



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
*Campus* DE SOBRAL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

NAYARA ARAÚJO CEZARIO

**ASSOCIAÇÃO DE DIOSMINA E HESPERIDINA EM MODELO DE  
HEMIPARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM RATOS**

SOBRAL

2017

NAYARA ARAÚJO CEZARIO

**ASSOCIAÇÃO DE DIOSMINA E HESPERIDINA EM MODELO DE  
HEMIPARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA 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

Orientador: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho  
Co-orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

SOBRAL

2017

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)

---

- C419a Cezario, Nayara Araújo.  
Associação de diosmina e hesperidina em modelo de hemiparkinsonismo induzido por 6-  
hidroxidopamina em ratos / Nayara Araújo Cezario. – 2017.  
92 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia, Sobral, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho.

Coorientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

1. 6-hidroxidopamina. 2. Diosmin. 3. Doença de Parkinson. I. Título.

CDD 660.6

---

NAYARA ARAÚJO CEZARIO

**ASSOCIAÇÃO DE DIOSMINA E HESPERIDINA EM MODELO DE  
HEMIPARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA 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: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof Dr. Gerardo Cristino Filho  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Tiago Sousa de Melo  
Instituto Superior de Teologia Aplicada (INTA)

---

Prof. Dr. Ricardo Basto Souza  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

## AGRADECIMENTOS

À Deus sempre, pois sei que ele sempre faz o melhor por mim e tenho feito o possível para seguir forte o caminho da evolução.

Agradeço aos meus pais queridos e amados por terem feito todo o possível por mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por fomentar o desenvolvimento deste projeto.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral*, e aos Laboratórios de Fisiologia e Neurociência, Farmacologia e Imunologia pela infra-estrutura fornecida, essenciais para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus orientadores, os Doutores, Gerardo Cristino Filho e Lissiana Magna Vasconcelos.

À profa. Lissiana pelo acolhimento no laboratório, pela calma e paciência, pelas correções e pelo seu jeito único e meigo de ser.

À Rayane Siqueira, minha companheira de bancada, que me ajudou em todas os experimentos, em especial nas avaliações neuroquímicas e eutanásias.

Aos meus iniciadores no Laboratório de Neurociência, Annyta Fernandes Frota e Ricardo Basto Souza, pelas dicas e incentivo na pesquisa.

À minha amiga e “co-co-orientadora” Annyta, que me ensinou desde a melhor maneira de pegar os animais, até o procedimento cirúrgico. E que mesmo distante, sempre esteve disposta a me auxiliar em todas as dúvidas e incertezas tanto na parte experimental, como na parte intelectual do trabalho.

À ex-bolsista do laboratório e agora médica e amiga, Luziana Mara, por me auxiliar nos tratamentos dos animais nos fins de semana, no meu primeiro ano de experimentos.

Ao Fernando Filho, que com toda sua paciência única, treinou praticamente todos os meus animais no *Rotarod*.

À fofofíssima Larissa, a Manu e ao Ian, por tratarem meus animais nesses últimos meses em que estive ocupada com o desenvolvimento da dissertação.

*“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”*

*Winston Churchill*

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma das desordens neurodegenerativas mais comuns relacionadas com a idade, vem afetando milhões de pessoas no mundo todo. A doença é caracterizada pela morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância *nigra pars compacta* no mesencéfalo, resultando em disfunção motora. A Levodopa (L-DOPA) ainda é a droga “padrão-ouro” para a reposição de dopamina na DP, aliviando os sintomas motores da doença, porém, além de não impedir a progressão da doença, a L-DOPA provoca uma série de efeitos colaterais. O Diosmin (DM) é um medicamento já comercializado, composto por uma fração flavonóica purificada, sob forma micronizada de 90% diosmina e 10% hesperidina. É utilizado para o tratamento sintomático de sintomas relacionados à Insuficiência Venosa Crônica. Diversos estudos comprovam a atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e neuroprotetoras dos componentes desse fármaco. Dentro desse contexto, a descoberta de novas drogas que possam impedir a progressão da DP e que reduzam os efeitos adversos dos tratamentos tradicionais faz-se necessária, portanto objetivou-se estudar os efeitos do diosmin sozinho ou associado a L-DOPA no modelo experimental do DP induzido por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Para isso, ratos lesionados com 6-OHDA (21 µg/ animal) unilateralmente no corpo estriado direito foram tratados com DM (50, 100 e 200 mg/kg); L-DOPA (25 mg/kg) ou DM 100 mg/kg em associação com L-DOPA 12,5 mg/kg durante 14 dias, com início 7 dias pós-cirurgia. No 21º dia, os animais foram submetidos a ensaios comportamentais específicos (Teste do Campo aberto, *Rotarod* e Teste Rotacional induzido por apomorfina). Em seguida, os animais foram sacrificados e suas áreas cerebrais foram, dissecadas para análises neuroquímicas (glutaciona reduzida, peroxidação lipídica e nitrito). DM (100 mg/kg v.o.) foi capaz de reverter os déficits motores induzidos pela 6-OHDA, além de elevar o níveis de glutaciona reduzida (GSH) e reduzir substancialmente os níveis de nitrito/nitrato. Além disso, a associação do Diosmin com a sub-dose de Levodopa mostrou alguns efeitos melhores do que a L-DOPA sozinha em dose maior. Contudo, DM não mostrou modulação nos níveis de malondialdeído nas áreas cerebrais de animais hemiparkinsonianos. Assim, DM revelou uma atividade neuroprotetora contra distúrbios motores e neuroquímicos em ratos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA. Adicionalmente, nossos dados sugerem uma possível eficiência na associação entre DM com L-DOPA para o tratamento de déficit motor induzido por 6-OHDA em ratos.

**Palavras-chave:** 6-hidroxi-dopamina. Diosmin. Doença de Parkinson.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is one of the most common age-related neurodegenerative disorders, affecting millions of people worldwide. The disease is characterized by selective death of the dopaminergic neurons located in the substantia nigra pars compacta in the midbrain, resulting in motor dysfunction. Levodopa (L-DOPA) is still the "gold standard" drug for the dopamine replacement in PD, alleviating the motor symptoms of the disease. However, L-DOPA causes a series of collateral effects. Diosmin (DM) is an already marketed drug, composed of a purified flavonoic fraction, in micronized form of 90% diosmin and 10% hesperidin. It is used for the symptomatic treatment of symptoms related to Chronic Venous Insufficiency. Several studies confirm the antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and neuroprotective activity of the components of this drug. In this context, the discovery of new drugs that may prevent the progression of PD and reduce the adverse effects of traditional treatments is necessary, so it was aimed to study the effects of diosmin alone or associated with L-DOPA in the experimental model of DP induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). For this, unilateral 6-OHDA (21 µg/animal) lesions in the right striatum were treated with DM (50, 100 and 200 mg/kg); L-DOPA (25 mg/kg) or DM 100 mg/kg in combination with L-DOPA 12.5 mg/kg for 14 days, starting 7 days post-surgery. On the 21st day, the animals were submitted to specific behavioral tests (Open field test, Rotarod and Rotational Test). After, the animals were sacrificed, and its brain areas were dissected for neurochemical analyzes (reduced glutathione, lipid peroxidation and nitrite). DM (100 mg/kg v.o.) was able to reverse motor deficits induced by 6-OHDA, as well as increased the levels of reduced glutathione (GSH) and substantially reduced nitrite / nitrate levels. In addition, the association of Diosmin with sub-dose of Levodopa showed some effects better than L-DOPA alone at a higher dose. Nevertheless, DM did not show modulation in the malondialdehyde levels in the brains areas from hemiparkinsonian's animals. Thus, DM revealed a neuroprotective activity against motor and neurochemical disturbs in 6-OHDA-injured hemiparkinsonian rats. Additionally, our data suggest a possible efficiency in the association between DM with L-DOPA for treatment of motor deficit induced by 6-OHDA in rats.

**Keywords:** 6-hydroxydopamine. Diosmin. Parkinson's disease.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Célcus
µL	Microlitros
µM	Micromolar
µMol	Micromol
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase
A/ABS	Absorbância
AP	Antero-posterior
ATP	Adenina trifosfatada
ATV	Área tegmental ventral
CE	Corpo estriado
CEPA	Comissão de Ética em Pesquisa Animal
COMT	Catecol-O-metil transferase
CPF	Córtex Pré-frontal
Cm	Centímetros
DAT	Transportador de Dopamina
DM	Diosmin
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença de Parkinson
DTNB	Ácido 2-nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramas
GABA	Ácido inibitório gama-aminobutírico
GPe	Globo pálido externo
GPI	Globo pálido interno
GSH	Glutathione reduzida
h	Hora
H <sup>+</sup>	Próton de Hidrogênio
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Ácido fosfórico
HC	Hipocampo
HCl	Ácido clorídrico
i.p.	Intraperitoneal
IL1β	Interleucina 1 beta
iNOS/NOS2	Óxido nítrico sintase induzida
ipsi	Ipsilateral
K <sup>+</sup>	Íon de Potássio
KCl	Cloreto de potássio
Kg	Quilogramas

L	Médio-lateral
LD	Levodopa
MDA	Malonildialdeído
Mg	Miligramas
Mg <sup>2+</sup>	Magnésio
min	Minutos
mM	Milimolar
MAO	Monoaminas oxidase
n	Quantidade de animais por grupo
NaNO <sub>2</sub>	Nitrito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEED	N-naftil-etilenodiamina
Nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
OH	Hidroxila
<i>Per os</i>	Via oral
pH	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SNpc	Substância negra pars compacta
SNpr	Substância negra pars reticulada
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidades
UFC	Universidade Federal do Ceará
V	Vertical
VMAT	Antiportador de prótons não-seletivo de monoaminas
Vol	Volume

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	– Síntese de dopamina e neurotransmissão dopaminérgica.....	19
<b>Figura 02</b>	– Representação esquemática dos dois principais circuitos dopaminérgicos no cérebro - via nigroestriatal e via mesocorticolímbica.....	21
<b>Figura 03</b>	– Organização Funcional dos Circuitos dos Núcleos da Base Afetados na Doença de Parkinson.....	22
<b>Figura 04</b>	– Comunicação entre os gânglios da base e o cerebelo.....	24
<b>Figura 05</b>	– Curso temporal da lesão nigrostriatal após injeção intrastriatal de 6-OHDA no cérebro de ratos.....	29
<b>Figura 06</b>	– Estruturas químicas da diosmina e da hesperidina.....	32
<b>Figura 07</b>	– Estrutura química da diosmetina.....	33
<b>Figura 08</b>	– Mecanismo neuronal da noradrenalina na vasoconstrição e vasodilatação dos vasos sanguíneos.....	34
<b>Figura 09</b>	– Ilustração do Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).....	38
<b>Figura 10</b>	– Representação esquemática temporal do procedimento de indução do parkinsonismo até o comportamento.....	40
<b>Figura 11</b>	– Teste de Campo aberto para ratos.....	41
<b>Figura 12</b>	– Teste de <i>Rotarod</i> em ratos.....	42
<b>Figura 13</b>	– Teste rotacional induzido por apomorfina.....	43
<b>Figura 14</b>	– Áreas cerebrais para avaliações neuroquímicas.....	44
<b>Figura 15</b>	– Ilustração da Reação de Griess.....	45
<b>Figura 16</b>	– Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos.....	46
<b>Figura 17</b>	– Reação entre a glutatona reduzida e DTNB (reagente de Ellman) para a determinação de hidroperóxidos empregando a enzima glutatona reduzida.....	47
<b>Figura 18</b>	– Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto ( <i>Open field test</i> )	50
<b>Figura 19</b>	– Análise da atividade motora no Teste de <i>Rotarod</i> .....	52
<b>Figura 20</b>	– Teste Rotacional Induzido por Apomorfina.....	53
<b>Figura 21</b>	– Análise Temporal da Variação Rotacional.....	54
<b>Figura 22</b>	– Análise dos níveis de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais.....	56
<b>Figura 23</b>	– Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) em áreas cerebrais....	58
<b>Figura 24</b>	– Análise dos níveis de Glutatona reduzida (GSH) nas áreas cerebrais.....	60
<b>Figura 25</b>	– Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto ( <i>Open field test</i> )	62
<b>Figura 26</b>	– Análise da atividade motora no Teste de <i>Rotarod</i> .....	64

<b>Figura 27</b> – Teste Rotacional Induzido por Apomorfina.....	65
<b>Figura 28</b> – Análise Temporal da Variação Rotacional.....	66
<b>Figura 29</b> – Análise dos níveis de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais.....	68
<b>Figura 30</b> – Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) em áreas cerebrais.....	70
<b>Figura 31</b> – Análise dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) nas áreas cerebrais.....	72

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Doença de Parkinson: Desafios e Perspectivas.....	14
1.1.2	Epidemiologia, Aspectos Econômicos e Taxa de mortalidade da Doença de Parkinson.....	16
1.2	Síntese de dopamina e neurotransmissão dopaminérgica.....	17
1.3	Outras áreas cerebrais estão envolvidas na fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	23
1.4	Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	25
1.5	Modelo animal da Doença de Parkinson em roedores com 6-hidroxidopamina (6-OHDA).....	27
1.6	Levopa: o tratamento padrão-ouro para o controle dos sintomas motores da Doença de Parkinson.....	30
1.7	Flavonóides.....	31
1.7.1	Diosmin.....	32
1.7.1.1	Mecanismo de Ação do Diosmin e bases para a sua atividade neuroprotetora.....	33
2	OBJETIVOS.....	36
2.1	Objetivo geral.....	36
2.1.1	Objetivos específicos.....	36
3	METODOLOGIA.....	37
3.1	Animais.....	37
3.1.1	Aspectos Éticos.....	37
3.1.2	Modelo Experimental de Doença de Parkinson através da neurodegeneração induzida por 6-OHDA em ratos.....	37
3.1.2.1	Cirurgia estereotáxica.....	37
3.2	Diosmin: fração flavonoica purificada, sob forma micronizada de 90% diosmina e 10% hesperidina.....	39
3.3	Levodopa.....	39
3.4	Tratamento farmacológico.....	39
3.5	Estudo Comportamental.....	40
3.5.1	Avaliação da Atividade Locomotora.....	41
3.5.1.1	Teste do Campo Aberto.....	41
3.5.2	Avaliação da Coordenação Motora.....	42
3.5.2.1	Teste do <i>Rotarod</i> .....	42
3.5.3	Teste Rotacional.....	43
3.6	Dissecação das Áreas Cerebrais.....	44
3.7	Análises Neuroquímicas Relacionadas a Neurodegeneração.....	44
3.7.1	Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato.....	44
3.7.2	Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS).....	45
3.7.3	Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH).....	46
3.8	Análise Estatística.....	47

4	RESULTADOS.....	49
4.1	Resultados da 1° ETAPA – Levantamento da Melhor Dose de Diosmin.....	49
4.1.1	Avaliação da Atividade Locomotora.....	49
4.1.1.1	Teste de Campo Aberto (Open Field Test).....	49
4.1.1.2	Teste do <i>Rotarod</i> .....	51
4.1.1.3	Teste Rotacional Induzido por apomorfina.....	52
4.2	Análises Neuroquímicas.....	54
4.2.1	Determinação das Concentrações de Nitrito (NO <sub>2</sub> )/ Nitrato (NO <sub>3</sub> ) em diferentes áreas cerebrais.....	54
4.2.2	Determinações dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em diferentes áreas cerebrais.....	57
4.2.3	Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) em áreas Cerebrais.....	59
4.3	Resultados da 2° ETAPA – Associação da melhor dose de Diosmin (100 mg/kg) com Levodopa em sub-dose.....	61
4.3.1	Avaliação da Atividade Locomotora.....	61
4.3.1.1	Teste de Campo Aberto ( <i>Open Field Test</i> ).....	61
4.3.1.2	Teste do <i>Rotarod</i> .....	62
4.3.1.3	Teste Rotacional Induzido por apomorfina.....	64
4.4	Análises Neuroquímicas.....	66
4.4.1	Determinação das Concentrações de Nitrito (NO <sub>2</sub> )/Nitrato (NO <sub>3</sub> ) em diferentes áreas cerebrais.....	66
4.4.2	Determinações dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em diferentes áreas cerebrais.....	69
4.4.3	Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) em áreas cerebrais.....	71
5	DISCUSSÃO.....	73
6	CONCLUSÃO.....	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson: Desafios e Perspectivas

Textos da cultura indiana contendo descrições sobre a Doença de Parkinson (DP) datam de 1000 a.c., fontes chinesas também fornecem descrições acerca da doença, mas a primeira descrição médica só ocorreu em 1817 por James Parkinson. Parkinson escreveu um pequeno tratado sobre uma condição que ele tinha observado entre seis de seus pacientes (BARNETT, 2016; GOETZ, 2011).

“Movimento involuntário trêmulo, com potência muscular diminuída, em partes que não estão em ação e até mesmo quando apoiada; com uma propensão para dobrar o tronco para a frente, e para passar de um andar a um ritmo de marcha: os sentidos e intelectos sendo ilesos” (PARKINSON, 1817).

Parkinson chamou esta doença de paralisia agitante. Mais de 50 anos depois, Jean-Martin Charcot condenou o uso do termo "paralisia agitante" porque reconheceu que os pacientes não são marcadamente fracos e não necessariamente têm tremor. Ele sugeriu a utilização do termo “Doença de Parkinson” em homenagem a James Parkinson e separou a doença de Parkinson de esclerose múltipla e outras doenças caracterizadas por tremores (GOETZ, 2011).

A degeneração da substância negra do mesencéfalo foi relacionada à Doença de Parkinson só em 1920 por Tretiakoff. No final de 1950 a descoberta da localização da dopamina no estriado levou a hipótese do papel da perda de dopamina na patogênese da doença de Parkinson (GOETZ, 2011). Desta forma, Bertler e Rosengred (1959) concluíram que “a dopamina está relacionada com a função do estriado e, portanto, com o controle de movimento”.

A doença de Parkinson (DP) é uma das desordens neurodegenerativas progressivas relacionada com a idade mais comum. Caracterizada pela morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância *nigra pars compacta* no sistema nervoso central. Esses neurônios são produtores do neurotransmissor dopamina, envolvidos na coordenação no sistema motor. Apesar da etiologia desta doença ser desconhecida, todos os pacientes com DP apresentam no sistema nervoso central e periférico os chamados "corpos de Lewy", que são agregados intracelulares de  $\alpha$ -sinucleína mal dobradas (MAZZETTI et al., 2015; STANDAERT; GALANTER, 2014).

A destruição dos neurônios dopaminérgicos resulta nas características fundamentais 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; com frequência, observa-se uma perda de 95% dos neurônios na necropsia (STANDAERT; GALANTER, 2014; WU; HALLETT; CHAN, 2015).

A DP normalmente afeta um lado do corpo antes de progredir e envolver o outro lado. Há um constante agravamento dos sintomas ao longo do tempo, e se não tratada, leva 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 foram classificadas como não-motoras. Estes incluem fadiga, depressão, ansiedade, distúrbios do sono, prisão de ventre, incontinência urinária e outros distúrbios autonômicos (sexuais, gastrointestinais), queixas sensoriais, diminuição da motivação e apatia, lentidão no pensamento (bradifrenia), e um declínio cognitivo que pode evoluir para demência (FAHN; SULZER, 2004).

A etiologia da morte neuronal na DP ainda não está clara. 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, fatores ambientais, ação tóxica do óxido nítrico, além de fatores hereditários e ambientais. Estes múltiplos fatores interagem mutuamente e induzem um ciclo vicioso de toxicidade que faz com que a plasticidade sináptica seja alterada, causando alterações morfológicas e finalmente morte celular (CALABRESI et al., 2015).

As atuais abordagens terapêuticas podem aliviar os sintomas clínicos, mas não podem curar a doença. A DP é normalmente tratada com terapias de reposição de dopamina orais, comumente com o precursor de dopamina: a levodopa (L-DOPA) (CALABRESI et al., 2015). Sintetizada pela primeira vez em 1910 por G. Barger e J. Ewens, a levodopa foi injetada pela primeira vez em pacientes parkinsonianos em 1961 por Birkmayer, cujo os efeitos foram rapidamente observados e publicados (GOETZ, 2011).

Desde então a L-DOPA tem fornecido um excelente controle dos sintomas motores nos estágios iniciais da doença. No entanto, a longo prazo o tratamento leva a complicações motoras e, ocasionalmente, distúrbios de controle de impulsos causados por intermitente estimulação de receptores de dopamina e efeitos “ON/OFF”, além da necessidade do aumento da frequência e das doses de levodopa (CALABRESI et al., 2015; PALFI et al., 2014).

Na busca de compostos que possam prevenir, impedir o progresso ou até mesmo encontrar a tão esperada cura da DP, pesquisadores tem investido suas esperanças em



compostos naturais que possam substituir ou ao menos amenizar os efeitos colaterais ocasionados pelos tratamentos convencionais usados para o tratamento de pacientes com Doença de Parkinson. Os flavonóides são fitoquímicos encontrados de forma natural em uma variedade de frutas e legumes que conferem cor, sabor e aroma aos alimentos e exibem um grande número de atividades biológicas, tais como antioxidante, antitumoral, antiplaquetários, antimalária, anti-inflamatórios, antidepressivos e propriedades anticonvulsivantes (GUAN; LIU, 2016; TESTA et al., 2016).

### **1.1.2 Epidemiologia, Aspectos Econômicos e Taxa de mortalidade da Doença de Parkinson**

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que 1% da população acima dos 65 anos sofre com a Doença de Parkinson. 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).

Em termos globais, O custo econômico total da DP em 2014 foi de mais de 9,9 bilhões de dólares, isso representa um aumento de US \$ 3,2 bilhões desde 2005, ou 46%. Na Europa 1,2 milhões de pessoas têm Parkinson: cerca de 260 mil na Alemanha; 200.000 na Itália; 150.000 na Espanha; 120.000 no Reino Unido e 117.000 em França (EUROPEAN PARKINSON'S DISEASE ASSOCIATION, 2016). Na Austrália, 1 a cada 340 habitantes vive com DP (DELOITTE ACCESS ECONOMICS, 2015). Na Alemanha a taxa de incidência da Doença de Parkinson é de 192 a 229/100 000 pessoas por ano (NERIUS; FINK; DOBLHAMMER, 2016)

Segundo levantamento de Macleod, Taylor e Counsell (2014), a sobrevida em pacientes com DP diminui em média 5% ao ano, e a duração do início da doença para a morte em uma série de pacientes falecidos varia de 7 a 14 anos. A idade mais avançada no início e a presença de demência foram mais consistentemente encontradas como preditores

independentes de mortalidade. Ainda segundo os autores não há evidências de que a L-DOPA conduza a uma redução da mortalidade na DP. Xu e colaboradores (2014) verificaram que a taxa de mortalidade em indivíduos com DP, aumentou 2,22 vezes em relação à população geral.

## **1.2 Síntese de dopamina e neurotransmissão dopaminérgica**

O sistema nervoso pode ser dividido em sistema nervoso central (SNC), composto pelo encéfalo e pela medula espinal, e sistema nervoso periférico (SNP), composto de todos os nervos e seus componentes fora do SNC. A segunda população de células, as chamadas células gliais, tem a função de apoiar e proteger os neurônios. As células gliais também participam da atividade neuronal, formam um reservatório de células-tronco no interior do sistema nervoso e propiciam a resposta imunológica a inflamações e lesões (KREBS; WEINBERG; AKESSON, 2013).

Mais de 100 milhões de neurônios preenchem o sistema nervoso humano. Cada neurônio tem contato com mais de mil outros neurônios. Os contatos neuronais são organizados em circuitos ou redes que se comunicam para o processamento de todas as informações conscientes e inconscientes do encéfalo e da medula espinal. Qualquer desregulação desse circuito pode levar ao desenvolvimento de anomalias que resultam em doenças (KREBS; WEINBERG; AKESSON, 2013).

No tronco encefálico de vertebrados, uma região denominada mesencéfalo abriga uma coleção de neurônios que expressam a dopamina. Na Doença de Parkinson uma degeneração acentuada desses neurônios ocorre na parte compacta da substância negra, uma região de coloração escurecida com conteúdo excepcionalmente alto de melanina em suas células (VOGT WEISENHORN; GIESERT; WURST, 2016). A degeneração acentuada dos neurônios dopaminérgicos leva ao esgotamento de dopamina (DA) nas suas projeções do corpo estriado, e de outros neurônios do tronco cerebral (ARMANDO et al., 2016). Além do controle dos movimentos voluntários, a DA desempenha várias funções no cérebro: na modulação do comportamento e cognição; motivação; punição e recompensa; inibição da produção de prolactina; dormir; sonhar; humor; atenção; memória de trabalho e aprendizagem (OLGUÍN et al., 2016).

A dopamina é produzida a partir do aminoácido neutro, tirosina. A maior parte da tirosina é obtida da dieta, e uma pequena proporção também pode ser sintetizada no fígado a partir da fenilalanina. A primeira etapa na síntese de DA consiste na conversão da tirosina em L-DOPA (l-3,4- diidroxifenilalanina). Essa reação é catalisada pela enzima tirosina hidroxilase

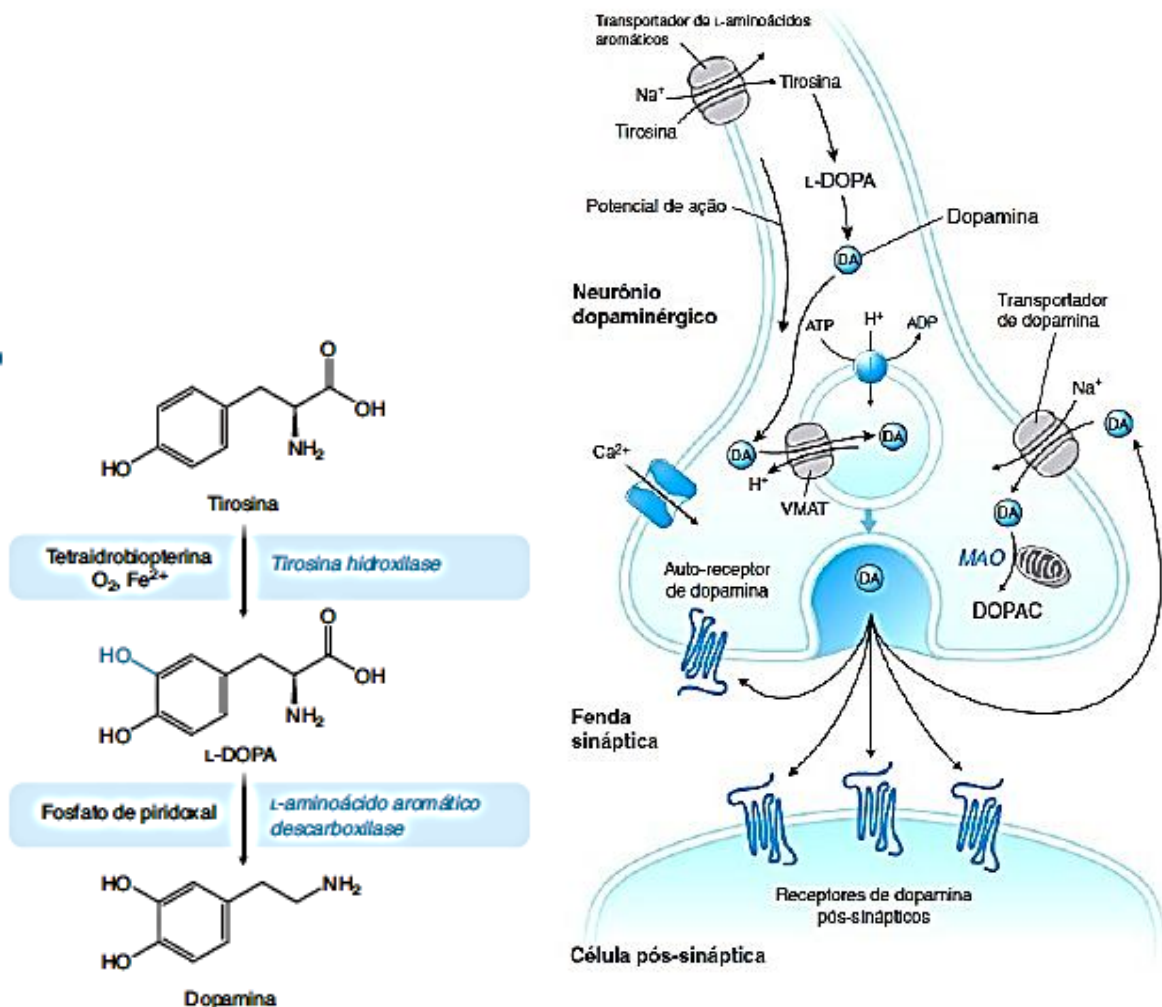
(TH). A próxima e última etapa na síntese de DA consiste na conversão da L-DOPA em DA pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (STANDAERT; GALANTER, 2014).

