. et al., Effect of eccentric training on mitochondrial function and oxidative stress in the skeletal muscle of rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 46, n. 1, p. 14-20, 2013.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, v. 11, n. 3-4, p. 151-167, 2007.

SINGH, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. **Brain Research Reviews**, v. 54, n. 2, p. 233-250, 2007.

SOUZA, L. C.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T.; DEL FABBRO, L.; CARLOS FILHO, B.; BOEIRA, S. P.; JESSE, C. R. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 40, p. 103-109, 2013.

SOUZA, R. B.; FROTA, A. F.; SOUSA, R. S.; CEZARIO, N. A.; SANTOS, T. B.; SOUZA, L. M. et al., Neuroprotective Effects of Sulphated Agar from Marine Alga *Gracilaria cornea* in Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model: Behavioural, Neurochemical and Transcriptional Alterations. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, n. 2, p. 159-170, 2017.

STANDAERT, D. E.; GALANTER, J. M. **Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica**. Cap. 12, 2014.

SUBRAMANIAM, S. R.; CHESSELET, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Progress Neurobiology**. v. 106-107, p. 17-32, 2013.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 157-169, 2013.

SULZER, D.; SURMEIER, D. J. Neuronal vulnerability, pathogenesis, and Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, p. 41-50, 2013.

SUN, Y.; QIAO, L.; SHEN, Y.; JIANG, P.; CHEN, J.; YE, X. Phytochemical profile and antioxidant activity of physiological drop of citrus fruits. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, p. C37-C42, 2013.

TAMILSELVAM, K.; NATARAJ, J.; JANAKIRAMAN, U.; MANIVASAGAM, T.; ESSA, M. M. Antioxidant and anti-inflammatory potential of hesperidin against 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced experimental Parkinson's disease in mice. **International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, v.3, n.3, 2013.

TAMILSELVAM, K.; BRAIDY, N.; MANIVASAGAM, T.; ESSA, M. M.; PRASAD, N. R.; KARTHIKEYAN, S.; THENMOZHI, A. J.; SELVARAJU, S.; GUILLEMIN, G. J. Neuroprotective Effects of Hesperidin, a Plant Flavanone, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Parkinson's Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2 p. 1-11, 2013.

TANAKA, S.; IDE, M.; SHIBUTANI, T.; OHTAKI, H.; NUMAZAWA, S.; SHIODA, S. et al., Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 83, n. 4, p. 557-566, 2006.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 803-819, 2013.

THENMOZHI, A. J.; DHIVYA BHARATHI, M.; KIRUTHIKA, R.; Manivasagam, T.; Borah, A.; Essa, M. M. Attenuation of Aluminum Chloride-Induced Neuroinflammation and Caspase Activation Through the AKT/GSK-3 $\beta$  Pathway by Hesperidin in Wistar Rats. **Neurotoxicity research**, p. 1-14, 2018.

THENMOZHI, A. J.; RAJA, T. R. W.; MANIVASAGAM, T.; JANAKIRAMAN, U.; ESSA, M. M. Hesperidin ameliorates cognitive dysfunction, oxidative stress and apoptosis against aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease. **Nutritional Neuroscience**. v. 20, n. 6, p. 360-368, 2017.

TILLERSON, J.L.; COHEN, A. D.; PHILHOWER, J.; MILLER, G. W.; ZIGMOND, M. J.; SCHALLERT, T. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 12, p. 4427-4435, 2001.

TRIPOLI, E.; LA GUARDIA, M.; GIAMMANCO, S.; DI, M. D.; GIAMMANCO, M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 466-479, 2007.

VAUZOUR, D.; VAFEIADOU, K.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; RENDEIRO, C.; SPENCER, J. P. E. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. **Genes & Nutrition**, v. 3, n. 3-4, p. 115-126, 2008.

VIVIANI, B.; BORASO, M.; MARCHETTI, N.; MARINOVICH, M. Perspectives on neuroinflammation and excitotoxicity: A neurotoxic conspiracy? **Neurotoxicology**, v.43, p. 10-20, 2014.

WILMSEN, P. K.; SPADA, D. S.; SALVADOR, M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4757-4761, 2005.

WU, T.; HALLETT, M.; CHAN, P. Motor automaticity in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, n. 6, p. 1-9, 2015.

YUAN, H.; SARRE, S.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. **Journal of neuroscience methods**, v. 144, n. 1, p. 35-45, 2005.

YUSTE, J. E.; TERRAGON, E.; CAMPUZANO, C. M.; ROS-BERNAL, F. Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 322, 2015.

ZAGER, A.; ANDERSEN, M. L.; LIMA, M. M.; REKSIDLER, A. B.; MACHADO, R. B.; TUFIK, S. Modulation of sickness behavior by sleep: the role of neurochemical and neuroinflammatory pathways in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 8, p. 589-602, 2009.