A Dopamina é transportada no interior de vesículas secretoras para armazenamento e liberação pela ação de um antiportador de prótons não-seletivo de monoaminas (VMAT), que é impulsionado pelo gradiente eletroquímico criado por uma ATPase de prótons. Com a estimulação da célula nervosa, as vesículas de armazenamento de DA fundem-se com a membrana plasmática de modo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ , liberando DA na fenda sináptica (STANDAERT; GALANTER, 2014).

Na fenda, a DA pode ligar-se tanto a receptores de DA pós-sinápticos quanto a auto-receptores de Dopamina pré-sinápticos. Os receptores de dopamina são categorizados em duas famílias principais: a família D1, compreendendo os receptores D1 e D5, e a família D2, compreendendo os receptores D2, D3 e D4. Ambas as classes de receptores D1 e D2 são receptores acoplados a proteína G (RANGANATH; JACOB, 2016). A maior parte da Dopamina liberada na fenda sináptica é transportada de volta à célula pré-sináptica por uma proteína de 11 domínios transmembrana, o transportador de dopamina (DAT). A DA captada no interior da célula pré-sináptica pode ser reciclada em vesículas para uso subsequente na neurotransmissão (pelo VMAT) ou pode ser degradada pela ação das enzimas monoaminas oxidase (MAO) ou catecol-O-metil transferase (COMT) (STANDAERT; GALANTER, 2014).

O mecanismo de síntese e neurotransmissão dopaminérgica pode ser melhor compreendido na figura 01.

Figura 01 - Síntese de dopamina e neurotransmissão dopaminérgica.



Fonte: STANDAERT; GALANTER, 2014.

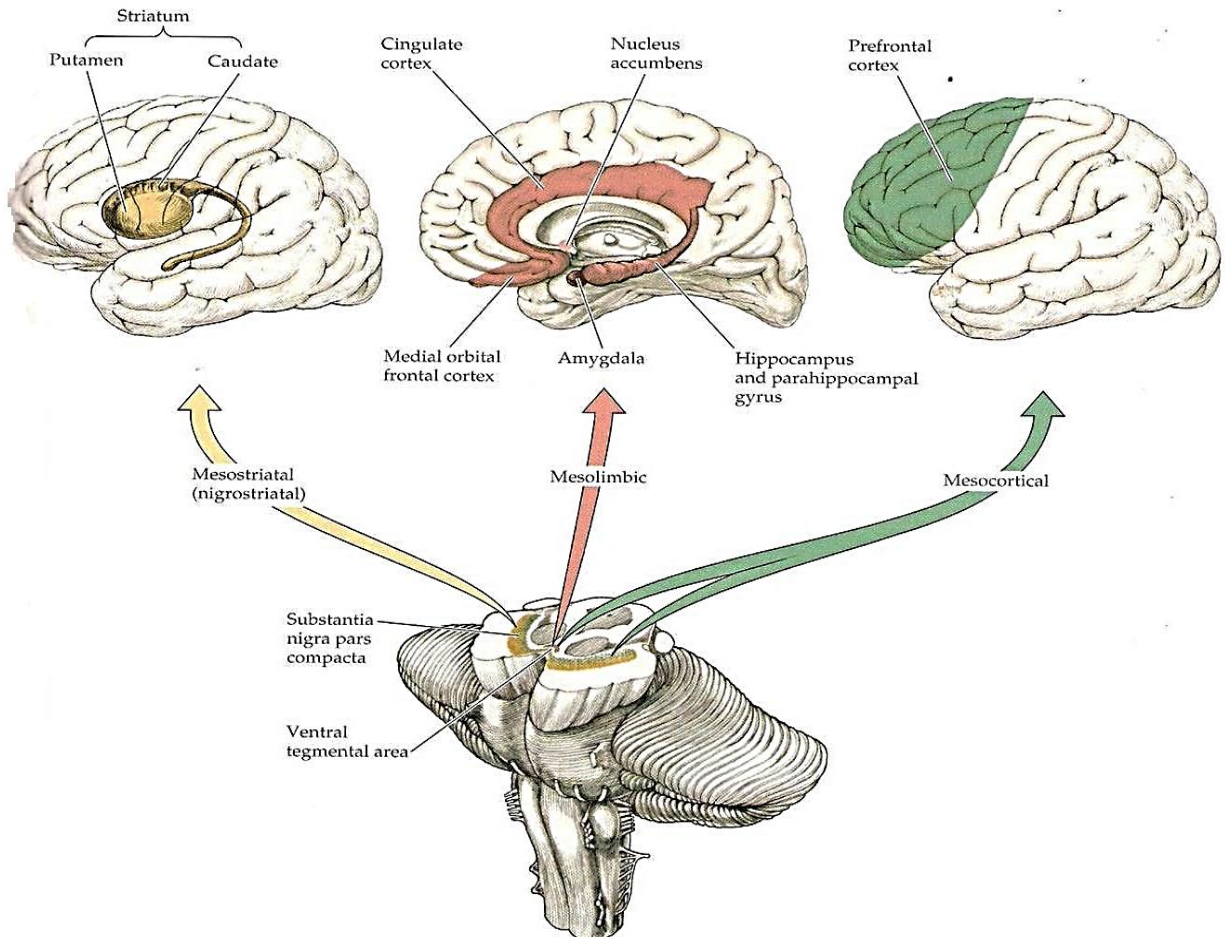
Os neurônios dopaminérgicos originam-se de uma população de células progenitoras localizadas na placa mesencefálica, nomeadamente a zona ventricular ventral. Após a diferenciação, esses neurônios migram para formar diferentes subgrupos de neurônios dopaminérgicos. Assim, no cérebro dos mamíferos, podem distinguir-se nove grupos de células dopaminérgicas (A8-A17) (STIEVENARD et al., 2016; VOGT WEISENHORN; GIESERT; WURST, 2016).

Entre esses grupos, podemos destacar dois núcleos principais: a substância *nigra pars compacta* (SNpc, grupo A9) e a área tegmental ventral (ATV, grupo A10). Os neurônios dopaminérgicos SNpc enviam projeções para o estriado dorsal dentro da via nigroestriatal e regulam o controle voluntário do movimento como parte dos circuitos dos gânglios da base

(GB). Sua degeneração resulta na doença de Parkinson. Enquanto isso, os neurónios dopaminérgicos ATV projetam para o estriado ventral contendo o núcleo *accumbens*, bem como para a amígdala e o córtex pré-frontal através da via mesocorticolímbica (Figura 02) (LUO; HUANG, 2016; STIEVENARD et al., 2016).

A dopamina liberada da via nigrostriatal modula a transmissão corticostriatal em neurónios espinhosos médios expressando receptores D1 ou D2 de dopamina, o que leva à ativação ou supressão de movimento. A via mesocorticolímbica regula as funções cognitivas, incluindo emoção, motivação, recompensa e comportamentos viciantes. Disfunções nesses neurónios têm sido implicadas em transtornos psiquiátricos (LUO; HUANG, 2016). A proximidade anatômica e neuroquímica compartilhada dessas duas vias contribuem para o ajuste fino de comportamentos motivados, a modulação da droga de uma via dopaminérgica afetará a outra (STIEVENARD et al., 2016).

Figura 02 – Representação esquemática dos dois principais circuitos dopaminérgicos no cérebro - via nigroestriatal e via mesocorticolímbica.



**Fonte:** Google imagens, 2017. **Legenda:** Representação esquemática dos dois principais circuitos dopaminérgicos no cérebro de humanos. Localização das principais estruturas mesencéfalicas dopaminérgicas no cérebro. Os neurônios dopaminérgicos da *substantia nigra pars compacta* (SNpc, em amarelo) projetam-se para o estriado dorsal contendo o núcleo caudado e o putamen. Os neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (ATV, vermelho e verde) projetam-se para o núcleo accumbens localizado no estriado ventral, na amígdala e no córtex pré-frontal.

Os gânglios da base consistem no corpo estriado (núcleo caudado e putamen), os segmentos internos e externos do globus pallidus (GPi e GPe respectivamente), o núcleo subtalâmico (NST) e a substância negra (SN) que é composta por uma camada superior, densa de células e uma camada mais baixa, escassa de células, denominadas substância negra *pars compacta* (SNpc) e substância negra *pars reticulada* (SNpr), respectivamente (GALVAN; DEVERGNAS; WICHMANN, 2015; VOGT WEISENHORN; GIESERT; WURST, 2016).

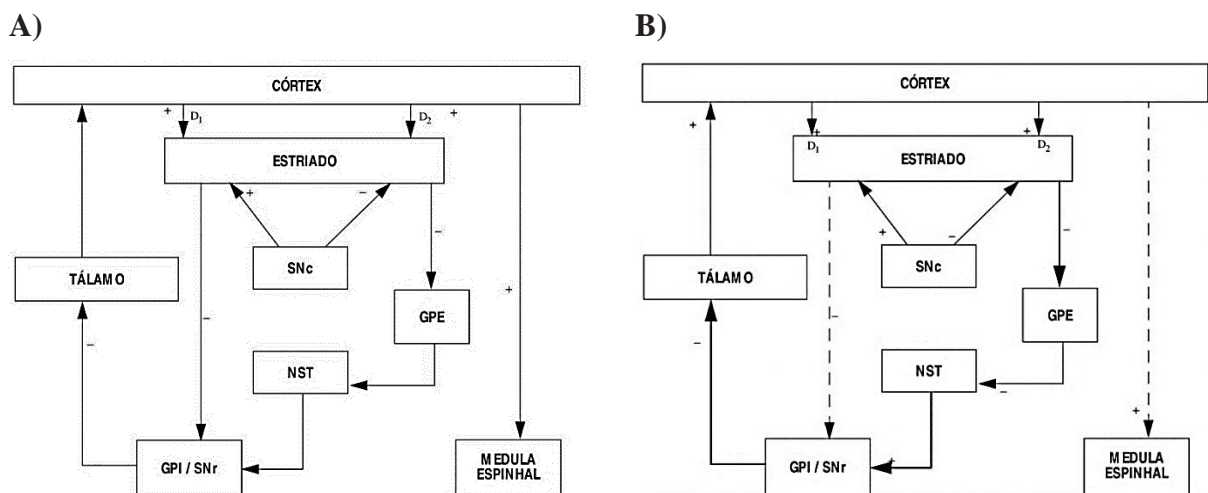
A principal região de entrada do GB é o estriado, que recebe impulsos excitatórios de muitas regiões do córtex cerebral. Cerca de 90% das células estriatais são neurônios

espinhosos médios que liberam o ácido inibitório gama-aminobutírico (GABA) e têm receptores da dopamina D1 ou D2 que inervam núcleos alvo distintos, formando a via direta e indireta (MAGRINELLI et al., 2016; SARKAR; RAYMICK; IMAM, 2016).

As principais regiões de saída da GB são GPi e SNpr, que projetam para a atividade de modulação tálamo de regiões corticais e para o tronco cerebral. O neurotransmissor principal do circuito GB é o GABA, enquanto que os neurônios do NST utilizam o glutamato excitatório e os SNpc utilizam a dopamina (MAGRINELLI et al., 2016).

Na via direta, os neurônios estriatais expressam primariamente receptores D1 de dopamina, estes projetam-se para a saída dos núcleos basais, o GPi. Estes últimos neurônios inibem tonicamente o tálamo. Com a inibição do GPi, o tálamo envia projeções excitatórias ao córtex via glutamato que dão início ao movimento. Enquanto na via indireta, os neurônios estriatais expressam predominantemente receptores D2 e projetam-se para o GPe, que inibem tonicamente neurônios do núcleo subtalâmico. Com o inibição do GPe, os neurônios do NST podem estimular neurônios no segmento interno do globo pálido a inibir o tálamo, inibindo o movimento (Figura 03A) (STANDAERT; GALANTER, 2014).

Figura 03 - Organização Funcional dos Circuitos dos Núcleos da Base Afetados na Doença de Parkinson.



**Fonte:** BEDIN, FERRAZ, 2003, adaptado de ALEXANDER, CRUTCHER, 1990. **Legenda:** Organização Funcional dos Circuitos dos Núcleos da Base. A: Organização Funcional dos Circuitos da via direta e indireta nos núcleos da base. B: Organização Funcional dos Circuitos da via direta e indireta nos núcleos da base na Doença de Parkinson. SNc (substância negra compacta); SNr (substância negra reticulada); GPE (globo pálido externo); GPI (globo pálido interno); NST (núcleo subtalâmico)

A presença de níveis aumentados de dopamina no estriado tende a ativar neurônios que expressam D1 na via direta, enquanto inibe os neurônios da via indireta que expressam D2. Na DP, os níveis reduzidos de dopamina dos gânglios basais causam alterações nas funções das vias dos gânglios basais através de alterações na excitabilidade neuronal e plasticidade sináptica. A eficácia da via direta excitatória dos gânglios basais diminui enquanto a eficácia da via indireta inibitória aumenta resultando em aumento da atividade de disparo neuronal nos núcleos de saída da GB e levando a uma inibição excessiva dos sistemas motores talamo-cortical e de tronco cerebral, interferindo com a velocidade normal de início e execução do movimento (Figura 03B) (MAGRINELLI et al., 2016; SCHROLL; HAMKER, 2016; STANDAERT; GALANTER, 2014).

### **1.3 Outras áreas cerebrais estão envolvidas na fisiopatologia da Doença de Parkinson**

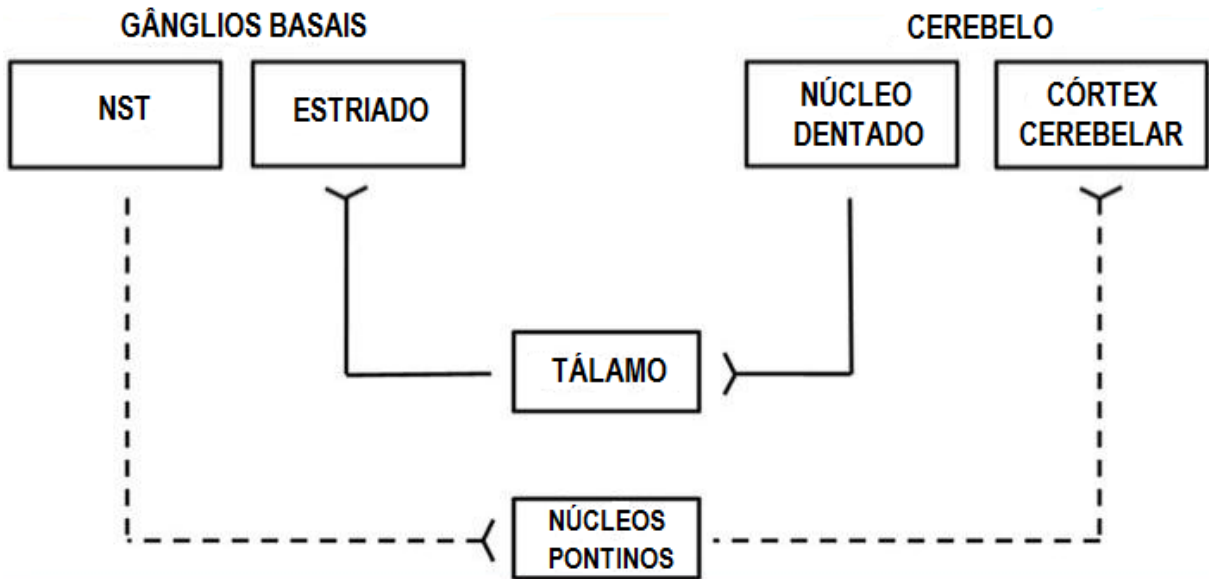
Os gânglios basais são os principais alvos clínicos e de pesquisa na doença de Parkinson, mais recentemente, tornou-se evidente a importância da degeneração adicional, incluindo outros sistemas catecolaminérgicos. Importante na coordenação do movimento voluntário, da marcha, da postura e das funções motoras, o cerebelo tem sido associado à fisiopatologia da Doença de Parkinson (WU; HALLETT, 2013).

Estudos anatômicos identificaram conexões recíprocas entre os gânglios da base e o cerebelo. Existem alterações patológicas relacionadas com a doença de Parkinson no cerebelo, além disso, foram detectadas modulações funcionais e morfológicas no cerebelo relacionadas à acinesia / rigidez, tremor, distúrbio da marcha, discinesia e alguns sintomas não motores. A GB e o cerebelo modulam a atividade de áreas corticais cerebrais em grande parte sobrepostas através de laços multissinápticos, que tradicionalmente se supunham estar separados (MAGRINELLI et al., 2016; WU; HALLETT, 2013).

Estudos recentes mostraram que o núcleo dentado do cerebelo se projeta para o estriado e para o Glóbo Pálido externo e que o Núcleo Subtalâmico tem projeções disinápticas topográficas para o córtex cerebelar através dos núcleos pontinos (BOSTAN; DUM; STRICK, 2010). Mostrando que o cerebelo e os gânglios da base têm comunicações bidirecionais substanciais entre si formando uma rede funcional integrada (Figura 04), sugerindo uma participação do cerebelo nos domínios motor e não motor (MAGRINELLI et al., 2016; WU; HALLETT, 2013).



Figura 04 – Comunicação entre os gânglios da base e o cerebelo.



**Fonte:** Adaptado de BOSTAN; DUM; STRICK, 2010. **Lengenda:** A linha contínua indica a projeção do núcleo dentado para o estriado, enquanto a linha pontilhada indica a projeção do núcleo subtalâmico para o córtex cerebelar. NST = núcleo subtalâmico.

Outra área que ganha crescente atenção no envolvimento com a Doença de Parkinson é o hipocampo, uma estrutura do lobo temporal envolvida no aprendizado fisiológico e na memória. O hipocampo parece estar implicada na disfunção cognitiva observada em alguns pacientes com doença de Parkinson (CALABRESI et al., 2013; REGENSBURGER; PROTS; WINNER, 2014).

Na visão tradicional da doença de Parkinson, o hipocampo não foi considerado como tendo um papel, com exceção de suas possíveis implicações na demência, porém, dados emergentes sugerem interações entre os sistemas dopaminérgicos e o hipocampo na plasticidade sináptica, memória adaptativa e comportamento motivado. O hipocampo é modulado pela entrada dopaminérgica a partir da área tegmental ventral e do bulbo olfatório e pela entrada noradrenérgica do locus coeruleus, podendo, assim, estar envolvidos na regulação motora e do humor (CALABRESI et al., 2013; REGENSBURGER; PROTS; WINNER, 2014).

Uma ampla gama de sintomas não-motores, como distúrbio do comportamento do sono, do movimento rápido dos olhos, constipação, depressão, ansiedade e apatia está presente em pacientes com Doença de Parkinson, que ocorrem não apenas nos estádios avançados, mas também nas fases iniciais, podendo preceder o início da doença motora. Esses déficits cognitivos têm sido principalmente implicados na disfunção colinérgica e noradrenérgica

envolvendo funções do hipocampo (CALABRESI et al., 2013; REGENSBURGER; PROTS; WINNER, 2014).

#### 1.4 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

Apesar da etiologia da Doença de Parkinson ser desconhecida, todos os pacientes com DP apresentam no sistema nervoso central e periférico os chamados "corpos de Lewy". Os corpos de Lewy (CL) e neurites de Lewy são inclusões citoplasmáticas eosinofílicas constituídas por várias estruturas de natureza protéica encontradas em áreas de degeneração celular, podendo ser consideradas como marcadores de perda neuronal (MAZZETTI et al., 2015; STANDAERT; GALANTER, 2014; VOLPICELLI-DALEY et al., 2016).

O principal constituinte desses corpos é a  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -Syn), uma proteína neuronal de função ainda pouco caracterizada, predominantemente expressa no cérebro em terminais pré-sinápticos, particularmente no neocórtex, hipocampo, estriado, tálamo e cerebelo (SALAHUDDIN et al., 2016). Mutações pontuais, duplicação de genes e eventos de triplicação no *locus*  $\alpha$ -Syn foram identificados numa série de famílias com DP de início precoce dominante autossômica (KOUKOURAKI; DOXAKIS, 2016). Quando mutado ou sobre-expressos,  $\alpha$ -Syn afeta várias vias de transporte de membrana e de esforço, incluindo exocitose, transporte do Retículo Endoplasmático (RE) ao Complexo de Golgi (CG), estresse do RE, homeostase no CG, endocitose, autofagia, estresse oxidativo e outros (WANG; HAY, 2015).

Substâncias tóxicas são geradas durante o transporte de elétrons, reações enzimáticas, de auto-oxidação, ou ainda, pelo grupo heme de proteínas, comumente chamadas de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio livre ( $O_2$ ), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil. Um radical livre é definido como um átomo ou molécula de qualquer espécie que contém um ou mais elétrons não pareados. Esses radicais são capazes de reagir rapidamente com vários compostos ou atingir alvos celulares, como as membranas lipídicas, causando danos às células, inclusive a morte celular (ANSCHAU; IAGUER, 2011).

As mitocôndrias são uma importante fonte de espécies reativas de oxigênio, produzidos como subprodutos da fosforilação oxidativa normal, em particular, os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons. EROs são importantes moléculas de sinalização intracelular que regulam a diferenciação, o crescimento, a morte celular e envelhecimento. O cérebro é um dos órgãos mais vulneráveis aos efeitos das EROs por causa de sua alta demanda de oxigênio e sua abundância de células suscetíveis a peroxidação lipídica. Pequenos aumentos

nos níveis de EROS podem estimular vias celulares a obter respostas antioxidantes e proteger as células contra insultos maiores posteriores à sinalização. Por outro lado, o excesso de EROS contribui para a peroxidação lipídica, danos no DNA, a inibição da atividade da cadeia respiratória mitocondrial, e em última análise, a morte celular neuronal (BINGOL; SHENG, 2016; CHATURVEDI; BEAL, 2013; KIM et al., 2015).

A substância *nigra pars compacta* é uma região particularmente sensível a EROs, provavelmente por causa da presença da dopamina endógena, ferro e neuromelanine. Além disso, nesta área o sistema de defesa antioxidante e desintoxicante são fracos devido aos baixos níveis de GSH. A glutatona reduzida e os sistemas antioxidantes à base de GSH são importantes reguladores de neurodegeneração associada à DP. Todo esse desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes podem afetar o aparecimento e/ ou o curso de um número de doenças comuns, incluindo a doença de Parkinson e doenças de Alzheimer (MAZZETTI et al., 2015).

Outro fator envolvido na patologia da DP é a ativação da microglia, células do sistema imunológico residentes no cérebro. Como macrófagos residentes no SNC, a microglia é classicamente vista como a primeira linha de defesa da resposta imune a insultos do SNC e condições patológicas. Sob condições neuropatológicas, a microglia passa de um vigilante para um estado reativo. As microglias ativadas podem produzir várias moléculas potencialmente neurotóxicas, incluindo o óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) (CARTA et al., 2017; JUNG; LEEM; KIM, 2014).

O óxido nítrico (NO) regula vários processos patológicos e fisiológicos no corpo de mamíferos, dependendo da sua concentração e local de produção. Um nível definido de NO é necessário para as funções fisiológicas normais. No entanto, uma produção excessiva de NO na célula está associada à redução da defesa antioxidante, o que torna as células mais vulneráveis. Devido à natureza muito instável, NO é convertido em nitrito, peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio que pode levar ao estresse nitrosativo no sistema nigroestriatal. Estresse nitrosativo é amplamente implicado na Doença de Parkinson (GUPTA et al., 2014).

### **1.5 Modelo animal da Doença de Parkinson em roedores induzido com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA)**

O uso de animais e células para modelar diferentes aspectos da Doença de Parkinson possibilita o estudo tanto da progressão da doença, como também permite explorar possíveis tratamentos. Embora, nenhum dos modelos animais ou celulares atuais de DP contemplem todas as características fisiopatológicas prevalentes desta doença em humanos, eles têm contribuído amplamente para o conhecimento da Doença de Parkinson. Atualmente existem modelos animais e celulares induzidos por toxinas e modelos genéticos (DUTTA; ZHANG; LIU, 2008; JAGMAG et al., 2016).

Pesquisadores geralmente preferem modelos que utilizam o rato para simular doenças genéticas humanas, pois os ratos apresentam redes neuronais semelhantes a dos humanos, com genes homólogos, indicando que modelos de ratos com DP são susceptíveis de espelhar os eventos patológicos que ocorrem em humanos com esta doença. Além disso, o tempo de vida relativamente longo (2 anos) oferece a oportunidade para avaliar alterações patológicas em todo o processo de envelhecimento. Finalmente, o amplo espectro de leitura fenotípica em roedores melhor representa as características complexas da Doença de Parkinson humana (LEE; DAWSON; DAWSON, 2012).

A 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), é um metabolito hidroxilado de dopamina, com efeito seletivo sobre neurônios catecolaminérgicos, devido a sua analogia estrutural às catecolaminas. Desta forma a 6-OHDA é captada por estes neurônios através do sistema de transporte de alta afinidade presente em seus terminais (DAT), que transporta a toxina dentro dos neurônios dopaminérgicos, produzindo peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e radicais hidroxilo durante a sua auto-oxidação, conduzindo à geração de espécies reativas de oxigênio e, em última análise, a citotoxicidade relacionada com o stress oxidativo. Como um mecanismo adicional, o 6-OHDA pode acumular-se nas mitocôndrias, onde inibe a atividade do complexo I da cadeia respiratória (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; PONZONI; GARCIA-CAIRASCO, 1995; ZHANG et al., 2015).

A lesão causada pela 6-OHDA imita muitas características cruciais de neurônios em degeneração observada em amostras de DP humanos, que incluem oxidação e nitração de proteínas, a inibição do proteossoma, o aumento da ubiquitinação de proteínas, a depleção de glutatona reduzida (GSH), e a acumulação de proteínas de sinalização ativadas (PONZONI; GARCIA-CAIRASCO, 1995; ZHANG et al., 2015).

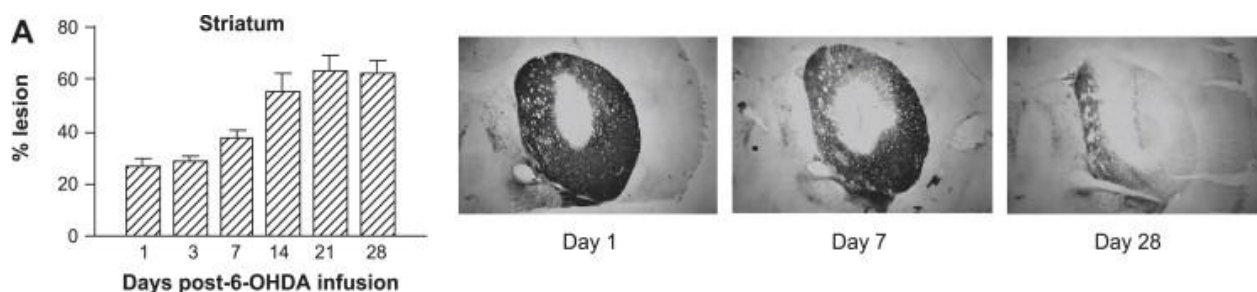
A 6-Hidroxidopamina sendo hidrofílica não pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e, assim, a administração é realizada por injeção direta na substância *nigra pars compacta*, no feixe medial do prosencéfalo (FMP) ou estriado, dependendo da velocidade que a formação da lesão é desejada (BLESÁ; PRZEDBORSKI S, 2014; JAGMAG et al., 2016). Devido à dificuldade em direcionar essas pequenas estruturas cerebrais, o 6-OHDA é mais comumente usado em ratos do que em comundongos para modelar DP (TIEU, 2011).

Classicamente a 6-OHDA é injetada no SNpc ou no feixe medial do prosencéfalo, produzindo uma lesão maciça, praticamente completa, de corpos celulares dopaminérgicos *nigrais*. Os neurônios SNpc começam a morrer nas primeiras 12 h de injeção, e a lesão marcada dos terminais dopaminérgicos estriados, paralelamente à depleção de dopamina, é estabelecida dentro de 2-3 dias (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; BLANDINI; ARMENTERO, 2012; TIEU, 2011).

Em meados da década de 1990, foi proposta uma variante do procedimento original, na qual o 6-OHDA é injetado no estriado, onde os terminais dos neurônios SNpc estão localizados, resultando no dano imediato dos terminais estriatais, seguido pela perda celular progressiva retardada dos neurônios SNpc, que são secundariamente afetados, induzindo dano lento, progressivo e parcial à estrutura nigroestriatal de uma forma retrógrada durante um período de até 3 semanas. Esta modalidade alternativa proporcionou assim um modelo progressivo de degeneração nigroestriatal mais semelhante à evolução gradual do processo neurodegenerativo da DP humana (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; BLANDINI; ARMENTERO, 2012; TIEU, 2011). O modelo estriatal também mostrou produzir sintomas não-motores da DP, incluindo disfunção cognitiva, psiquiátrica e gastrointestinal. Além disso, sendo o estriado uma estrutura grande, aumenta a probabilidade de sucesso da cirurgia para indução do modelo (TIEU, 2011).

Uma única infusão estriatal de 6-OHDA (20 µg/ 3 µL) provoca uma lesão dos terminais dopaminérgicos, que engloba um terço do estriado injetado 24 h após a injeção (Figura 05). A perda de terminais dopaminérgicos aumenta então linearmente, nos dias seguintes, atingindo o pico na terceira semana (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008).

Figura 05 – Curso temporal da lesão nigrostriatal após injeção intraestriatal de 6-OHDA no cérebro de ratos.



**Fonte:** BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008. **Legenda:** Curso temporal da lesão nigrostriatal após injeção intraestriatal de 6-OHDA. São mostradas as colorações imunohistoquímicas para a tirosina hidroxilase (TH) no estriado de ratos lesionados, em diferentes pontos temporais. As barras representam o volume estriatal (%) desprovido de coloração TH, no hemisfério lesionado.

Como existe uma alta taxa de mortalidade associada com injeções bilaterais, onde uma maior proporção de animais morre como resultado de afagia, adipsia e convulsões, tipicamente, é realizada a injeção unilateral em um hemisfério (modelo hemiparkinsoniano), deixando o lado não lesionado como um controle interno. Subsequente a esta a lesão unilateral, uma injeção sistêmica de agonistas dos receptores da dopamina (tais como apomorfina), induz a rotação assimétrica (BOVÉ; PERIER, 2012; TIEU, 2011).

Este comportamento rotacional está relacionado com o grau da lesão nigrostriatal, embora este não seja um indicador preciso da perda de células dopaminérgicas. Vários mecanismos compensatórios, como o aumento da densidade do receptor pós-sináptico D2 da dopamina, por exemplo, são ativados em resposta à lesão para compensar a diminuição da dopamina. Esta hipersensibilidade à dopamina no lado lesionado implica um desequilíbrio entre os dois estriados e uma resposta assimétrica aos fármacos dopaminérgicos administrados sistematicamente. Quando são administrados agonistas dopaminérgicos tais como apomorfina ou levodopa, o animal exibe uma rotação contralateral. Isto é devido ao fato de o lado não lesionado ser capaz de libertar mais dopamina do que o lado lesionado (BOVÉ; PERIER, 2012).

A perda de células SNpc tardia e progressiva, que pode ser obtida com a infusão intraestriatal de 6-OHDA, fornece uma excelente ferramenta para testar tratamentos inovadores de natureza diferente, particularmente relacionada a neuroproteção. Em contraste, a injeção intra-SNpc ou intra-fmb irá produzir uma lesão completa e imediata e, portanto, uma janela terapêutica é praticamente inacessível (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008).

A principal vantagem de utilizar o modelo de 6-OHDA é o seu efeito quantificável na anomalia motora nos animais, no entanto, como muitos outros modelos neurotóxicos de DP,

a propriedade neurodegenerativa aguda do modelo 6-OHDA não tem os efeitos progressivos, dependentes da idade, como ocorre nos indivíduos com Doença de Parkinson. Além disso, corpos de Lewy não estão presentes neste modelo. Apesar da evolução progressiva dos modelos animais PD, a injeção intracerebral de 6-OHDA ainda é a ferramenta mais utilizada na obtenção de lesão nigroestriatal controlada no animal, devido à complexidade e custo relativamente baixos do procedimento (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; TIEU, 2011).

## **1.6 Levodopa: tratamento padrão-ouro para o controle dos sintomas motores da Doença de Parkinson**

Atualmente, não há terapias modificadoras para a Doença de Parkinson e a levodopa (L-DOPA ou LD) permanece como o tratamento padrão-ouro para o controle dos sintomas motores da doença. No entanto, a administração repetida de L-DOPA pode induzir flutuações motoras, bem como transtornos de controle impulsivo e movimentos involuntários, também chamado de Discinesia Induzida por L-DOPA (DIL). A DIL é a flutuação motora mais perturbadora e pode ser incapacitante e interferir com a vida diária. Dentro de 5 anos de tratamento, cerca de 50% dos pacientes desenvolvem flutuações motoras e discinesia. Portanto, existe um objetivo crescente de melhorar o tratamento é proporcionar uma concentração plasmática mais estável e mais sustentada de LD e conseqüente transmissão dopaminérgica contínua no sistema dos gânglios basais (ANNUS; VÉCSEI, 2017; PAN, CAI, 2017).

A L-DOPA é o precursor da dopamina, e ao contrário da DA, pode penetrar através da barreira hemato-encefálica. No entanto, após ingestão oral, LD é extensivamente e rapidamente metabolizado por enzimas periféricas (ANNUS; VÉCSEI, 2017). Desta forma, comumente utiliza-se junto com a levodopa um inibidor de dopa-descarboxilase periférica no tratamento da DP para reduzir a sua rápida conversão em dopamina nos tecidos periféricos, porém, mesmo assim esse tratamento normalmente resulta em efeitos colaterais. Uma das principais causas dos efeitos colaterais associados a L-DOPA é a formação de 3-*O*- Metildopa (3-OMD), que é o seu principal metabolito, e pode interferir com a utilização de L-DOPA, e também pode induzir danos neuronais através do estresse oxidativo (ROCHA et al., 2016).

À medida que a degeneração dos terminais dopaminérgicos progride, a capacidade de armazenamento dos neurônios dopaminérgicos diminui, levando ao encurtamento do efeito da L-DOPA, estimulação pulsátil de receptores de dopamina e ao aparecimento de flutuações e discinesia. Além disso, há uma série de evidências que apontam para a contribuição da LD

principalmente para o estresse oxidativo e neuroinflamação no estriado lesionado onde ocorrem alterações relacionadas à discinesia, assim como uma sobreativação glial pela L-DOPA que conduzem uma comunicação neurônio-glia aberrante, que afeta a atividade sináptica e a neuroplasticidade, contribuindo para o desenvolvimento da discinesia (CARTA et al., 2017).

## 1.7 Flavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários da classe dos polifenóis. São compostos policíclicos possuindo uma estrutura C6-C3-C6, consistindo de dois anéis aromáticos ligados por um heterocíclico oxigenado. Substituído com números variáveis de grupos hidroxilas, suas principais classes de valor dietético são: antocianinas, isoflavonas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanas, e os oligoméricos relacionados e polimérico proantocianidinas. Nestas classes há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; HÜGEL et al., 2016).

Os flavonóides são produtos naturais amplamente distribuídos no reino vegetal, mais de 6000 tipos de flavonóides foram identificados até o momento (TESTA et al., 2016). Os flavonóides são amplamente utilizados como antioxidantes, por apresentarem vários grupos hidroxila fenólicos que doam átomos de hidrogênio ativos e param/retardam a oxidação de lípidios. Eles podem proteger constituintes celulares contra o estresse oxidativo e, por conseguinte, reduzir o risco de doenças neurodegenerativas associadas com o estresse oxidativo, como a DP (DU et al., 2016; SOLANKI et al., 2015).

Como moléculas de sinalização, flavonóides interagem com receptores celulares ou proteínas-chave (quinases) e enzimas que estão envolvidas na cascata de sinalização para catalisar ou regular vias de sinalização, resultando em respostas fisiológicas ou expressão dos genes que medeiam à função das células sob condições normais e patológicas. Os flavonóides são capazes de modular a atividade de diversas vias metabólicas e reduzir o declínio cognitivo e disfunção neuronal (HÜGEL et al., 2016; SOLANKI et al., 2015).

Até o momento, há pouca informação sobre a biodisponibilidade dos flavonóides e sua capacidade de alcançar o Sistema Nervoso Central (SNC), porém, a detecção de alguns polifenóis e seus metabólitos em diferentes áreas do cérebro após a administração oral em modelos murinos indica que, pelo menos, alguns flavonóides são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. No entanto, muitos flavonóides não alcançaram sucesso como



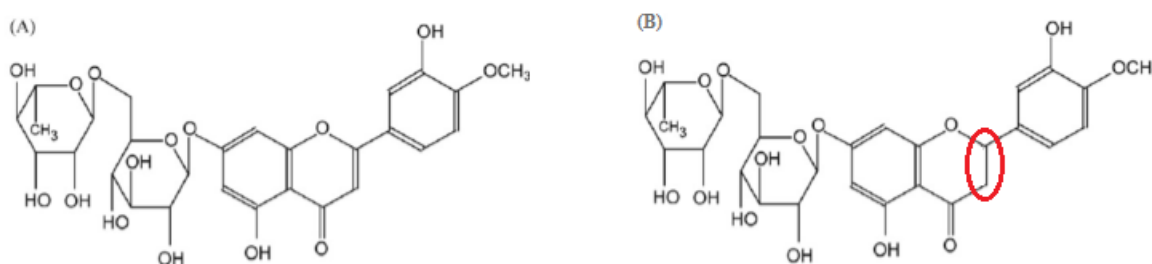
agentes terapêuticos devido ao conhecimento insuficiente quanto ao seu metabolismo e mecanismo de ação (MATIAS; BUOSI; GOMES, 2016).

### 1.7.1 Diosmin®

O Diosmin® é um medicamento já comercializado, composto por uma fração flavonóica purificada, sob forma micronizada de 90% diosmina e 10% hesperidina. É utilizado para o tratamento de sintomático das varizes e de outros sintomas relacionados à Insuficiência Venosa Crônica como dor nas pernas, sensação de queimação, inchaços e no tratamento dos sintomas relacionados à insuficiência venosa do plexo hemorroidário como dor, inchaço local, sensação de queimação e sangramento (ACHE, 2015).

A hesperidina (Figura 06B) é uma flavanona extraída da espécie *Rutaceae aurantieae*, um tipo de laranja pequena colhida na Espanha, África do Norte e China, cuja principal propriedade fisiológica é a sua atividade anti-inflamatória. A diosmina (Figura 06A), que difere molecularmente da hesperidina pela presença de uma ligação dupla entre dois átomos de carbonos no anel central de carbono, é uma flavona sintetizada a partir da hesperidina. Os compostos hesperidina e o diosmina são exemplos de flavonóides que são relatados como efetivos contra radicais livres (BOGUCKA-KOCKA et al., 2013; DEL-RÍO et al., 2004; LEWINSKA et al., 2017; UMENO et al., 2016).

Figura 06 – Estruturas químicas da diosmina e da hesperidina



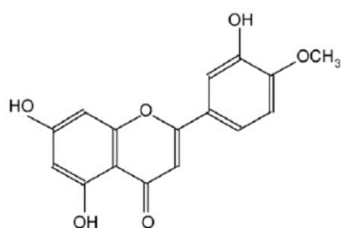
Fonte: Adaptado de CAMPANERO et al., 2010. Legenda: (A) Estrutura química da Diosmina; (B) Estrutura química da Hesperidina.

A diosmina tem sido utilizada há mais de 30 anos como flebotônico e agente de proteção vascular. O composto apresenta uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo anti-inflamatórios, redução de lipídios no sangue, anti-hiperglicêmicos, antioxidantes e de eliminação de radicais livres. Recentemente a diosmina começou a ser investigada como

fármaco terapêutico para outras doenças como: câncer, síndrome pré-menstrual, colite e diabetes. Além disso é também um agente potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas (BOGUCKA-KOCKA et al., 2013; MONOGRAPH. DIOSMIN, 2004).

Após administração oral, a diosmina é rapidamente hidrolisada por enzimas da microflora intestinal em sua flavona aglicona, a diosmetina (Figura 07), que é subsequentemente absorvida pelo sistema circulatório. Após 26-43 h, a diosmetina é degradada em ácidos fenólicos ou seus derivados conjugados com glicina e eliminados através da urina. A diosmina e a diosmetina que não são absorvidas, são eliminadas nas fezes (BOGUCKA-KOCKA et al., 2013).

Figura 07 – Estrutura química da diosmetina.



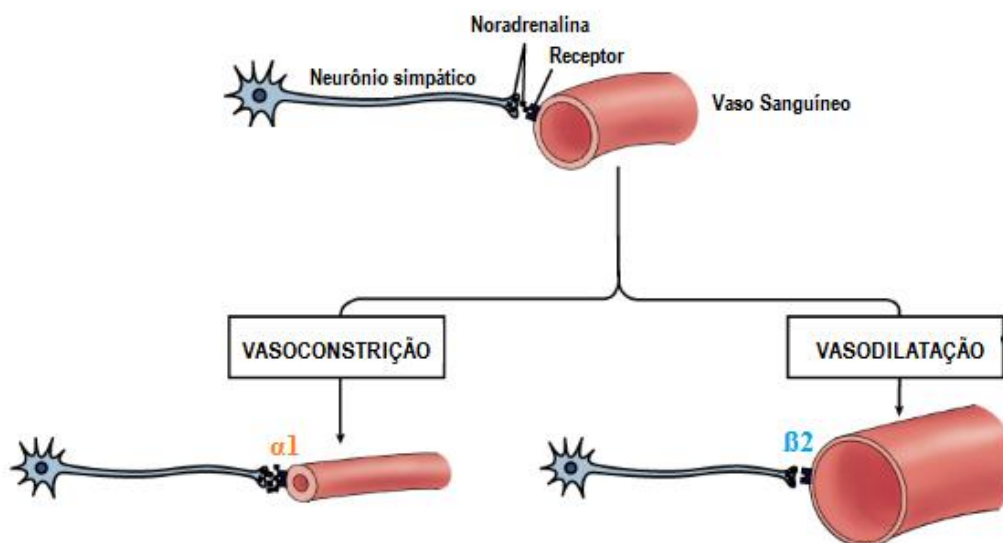
Fonte: CAMPANERO et al., 2010.

#### 1.7.1.1 Mecanismo de Ação do Diosmin e bases para a sua atividade neuroprotetora

Entre os fármacos vasoativos, a fração micronizada purificada flavonóide de diosmina e hesperidina (MPFF) continua a ser o agente com o mais alto grau de recomendação e também indicado para o apoio farmacoterapêutico de cicatrização da úlcera de perna, juntamente com sulodéxido e pentoxifilina (GAVORNÍK; GAŠPAR; GAVORNÍKOVÁ, 2015).

Existe apenas um mecanismo neuronal totalmente estabelecido atribuído ao Diosmin®. Seu mecanismo de ação tem como princípio a inativação da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT), que metaboliza as catecolaminas (dopamina, epinefrina e norepinefrina) que não se ligaram a nenhum receptor durante a neurotransmissão. A noradrenalina é produzida nos neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso simpático e exerce uma série de funções dependendo do tipo de receptor ao qual se liga. Quando ligada ao receptor  $\alpha_1$  acoplados a proteína G das células do tecido muscular dos vasos sanguíneos, ela promove a vasoconstrição dos mesmos (Figura 08), pelo aumento das concentrações de cálcio dentro das células (BOUDET; PEYRIN, 1986; OLIVEIRA, 2008).

Figura 08 – Mecanismo neuronal da noradrenalina na vasoconstrição e vasodilatação dos vasos sanguíneos



**Fonte:** Autora. 2017. **Legenda:** O mecanismo neural da noradrenalina envolve, basicamente, as fibras do sistema simpático, e parassimpático, em alguns órgãos – a musculatura esquelética, aparentemente, não recebe inervação parassimpática, apenas simpática, portanto, inervação adrenérgica. As fibras simpáticas liberam, no órgão-alvo, **noradrenalina**. Grande variedade da resistência vascular periférica é dada pela resistência das arteríolas musculares. Essas arteríolas possuem dois tipos de receptores na sua musculatura lisa que são:  **$\alpha 1$**  e  **$\beta 2$** . Os receptores  $\beta 2$ , quando estimulados, produzem vasodilatação; porém, a noradrenalina tem uma afinidade muito maior pelo  $\alpha 1$ , do que pelo  $\beta 2$ , então ela é tipicamente vasoconstritora. O papel do Diosmin® nesse mecanismo é sua atividade de inativação de COMT. Catecol-O-metiltransferase são enzimas que agem degradando as noradrenalin, desta forma, com a eliminação das COMT, mais noradrenalina ficam livres para exercer sua função vasoconstritora sob os vasos sanguíneos, amenizando os sintomas ligadas a Insuficiência Venosa Crônica.

O efeito inibitório do Diosmin® sobre a captura e o metabolismo da noradrenalina pelas paredes venosas, resulta em um aumento do tônus vascular com redução da elasticidade e permeabilidade nos vasos sanguíneos. Alguns flavonoides como: crisina, apigenina, luteolina, myricetin e a diosmina, possuem essa característica de estender o efeito da noradrenalina na parede da veia. A presença e a posição de grupos hidroxilo no anel B e a presença de uma ligação dupla entre C2 e C3 da benzopirano parecem aumentar a potência vasodilatadora da diosmina (BOGUCA-KOCKA et al., 2013).

O espessamento e a remodelação da parede venosa são influenciados por dois parâmetros: estresse anormal de cisalhamento e hipóxia que ativam o endotélio primeiro no nível de cúspides valvulares e, em seguida, em grandes veias. A hipóxia leva a ativação do endotélio e acúmulo de leucócitos. A ativação do endotélio leva à liberação de prostaglandinas (em particular PGF 2a) e fator de crescimento de fibroblastos b (b-FGF), ambos fatores são conhecidos por estarem diretamente envolvidos na remodelação e conseqüentemente na ocorrência de varizes. A adesão dos glóbulos brancos a superfície endotelial é estabelecida

através de certas moléculas, entre elas: molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), a molécula de adesão de células vascular-1 (VCAM-1), Antígeno-1 associado à função linfocitária (LFA-1) e Antígeno-4 (VLA-4). Essa interação entre células endoteliais e leucócitos leva à libertação de enzimas proteolíticas e radicais livres (KATSENIS, 2005).

Além de ser um potente inibidor da prostaglandina, Diosmin® reduz a expressão de moléculas de adesão endotelial e inibe a adesão, migração e ativação de leucócitos no nível capilar. Ao inibir a ativação endotelial, a fração flavonóide purificada micronizada (Diosmin®), pode prevenir a cascata inflamatória resultante da interação leucócito-endotélio. Isto Subsequentemente atrasa o aparecimento de refluxo e inibe o início do círculo vicioso terminando em aumento venoso pressão proporcionando assim proteção contra danos microcirculatório (KATSENIS, 2005; MONOGRAPH. DIOSMIN, 2004).

A dose habitual recomendada de Diosmin® é de 1000 mg uma vez por dia, e segundo o fabricante não existem estudos que comprovem interações com outras medicações (ACHE, 2015). De fato existem numerosos estudos que confirmam a eficácia e segurança do Diosmin® em doses de até 2000 mg por dia em alguns meses de terapia (GUILLOT et al., 1989; MEYER, 1994; STANIEWSKA, 2016), Em um estudo recente, realizado por Staniewska (2016) envolvendo 327 pacientes que tomaram uma dose de 2000 mg por dia de Diosmin® por um período de 4 meses, não foram observados eventos adversos significativos em aspectos como contagem de células sanguíneas, nível de fibrinogênio, nível de alanina transaminase e aspartato, nível de ureia e creatinina, análise de urina, nível de pressão arterial sistólica e diastólica.

Além dos seus efeitos nos vasos sanguíneos, outras atividades foram observadas com seus constituintes, a hesperidina e a diosmina. Foram encontrados uma série de trabalhos testando e comprovando a atividade neuroprotetora da hesperidina em modelo animal da Doença de Parkinson (ANTUNES et al., 2014; TAMILSELVAM et al., 2013), porém, trabalhos usando a associação diosmina mais hesperidina ou mesmo testando apenas a diosmina em modelo animal específico de DP não foram encontrados até o momento. Apesar disso, a Diosmina tem mostrado atividade neuroprotetora em outros modelos de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (REZAI-ZADEH et al., 2009; SAWMILLER et al., 2016). O que nos leva a hipotetizar, com base em todas os dados da literatura já relatados das atividades biológicas atribuídas aos compostos diosmina e hesperidina, que essa associação é capaz de proteger e até reverter o quadro neurodegenerativo característico da Doença de Parkinson.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial neuroprotetor do Diosmin® nas alterações neurocomportamentais e de neurodegeneração em modelo de Doença de Parkinson induzido por 6-hidroxidopamina em ratos.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do Diosmin® nas alterações comportamentais dos testes de atividade locomotora espontânea: Campo aberto (avaliação do sistema dopaminérgico - DA e glutamatérgico mesolímbico) e de mensuração da lesão nigroestriatal: teste do *rotarod* e teste rotacional no modelo de Doença Parkinson induzido por 6-OHDA em ratos;
- Avaliar o efeito do Diosmin® no estresse oxidativo e nas alterações da atividade enzimática dos sistemas antioxidantes em córtex pré-frontal (CPF), corpo estriado (CE), hipocampo (HC) e vermis cerebelar (VC) de ratos submetidos ao modelo de Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA;
- Verificar os efeitos da associação Diosmin® + L-DOPA nas alterações comportamentais de ratos submetidos ao modelo de Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA;
- Avaliar os efeitos da associação Diosmin® + L-DOPA no estresse oxidativo e peroxidação lipídica no modelo da Doença de Parkinson induzido por 6-OHDA em ratos.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Animais

Foram utilizados nos experimentos ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus albinus* da raça Wistar, adultos, do sexo masculino, pesando entre 250 e 300 gramas (n= 06), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza e os mesmos foram conduzidos a Hospedaria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará *Campus* de Sobral. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos e mantidos em caixas grandes padrão para ratos, de prolipropileno e com armazenamento máximo de seis animais por caixa. Os mesmos foram acondicionados à temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ), com ciclo de claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

##### 3.1.1 Aspectos éticos

O protocolo experimental deste projeto foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC *Campus* Sobral, com número de aceite 14/15. Todos os procedimentos experimentais foram elaborados de acordo com o “Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório” da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

##### 3.1.2 Modelo Experimental de Doença de Parkinson através de Neurodegeneração induzida por 6-OHDA em ratos

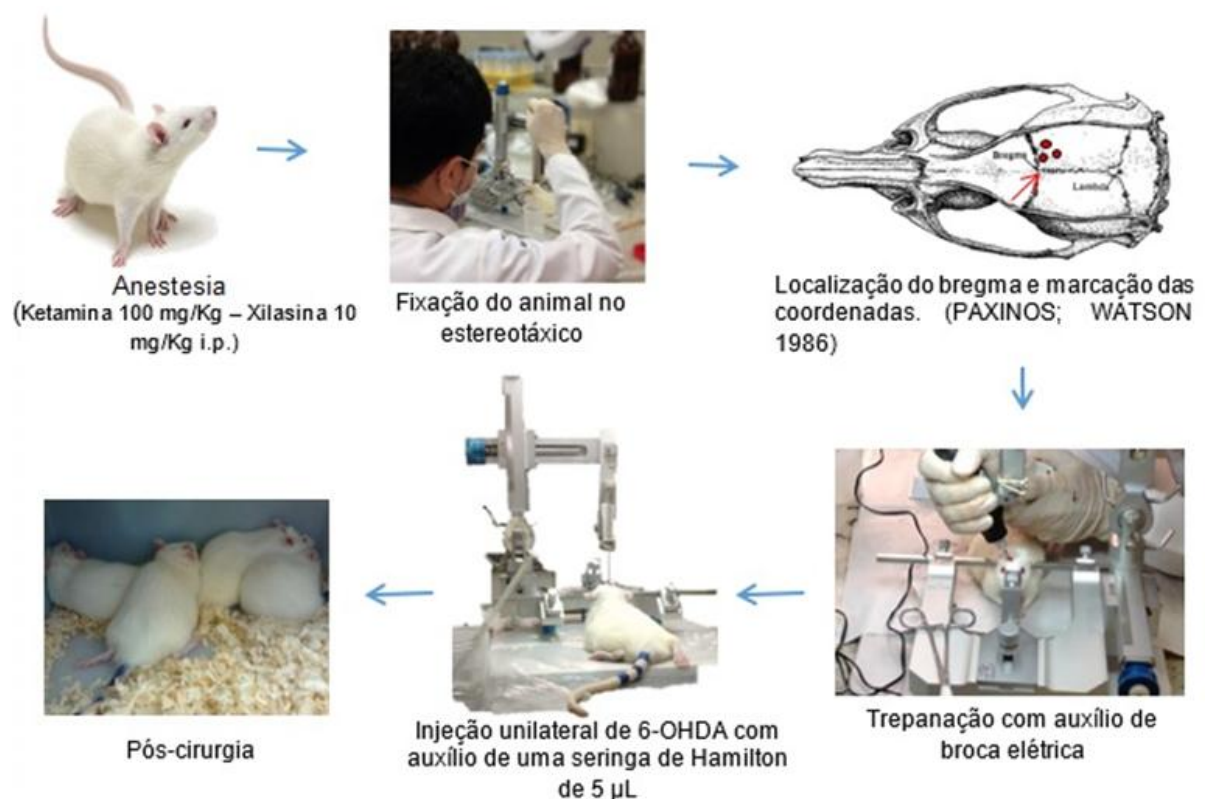
###### 3.1.2.1 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram divididos em sete grupos (n=6), sendo o grupo 01 formado por animais falso operados (Sham/ lesionados com salina 0,9 %) e os grupos de 02 a 07 os animais foram lesionados com a neurotoxina 6-OHDA, no corpo estriado direito do rato. Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg; i.p.) e xilasina (10 mg/kg; i.p.), após a anestesia, foi verificado se o animal apresentava qualquer reflexo doloroso. A cabeça do animal foi fixada

no aparelho estereotáxico (INSIGHT), através de duas barras de fixação inseridas nos meatos auditivos externos do animal e os dentes incisivos fixados em uma barra de sustentação.

Logo após a fixação do animal, foram realizadas tricotomia e assepsia da região superior da cabeça (álcool 70%). Uma pequena incisão foi feita na cabeça do animal e com isso, foi possível a localização do bregma. Tendo a localização do bregma, o periósteo foi removido e foram determinadas as coordenadas estereotáxicas (em milímetros), segundo o atlas de Paxinos e Watson (1986), para a realização de 3 orifícios por trepanação, segundo Souza e colaboradores (2017): 1: L: -2.5, AP: +0.5, V: +5.0; 2: L: -3.0, AP: -0.5, V: +6.0; e 3: L: -3.7, AP: -0.9, V: +6.5, em relação ao bregma, com o auxílio de uma broca elétrica realizou-se a trepanação no crânio do animal. Em seguida com uma seringa de Hamilton de 5  $\mu$ L, os animais receberam injeção intraestriatal de 6-OHDA (21 $\mu$ g/ $\mu$ L) (BATASSINI et al., 2015; SOUZA et al., 2017) ou salina (0,9%) no corpo estriado direito (2  $\mu$ l por orifício) (Figura 09).

Figura 09 - Ilustração do Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).



Fonte: FROTA, 2014.

### **3.2 Diosmin: fração flavonoica purificada, sob forma micronizada de 90% diosmina e 10% hesperidina**

O fármaco testado nesse modelo experimental possui nome comercial Diosmin®, foi adquirido em forma de comprimidos revestidos, comercializados pelo laboratório ACHÉ. As doses escolhidas para serem testadas foram baseadas nos resultados obtidos por Liu e colaboradores (2015).

### **3.3 Levodopa**

A levodopa utilizada nos experimentos foi adquirida comercialmente sob o nome de Prolopa®HBS (100 mg de Levodopa + 28, 5 mg de Cloridrato de benserazida/ laboratório Roche). As doses escolhidas foram baseadas no trabalho de Chen e colaboradores (2015).

### **3.4 Tratamento farmacológico**

Após o procedimento cirúrgico descrito no tópico 3.1.2.1 para indução de parkinsonismo, os animais foram deixados em suas respectivas caixas na hospedaria por um período de sete dias. No oitavo dia iniciou-se o tratamento (via gavagem) com duração de 14 dias.

Como já mencionado anteriormente, foram utilizados 7 grupos experimentais nesse estudo. Inicialmente testou-se três concentrações de Diosmin® diluído em salina (0,9%) para determinação da melhor dose, desta forma os grupos 3, 4, e 5 foram tratados com Diosmin (DM) nas doses de 50 (DM50); 100 (DM100); 200 (DM200) mg/Kg v.o., respectivamente, cujo os resultados obtidos foram comparados com dois grupos controles: Grupo 1 – Sham (falso operado) e grupo 2 (6-OHDA) tratados com salina (0,9%).

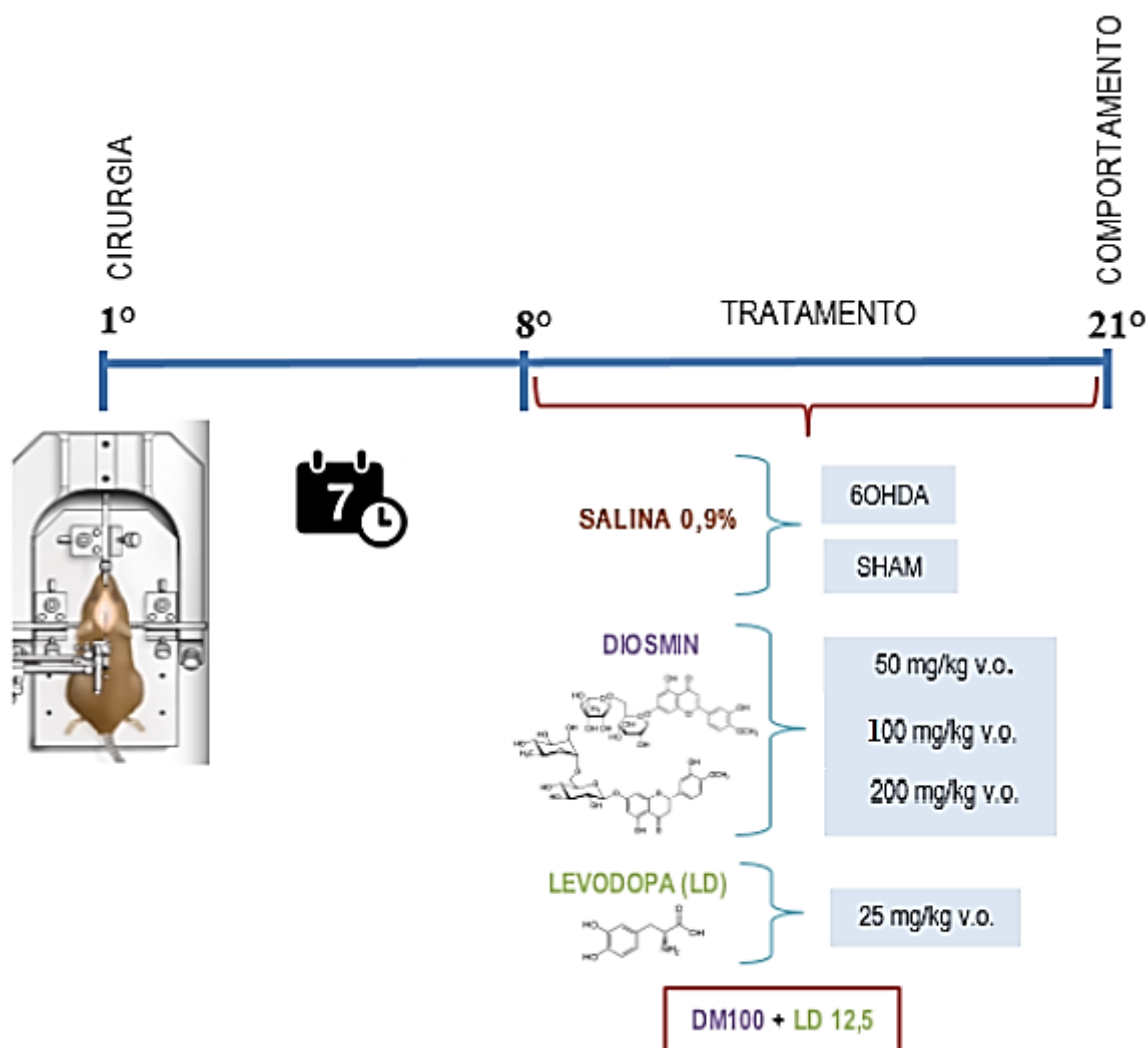
Com os resultados preliminares das três doses testadas. Dois novos grupos de animais foram utilizados, um grupo 6 que foi tratado com Levodopa (LD) 25 mg/kg, uma dose eficaz no tratamento de neurodegeneração induzida por 6-OHDA (CHEN et al., 2015; PINTO; VIANA, 2015) e o grupo 7 foi tratado com a associação de DM 100 mg/kg e LD 12,5 mg/kg, uma sub-dose da Levodopa (CHEN et al., 2015) (Figura 10).

Durante todo o período de tratamento, os animais foram pesados diariamente e a alimentação foi removida 1 hora antes e recolocada 1 hora após o tratamento para evitar



possíveis intervenções do alimento com a medicação. No 21º dia, 2h após o tratamento, os animais foram submetidos a ensaios neurocomportamentais, os quais serão descritos adiante.

Figura 10 - Representação esquemática temporal do procedimento de indução do parkinsonismo até o comportamento.



Fonte: Autora, 2017.

### 3.5 Estudo Comportamental

Os experimentos foram realizados durante o dia, em dias distintos, onde os animais foram observados em um ambiente fechado, desprovido de barulhos externos e com temperatura constante ( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Para o teste de campo aberto foi utilizado uma iluminação de baixa densidade (luz vermelha de 15 W). Os demais ensaios foram realizados com

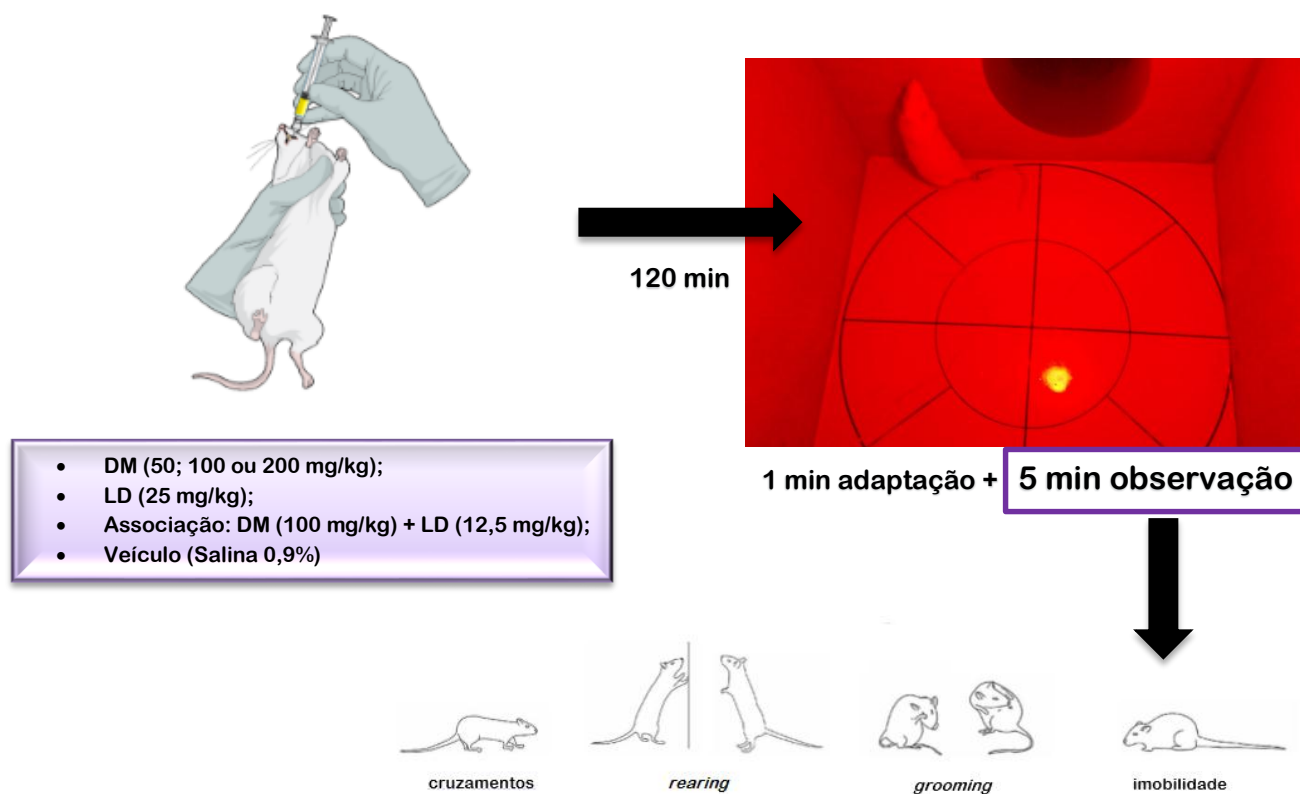
iluminação normal. Em todos os testes com exceção do rotacional, após a observação de cada animal foi utilizado álcool 10% para a remoção de resíduos deixados pelo animal.

### 3.5.1 Avaliação da Atividade Locomotora

#### 3.5.1.1 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 parâmetros avaliados no tempo de 5 minutos foram: 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 (Figura 11).

Figura 11 - Teste de Campo aberto para ratos.



Fonte: Autora, 2017.

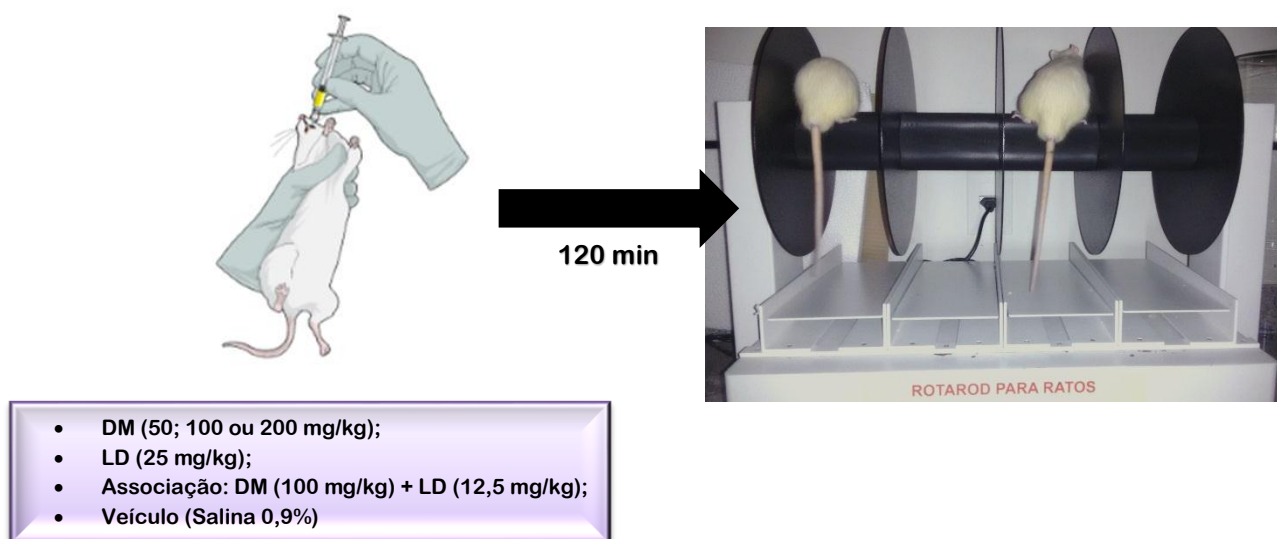
### 3.5.2 Avaliação da Coordenação Motora

#### 3.5.2.1 Teste do *Rotarod*

O teste do *Rotarod* mede o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). As principais vantagens do teste são: (i) não requerem drogas, mas são, no entanto, altamente objetivas, reproduzíveis e fáceis de quantificar; (ii) a queda de animais da haste rotativa parece depender de uma combinação de déficits induzidos por lesões que se tornam mais evidentes quando os ratos são forçados a mover-se a velocidades mais rápidas (ROZAS; LABANDEIRA GARCÍA, 1997).

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. Foram registrados: tempo de latência (segundos), velocidade do equipamento no momento da primeira queda (RPM) tempo de permanência na barra giratória (segundos), e o número de quedas (DUNHAM; MIYA, 1957) (Figura 12). Os animais foram adaptados ao equipamento antes da avaliação no 21º dia. A adaptação foi realizada no 16º dia (5-12 RPM), no 18º dia (5-18 RPM) e 20º dia (5-22 RPM) após a cirurgia.

Figura 12 - Teste de *Rotarod* em ratos

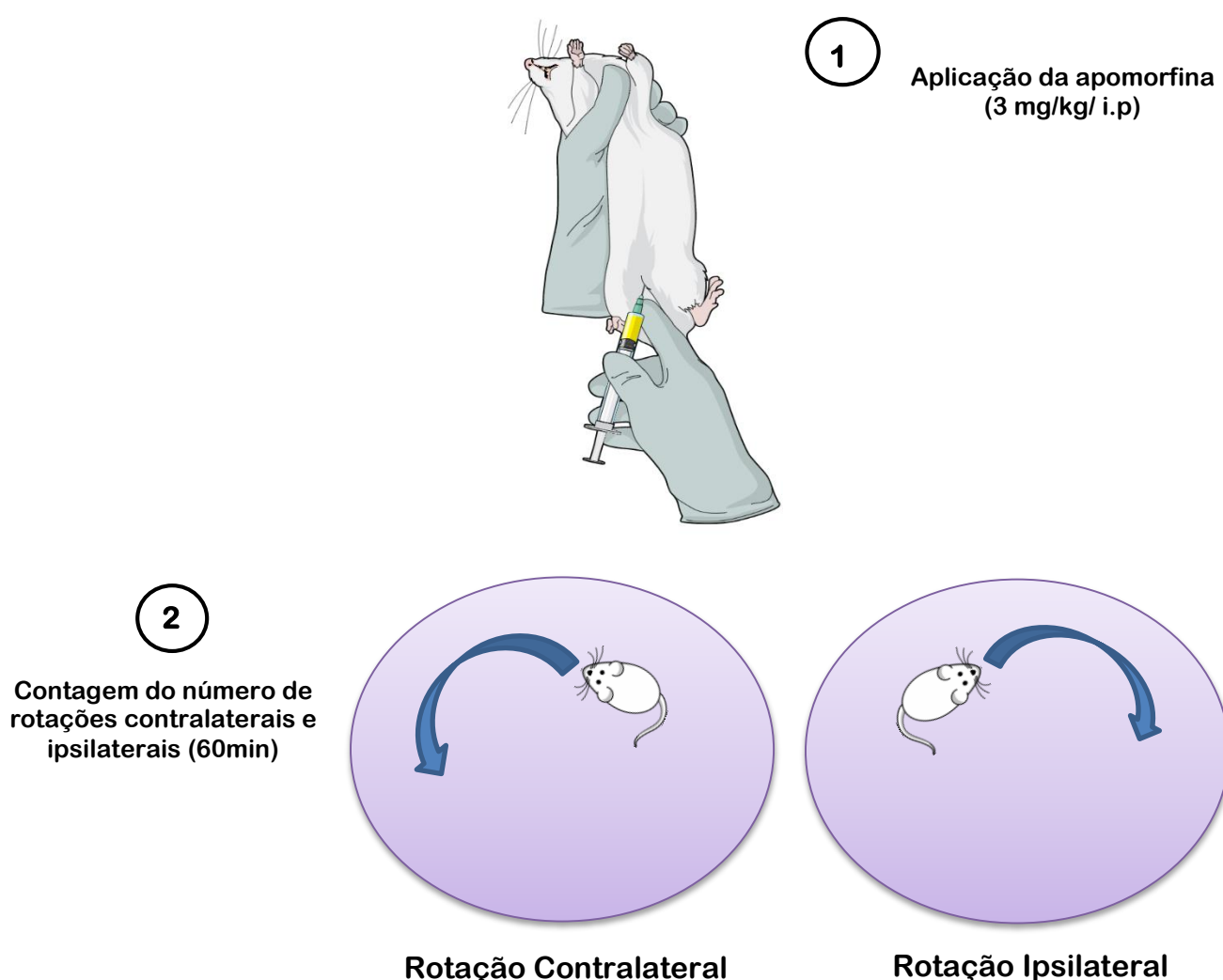


Fonte: Autora, 2017.

### 3.5.3 Teste Rotacional

Os animais foram submetidos ao teste rotacional no 21º dia após a lesão com 6-OHDA. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3 mg/kg, i.p., que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo, foi observado durante 60 minutos (KIM et al., 1998) (Figura 13).

Figura 13 - Teste rotacional induzido por apomorfina

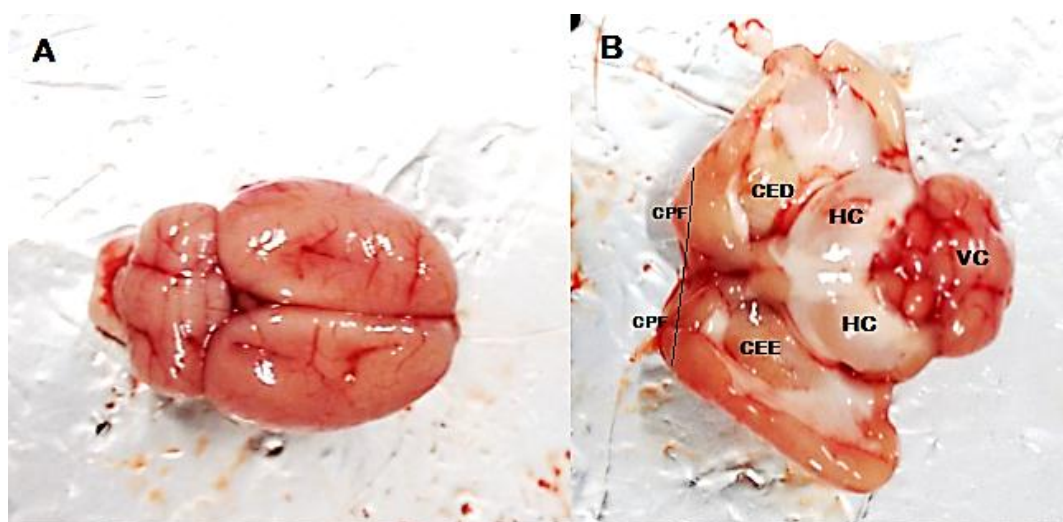


**Fonte:** Autora, 2017. **Legenda:** Ilustração do teste Rotacional induzido por apomorfina. 1. Os animais receberam 3 mg/Kg, i.p. 2. Logo após a administração da apomorfina, o animais foram observados durante 60 min e o número de rotações contralaterais e ipsilaterais foram contabilizados.

### 3.6 Dissecação das Áreas Cerebrais

No 22º dia após a cirurgia, os animais foram eutanasiados por guilhotinamento e, logo em seguida, os encéfalos foram retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo. Em seguida o hipocampo (HC), o corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido/ CE ipsi e contralateral), o córtex pré-frontal (CPF) e vermis cerebelar (VC) (Figura 14), foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento. Após a dissecação, cada área foi colocada em papel alumínio sobre gelo, pesada e armazenada a -80 °C.

Figura 14 – Áreas cerebrais para avaliações neuroquímicas



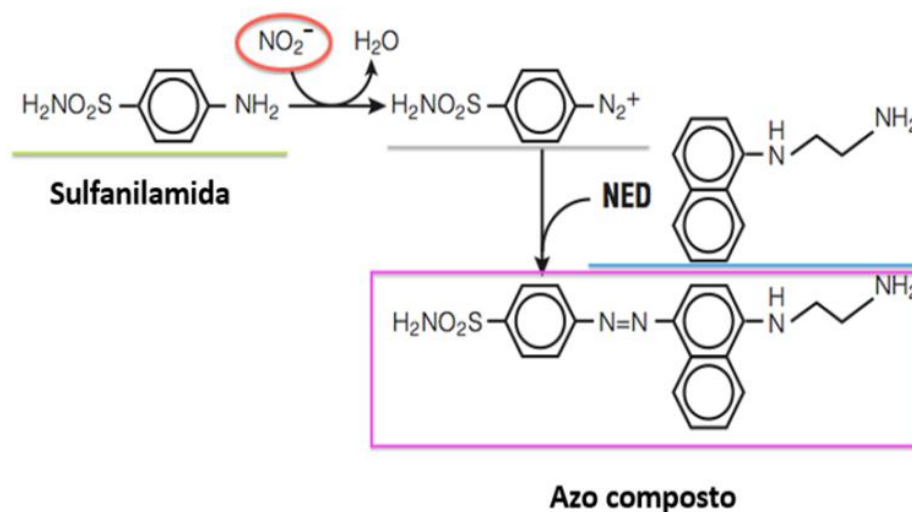
**Fonte:** Autora, 2017. **Legenda:** (A) Figura de todo o encéfalo após ser removido da caixa craniana. (B) Áreas cerebrais à serem separadas das estruturas circunjacentes: CPF: córtex pré-frontal; CED: corpo estriado direito (ipsilateral); CEE: corpo estriado esquerdo (contralateral); HC: hipocampo; VC: vermis cerebelar.

### 3.7 Análises Neuroquímicas Relacionadas a Neurodegeneração

#### 3.7.1 Determinação da Concentração de Nitrito/Nitrato

Em condições ácidas o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida este sal reage com o N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura, com o pico de absorvância em 540 nm (Figura 15).

Figura 15 - Ilustração da Reação de Griess



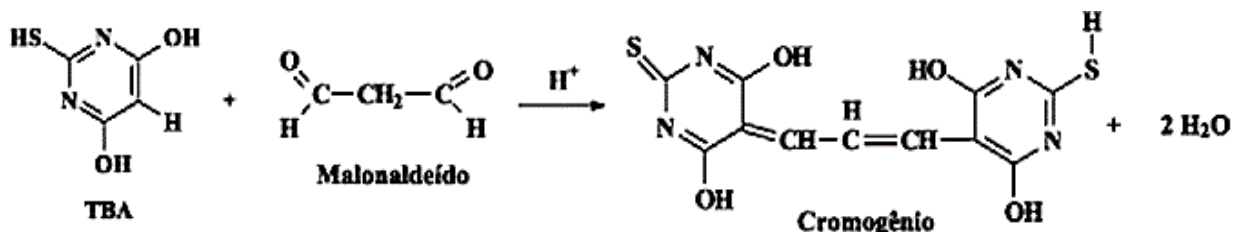
**Fonte:** Imagens Google, adaptado, 2017.

Para a determinação da produção de Nitrito/Nitrato, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de  $\text{NaNO}_2$  e dissolvidos em 10 mL de água destilada. Em seguida foram feitas as diluições em série (10 e 20x), 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  $\mu\text{M}$ . Foi realizada uma equação da reta para o 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% (p/v) em solução de fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4, após centrifugação (11000 g por 15 min à 4°C), 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 ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva padrão de  $\text{NaNO}_2$ .

### 3.7.2 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 16).

Figura 16 - Ilustração da reação entre ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos



Fonte: Imagens google, 2017.

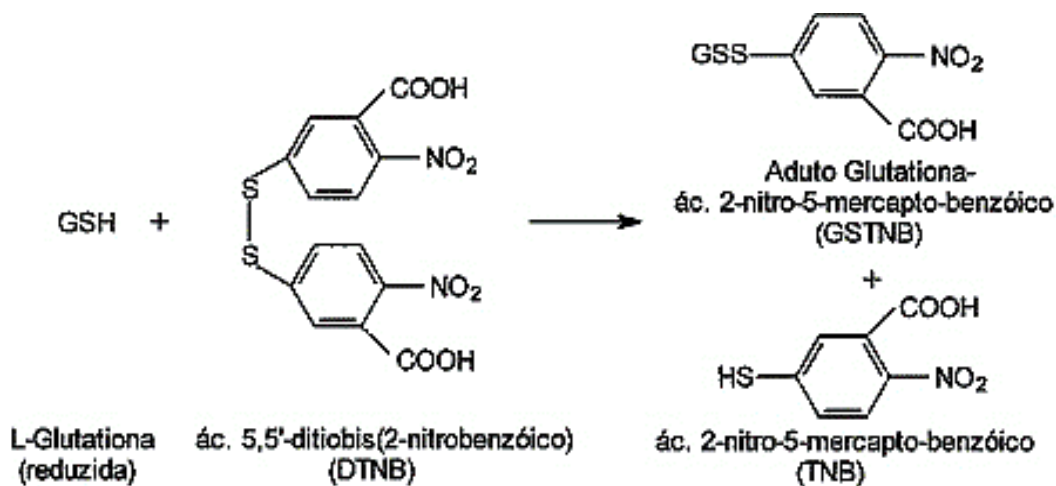
O grau de lipoperoxidação em corpo estriado de ratos foi medido através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução fosfato de potássio 150 mM, pH 7,4. Um volume de 0,25 mL do homogeneizado levado ao banho maria 37 °C por 1 hora e precipitado com 400  $\mu$ L de ácido perclórico 35%, após centrifugação (14000 g por 15 min à 4°C), o sobrenadante foi transferido e acrescido 200  $\mu$ L de solução de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Após banho de água fervente (95-100 °C por 30 min). O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de tecido.

### 3.7.3 Determinação da Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

A glutathiona é o maior agente antioxidante produzido por células animais, e o qual pode ser encontrado em sua forma oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH) (POMPELLA et al., 2003).

A determinação da concentração da GSH baseia-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412 nm, a concentração da glutathiona reduzida foi expressa em nanograma de GSH/g de tecido, conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1968) (Figura 17).

Figura 17 - Reação entre a glutatona reduzida e DTNB (reagente de Ellman) para a determinação de hidroperóxidos empregando a enzima glutatona reduzida



Fonte: Google imagens, 2017.

Para a determinação da concentração de GSH, foi construída uma curva padrão a partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), a qual foi preparada em triplicata de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Para a determinação da equação da curva padrão de GSH, foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01 M) e, logo após, feita a leitura da absorbância a 412 nm.

Preparou-se o homogenato a 10% em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%. O material foi agitado e centrifugado (3000 g/15 min/4 °C). Em seguida foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB 0,01 M. Após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro. A concentração da glutatona reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

### 3.8 Análise Estatística

Todos os valores numéricos foram apresentados como erro padrão da média (EPM) e submetidos a análises de diferenças estatísticas através da análise de variância (*One-way* ou *Two-way* ANOVA), seguido pelo teste de Comparações Múltiplas do teste de Bonferroni.



Consideraram-se os valores com  $P < 0,05$  como estatisticamente significativos. A análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism, versão 6.0, (San Diego, CA, EUA). Adicionalmente, todos os experimentos foram realizados por observadores “cegos”.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultados da 1º ETAPA – Levantamento da Melhor Dose

#### 4.1.1 Avaliação da Atividade Locomotora

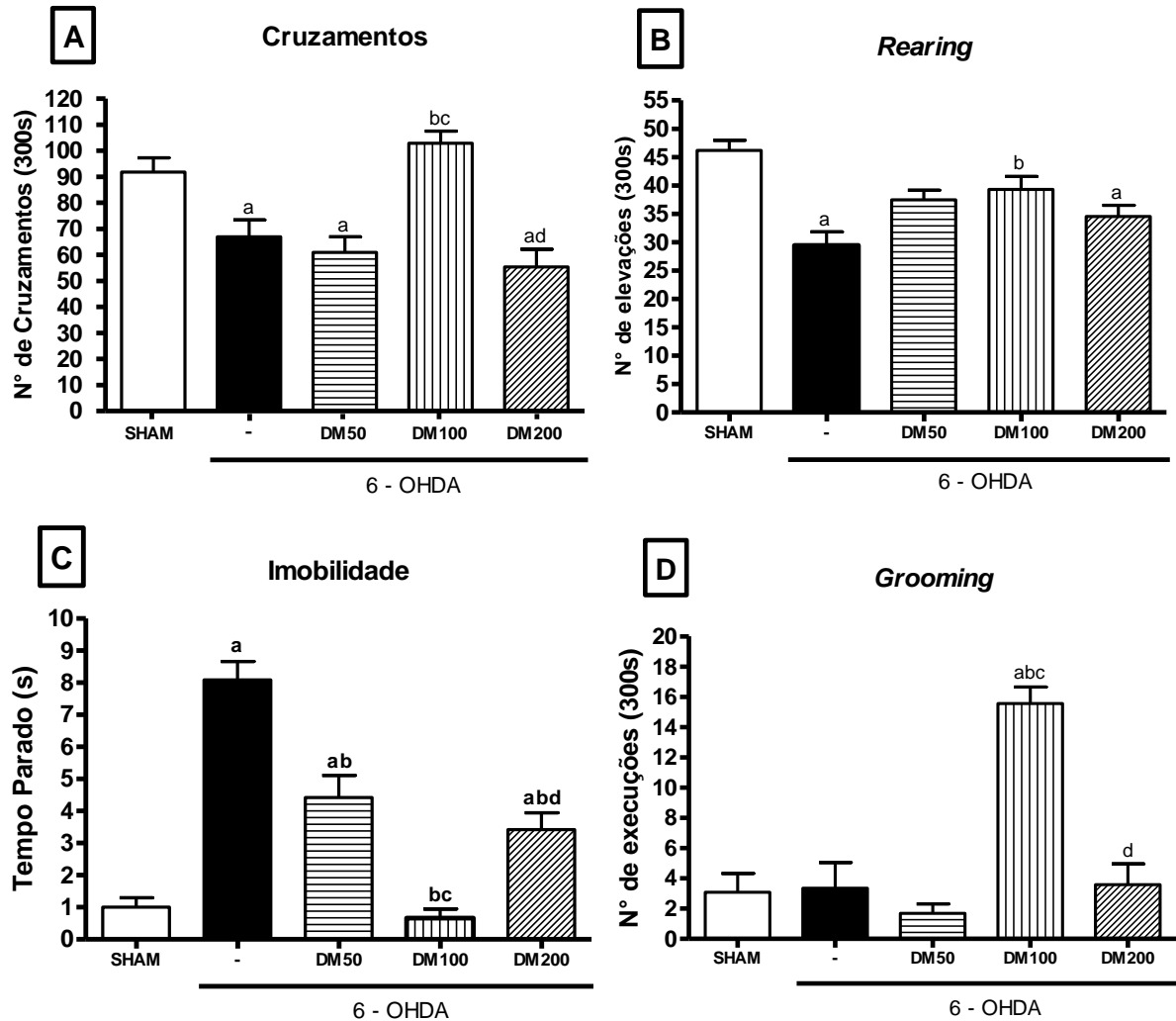
##### 4.1.1.1 Teste de Campo Aberto (*Open Field Test*)

No teste de campo aberto, os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram diminuição da atividade locomotora horizontal em 37% (cruzamentos:  $67,00 \pm 2,16$ ), bem como diminuição da atividade locomotora vertical 56% (*rearing*:  $29,43 \pm 2,399$ ) em relação ao grupo Sham (cruzamentos:  $91,8 \pm 5,5$ ; *rearing*:  $46,17 \pm 1,815$ ). Além disso, o tempo de imobilidade no controle positivo teve uma elevação de 700% (tempo parado:  $8,09 \pm 0,57$  s), em relação ao grupo falso operado (tempo parado:  $1,0 \pm 0,28$  s).

No teste de campo aberto, o grupo tratado com a dose de 100 mg/kg de Diosmin® (cruzamentos:  $102,9 \pm 4,6$ ) apresentou uma redução significativa ( $P < 0,001$ ) em relação ao controle positivo 6-OHDA (cruzamentos:  $67,00 \pm 2,16$ ) no número de cruzamentos, elevando em mais de 50% a atividade locomotora horizontal dos animais. Ao mesmo tempo, não observou-se diferença estatística de DM100 quando comparado com o controle SHAM (cruzamentos:  $91,83 \pm 5,50$ ). As demais doses testadas: DM50 e DM200 (cruzamentos:  $61,25 \pm 2,28$ ;  $55,33 \pm 6,89$ , respectivamente) não diferiram estatisticamente do grupo 6-OHDA. Resultados semelhantes foram verificados na avaliação da atividade locomotora vertical (*Rearing*), onde DM100 (*Rearing*:  $39,29 \pm 2,31$ ) diferiu estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do controle positivo (*Rearing*:  $29,43 \pm 2,39$ ), enquanto as demais doses (*Rearing*: DM50:  $37,45 \pm 1,72$ ; DM200:  $34,55 \pm 1,95$ ) não conseguiram reverter o quadro de deficiência locomotora característico dos animais lesionados com 6-OHDA. Já na análise do tempo de imobilidade durante o teste comportamental, todas as doses testadas (tempo parado: DM50:  $4,42 \pm 3,42$  s; DM100:  $1,81 \pm 1,04$  s; DM200:  $0,68 \pm 0,52$  s) reduziram a imobilidade dos animais ( $P < 0,001$ ) quando comparadas com o grupo 6-OHDA (tempo parado:  $8,09 \pm 0,57$  s), porém, das doses testadas, apenas DM100 não diferiu estatisticamente do grupo falso operado (tempo parado:  $1,003 \pm 0,28$  s), reduzindo o tempo de imobilidade dos animais lesionados com 6-OHDA à níveis normais. Observou-se ainda que a auto-limpeza (*Grooming*) no grupo controle (SHAM:  $3,08 \pm 1,24$ ) e no grupo lesionado (6-OHDA:  $3,35 \pm 1,69$ ) foi praticamente a mesma, o mesmo padrão ainda foi verificado nos grupos DM50 e DM200 (*Grooming*:  $1,69 \pm 0,61$ ;  $3,58 \pm 1,37$ , respectivamente). Os resultados do *Grooming* em animais tratados com DM100 (*Grooming*:

15,56 ± 1,09), mostraram um aumento em mais de 300% do número de *Groomings* em relação ao grupo 6-OHDA (Figura 18).

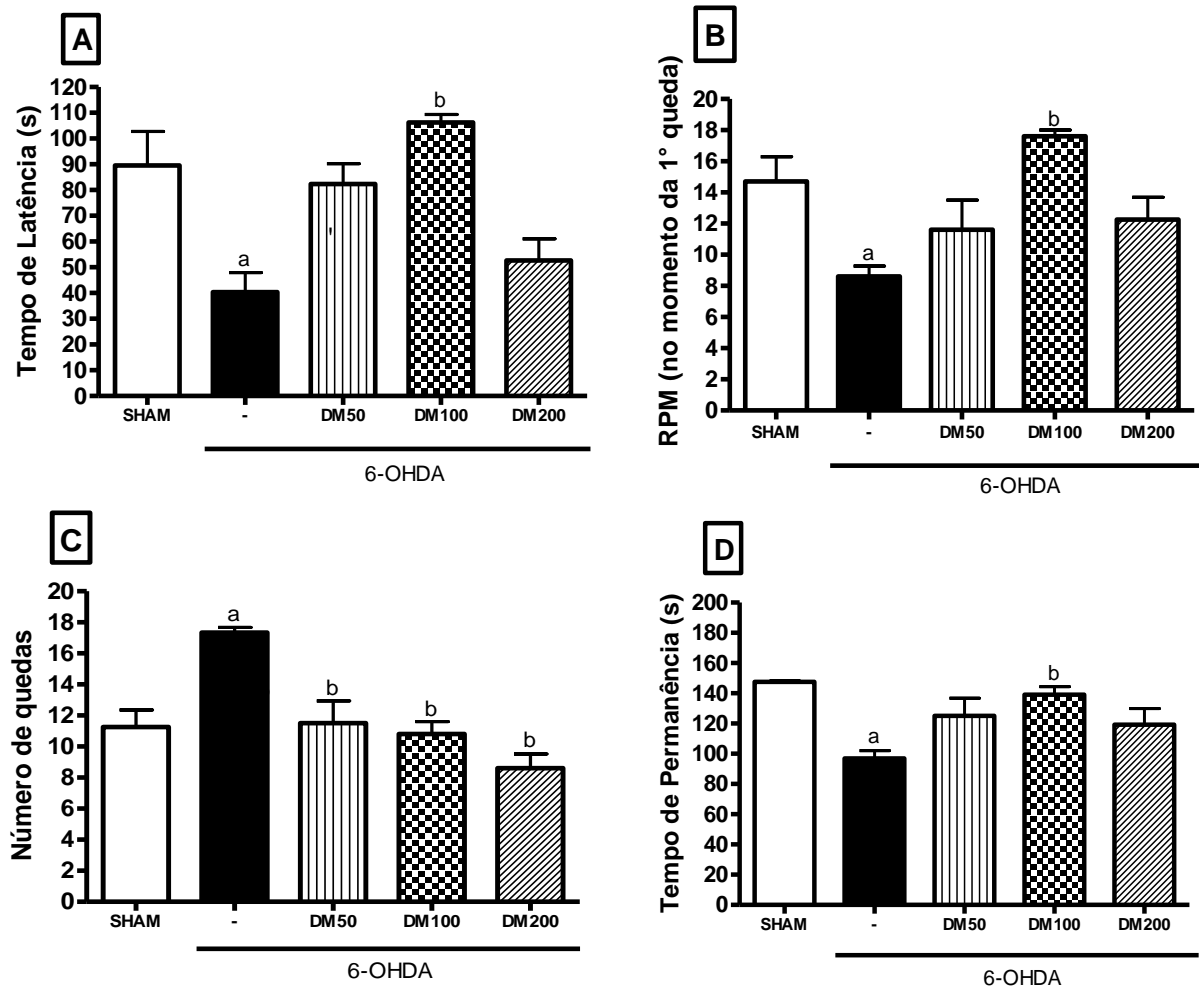
Figura 18 - Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (*Open field test*)



**Fonte:** Autora. **Legenda:** (A) Cruzamentos, (B) *Rearing*, (C) Tempo de imobilidade e (D) *Grooming*. Os ratos (n=06 *per* grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (50; 100 e 200 mg/Kg *per os*) ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em campo aberto (cruzamentos, *rearing*, *grooming*, tempo de imobilidade e *grooming*). Os dados estão expressos em médias ± EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50; d vs DM100. Considerou-se estatisticamente significante P<0,05.

#### 4.1.1.2 Teste do *Rotarod*

Para maior análise da ação do Diosmin® na atividade locomotora de ratos submetidos a lesão nigroestriatal de 6-OHDA, 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 ( $P < 0,5$ ) entre o grupo 6-OHDA e o grupo SHAM para todos os parâmetros avaliados. Os resultados no teste do *rotarod* mostraram que DM100 (latência:  $106,3 \pm 3,14$  s) elevou em mais de 250% o tempo de latência no equipamento em comparação com o grupo 6-OHDA (latência:  $40,33 \pm 7,6$  s). Além disso, os animais tratados com DM100 permaneceram mais no equipamento (permanência:  $139,0 \pm 5,44$  s), assim como a velocidade (RPM) ( $17,6 \pm 0,4$  RPM) do equipamento no momento da primeira queda dos animais era maior quando comparado com o controle positivo (permanência:  $96,83 \pm 5,28$  s e  $8,6 \pm 0,67$  RPM, respectivamente). As demais doses testadas não diferiram significativamente do grupo 6-OHDA, nos aspectos já mencionados. Apesar disso, todas as doses conseguiram reduzir o número de quedas dos animais (quedas: DM50:  $11,5 \pm 1,1$ ; DM100:  $10,8 \pm 0,8$ ; DM200:  $8,6 \pm 0,92$ ) em relação ao grupo 6-OHDA ( $17,33 \pm 0,33$  quedas) (Figura 19).

Figura 19 - Análise da atividade motora no Teste de *Rotarod*

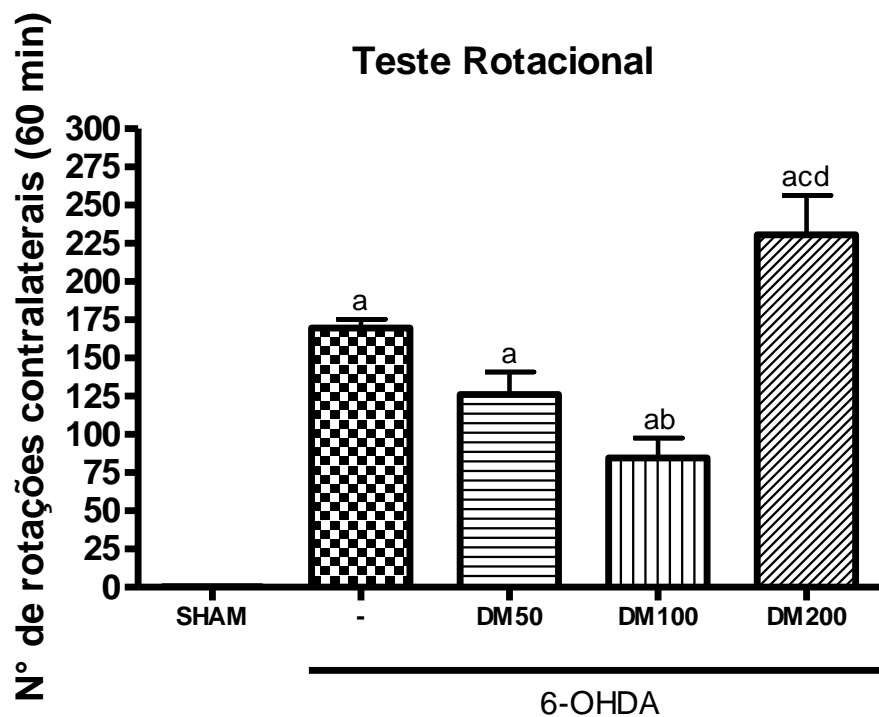
**Fonte:** Autora. **Legenda:** (A) Tempo de Latência, (B) Velocidade em RPM no momento da primeira queda, (C) Número de Quedas e (D) Tempo de Permanência. Os ratos ( $n=06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (50; 100 e 200 mg/Kg *per os*) ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste do *Rotarod* com velocidade inicial e final de 05 e 40 RPM, respectivamente, com tempo total de 5 min. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-). Considerou-se estatisticamente significativo  $P<0,05$ .

#### 4.1.1.3 Teste Rotacional Induzido por apomorfina

A severidade da lesão nigroestriatal provocada pela 6-OHDA nos cérebros dos ratos, foi mensurada através do teste rotacional induzido por apomorfina. Das três doses testadas (DM: 50; 100 e 200 mg/kg), apenas DM100 ( $84,53 \pm 13,16$  rotações) apresentou diferença significativa no número de rotações contralaterais ( $P<0,01$ ) quando comparado ao grupo 6-OHDA ( $169,6 \pm 5,69$  rotações), revertendo o deficit motor induzido pela 6-OHDA em mais de 50% neste teste (Figura 20).

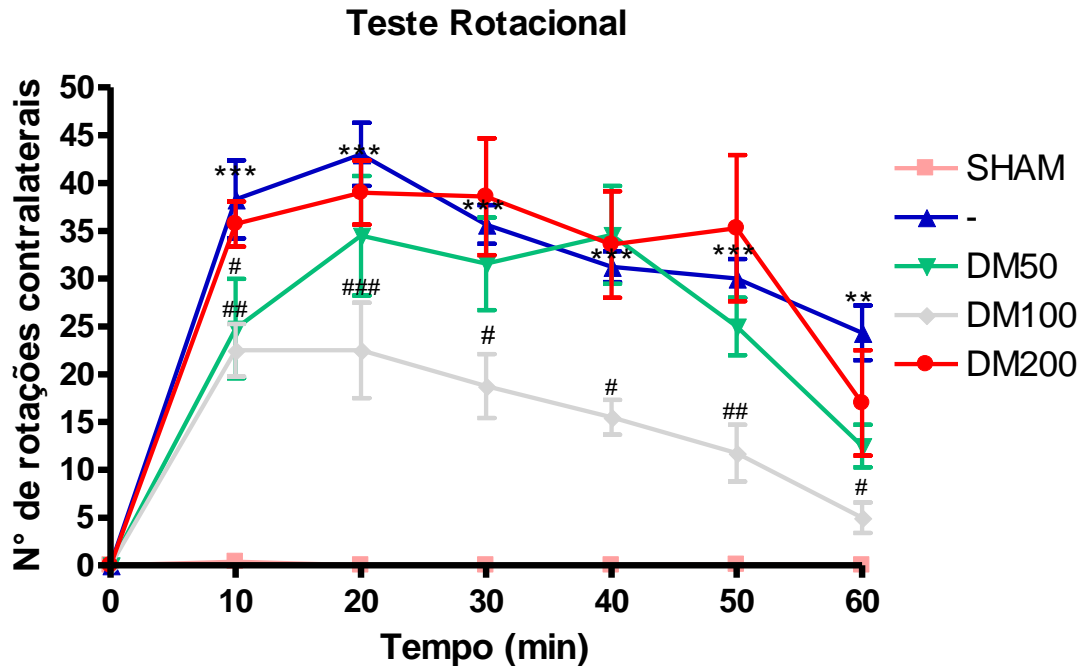
Na análise temporal, DM50 diferiu do grupo 6-OHDA apenas no primeiro momento (0-10 min) na observação das rotações contralaterais do teste rotacional, no restante do tempo (10-60 min) não observou-se diferenças significativas. Enquanto isso, DM100 reduziu o número de rotações em relação ao grupo 6-OHDA em todo o período de observação, já DM200 não reverteu o número de rotações em momento algum (Figura 21).

Figura 20 - Teste Rotacional Induzido por Apomorfina



**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (50;100 e 200 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.), onde o número total de rotações contralaterais à lesão foram contabilizados por um período de 60 min. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50; d vs DM100. Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$ .

Figura 21 - Análise Temporal da Variação Rotacional.



**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (50;100 e 200 mg/Kg *per os*) ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, *i.p.*), onde o número de rotações contralaterais à lesão foram contabilizados a cada 10 min dentro de um período total de 60 min. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças  $P < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, em relação ao Sham. # e ### indicam diferenças  $P < 0,05$  e  $P < 0,001$ , em relação ao grupo 6-OHDA.

## 4.2 Análises Neuroquímicas

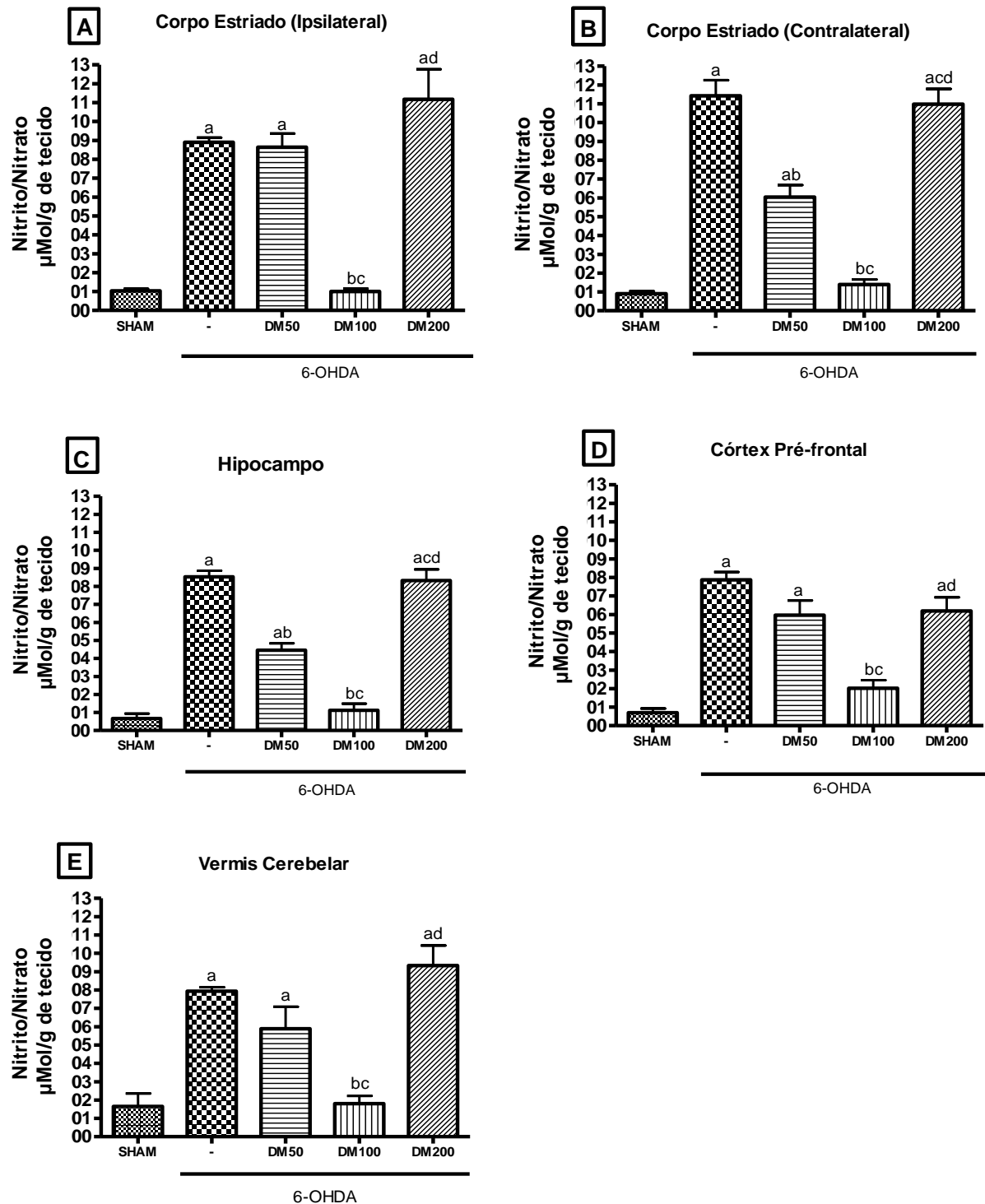
### 4.2.1 Determinação das Concentrações de Nitrito ( $\text{NO}_2$ )/ Nitrato ( $\text{NO}_3$ ) em diferentes áreas cerebrais

Os resultados da análise dos níveis de nitrito podem ser observadas na Figura 22, eles indicaram um aumento significativo ( $P < 0,001$ ) nos níveis de nitrito/nitrato no grupo lesionado com 6-OHDA em todas as áreas avaliadas em relação ao grupo SHAM. Das doses testadas, o grupo de animais tratados com DM 100 mg/kg em nenhuma das áreas analisadas apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo falso operado. Reduzindo os níveis de nitrito/nitrato em média 89% no corpo estriado ipsilateral ( $0,99 \pm 0,15 \mu\text{Mol/g}$ ), em 88% no corpo estriado contralateral ( $1,38 \pm 0,27 \mu\text{Mol/g}$ ), em 87% no hipocampo ( $1,12 \pm 0,36 \mu\text{Mol/g}$ ), em 74% no córtex pré-frontal ( $2,0 \pm 0,4 \mu\text{Mol/g}$ ) e em 77% no vermis cerebelar

( $1,79 \pm 0,4 \mu\text{Mol/g}$ ) quando comparadas com os níveis de nitrito/nitrato detectados no grupo 6-OHDA (CEI:  $8,9 \pm 0,24 \mu\text{Mol/g}$ ; CEC:  $11,4 \pm 0,8 \mu\text{Mol/g}$ ; HP:  $8,5 \pm 0,33 \mu\text{Mol/g}$ ; CPF:  $7,8 \pm 0,42 \mu\text{Mol/g}$ ; VC:  $7,9 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$ ). Já a dose de 50 mg/kg conseguiu reduzir os níveis elevados induzidos pela administração da 6-OHDA no hipocampo e no corpo estriado contralateral, porém, nas demais áreas esse efeito não foi observado. Com relação a dose de 200 mg/kg, não houve redução nos níveis de nitrito em nenhuma das áreas avaliadas em relação ao grupo 6-OHDA.



Figura 22 – Análise dos níveis de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais

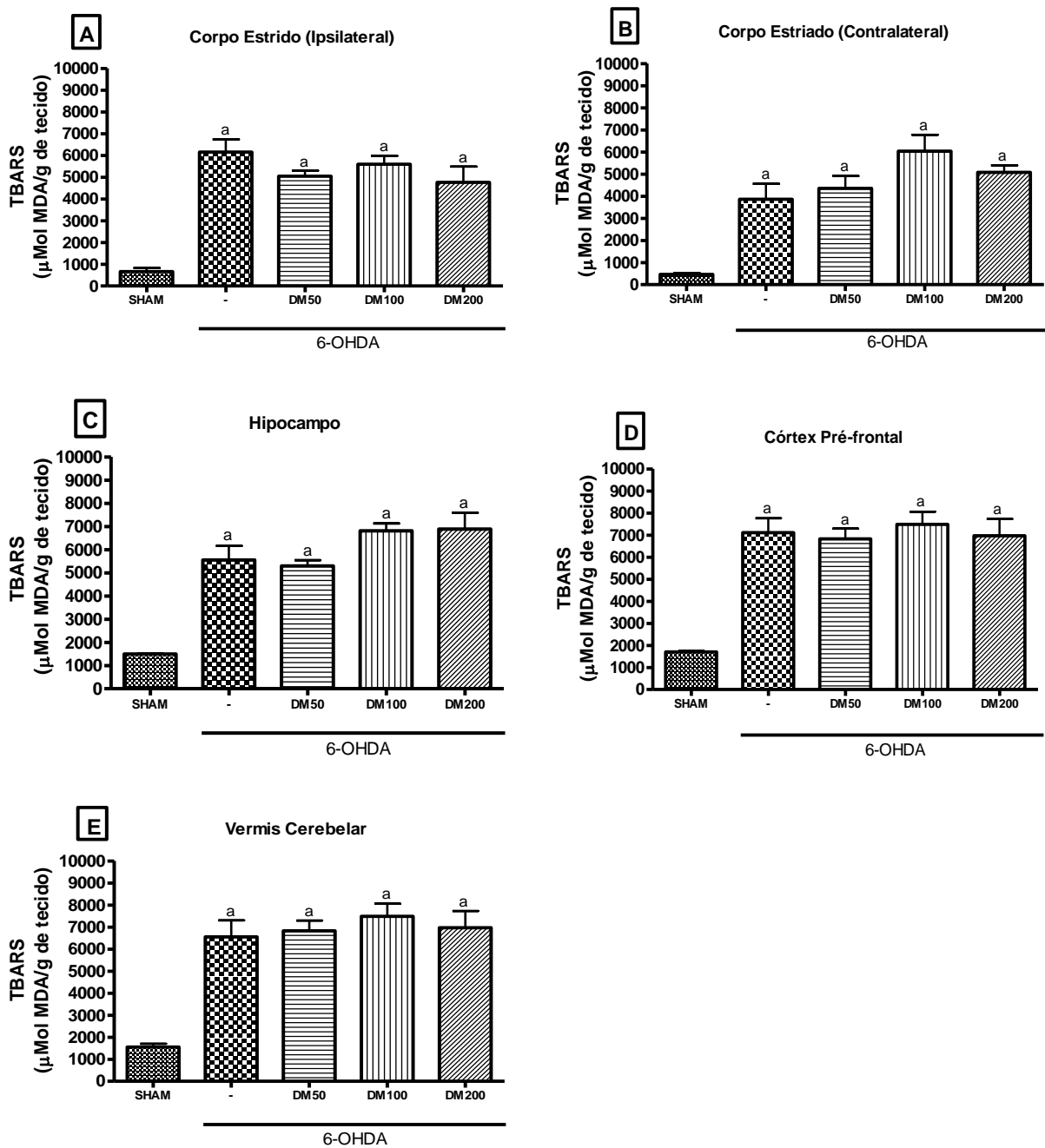


**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (50;100 e 200 mg/Kg per os) ou Salina (0,9%, per os) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 21º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em cinco áreas: (A) Corpo Estriado Ipsilateral, (B) Corpo Estriado Contralateral, (C) Hipocampo, (D) Córtex Pré-frontal e (E) Vermis Cerebelar para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50; d vs DM100. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

#### **4.2.2 Determinações dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em diferentes áreas cerebrais**

Para determinar uma possível ação antioxidante do Diosmin® em modelo animal de DP induzido por 6-OHDA, utilizou-se o teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Os teste detectou elevação dos níveis de malondialdeído, um dos principais produtos da peroxidação lipídica, em todas as áreas analisadas de animais lesionados com 6-OHDA em relação ao grupo SHAM, porém, nem uma das doses de Diosmin® avaliadas no respectivo teste conseguiu reverter sinificamente os níveis de peroxidação lipídica induzidas pela 6-OHDA (Figura 23).

Figura 23 – Análise dos níveis Peroxidação Lipídica (TBARS) em áreas cerebrais

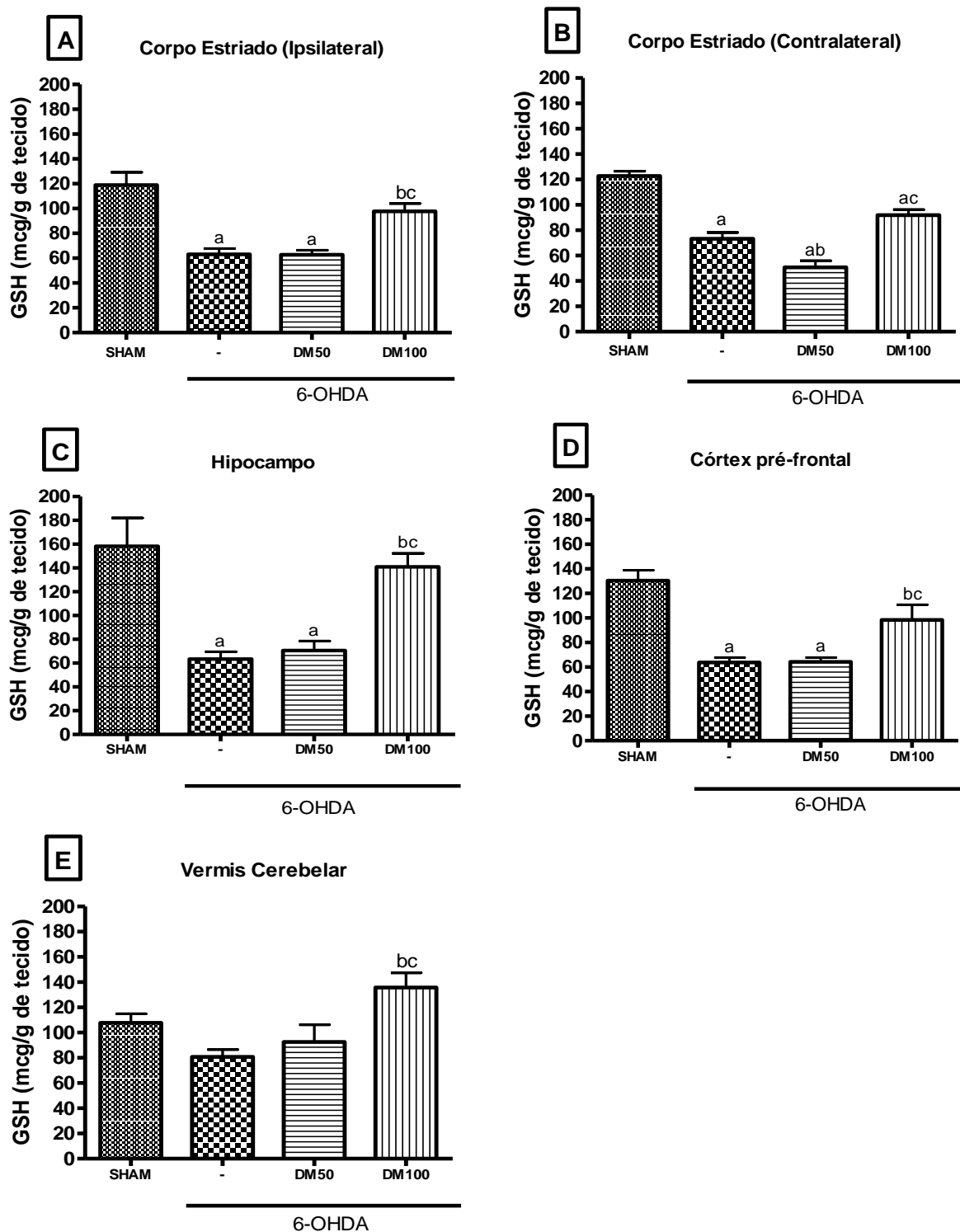


**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (50;100 e 200 mg/Kg *per os*) ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 21º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em cinco áreas: (A) Corpo Estriado Ipsilateral, (B) Corpo Estriado Contralateral, (C) Hipocampo, (D) Córtex Pré-frontal e (E) Vermis Cerebelar para determinação dos níveis de TBARS. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way ANOVA*, Bonferroni. *a* vs SHAM. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

### 4.2.3 Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) em áreas cerebrais

Para uma possível atividade antioxidante exercida pelo Diosmin®, via GSH, no nosso modelo, utilizou-se as duas melhores doses de DM obtidos a partir dos resultados apresentados nos testes anteriores, com isso a dose de 200 mg/kg foi descartada para este teste. Os resultados obtidos mostraram diferença significativa nos níveis de GSH no grupo 6-OHDA, que mostraram redução em relação ao grupo SHAM em praticamente todas as áreas analisadas, com exceção do vermis cerebelar. A dose de 50 mg/kg não apresentou atividade antioxidante, via GSH em nenhuma das áreas avaliadas e até reduziu os níveis de GSH em 44% no corpo estriado contralateral ( $50,76 \pm 5,1$  mcg/g) em relação ao grupo 6-OHDA ( $73,23 \pm 4,95$  mcg/g). Entretanto, o grupo tratado com DM 100 mg/kg elevou a atividade antioxidante no corpo estriado (Ipsilateral), hipocampo, córtex pré-frontal e vermis cerebelar. Além disso DM100 apresentou diferença significativa de DM50 em todas as áreas analisadas (Figura 24).

Figura 24 – Análise dos níveis de Glutathiona reduzida (GSH) nas áreas cerebrais



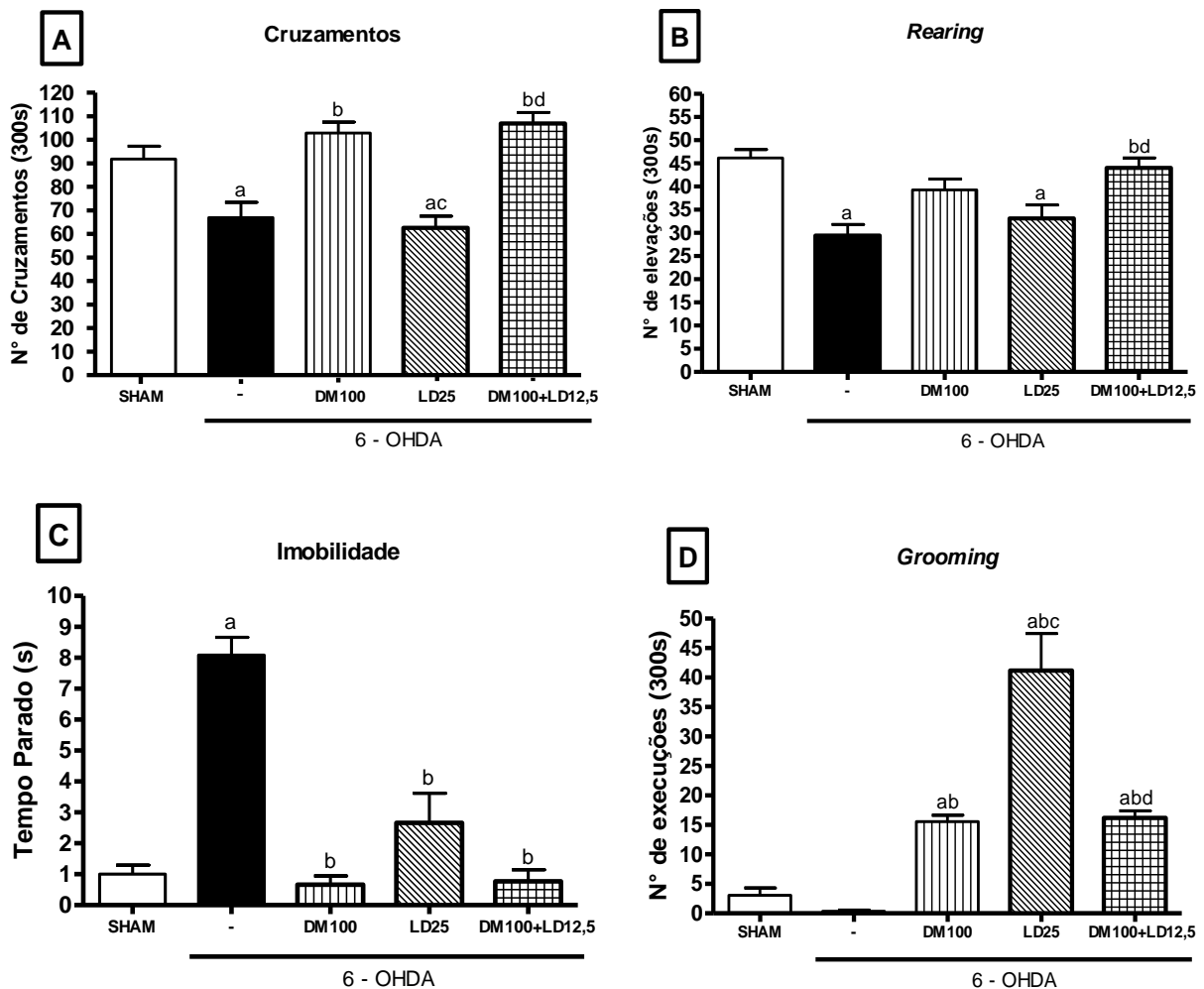
**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (50;100 e 200 mg/Kg *per os*) ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. Após os testes comportamentais no 21º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em cinco áreas: (A) Corpo Estriado Ipsilateral, (B) Corpo Estriado Contralateral, (C) Hipocampo, (D) Córtex Pré-frontal e (E) Vermis Cerebelar para determinação dos níveis de GSH. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

### **4.3 Resultados da 2ª ETAPA – Associação da melhor dose de Diosmin (100 mg/kg) com Levodopa em sub-dose**

#### **4.3.1 Avaliação da Atividade Locomotora**

##### **4.3.1.1 Teste de Campo Aberto (*Open Field Test*)**

No teste de campo aberto, a associação do Diosmin® na dose 100 mg/kg com o o tratamento convencional para DP, L-DOPA na dose de 12,5 mg/kg não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento com o Diosmin® 100 mg/kg sozinho. Já quando comparada ao grupo tratado com a L-dopa na dose de 25 mg/kg (cruzamentos:  $62,56 \pm 4,99$ ; *rearing*:  $33,13 \pm 2,91$ ), a associação de DM + LD apresentou aumento na atividade locomotora horizontal (cruzamentos:  $107,0 \pm 4,62$ ) e vertical (*rearing*:  $44,00 \pm 2,16$ ) em 58% e 25% respectivamente. O tempo de imobilidade de DM100; LD25 e da associação DM + LD não diferiu estatisticamente entre eles, nem em relação ao grupo falso operado. Na avaliação da auto-limpeza (*grooming*), os animais tratados com LD 25 mg/kg apresentaram um aumento de 65% do número de *groomies* em relação ao grupo tratado com DM100 e de 60% em relação ao grupo tratado com o associado (Figura 25).

Figura 25 - Análise da atividade motora no Teste de Campo Aberto (*Open field test*)

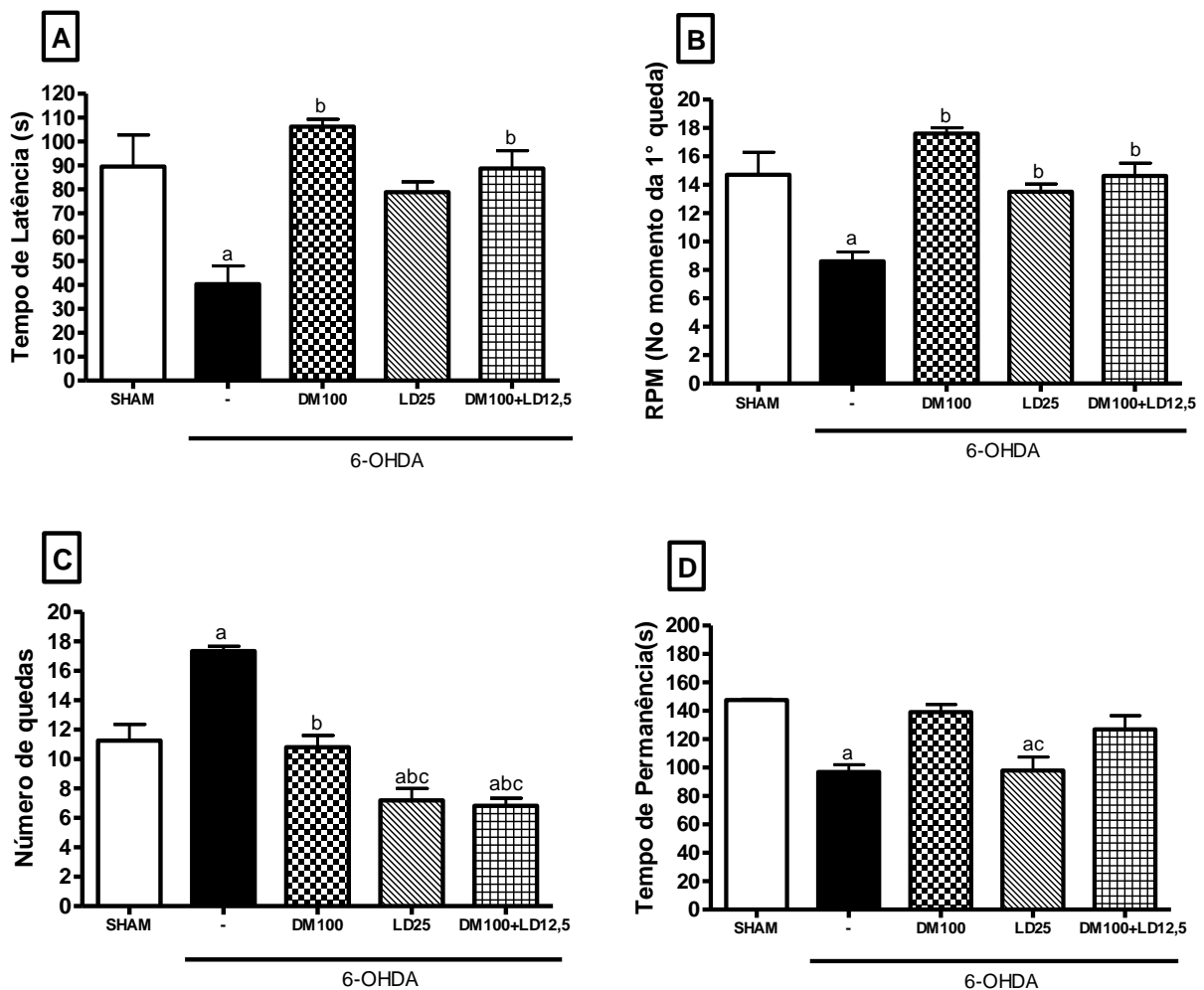
**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (100 mg/Kg *per os*); LD (25 mg/Kg *per os*); associação de DM + LD (100 e 12,5 mg/Kg *per os*, respectivamente); ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram observados durante 5 min em campo aberto (cruzamentos, *rearing*, *grooming*, tempo de imobilidade e *grooming*). Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50; d vs DM100. Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$ .

#### 4.3.1.2 Teste do Rotarod

Os resultados obtidos no teste de rota-rod para o tempo de latência não mostraram diferença significativa entre o grupo tratado com DM 100 mg/kg e o grupo tratado com o associado de DM + LD. Ambos apresentaram um aumento no tempo de latência de mais de 50% em relação ao grupo 6-OHDA. Entretanto a dose de L-dopa 25 mg/kg (latência:  $78,8 \pm 4,3$  s) não mostrou diferença significativa no tempo de latência quando comparada com o grupo 6-OHDA (latência:  $40,3 \pm 7,6$  s). O tratamento com LD25 ( $7,2 \pm 0,8$  quedas) e a com a

associação ( $6,8 \pm 0,519$  quedas) reduziram significativamente o número de quedas em relação ao grupo tratado com DM sozinho ( $10,8 \pm 0,8$  quedas). Por outro lado os animais tratados com LD25 (permanência:  $147,5 \pm 0,76$  s) foram os que menos tempo permaneceram no equipamento, e o único grupo que recebeu tratamento medicamentoso a diferir estatisticamente do grupo SHAM (permanência:  $97,8 \pm 9,5$  s) nesse parâmetro (Figura 26).



Figura 26 – Análise da atividade motora no teste do *rotarod*

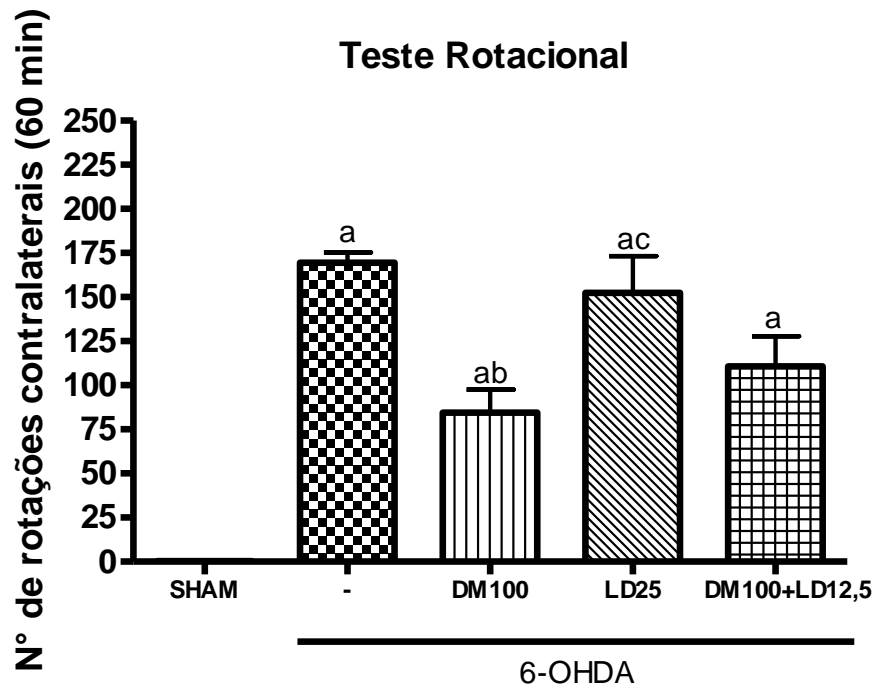
**Fonte:** Autora. **Legenda:** (A) Tempo de Latência, (B) Velocidade em RPM no momento da primeira queda, (C) Número de Quedas e (D) Tempo de Permanência. Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (100 mg/Kg *per os*); LD (25 mg/Kg *per os*); associação de DM + LD (100 e 12,5 mg/Kg *per os*, respectivamente); ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste do *Rotarod* com velocidade inicial e final de 05 e 40 RPM, respectivamente, com tempo total de 5 min. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50. Considerou-se estatisticamente signicante  $P < 0,05$ .

#### 4.3.1.3 Teste Rotacional Induzido por apomorfina

Quando avaliados os resultados dos animais tratados com a associação do Diosmin® com a Levodopa e dos animais tratados com a Levodopa sozinha, eles mostraram que, diferentemente dos animais tratados apenas com DM100, nenhuma das doses conseguiu reduzir o número de rotações contralaterais induzidas pela apomorfina em relação ao grupo 6-OHDA. Além disso, o grupo tratado com LD25 ( $152,3 \pm 20,8$  rotações) apresentou um aumento de 44%

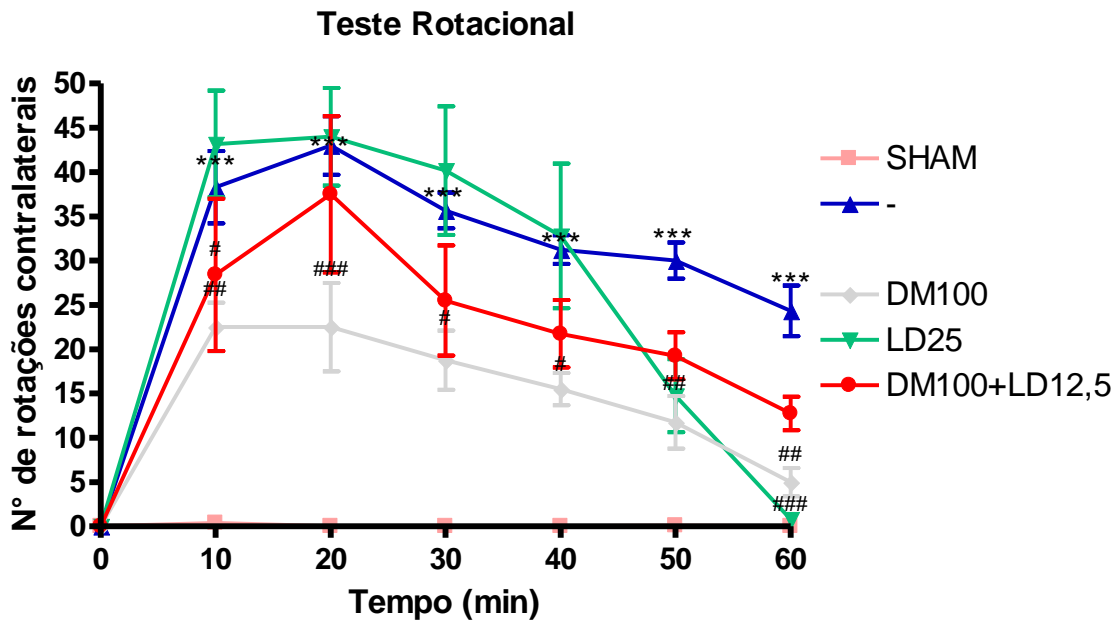
do número de rotações contralaterais em relação ao grupo tratado com DM100 ( $84,53 \pm 13,16$  rotações) (Figura 27). Da mesma forma, em nenhum momento da avaliação temporal, a associação apresentou diferença significativa do grupo 6-OHDA (Figura 28).

Figura 27 – Avaliação do número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina



**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (100 mg/Kg *per os*); LD (25 mg/Kg *per os*); associação de DM + LD (100 e 12,5 mg/Kg *per os*, respectivamente); ou Salina (0,9%, *per os*) durante 14 dias, com início 07 dias após serem submetidos a cirurgia estereotáxica. No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.), onde o número total de rotações contralaterais à lesão foram contabilizados por um período de 60 min. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50. Considerou-se estatisticamente significante  $P < 0,05$ .

Figura 28 – Análise temporal do teste rotacional induzido por apomorfina



**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (100 mg/Kg *per os*); LD (25 mg/Kg *per os*); associação de DM + LD (100 e 12,5 mg/Kg *per os*, respectivamente); ou Salina (0,9%, *per os*). No 21º dia, após 2h do tratamento, os animais foram submetidos ao teste rotacional induzido por apomorfina (3 mg/kg, i.p.), onde o número de rotações contralaterais à lesão foram contabilizados a cada 10 min dentro de um período total de 60 min. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. \*, \*\* e \*\*\* indicam diferenças  $P < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $P < 0,001$ , respectivamente, em relação ao Sham. # e ## indicam diferenças  $P < 0,05$  e  $P < 0,001$ , em relação ao grupo 6-OHDA.

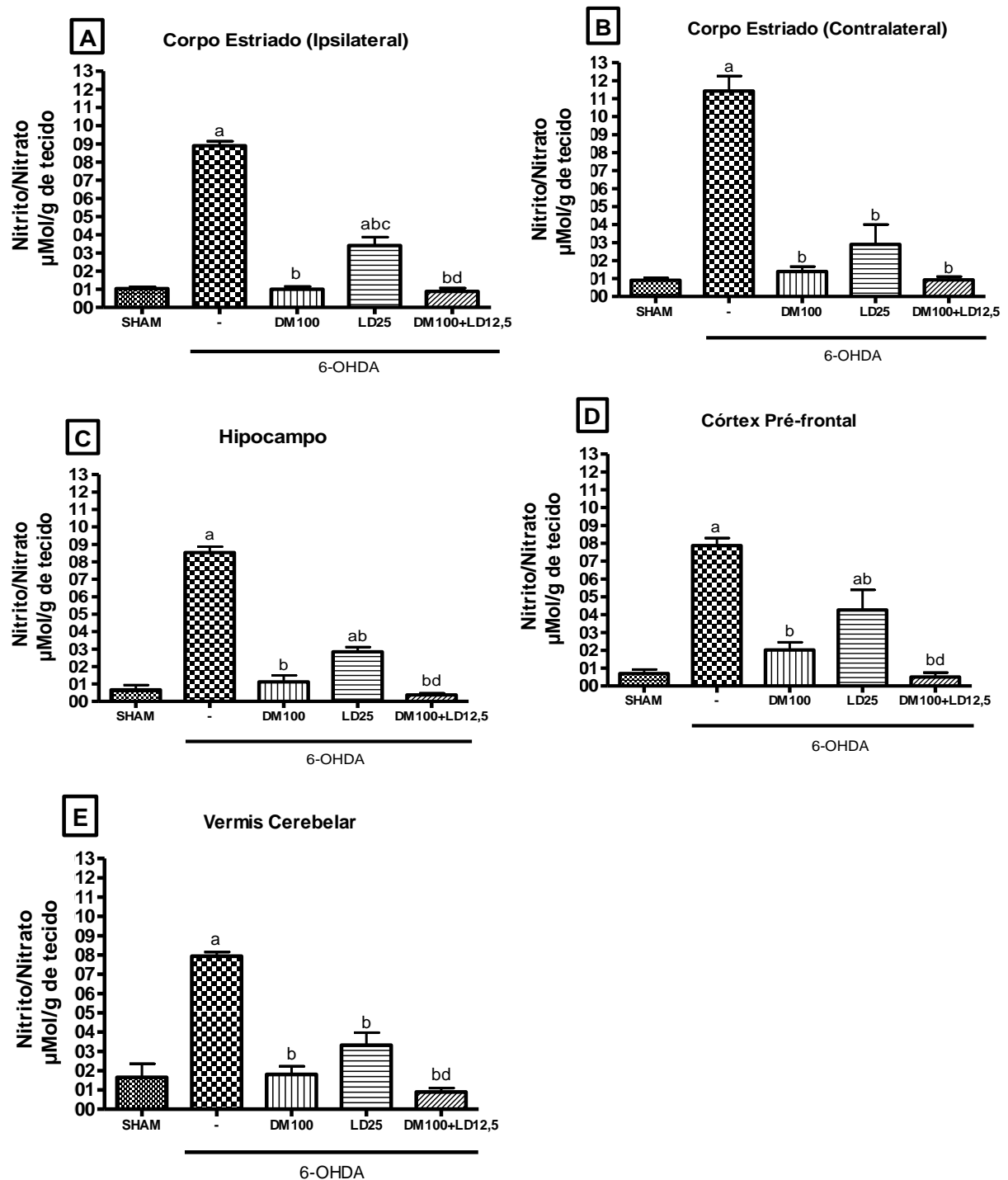
#### 4.4 Análises Neuroquímicas

##### 4.4.1 Determinação das Concentrações de Nitrito ( $\text{NO}_2$ )/Nitrato ( $\text{NO}_3$ ) em diferentes áreas cerebrais

Os níveis de nitrito foram reduzidos em todas as áreas cerebrais avaliadas, tanto no grupo tratado com L-DOPA 25 mg/kg, quando no grupo tratado com a associação de DM 100 mg/kg com L-DOPA na dose de 12,5 mg/kg, quando comparados com os níveis de nitrito obtidos nos animais do grupo 6-OHDA. Entretanto, esses níveis foram significativamente menores no grupo tratado com a associação em relação ao grupo LD25, no corpo estriado ipsilateral (associação:  $0,88 \pm 0,18 \mu\text{Mol/g}$  vs LD25:  $3,4 \pm 0,47 \mu\text{Mol/g}$ ), no hipocampo (associação:  $0,37 \pm 0,1 \mu\text{Mol/g}$  vs LD25:  $2,8 \pm 2,6 \mu\text{Mol/g}$ ), córtex pré-frontal (associação:  $0,5 \pm 0,25 \mu\text{Mol/g}$  vs LD25:  $4,2 \pm 1,11 \mu\text{Mol/g}$ ) e vermis cerebelar (associação:  $0,89 \pm 0,2 \mu\text{Mol/g}$  vs LD25:  $3,3 \pm 0,6 \mu\text{Mol/g}$ ). Não observou-se diferença significativa entre o grupo tratado com a associação e

o grupo tratado apenas com o Diosmin® na dose de 100 mg/kg em nenhuma das áreas analisadas para os níveis de nitrito/nitrato (Figura 29).

Figura 29 – Análise dos níveis de nitrito/nitrato nas áreas cerebrais

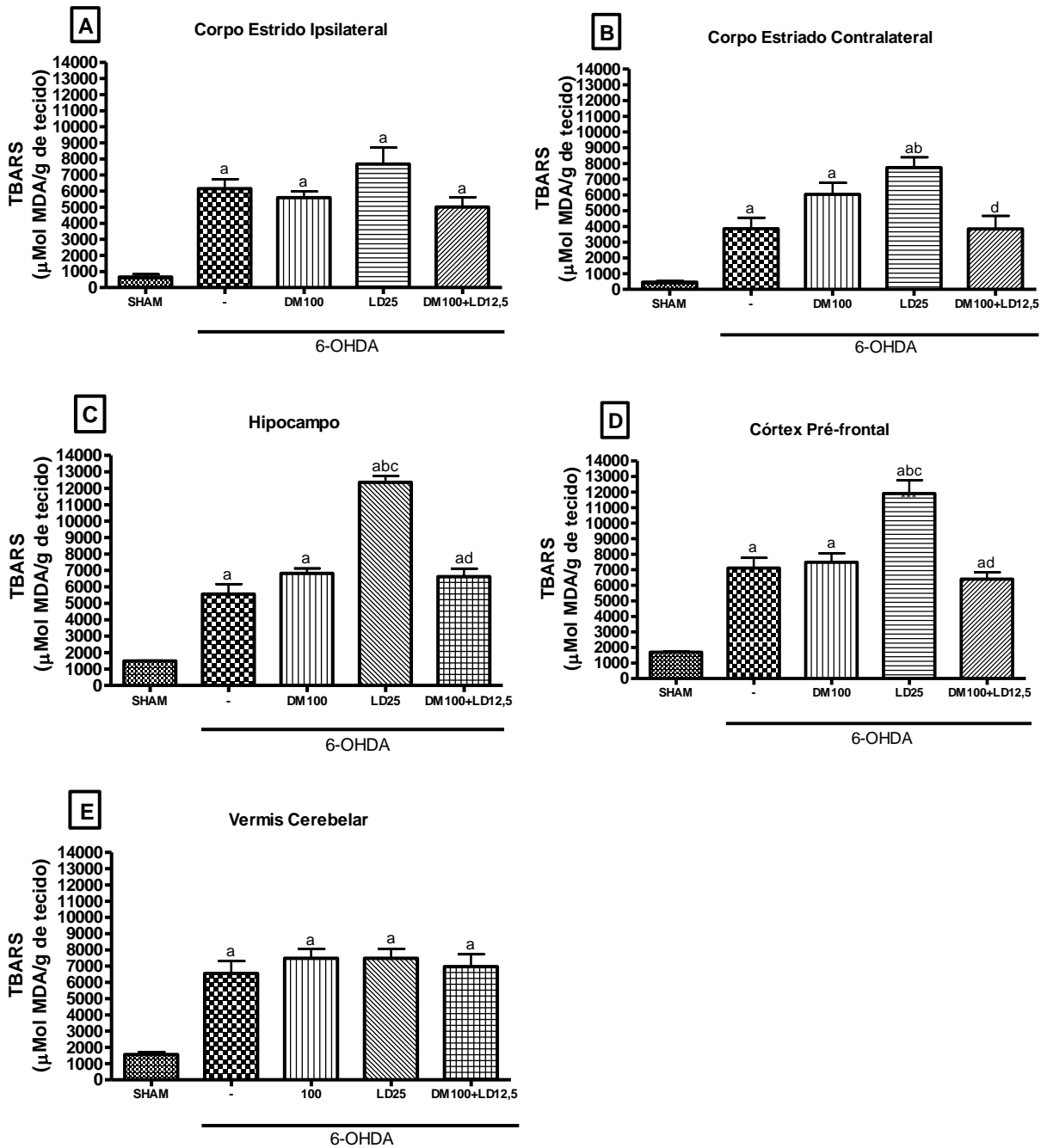


**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (100 mg/Kg per os); LD (25 mg/Kg per os); associação de DM + LD (100 e 12,5 mg/Kg per os, respectivamente); ou Salina (0,9%, per os). Após os testes comportamentais no 21º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em cinco áreas: (A) Corpo Estriado Ipsilateral, (B) Corpo Estriado Contralateral, (C) Hipocampo, (D) Córtex Pré-frontal e (E) Vermis Cerebelar para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. One-way ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50; d vs DM100. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

#### **4.4.2 Determinações dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em diferentes áreas cerebrais**

Com relação aos níveis de peroxidação lipídica, a associação DM + L-DOPA manteve os níveis de MDA no mesmo nível do grupo tratado com DM100, assim como não foi observada diferença significativa entre os animais tratados com DM100 em relação ao grupo 6-OHDA, também não observou-se diferença entre o grupo tratado com a associação em relação ao grupo 6-OHDA. Observou-se ainda que nos animais tratados com LD25, houve um acréscimo dos níveis de MDA de 122% no hipocampo, de 50% no corpo estriado contralateral e 40% córtex pré-frontal em relação ao grupo 6-OHDA (Figura 30).

Figura 30 – Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) nas áreas cerebrais



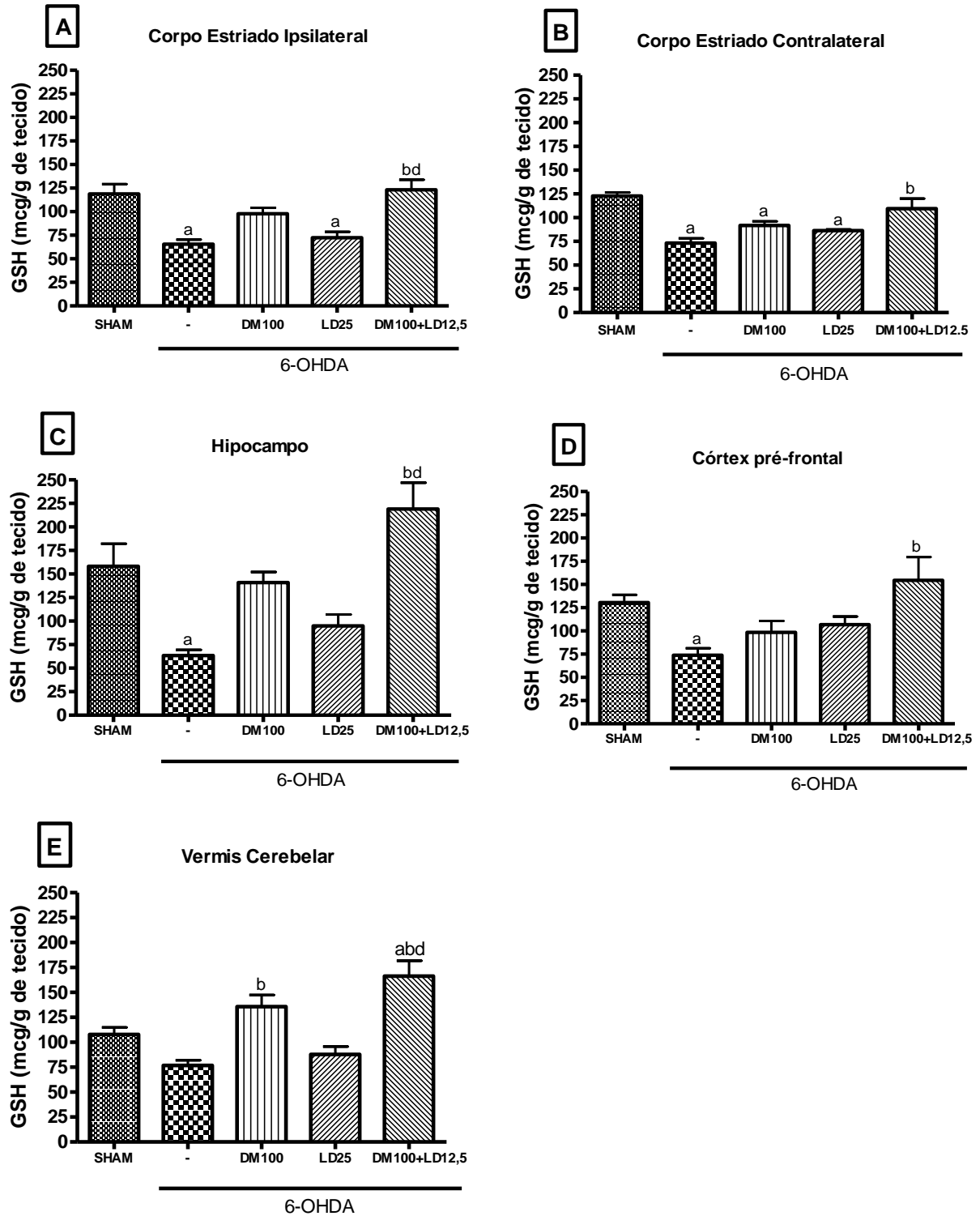
**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (100 mg/Kg per os); LD (25 mg/Kg per os); associação de DM + LD (100 e 12,5 mg/Kg per os, respectivamente); ou Salina (0,9%, per os). Após os testes comportamentais no 21º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em cinco áreas: (A) Corpo Estriado Ipsilateral, (B) Corpo Estriado Contralateral, (C) Hipocampo, (D) Córtex Pré-frontal e (E) Vermis Cerebelar para determinação dos níveis de TBARS. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way* ANOVA, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50; d vs DM100. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

#### **4.4.3 Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) em áreas cerebrais**

Enquanto os níveis de GSH não apresentaram diferença significativa entre o grupo tratado com LD25 e o controle positivo em nenhuma das áreas cerebrais analisadas, a associação de DM 100 mg/kg e LD 12,5 mg/kg apresentou efeito antioxidante através do aumento dos níveis de GSH em relação ao grupo 6-OHDA em todas as áreas analisadas (Figura 31).



Figura 31 – Análise dos níveis de glutatona reduzida nas áreas cerebrais



**Fonte:** Autora. **Legenda:** Os ratos ( $n = 06$  per grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300 g) foram tratados com DM (100 mg/Kg *per os*); LD (25 mg/Kg *per os*); associação de DM + LD (100 e 12,5 mg/Kg *per os*, respectivamente); ou Salina (0,9%, *per os*). Após os testes comportamentais no 21º pós-cirurgia, os animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados em cinco áreas: (A) Corpo Estriado Ipsilateral, (B) Corpo Estriado Contralateral, (C) Hipocampo, (D) Córtex Pré-frontal e (E) Vermis Cerebelar, para determinação dos níveis de GSH. Os dados estão expressos em médias  $\pm$  EPM. *One-way ANOVA*, Bonferroni. a vs SHAM; b vs 6-OHDA (-); c vs DM50; d vs DM100. Considerou-se estatisticamente significativa  $P < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho relata pela primeira vez os efeitos do tratamento com Diosmin® nos déficits motores e nas alterações neuroquímicas induzidas pela neurotoxina 6-OHDA em modelo animal.

Diosmina e hesperidina são flavonóides, cujas atividades neuroprotetoras já foram relatadas em diversas pesquisas. Existem alguns trabalhos testando e comprovando a atividade neuroprotetora da hesperidina em modelo animal e celular da Doença de Parkinson. Na literatura, em modelos animais, a hesperidina na dose de 50 mg/kg mostrou-se a dose com maior potencial neuroprotetor (ANTUNES et al., 2014; KIASALARI et al., 2016). Entretanto trabalhos usando a associação diosmina com hesperidina, ou mesmo testando apenas a diosmina em modelo animal de DP induzido por 6-OHDA, não foram encontrados até o momento.

O teste de campo aberto é cada vez mais usado para entender 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 recuperação da atividade locomotora induzida por 6-OHDA em animais tratados com Diosmin® na dose de 100 mg/kg.

Os animais que receberam o tratamento com Diosmin® em todas as doses reduziram o tempo de imobilidade em relação ao controle positivo, porém, apenas a dose de 100 mg/kg foi capaz de reduzir o tempo de imobilidade ao mesmo níveis observados no grupo 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).

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). No nosso trabalho foi observado um grande aumento na execução do comportamento de auto-limpeza (*grooming*) nos animais tratados com Diosmin® na dose de 100 mg/kg. Segundo Kaleueff e colaboradores (2016) em roedores, a administração sistêmica de agonistas do receptor D1 da dopamina amplifica o complexo comportamental super-estereotipada, levando à produção excessiva de *grooming*. Isto pode sugerir que o Diosmin® na concentração de 100

mg/kg poderia está funcionando ou como um agonista dos receptores do tipo D1 da dopamina, estimulando o funcionamento da via direta da dopamina e conseqüentemente aumentando a atividade locomotora dos animais. Ou o Diosmin® estaria aumentando os níveis de dopamina, através de um efeito possivelmente neuroprotetor exercido sob as células dopaminérgicas.

Entretanto não foi observada diferença no número de *grooming* entre o grupo 6-OHDA 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). Como o nosso procedimento de indução do parkinsonismo pela administração de 6-OHDA no corpo estriado direito não tem um lugar específico no corpo estriado, o processo de lesão pode ocorrer em qualquer local do corpo estriado, desta forma, os animais lesionados podem ou não apresentar um comportamento de auto-limpeza aumentado em relação ao grupo falso operado.

Juntamente com o campo aberto, o teste de *rotarod* representa a principal abordagem na caracterização fenotípica motora em modelos animais. Este teste mostra alta eficácia para a identificação de ratos com lesões dopaminérgicas máximas, mas também é eficaz para a identificação de lesões parciais (ROZAS; LABANDEIRA GARCÍA, 1997). Identificamos nos nossos resultados que os animais lesionados unilateralmente pela 6-hidroxidopamina apresentaram redução significativa no tempo de latência e redução do tempo de permanência na barra giratória, assim como o aumento no número de quedas em relação ao grupo SHAM. Entretanto, os animais tratados com a dose de 100 mg/kg conseguiram reverter esse quadro de déficit motor induzido pela 6-OHDA, elevando em mais de 250% o tempo de latência em comparação ao grupo 6-OHDA. O tempo de latência, é a principal medida obtida na barra giratória, ela reflete o equilíbrio dinâmico, a coordenação motora, o planejamento motor, a aprendizagem motora e as condições físicas gerais do animal. As quedas mais rápidas com tempo de latência menor se associam em geral a alterações na coordenação motora dos animais (SHIOTSUKI et al., 2010).

De forma semelhante, no teste rotacional, apenas a dose de Diosmin® 100 mg/kg foi capaz de reduzir o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina. A elevação no número de rotações se dá pela depleção de neurônios dopaminérgicos ocasionados pela lesão parcial ocasionada pela 6-OHDA (MEREDITH; KANG, 2006).

Assim como o Diosmin® melhorou os déficits motores induzidos pela 6-OHDA, outros trabalhos usando compostos flavonóides como objeto de estudo, resultaram em recuperação da atividade locomotora em animais hemiparkinsonianos. O pré-tratamento com Rutina (25 mg/kg v.o.) durante três semanas diminuiu significativamente as rotações no grupo

lesionado com 6-OHDA em comparação com a 6-OHDA tratada com veículo, em animais submetidos a injeção intrastriatal unilateral de 6-OHDA (KHAN et al., 2012). O tratamento com catequina (10 e 30 mg/kg i.p.) durante 14 dias atenuou o aumento do comportamento rotacional em ratos lesionados com 6-OHDA unilaterais intrastriatais e catequina (10 mg/kg) protegeu significativamente os animais contra os défices de atividade exploratória vertical induzidos pela 6-OHDA (TEIXEIRA et al., 2013). Curcumina (05, 10 e 20 mg/kg/30 dias) elevou o tempo de latência no teste do *rotarod* em ratos com lesão na substância negra induzida por 6-OHDA (SONG et al., 2016). Esses flavonóides exerceram atividade de melhoria da atividade locomotora, devido as suas atividades anti-oxidantes, fornecendo desta maneira, neuroproteção contra a 6-OHDA. Os autores sugerem ainda, que esses flavonóides poderiam ser adjuvantes para o tratamento da Doença de Parkinson. De forma semelhante, Diosmin® pode ter melhorado os deficits locomotores ocasionados pela 6-OHDA, através de uma neuroproteção mediada por suas propriedades anti-oxidantes.

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 intra-estriatal de 6-OHDA 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 intraestriatal de 6-OHDA elevou consideravelmente os níveis de nitrito no grupo 6-OHDA, em relação ao SHAM. Esse aumento dos níveis de nitrito/nitrato foram revertidos no grupo de animais tratados com Diosmin® (100 mg/kg) à níveis semelhantes aos do grupo SHAM em todas as áreas cerebrais analisadas. Sabe-se que o Diosmin® age reduzindo a expressão de moléculas de adesão endotelial e inibe a adesão, migração e ativação de leucócitos no nível capilar (MONOGRAPH. DIOSMIN, 2004; KATSENIS, 2005). Ação do Diosmin® em células de defesa do sistema nervoso foram verificadas por Sawmiller e colaboradores (2016) que concluíram que o tratamento com diosmina reduziu a ativação pró-inflamatória da microglia *in vitro* na presença de IFN $\gamma$  (Interferon gama) e/ ou do ligando CD40. Essa atividade do Diosmin® na redução pró-inflamatória de células do sistema imune pode explicar as reduções dos níveis de nitrito/nitrato observadas nos nossos resultados.

Por outro lado, nenhuma das doses testadas de Diosmin®, inclusive a dose de 100 mg/kg, foi capaz de reverter os elevados níveis de malondialdeído (MDA) provocados pela administração intra-estriatal de 6-hidroxidopamina 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). A estabilidade nos níveis de MDA nos grupos tratados com Diosmin®, podem indicar a ausência de atividade do Diosmin® sob as mitocôndrias, principais produtoras de EROs na disfunção induzida por 6-OHDA. Essa produção pode desencadear diversas lesões às estruturas celulares, incluindo a peroxidação lipídica das membrans celulares. (BINGOL; SHENG, 2016; CHATURVEDI; BEAL, 2013; KIM et al., 2015). Naso e colaboradores (2016) verificaram que em linhas de células de cancro do pulmão humano A549 incubadas por 24h com Diosmina, não houve alterações apreciáveis na produção de EROs devido à ausência de danos na membrana mitocondrial.

Entretando, uma série de outros trabalhos demonstraram a redução dos níveis de MDA exercida pela Diosmina e pela fração flavonóide purificada micronizada. Em uma investigação sobre os possíveis mecanismos de proteção da diosmina na lesão pulmonar induzida por lipopolissacarídeo (LPS), observou-se que os animais expostos a LPS apresentaram um aumento no nível de MDA e uma diminuição acentuada do teor de glutathiona. Estas alterações foram significativamente revertidas pelo tratamento com diosmina (50 e 100 mg/kg) de uma forma dose-dependente. Indicando uma possível regulação positiva de antioxidantes enzimáticas/ não-enzimáticas ou diminuição da produção de EROs exercida pela diosmina (IMAM et al., 2015). ABDEL-SALAM e colaboradores (2012) ao investigar os efeitos da fração flavonóide purificada micronizada (MPFF, Daflon®) no estresse oxidativo hepático e cerebral e na lesão hepática causada pelo LPS em ratos, verificaram que os ratos tratados com MPFF a 9 e 18 mg/kg apresentaram diminuição do MDA e nitrito cerebral e aumento do GSH, resultado da capacidade de redução do dano oxidativo atribuída ao MPFF.

Nossos resultados mostraram que o Diosmin® na dose de 100 mg/kg elevou os níveis de GSH no corpo estriado (ipsilateral), hipocampo, córtex pré-frontal e vermis cerebelar. Segundo Bové e Perier (2012) tem sido demonstrado que os ratos que sobre-expressam superóxido dismutase e glutathiona peroxidase são protegidos contra a toxicidade de 6-OHDA. GSH é um potente antioxidante natural, que age no combate de radicais livres. A depleção de GSH é observada em modelos animais induzidos pela neurotoxina 6-OHDA (BLESA et al., 2012).

Apesar dos resultados positivos associados ao tratamento com o Diosmin® na dose de 100 mg/kg, a dose menor de Diosmin® (50 mg/kg) utilizada, assim como a dose maior (200 mg/kg) não apresentaram a mesma capacidade de reversão dos déficits motores e

neuroquímicos ocasionados pela 6-OHDA. Observou-se ainda que na dose de 200 mg/kg houve uma tendência à aumentar o estresse oxidativo e o número de rotações contralaterais induzidas pela apomorfina, apesar de não apresentar diferença estatística do controle positivo nesses parâmetros. Provavelmente uma dose maior do medicamento poderia apresentar resultados de toxicidade. Isso porque os flavonóides podem atuar como antioxidantes e pró-oxidantes que podem ser modulados pelas concentrações usadas (LEWINSKA et al., 2017).

Vários estudos tem relatado os efeitos benéficos dos flavonóides, principalmente devido à sua capacidade antioxidante, incluindo sua ação de remoção direta de radicais livres e suas propriedades de atividade quelante de metais, porém, alguns estudos também tem demonstrado a atividade pró-oxidante dos flavonóides, principalmente em altas doses. Foi observada que a quercetina apresentou propriedades pró-oxidantes e citotóxicas em altas concentrações em culturas de células. De outro modo, em concentrações mais baixas, as propriedades pró-oxidantes da quercetina podem alterar o estado redox intracelular através da geração de quantidades moderadas de EROs ou indiretamente através da depleção parcial da GSH. Ambos os eventos podem levar a uma situação de estresse oxidativo leve, que por sua vez irá influenciar a expressão de genes antioxidantes por modulação de redox fatores de transcrição sensíveis (DAJAS et al., 2015).

Para verificar de forma mais eficaz a atividade do Diosmin® no nosso modelo, associamos a dose terapêutica de Diosmin® apresentada nos nossos resultados preliminares com o tratamento “padrão-ouro” para a Doença de Parkinson, a Levodopa. Utilizamos ainda a L-DOPA associada à um inibidor da descarboxilase de ácidos aromáticos (AADC), a benserazida, para evitar a rápida metabolização da L-DOPA nos tecidos periféricos. Além disso a Prolopa®HBS é usada para inibir as flutuações motoras, sendo liberada gradativamente na corrente sanguínea.

De uma forma geral, não observamos diferenças significativas entre os animais tratados com Diosmin® 100 mg/kg daqueles tratados com o DM em associação com a L-DOPA, com exceção de níveis mais elevados de GSH nos animais tratados com a associação. Na recuperação da atividade locomotora, a adição de LD na dose de 12,5 mg/kg ao tratamento com a dose terapêutica de Diosmin®, também não apresentou alterações quando comparadas com o tratamento com o Diosmin® sozinho, com exceção do teste rotacional, onde a associação não conseguiu reverter o número de rotações contralaterais resultantes da lesão nigroestrial por 6-OHDA.

Segundo Bové e Perier (2012), o número de rotações observadas em um rato no teste rotacional é significativamente reduzida após um tratamento crônico e intermitente de três

semanas com L-DOPA, talvez seja necessário um tempo maior de tratamento, além das duas semanas que nossos animais receberam tratamento com a L-DOPA para verificar efeito no teste rotacional. Chen e colaboradores (2015) verificaram o número de rotações induzidas por apomorfina em ratos tratados com piceídeo (um derivado não glicosilado de resveratrol). O teste rotacional foi realizado 7, 14, 21 e 28 dias após lesão com 6-OHDA na substância negra, a cada teste o número de rotações era reduzido em ratos tratados com piceídeo 50 mg/kg em associação com LD 12,5 mg/kg.

Surpreendentemente, o tratamento com LD 25 mg/kg não reverteu o déficit da atividade locomotora horizontal e vertical induzida pela 6-OHDA no teste de campo aberto, apesar de ter elevado o número de *grooming* em relação a todos os demais grupos, o que indica um aumento dos níveis de dopamina. Além disso, o tratamento com essa dose de L-DOPA não apresentou diferença significativa no número de rotações contralaterais em relação ao grupo 6-OHDA. Constatamos ainda que o tratamento com LD 25 mg/kg por 14 dias não foi suficiente para reverter o quadro de depleção de GSH induzido por 6-OHDA, além de elevar os níveis de MDA em áreas cerebrais em relação ao grupo 6-OHDA, estimulando o agravamento da peroxidação lipídica. Efeitos em grande parte melhorados pela associação do Diosmin® com LD 12,5 mg/kg, ou até mesmo pelo tratamento com o Diosmin® sozinho.

Há uma preocupação de longa data que a L-DOPA pode ser tóxica e acelerar a degeneração neuronal e a progressão clínica como uma consequência de espécies de oxigênio reativo geradas pelo metabolismo oxidativo da droga (OLANOW, 2015). Na neuropatologia da DP, os danos oxidativos e a neuroinflamação são os principais eventos, que podem ser amplificados pelo aumento do metabolismo da DA e L-DOPA, ocorrendo durante o tratamento prolongado com L-DOPA.

Vários estudos demonstraram que a acumulação intracelular de DA pode levar ao estresse oxidativo e neurotoxicidade através da formação de vários metabólitos tóxicos, a auto-oxidação de DA produz DA quinonas ou DA semiquinonas deficientes em elétrons, o que pode contribuir para a neurodegeneração através do estresse oxidativo e da disfunção mitocondrial (CARTA et al., 2017). Nikilova e colaboradores (2014) verificaram que a administração de Madopar® (L-DOPA + benzerazida) provocou um maior grau de estresse oxidativo do que o induzido pela Doença de Parkinson, por si só, em pacientes diagnosticados com essa doença. Em particular, uma dosagem elevada de levodopa pode contribuir para a progressão da doença (MÜLLER, 2013).

Apesar disso, o tratamento com L-DOPA 25 mg/kg reduziu os níveis de nitrito/nitrato induzidos por 6-OHDA. Em modelo animal induzido por lesão nigroestriatal por

6-OHDA. Ramírez-garcía, Palafox-sánchez e Limón (2015) concluíram que tratamento oral com L-DOPA/ Carbidopa (100 mg/kg) durante 20 dias causou aumento dos níveis de nitrito na substância *nigra pars compacta*, no estriado dorsal e no córtex pré-frontal mediano dos animais. Entretanto, Pinto e Viana (2015) utilizaram doses menores de L-DOPA em ratos submetidos a lesão estriatal por 6-OHDA, e verificaram redução dos níveis de nitrito/nitrato no estriado de ratos tratados tanto com a associação do chá-verde (25 mg/kg) + L-DOPA (25 mg/kg), quanto com L-DOPA sozinha (nas doses de 25 ou 50 mg/kg), durante 14 dias consecutivos. É possível que as concentrações das doses estejam associadas à essas alterações nos níveis de nitrito/nitrato.

Com a progressão da DP, surge a necessidade de aumentar as concentrações de L-DOPA e o número de vezes do consumo desta droga por dia para a reposição de DA, com isso, elevam-se as probabilidades de surgirem efeitos colaterais (PALFI et al., 2014). A redução da dose de L-DOPA é a melhor estratégia para evitar os efeitos adversos induzidos pela L-DOPA. No entanto, reduzir a dose de L-DOPA sozinho não é uma abordagem ideal. Embora uma dose baixa seja mais segura, é menos eficaz no alívio dos sintomas motores da DP. Para contrariar estes efeitos metabólicos associados a levodopa a longo prazo, um novo método de tratamento que permita um tratamento eficaz de L-DOPA com uma dosagem baixa é altamente importante (KURLAN, 2005; WEINTRAUB; COMELLA; HORN, 2008).

Ao associarmos o tratamento com Diosmin® à L-DOPA em uma dose baixa, observamos uma melhora significativa na atividade locomotora e no estresse oxidativo em ratos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA em comparação com os animais tratados com L-DOPA sozinha em uma dose maior. Evidências crescentes implicaram que a terapêutica crônica de combinação de fármacos é uma abordagem valiosa para atenuar os efeitos adversos induzidos por L-DOPA, como a associação da terapia com levodopa combinada com a aplicação suplementar de catadores de radicais livres (MÜLLER, 2013).

Ao investigar se o flavonóide hidroxissafrol amarelo A (HSYA) melhora a discinesia induzida por L-DOPA e as flutuações motoras em ratos lesionados com 6-hidroxi-dopamina. Wang e colaboradores (2015) verificaram que a co-administração de HSYA com L-DOPA melhorou significativamente a discinesia induzida por L-DOPA. O tratamento combinado também impediu o encurtamento da duração da resposta motora que define o desgaste das flutuações do motor. Segundo Peritore e colaboradores (2016), a combinação de resveratrol, quercetina ou galato de epigallocatequina com L-DOPA foi mais eficaz na redução dos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que o tratamento com L-DOPA sozinho. Além disso, a combinação de cada antioxidante com L-DOPA foi eficaz na preservação da viabilidade celular.



Em experimento realizado por Takeshima e colaboradores (2011), a exposição a L-DOPA durante 24 horas reduziu o número de células viáveis e aumentou a formação de quinona ligada à proteína na célula. Ambos os efeitos foram evitados pelo tratamento simultâneo de L-DOPA com baicaleína. Além disso, a baicaleína impediu a formação de radicais semiquinona de DA a partir de DA num sistema *in vitro* de células livres. O tratamento prolongado com baicaleína durante 96 horas também protegeu contra o excesso de morte celular induzida por L-DOPA e também aumentou os níveis de glutathione (GSH) em células CATH. Indicando atividade neuroprotetora exercida pela baicaleína contra o excesso de neurotoxicidade da DA induzida por L-DOPA através da supressão da formação de DA quinona.

Chen e colaboradores (2015), em seus estudos, verificaram redução nos níveis de MDA em ratos submetidos a lesão na substância negra por 6-OHDA e tratados por 21 dias com uma associação de 50 mg/kg de piceida + 12,5 mg/kg de L-DOPA. Sugerindo que piceida preserva e corrige várias vias/ parâmetros anti-oxidantes principais, seletivamente na região SNc afectada. Isto implica a sua potente atividade anti-oxidante como um importante mecanismo de sublinhamento para proteger a neurodegeneração da SNc vulnerável nestes modelos.

De maneira generalizada, os nossos resultados indicam que tanto o tratamento com Diosmin® 100 mg/kg, assim como quando associado com LD 12,5 mg/kg foram mais eficientes no tratamento de animais hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA, do que animais tratados com LD 25 mg/kg. Assim como a administração sistêmica Diosmin® 100 mg/kg conseguiu efeitos preventivos, comparáveis ou melhores do que a própria associação com a Levodopa. Além disso, Diosmin® já é reconhecido por sua atividade de inibição de COMT. Seu uso em associado à terapia L-DOPA/carbidopa ou benserazida provavelmente elevaria a biodisponibilidade de Levodopa, ao mesmo tempo que proporcionaria neuroproteção.

## 6 CONCLUSÃO

O tratamento com Diosmin® mostrou possível efeito neuroprotetor nas alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por 6-hidroxidopamina. Sua associação com a levodopa em sub-dose mostrou efeito superior em relação ao tratamento convencional de reposição de dopamina, a base de levodopa/benzerasida em uma dosagem mais elevada. Estes resultados sugerem um potencial terapêutico da associação do Diosmin® com a L-DOPA no tratamento da Doença de Parkinson, assim como a necessidade de pesquisas mais aprofundadas do mecanismo de ação do Diosmin® em modelo de DP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, O. M.; YOUNESS, E. R.; MOHAMMED, N. A.; ABD-ELMONIEM, M.; OMARA E.; SLEEM, A. A. Neuroprotective and hepatoprotective effects of micronized purified flavonoid fraction (Daflon®) in lipopolysaccharide-treated rats. **Drug Discov Ther**, v. 6, n. 6, p. 306-314, 2012.

ACHE. Bula Diosmin, 2015. Disponível em:  
<http://www.ache.com.br/Downloads/LeafletText/108/BulaDiosmin15-4-2015.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2015.

ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends Neurosci**, v. 13, n. 7, p. 266-271, 1990.

ANNUS, A.; VÉCSEI, L. Spotlight on opicapone as an adjunct to levodopa in Parkinson's disease: design, development and potential place in therapy. **Drug Des Devel Ther**, v. 11, p. 143–151, 2017.

ANSCHAU, V.; IAGUER, F. Avaliação da taxa de peroxidação lipídica em ratos suplementados com óleo de peixe e óleo de fígado de tubarão. **Unoesc & Ciência – ACBS**, Joaçaba, v. 2, n. 1, p. 17-30, 2011.

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. 11, n. 12, p. 1415-1422, 2014.

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

ARMANDO, V.; ANTONIO, G.; GIOVANNI, F.; MAURIZIO, I.; IDA, R. M.; ANDREA, G.; MICHELA, C.; CHIARA, R.; MARIO, C. A.; MARCO, V. Parkinson's Disease: Autoimmunity and Neuroinflammation. **Autoimmun Rev**, v. 16, 2016.

ASAKAWA, T.; FANG, H.; SUGIYAMA, K.; NOZAKI, T.; HONG, Z.; YANG, Y.; HUA, F.; DING, G.; CHAO, D.; FENOY, A. J.; VILLARREAL, S. J.; ONOE, H.; SUZUKI, K.; MORI, N.; NAMBA, H.; XIA, Y. Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease. **Neurosci Biobehav Rev**, 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 Oxid **Med Cell Longev**, 2014.

BARNETT, R. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, 2016, p. 217.

BATASSINI, C.; BROETTO, N.; TORTORELLI, L. S.; BORSOI, M.; ZANOTTO, C.; GALLAND, F.; SOUZA, T. M.; LEITE, M. C.; GONÇALVES, C. A. Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B. **Neural Plast**, 2015.

- BEDIN, B.; FERRAZ, A. C. Organização Funcional dos Circuitos dos Núcleos da Base Afetados na Doença de Parkinson e na Discinesia Induzida pela Levodopa. **Saúde Rev**, v. 5, n. 9, p. 77-88, 2003.
- BERTLER, A.; ROSENGREN, E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. **Experientia**, v. 15, p. 10-11, 1959.
- BINGOL, B.; SHENG, M. Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. **Free Radic Biol Med**, 2016.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS J**, v. 279, n. 7, p. 1156-1166, 2012.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14, n. 2, p. 124-129, 2008.
- BLESA, J.; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **J Biomed Biotechnol**, 2012.
- BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Front Neuroanat**, v. 8, n. 155, 2014.
- BOGUCKA-KOCKA, A.; WOŹNIAK, M.; FELDO, M.; KOCKIC, J.; SZEWCZYK, K. Diosmin--isolation techniques, determination in plant material and pharmaceutical formulations, and clinical use. **Nat Prod Commun**, v. 8, n. 4, p. 545-550, 2013.
- BOSTAN, A. C.; DUM, R. P.; STRICK, P. L. The basal ganglia communicate with the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci**, v. 107, p. 8452-8456, 2010.
- BOUDET, C.; PEYRIN, L. Comparative effect of tropolone and diosmin on venous COMT and sympathetic activity in rat. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 283, n. 2, p. 312-320, 1986.
- BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, 2012.
- 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.; CASTRIOTO, A.; DI FILIPPO, M.; PICCONI, B. New experimental and clinical links between the hippocampus and the dopaminergic system in Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 8, p. 811-821, 2013.
- 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.
- CAMPANERO, M. A.; ESCOLAR, M.; PEREZ, G.; GARCIA-QUETGLAS, E.; SADABA, B.; AZANZA, J. R. Simultaneous determination of diosmin and diosmetin in human plasma by ion trap liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass

spectrometry: Application to a clinical pharmacokinetic study. **J Pharm Biomed Anal**, v. 51, n. 4, p. 875-881, 2010.

CARLINI, E. A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 1, p. 25-31, 1979.

CARTA, A. R.; MULAS, G.; BORTOLANZA, M.; DUARTE, T.; PILLAI, E.; FISONE, G.; VOZARI, R. R.; DEL-BEL, E. l-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? **Eur J Neurosci**, v. 45, n. 1, p. 73-91, 2017.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHATURVEDI, R. K.; BEAL, M. F. Mitochondria targeted therapeutic approaches in Parkinson's and Huntington's diseases. **Mol Cell Neurosci**, v. 55, p. 101-114, 2013.

CHEN, Y.; ZHANG, D. Q.; LIAO, Z.; WANG, B.; GONG, S.; WANG, C.; ZHANG, M. Z.; WANG, G. H.; CAI, H.; LIAO, F. F.; XU, J. P. Anti-oxidant polydatin (piceid) protects against substantia nigral motor degeneration in multiple rodent models of Parkinson's disease. **Mol Neurodegener**, v. 10, n. 4, 2015b.

DAJAS, F.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; ARREDONDO, F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MARTÍNEZ, M.; RIVERA, F.; VAAMONDE, L. Quercetin in brain diseases: Potential and limits. **Neurochem Int**, v. 89, p. 140-148, 2015.

DELOITTE ACCESS ECONOMICS. **Living with Parkinson's Disease: An updated economic Analysis 2014 Parkinson's Australia**, 129p, 2015.

DEL-RIO, J. A.; FUSTER, M. D.; GÓMEZ, P.; PORRAS, I.; GARCIA-LIDÓN, A.; ORTUÑO, A. *Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. **Food Chem**, v. 84, p. 457-461, 2004.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 421-31, 1990.

DU, G.; SUN, L.; ZHAO, R.; DU, L.; SONG, J.; ZHANG, L.; HE, G.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. Polyphenols: Potential source of drugs for the treatment of ischaemic heart disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 162, p. 23-34, 2016.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc**, v. 46, n. 3, 1957. p 208.

DUTTA, G.; ZHANG, P.; LIU, B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 22, n. 5, p. 453-464, 2008.

EUROPEAN PARKINSON'S DISEASE ASSOCIATION - EPDA, 2016. Prevalence of Parkinson's disease. Disponível em: < <http://www.epda.eu.com/en/resources/life-with-parkinsons/part-1/prevalence-of-parkinsons-disease/>>. Acesso em: 24 dez. 2016.

FAHN, S.; SULZER, D. Neurodegeneração e neuroproteção na Doença de Parkinson. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 139-154, 2004.

FROTA, A. F. *Cimicifuga Racemosa: Uma nova perspectiva para o tratamento de distúrbios neurológicos*. 2015. 177f. Dissertação – Universidade Federal do Ceará. Sobral, 2015.

GALVAN, A.; DEVERGNAS, A.; WICHMANN, T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. **Front Neuroanat**, v. 9, n. 5, 2015.

GAVORNÍK, P.; GAŠPAR, A.; GAVORNÍKOVÁ, E. Present and future in the management of venous vascular diseases. **Vnitr Lek**, v. 61, n. 2, p. 151-156, 2015.

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.

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

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

GUAN, L. P.; LIU, B. Y. Antidepressant-like effects and mechanisms of flavonoids and related analogues. **Eur J Med Chem**, v. 12, n. 121, p. 47-57, 2016.

GUILLOT, B.; GUILHOU, J. J.; DE CHAMPVALLINS, M.; MALLET, C.; MOCCATTI, D.; POINTEL, J. P. A long term treatment with a venotropic drug. Results on efficacy and safety of Daflon 500 mg in chronic venous insufficiency. **Int Angiol**, v. 8, n. 4, p. 67-71, 1989.

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. **Mol Neurobiol**, v. 49, p. 262-275, 2014.

HÜGEL, H. M.; JACKSON, N.; MAY, B.; ZHANG, A. L.; XUE, C. C. Polyphenol protection and treatment of hypertension. **Phytomedicine**, v. 23, n. 2, p. 220-231, 2016.

IMAM, F.; AL-HARBI, N. O.; AL-HARBI, M. M.; ANSARI, M. A.; ZOHEIR, K. M.; IQBAL, M.; ANWER, M. K.; AL HOSHANI, A. R.; ATTIA, S. M.; AHMAD, S. F. Diosmin downregulates the expression of T cell receptors, pro-inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B activation against LPS-induced acute lung injury in mice. **Pharmacol Res**, v. 102, p. 1-11, 2015.

JAGMAG, S. A.; TRIPATHI, N.; SHUKLA, S. D.; MAITI, S.; KHURANA, S. . Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Front Neurosci**, v. 9, n. 503, 2016.

JUNG, U. J.; LEEM, E.; KIM, S. R. Naringin: a protector of the nigrostriatal dopaminergic projection. **Exp Neurobiol**, v. 23, n. 2, p. 124-129, 2014.

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, p. 45–59, 2016.

KATSENI, K. Micronized purified flavonoid fraction (MPFF): a review of its pharmacological effects, therapeutic efficacy and benefits in the management of chronic venous insufficiency. **Curr Vasc Pharmacol**, v. 3, n. 1, p. 1-9, 2005.

KHAN, M. M.; RAZA, S. S.; JAVED, H.; AHMAD, A.; KHAN, A.; ISLAM, F.; SAFHI, M. M.; ISLAM, F. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2012.

KIASALARI, Z.; KHALILI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M. Protective Effect of Oral Hesperetin Against Unilateral Striatal 6-Hydroxydopamine Damage in the Rat. **Neurochem Res**, 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. **Exp Neurobiol**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015.

KIM, Y. S.; JOO, W. S.; JIN, B. K.; CHO, Y. H.; BAIK, H. H.; PARK, C. W. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, v. 9, p. 2387-2390, 1998.

KOUKOURAKI, P.; DOXAKIS, E. Constitutive translation of human  $\alpha$ -synuclein is mediated by the 5'-untranslated region. **Open Biol**, v. 6, n. 4, 2016.

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. **Mov Disord**, v. 28, n. 3, p. 311-318, 2013.

KREBS, C.; WEINBERG, J.; AKESSON, E. Neurociências ilustrada. Capítulo 1: **Introdução Sistema Nervoso e à Neurofisiologia Básica**. Porto Alegre: Artmed, 2013. 22 p.

KURLAN, R. "Levodopa phobia": a new iatrogenic cause of disability in Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, p. 923–924, 2005.

LEE, Y.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Animal models of Parkinson's disease: vertebrate genetics. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 10, 2012.

LEWINSKA, A.; ADAMCZYK-GROCHALA, J.; KWASNIEWICZ, E.; DEREGOWSKA, A.; WNUK, M. Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity. **Toxicol Lett**, v. 265, p. 117-130, 2017.

LIU, W.; KONG, S.; XIE, Q.; SU, J.; LI, W.; GUO, H.; LI, S.; FENG, X.; SU, Z.; XU, Y.; LAI, X. Protective effects of apigenin against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Int J Mol Med**, v. 35, n. 3, p. 739-746, 2015.

LUO, S. X.; HUANG, E. J. . Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly. **Am J Pathol**, v. 186, n. 3, p. 478-88, 2016.

- MACLEOD, A. D.; TAYLOR, K. S.; COUNSELL, C. E. Mortality in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**, v. 29, n. 13, p. 1615-1622, 2014.
- MAGRINELLI, F.; PICELLI, A.; TOCCO, P.; FEDERICO, A.; RONCARI, L.; SMANIA, N.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. **Parkinsons Dis**, 2016.
- MATIAS, I.; BUOSI, A. S.; GOMES, F. C. A. Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. **Neurochemistry International**, v. 95, p. 85-91, 2016.
- MAZZETTI, A. P.; FIORILE, M. C.; PRIMAVERA, A.; BELLO, M. L. Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. **Neurochemistry International**, v. 82, p. 10-18, 2015.
- MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord**, v. 21, n. 10, p. 1595-606, 2006.
- MEYER, O. C. Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in hemorrhoidal disease. **Angiology**, v. 45, p. 579-584, 1994.
- MONOGRAPH. DIOSMIN. [No authors listed] **Altern Med Rev**, v. 9, n. 3, p. 308-311, 2004.
- MÜLLER, T. Detoxification and antioxidative therapy for levodopa-induced neurodegeneration in Parkinson's disease. **Expert Rev Neurother**, v. 13, n. 6, p. 707-718, 2013.
- NASO, L.; MARTÍNEZ, V. R.; LEZAMA, L.; SALADO, C.; VALCARCEL, M.; FERRER, E. G.; WILLIAMS, P. A. Antioxidant, anticancer activities and mechanistic studies of the flavone glycoside diosmin and its oxidovanadium (IV) complex. Interactions with bovine serum albumin. **Bioorg Med Chem**, v. 24, n. 18, p. 4108-4119, 2016.
- NERIUS, M.; FINK, A.; DOBLHAMMER, G. Parkinson's disease in Germany: prevalence and incidence based on health claims data. **Acta Neurol Scand**, 2016.
- NIKOLOVA, G. D.; GRIGOROV, B. G.; ZHELEVA, A. M.; GADJEVA, V. G. Influence of Therapy on Some Important Final Products of Oxidation of Lipids, Proteins and Nucleic Acids in Patients with Parkinson's Diseases. **Advances in Biological Chemistry**, v. 4, n. 4, 2014.
- OLANOW, C. W. Levodopa: effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 30, n. 1, p. 37-44, 2015.
- OLGUÍN, H. J.; GUZMÁN, D. C.; GARCÍA, E. H.; MEJÍA, G. B. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-16, 2016.
- OLIVEIRA, E. A. S. Apostila nº 08. **fármacos agonistas adrenérgicos fármacos que atuam sobre o sistema respiratório**, p. 1-17, 2008. Disponível em:



<<http://www.easo.com.br/Downloads/Farmacos%20Agonistas%20Adrenergicos%20e%20Ap%20Respiratorio.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2015.

PALFI, S.; GURRUCHAGA, J. M.; G RALPH, G. S.; LEPETIT, H.; LAVISSE, S.; BUTTERY, P. C.; WATTS, C.; MISKIN, J.; KELLEHER, M.; DEELEY, S.; IWAMURO, H.; LEFAUCHEUR, J. P.; THIRIEZ C.; FENELON, G.; CHERRY, L.; BRUGIÈRES, P.; GABRIEL, I.; ABHAY, K.; DROUOT, X.; NAOKI TANI.; KAS, A.; GHALEH, B.; CORVOISIER, P.; DOLPHIN, P.; BREEN, D. P.; MASON, S.; GUZMAN, N. V.; MAZARAKIS, N. D.; RADCLIFFE, P. A.; HARROP, R.; KINGSMAN, S. M.; RASCOL, O.; NAYLOR, S.; BARKER, R. A.; HANTRAYE, P.; REMY, P.; CESARO, P.; KYRIA. Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose-escalation, open-label, phase 1/2 trial. **The Lancet**, v. 383, p. 1138-1146, 2014.

PAN, J.; CAI, H. Opioid system in L-DOPA induced dyskinesia. **Transl Neurodegener**, v. 6, n. 1, 2017.

PARKINSON, J. **An essay on the shaking palsy**. London: Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones, 1817.

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: 05 jan. 2017.

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

PERITORE, C. S.; HO, A.; YAMAMOTO, B. K.; SCHAUS, S. E. Resveratrol attenuates L-DOPA-induced hydrogen peroxide toxicity in neuronal cells. **Neuroreport**, v. 23, n. 17, p. 989-994, 2015.

PINTO, N. B.; VIANA, G. S. B. **Avaliação da atividade neuroprotetora do extrato padronizado de Camellia sinensis e de seus princípios bioativos: envolvimento de ações anti-inflamatórias e antioxidantes**. 2015. 296f. Tese – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2015.

POMPELLA, A.; VISVIKIS, A.; PAOLICCHI, A.; TATA, V.; CASINI, A. F. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 503-1499, 2003.

PONZONI, S.; GARCIA-CAIRASCO, N. Neurobiology do parkinsonisms ii. modelos experimentais. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 53, p. 711-717, 1995.

RAMÍREZ-GARCÍA, G.; PALAFOX-SÁNCHEZ, V.; LIMÓN, I. D. Nitrosative and cognitive effects of chronic L-DOPA administration in rats with intra-nigral 6-OHDA lesion. **Neuroscience**, v. 290, p. 492-508, 2015.

RANGANATH, A.; JACOB, S. N. Doping the Mind: Dopaminergic Modulation of Prefrontal Cortical Cognition. **Neuroscientist**, v. 22, n. 6, p. 593-603, 2016.

REGENSBURGER, M.; PROTS, I.; WINNER, B. Adult hippocampal neurogenesis in Parkinson's disease: impact on neuronal survival and plasticity. **Neural Plast**, 2014.

REZAI-ZADEH, K.; DOUGLAS, S. R., BAI, Y.; TIAN, J., HOU, H.; MORI, T.; ZENG, J.; OBREGON, D.; CIDADE, T.; TAN, J. Flavonoid-mediated presenilin-1 phosphorylation reduces Alzheimer's disease beta-amyloid production. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 3, p. 574-588, 2009.

ROCHA, J. F.; FERREIRA, J. J.; FALCÃO, A.; SANTOS, A.; PINTO, R.; NUNES, T.; ALMEIDA, L.; SOARES-DA-SILVA, P. Effect of 3 Single-Dose Regimens of Opicapone on Levodopa Pharmacokinetics, Catechol-O-Methyltransferase Activity and Motor Response in Patients With Parkinson Disease. **Clin Pharmacol Drug Dev**, v. 5, n. 3, p. 232-240, 2016.

ROCHE, 2017. **Prolopa®HBS**. Disponível em: <<https://www.dialogoroche.com.br/>>. Acesso em: 06 fev. 2017.

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

SALAHUDDIN, P.; FATIMA, M. T.; ABDELHAMEED, A. S.; NUSRAT, S.; KHAN, R. H. Structure of amyloid oligomers and their mechanisms of toxicities: Targeting amyloid oligomers using novel therapeutic approaches. **Eur J Med Chem**, v. 114, p. 41-58, 2016.

SARKAR, S.; RAYMICK, J.; IMAM, S. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 6, 2016.

SAWMILLER, D.; HABIB, A.; LI, S.; DARLINGTON, D.; HOU, H.; TIAN, J.; SHYTLER, R. D.; SMITH, A.; GIUNTA, B.; MORI, T.; TAN, J. Diosmin reduces cerebral A $\beta$  levels, tau hyperphosphorylation, neuroinflammation, and cognitive impairment in the 3xTg-AD mice. **J. Neuroimmunol**, v. 299, p. 98-106, 2016.

SCHROLL, H.; HAMKER, F. H. Basal Ganglia dysfunctions in movement disorders: What can be learned from computational simulations. **Mov Disord**, v. 31, n. 11, p. 1591-1601, 2016.

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

SHIOTSUKI, H.; YOSHIMI, K.; SHIMO, Y.; FUNAYAMA, M.; TAKAMATSU, Y.; IKEDA, K.; TAKAHASHI, R.; KITAZAWA, S.; HATTORI, N. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **J Neurosci Methods**, v. 189, n. 2, p. 180-185, 2010.

SIELGEL, P. S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **J. Psychol**, v. 21, p. 227-236, 1946.

SOLANKI, I.; PARIHAR, P.; MANSURI, M. L.; PARIHAR, M. S. Flavonoid-Based Therapies in the Early Management of Neurodegenerative Diseases. **Adv. Nutr**, v. 6, n. 1, p. 64-72, 2015.

SONG, S.; NIE, Q.; LI, Z.; DU, G. Curcumin improves neurofunctions of 6-OHDA-induced parkinsonian rats. **Pathol Res Pract**, v. 212, n. 4, p. 247-251, 2016.

SOUZA, R. B.; FROTA, A. F.; SOUSA, R. S.; CEZARIO, N. A.; SANTOS, T. B.; SOUZA, L. M.; COURA, C. O.; MONTEIRO, V. S.; CRISTINO FILHO, G.; VASCONCELOS, S. M.; DA CUNHA, R. M.; AGUIAR, L. M.; BENEVIDES, N. M. Neuroprotective Effects of Sulphated Agaran from Marine Alga *Gracilaria cornea* in Rat 6-Hydroxydopamine Parkinson's Disease Model: Behavioural, Neurochemical and Transcriptional Alterations. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 120, n. 2, p. 159-170, 2017.

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

STANIEWSKA, A. [Safety of use of micronized diosmin at daily doses up to 2000 mg per day]. **Pol Merkur Lekarski**, v. 41, n. 244, p. 188-191, 2016.

STIEVENARD, A.; MÉQUINION, M.; ANDREWS, Z. B.; DESTÉE, A.; CHARTIER-HARLIN, M. C.; VILTART, O.; VANBESIEN-MAILLIOT, C. C. Is there a role for ghrelin in central dopaminergic systems? Focus on nigrostriatal and mesocorticolimbic pathways. **Neurosci Biobehav Rev**, 2016.

TAKESHIMA, M.; MURATA, M.; URASOE, N.; MURAKAMI, S.; MIYAZAKI, I.; ASANUMA, M.; KITA, T. Protective effects of baicalein against excess L-DOPA-induced dopamine quinone neurotoxicity. **Neurol Res**, v. 33, n. 10, p. 1050-1056., 2011.

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. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2 p. 1-11, 2013.

TEIXEIRA, M. D.; SOUZA, C. M.; MENEZES, A. P.; CARMO, M. R.; FONTELES, A. A.; GURGEL, J. P.; LIMA, F. A.; VIANA, G. S.; ANDRADE, G. M. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 110, p. 1-7, 2013.

TESTA, R.; BONFIGLI, A. R.; GENOVESE, S.; DE NIGRIS, V.; CERIELLO, A. The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications. **Nutrients**, v. 8, n. 5, 2016.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 2011.

UMENO, A.; HORIE, M.; MUROTOMI, K.; NAKAJIMA, Y.; YOSHIDA, Y. Antioxidative and Antidiabetic Effects of Natural Polyphenols and Isoflavones. **Molecules**, v. 20, n. 6, 2016.

VOGT WEISENHORN, D. M.; GIESERT, F.; WURST, W. Diversity matters - heterogeneity of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon and its relation to Parkinson's Disease. **J Neurochem**, v. 139, n. 1, p. 8-26, 2016.

VOLPICELLI-DALEY, L. A.; KIRIK, D.; STOYKA, L. E.; STANDAERT, D. G.; HARMS, A. S. How can rAAV- $\alpha$ -synuclein and the fibril  $\alpha$ -synuclein models advance our understanding of Parkinson disease. **J Neurochem**, 2016. 49 p.

WANG, T.; HAY, J. C. Alpha-synuclein Toxicity in the Early Secretory Pathway: How It Drives Neurodegeneration in Parkinsons Disease. **Front Neurosci**, v. 9, n. 433, 2015.

WANG, T.; DUAN, S. J.; WANG, S. Y.; LU, Y.; ZHU, Q.; WANG, L. J.; HAN, B. Coadministration of hydroxysafflor yellow A with levodopa attenuates the dyskinesia. **Physiol Behav**, v. 147, p. 193-197, 2015.

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C. L.; HORN, S. Parkinson's disease — part 2: treatment of motor symptoms. **Am. J. Manage Care**, v. 14, p. S49–S58, 2008.

WU, T.; HALLETT, M. The cerebellum in Parkinson's disease. **Brain**, v. 136, n. 3, p. 696-709, 2013.

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

XU, J.; GONG, D. D.; MAN, C. F.; FAN, Y. Parkinson's disease and risk of mortality: meta-analysis and systematic review. **Acta Neurol Scand**, v. 129, n. 2, p. 71-79, 2014.

ZHANG, X. S.; HA, S.; WANG, X. L.; SHI YL.; DUAN, S. S.; LI ZA. Tanshinone IIA protects dopaminergic neurons against 6-OHDA induced neurotoxicity through miR-153/Nrf2/ARE signaling pathway. **Neuroscience**, v. 1, p. 1-14, 2015.

ANEXO 01



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Av. Comte. Maurocélia Roeha Pontes, 100, Derby  
CEP: 62.042-280 Sobral-CE  
Fone/Fax: (88) 3611.8000

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 15/15, sobre o projeto intitulado: **Avaliação dos efeitos neuropsicofarmacológicos de *Stemodia maritima* em camundongos**, de responsabilidade do Profa. Dra. **Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional na Ciência e Experimentação Animal (CONCEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), em reunião realizada em 06 de outubro de 2015.

Sobral, 06 de outubro de 2015.

Assinatura manuscrita em tinta preta, sobre uma linha horizontal.

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA