



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

**ANA PAULA FONTENELE MENEZES MENDONÇA**

**RESVERATROL EXERCE EFEITO NEUROPROTETOR EM ANIMAIS  
PARKINSONIANOS VIA INIBIÇÃO DA INFLAMAÇÃO E  
AUMENTO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE DOPAMINA (DAT)**

**FORTALEZA**

**2017**

**ANA PAULA FONTENELE MENEZES MENDONÇA**

**RESVERATROL EXERCE EFEITO NEUROPROTETOR EM ANIMAIS  
PARKINSONIANOS VIA INIBIÇÃO DA INFLAMAÇÃO E  
AUMENTO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE DOPAMINA (DAT)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências médicas Área de concentração: Biomedicina

Orientador: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade

**FORTALEZA**

**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)

---

M1r MENDONÇA, ANA PAULA FONTENELE MENEZES.

RESVERATROL EXERCE EFEITO NEUROPROTETOR EM ANIMAIS PARKINSONIANOS VIA INIBIÇÃO DA INFLAMAÇÃO E AUMENTO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE DOPAMINA (DAT) / ANA PAULA FONTENELE MENEZES MENDONÇA. – 2017.

148 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade .

1. Doença de Parkinson. 2. Memória. 3. Resveratrol. 4. Inflamação. 5. Apoptose. I. Título.

CDD 610

---

**ANA PAULA FONTENELE MENEZES MENDONÇA**

**RESVERATROL EXERCE EFEITO NEUROPROTETOR EM ANIMAIS  
PARKINSONIANOS VIA INIBIÇÃO DA INFLAMAÇÃO E  
AUMENTO DA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE DOPAMINA (DAT)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Ciências Médicas. Área de concentração: Biomedicina.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Maria Blanco Martinez  
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

Profa. Dra. Fernanda Martins Maia  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Veralice Meireles Sales Bruin  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus, que me deu a vida e a quem tudo devo, por me guiar e proteger nessa jornada e a Nossa Senhora por estar sempre iluminando os meus passos.

## AGRADECIMENTO

À Deus em primeiro lugar, por ter me protegido e iluminado durante a toda essa jornada, por ter me guiado e ter me dado força, coragem e muita determinação em todos os momentos.

Aos meus pais, Paulo Pedro e Ana Maria, meus maiores mestres, não pelos ensinamentos técnicos e científicos, mas sim pelo exemplo de vida, de Fé, de perseverança, de moral, de ética e humildade. Por não terem medido esforços para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar, pelo constante incentivo, por terem me apoiado em todas as decisões e por todo amor que me dedicaram.

Ao meu grande amor, meu esposo Paulo Jorge, pelo constante incentivo, companheirismo e apoio, me ajudando nos experimentos e nos estudos, permanecendo sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. Pela dedicação, ajuda, compreensão, cumplicidade e paciência em todos os momentos. E também por ter feito todas as figuras desse trabalho, porque sem você eu jamais conseguiria.

À nossa filha Maria Anita que ainda nem nasceu e que já transborda o meu coração de amor e felicidade...

À Dra. Geanne Matos de Andrade, minha orientadora, que sempre foi para mim um exemplo de pesquisadora, agradeço pela orientação valiosa, paciência, confiança, atenção, dedicação, incentivo, compreensão e amizade, bem como, pelo incrível aprendizado e pela oportunidade que me foi concedida.

Aos professores dos departamentos de Pós-Graduação em Ciências Médicas e Farmacologia, pelos ensinamentos e pelo apoio na realização dos experimentos.

Às minhas queridas amigas que sempre estiveram presentes em todos os momentos do Laboratório de Neurociências e Comportamento: Analu, Julliana Catharina, Kelly Rose, Juliana Pereira e Thaís. Através de vocês pude entender que amigos são os irmãos que escolhemos. Tudo isso, na certeza que vocês estaram sempre em meu coração.

Aos amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento: Marta, Carolina, Patrícia, Ana Carla, Diego, Mara, Neila, Emerson, Bruno, Amanda, Priscila, Albet. Agradeço pelas reflexões, críticas, sugestões recebidas, pela contribuição na parte experimental, pelos momentos de descontração e pela amizade que fica.

Aos bolsistas que passaram pelo Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC) durante todo esse período, meu agradecimento a todos vocês por terem colaborado na minha pesquisa científica, fazendo do trabalho diário um ambiente agradável e alegre.

A todos os amigos com os quais convivi durante este tempo no Departamento de Fisiologia e Farmacologia e que estão distribuídos pelos diversos laboratórios. Agradeço pelo espírito de colaboração e pela amizade.

Aos técnicos dos laboratórios Arnaldo, Vilani e Lena, pela contribuição no trabalho, atenção e amizade.

Aos funcionários do departamento de Medicina Clínica, em especial às secretárias da Pós-Graduação em Ciências Médicas, Ivone e Rita, pela atenção e disponibilidade de sempre.

À todos que fazem o DoréLab pelo aprendizado e experiência transmitida durante o período de doutorado sanduíche na Universidade da Florida, sob a orientação do Prof. Dr. Sylvain Doré.

Aos professores Danielle Macêdo Gaspar e José Eduardo Ribeiro Honório Júnior, por terem participado do meu exame de qualificação contribuindo com orientações importantes concernentes à didática.

Aos meus irmãos Paulo Jansen e Edgar Jefferson, pela amizade, pela cumplicidade e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus sobrinhos, Pedro Yves e Maria Klara, pelos momentos felizes compartilhados.

À toda minha família por ter suportado os momentos de ausência.

À todos os meus amigos, pela amizade e apoio em todos os momentos.

À CAPES, pelo incentivo científico e apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio no doutorado e no doutorado sanduíche.

A todos que, de alguma forma, colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho. Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar.  
Mas o mar seria menos se lhe faltasse uma gota”  
(Madre Teresa de Calcutar)



## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa do movimento, afetando 1% da população na faixa etária de 65 anos e aumentando para 4 a 5% depois de 85 anos. A DP é caracterizada clinicamente por tremor de repouso, acinesia, rigidez e problemas posturais e já está demonstrado que o estresse oxidativo está envolvido na patofisiologia da doença. O resveratrol é uma fitoalexina que têm sido descrita como tendo propriedades antioxidantes e antiinflamatórias, com ação neuroprotetora no parkinsonismo experimental. O objetivo deste estudo foi investigar o mecanismo de ação neuroprotetor do resveratrol sobre as alterações comportamentais, bioquímicas e moleculares induzidas pela 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), um modelo animal de parkinsonismo. Ratos machos *Wistar* (180-240 g) receberam injeções de 6-OHDA (18 µg/3µl) no estriado direito através de uma cirurgia estereotáxica e foram tratados por via intragástrica com Resveratrol (50 mg/kg). Observamos que os animais parkinsonianos apresentaram déficit no comportamento motor, no equilíbrio, na memória e na capacidade olfatória. O resveratrol foi capaz de proteger esses animais dos déficits motores, memória, aprendizado e na capacidade olfatória. Os animais parkinsonianos também apresentaram um comportamento depressivo comprovado com a redução das monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina) no estriado lesionado e na substância negra, este efeito foi totalmente revertido pelo resveratrol na dose testada, com a prevenção do comportamento depressivo nos animais como com o reestabelecimento das dosesagens normais das monoaminas. Neste trabalho, conseguimos provar que resveratrol preveniu a morte dos neurônios dopaminérgicos na substância negra (TH e FluorojadeC) como também a diminuição da proteína transportadora de dopamina (DAT) e D2. A inflamação está diretamente relacionada com a patogenia da DP. No nosso modelo podemos observar um aumento da astrogliose (GFAP), da microgliose (CD11-b), da ciclooxigenase-2 (COX-2), do IL-1β e da ação pró-apoptótica (GSK-3β). O resveratrol apresentou efeito protetor neuronal sobre a resposta inflamatória, prevenindo o aumento dos astrócitos, da micróglia, da COX-2 e da apoptose. Dessa forma, o resveratrol exerce um efeito neuroprotetor modelo de parkinsonismo em ratos, devido a sua ação antiinflamatória e antiapoptótica.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. Resveratrol. Neuroproteção. Memória. Depressão. Inflamação. Apoptose. DAT

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative movement disorder, affecting 1% of the 65-year population and increasing to 4 to 5% after 85 years. PD is characterized clinically by resting tremor, akinesia, rigidity and postural instability and it has already been demonstrated that oxidative stress is involved in the pathophysiology of the disease. Resveratrol is a phytoalexin that has been described as having antioxidant and anti-inflammatory properties, with neuroprotective action in experimental parkinsonism. The objective of this study was to investigate the mechanism of neuroprotective action of resveratrol on the behavioral, biochemical and molecular changes induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA), an animal model of parkinsonism. Male Wistar rats (180-240 g) received 6-OHDA injections (18 µg / 3 µl) in the right striatum through stereotactic surgery and were treated resveratrol (50 mg / kg). We observed that parkinsonian animals presented deficits in motor behavior, balance, memory and olfactory discrimination. Resveratrol was able to protect these animals from motor deficits, memory, learning and olfactory disability. Parkinsonian animals also had depressive behavior with the reduction of monoamines (dopamine, serotonin and naradrenaline) in the injured striatum and substantia nigra. This effect was totally reversed by resveratrol at the dose tested, with the prevention of depressive behavior in animals and the reestablishment of normal doses of monoamines. We were also able to prove that resveratrol prevented the death of the dopaminergic neurons in the substantia nigra (TH and Fluor Jade C) as well as the decrease of the dopamine transporters (DAT) and D2. The inflammation is directly related to the pathogenesis of PD. In our model we can observe an increase in astrogliosis (GFAP), microgliosis (CD11-b), cyclooxygenase-2 (COX-2), IL-1 $\beta$  and apoptotic action (GSK-3 $\beta$ ). Resveratrol presented a protective effect on the inflammatory response, preventing the increase of the astrocytes, microglia, COX-2 and apoptosis. This suggests resveratrol exerts a neuroprotective effect on parkinsonism induction in rats, probably due to its anti-inflammatory and antiapoptotic action.

**Keywords:** Parkinson's disease. Resveratrol. Neuroprotection. Memory. Depression. Inflammation. Apoptosis. DAT.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho esquemático representativo da organização clássica dos circuitos dos núcleos da base no cérebro normal e de indivíduos com DP .....	27
Figura 2 – Modelos experimentais da Doença de Parkinson .....	35
Figura 3 – Fórmulas moleculares do resveratrol .....	38
Figura 4 – Ações do trans-resveratrol .....	40
Figura 5 – Animal posicionado no aparelho estereotáxico com as suturas ósseas expostas .....	44
Figura 6 – Figura esquemática representativa das 3 coordenadas estereotáxicas para injeção intracraniana de 6-OHDA no corpo estriado .....	45
Figura 7 – Desenho experimental dos três protocolos experimentais .....	48
Figura 8 – Desenho experimental – 1º grupo .....	49
Figura 9 – Desenho experimental – 2º grupo .....	50
Figura 10 – Desenho esquemático de rato com perda parcial de neurônios dopaminérgicos nigrostriatal após um desafio com a apomorfina .....	51
Figura 11 – Animal no teste rotacional induzido por apomorfina .....	51
Figura 12 – Arena do teste de campo aberto dividido em quatro quadrantes iguais .....	52
Figura 13 – Aparelho do rotarod .....	53
Figura 14 – Animal durante o movimento de <i>rearing</i> no teste do cilindro .....	54
Figura 15 – Animal durante o teste do nado forçado .....	54
Figura 16 – Aparelho de esquiva passiva .....	55
Figura 17 – Labirinto aquático sinalizado e o animal sobre a plataforma .....	56

Figura 18 – Animal na caixa da discriminação olfativa .....	58
Figura 19 – Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (0,6 mg/kg) em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I) .....	65
Figura 20 – Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (0,6 mg/kg) em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II) .....	65
Figura 21 – Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (0,6 mg/kg) em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III) .....	66
Figura 22 – Avaliação da atividade locomotora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I) .....	67
Figura 23 – Avaliação da atividade locomotora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II) .....	68
Figura 24 – Avaliação da atividade locomotora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III) .....	68
Figura 25 – Avaliação da simetria dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I) .....	70
Figura 26 – Avaliação da simetria dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II) .....	71
Figura 27 – Avaliação da simetria dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III) .....	71
Figura 28 – Avaliação do comportamento depressivo em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I) .....	73
Figura 29 – Avaliação do comportamento depressivo em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II) .....	73
Figura 30 – Avaliação do comportamento depressivo em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III) .....	74
Figura 31 – Avaliação da memória aversiva em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I) .....	76
Figura 32 – Avaliação da memória aversiva em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II) .....	77

Figura 33 – Avaliação da memória aversiva em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III) .....	78
Figura 34 – Avaliação da memória espacial em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I) .....	80
Figura 35 – Avaliação da memória espacial em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II) .....	80
Figura 36 – Avaliação da memória espacial em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III) .....	81
Figura 37 – Avaliação do equilíbrio e da coordenação motora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	83
Figura 38 – Avaliação do prejuízo olfativo em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	85
Figura 39 – Efeito do resveratrol sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no estriado lesionado de ratos parkinsonianos .....	89
Figura 40 – Imunomarcção para TH no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	89
Figura 41 – Efeito do resveratrol sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH na substância negra de ratos parkinsonianos .....	90
Figura 42 – Imunomarcção para TH na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	90
Figura 43 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para DAT no estriado lesionado de ratos parkinsonianos .....	92
Figura 44 – Imunomarcção para DAT no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	92
Figura 45 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para DAT na substância negra de ratos parkinsonianos .....	93
Figura 46 – Imunomarcção para DAT na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	93
Figura 47 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para COX-2 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos .....	95
Figura 48 – Imunomarcção para COX-2 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	95
Figura 49 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para COX-2 a substância	

negra de ratos parkinsonianos .....	96
Figura 50 – Imunomarcção para COX-2 na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	96
Figura 51 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para GFAP no estriado lesionado de ratos parkinsonianos .....	98
Figura 52 – Imunomarcção para ativação astrocitária (GFAP) no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	98
Figura 53 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para GFAP na substância negra de ratos parkinsonianos .....	99
Figura 54 – Imunomarcção para ativação astrocitária (GFAP) na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	99
Figura 55 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para CD11-b no estriado lesionado de ratos parkinsonianos .....	101
Figura 56 – Imunomarcção para ativação da microgliose (CD11-b) no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	101
Figura 57 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para CD11-b na substância negra de ratos parkinsonianos .....	102
Figura 58 – Imunomarcção para ativação da microgliose (CD11-b) na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias ..	102
Figura 59 – Efeito do resveratrol sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluorojade C no estriado lesionado de ratos parkinsonianos ....	104
Figura 60 – Coloração por Fluorojade C no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	104
Figura 61 – Efeito do resveratrol sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluorojade C na substância negra de ratos parkinsonianos .....	105
Figura 62 – Coloração por Fluorojade C na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	105
Figura 63 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para GSK-3 $\beta$ no estriado lesionado de ratos parkinsonianos .....	107
Figura 64 – Imunomarcção para GSK-3 $\beta$ no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	107

Figura 65 – Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para GSK-3 $\beta$ na substância negra de ratos parkinsonianos .....	108
Figura 66 – Imunomarcção para GSK-3 $\beta$ na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias .....	108
Figura 67 – Expressão do receptor D1 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.....	109
Figura 68 – – Expressão do receptor D1 no mesencéfalo de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.....	110
Figura 69 – Expressão do receptor D2 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.....	111
Figura 70 – Expressão do receptor D2 no mesencéfalo de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.....	112
Figura 71 – Expressão da IL-1 $\beta$ no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.....	113
Figura 72 – Expressão da IL-1 $\beta$ no mesencéfalo de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.....	114
Figura 73 – Modelo proposto dos possíveis mecanismos de ação neuroprotetor do resveratrol em animais parkinsonianos.....	132

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sítios das lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA.....	45
Tabela 2 – Protocolo experimental I (Neuroprotetor).....	47
Tabela 3 – Protocolo experimental II (Neuroprotetor).....	47
Tabela 4 – Protocolo experimental III (Reversivo).....	47
Tabela 5 – Efeito do resveratrol na concentração de monoaminas no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.....	87
Tabela 6 – Efeito do resveratrol na concentração de monoaminas no mesencéfalo de ratos parkinsonianos.....	87



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVD – Atividade da vida diária  
DP – Doença de Parkinson  
PSP – Paralisia supranuclear progressiva  
MAS – Atrofia multissistêmica  
SNC – Sistema nervoso central  
SNpc – Substância negra *pars compacta*  
MARKs – Proteínas quinase reguladoras da afinidade aos microtúbulos  
GPi – Globo pálido interno  
GPe – Globo pálido externo  
NST – Núcleo subtalâmico  
SNr – Substância negra reticulada  
EROs – Espécies reativas do oxigênio  
SOD – Superóxido dismutase  
GSH – Glutathiona reduzida  
DA – Dopamina  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
TH – Tirosina hidroxilase  
AIF – Fator indutor da apoptose  
TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
GSK-3 $\beta$  – Quinase glicogênio sintase 3 beta  
6-OHDA – 6-hidroxidopamina  
MPTP – 1-metil- 4- fenil-1,2,3,6 – tetraidropiridina  
DAT – Transportador de dopamina  
D1 – Receptor de dopamina do tipo 1  
D2 – Receptor de dopamina do tipo 2  
GFAP – Proteína glial fibrilar  
HPLC – Cromatografia líquida de alta performance  
COX-2 – Ciclooxygenase 2  
CONCEA – Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal  
CEUA – Comissão de Ética no Uso Animal  
UFC – Universidade Federal do Ceará  
DMSO - Dimetilsulfóxido

5-HT – Serotonina  
ANOVA – Análise de variância  
ATP – Adenosina trifosfato  
CM – Núcleo do tálamo centromediano  
CPu – Complexo caudado-putâmen  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DOPAC – Ácido dihidroxifenilacético  
EPM – Erro padrão da média  
FDA – *Food and Drug Administration* (USA)  
FO – Falso-operado  
i.c.v. – Intracerebroventricular  
i.p. – Intraperitoneal  
i.v. – Intravenoso  
MR – Memória recente  
MT – Memória tardia  
BSA – Albumina bovina  
TA – Temperatura ambiente  
ABC – Complexo aquitina-biotina  
MIF – Média da intensidade de fluorescência  
IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta  
IL-6 – Interleucina 6  
LPS – Lipopolisacarídeo  
MAO – Monoamina oxidase  
MAS – Área motora suplementar  
MDA – Malonodialdeído  
min – minuto  
s – segundo  
NA – Noradrenalina  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
NF-kappaB – Fator de transcrição *NF-KB*  
NO – Óxido nítrico  
NO<sub>2</sub> – Nitrito  
NO<sub>3</sub> – Nitrato

OMS – Organização Mundial de Saúde

•OH –Radical hidroxila

PMC – Córtex pré-motor

PPN – Núcleo pedúnculo-pontino

RLs – Radicais livres

rpm – Rotações por minuto

TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

v.o. – Via oral

VA – Núcleo do tálamo ventral anterior

VL – Núcleo do tálamo ventrolateral

nº – número

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

$\mu$  - Micro

® - Marca registrada

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$\pm$  - Mais ou menos

< - Menor do que

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>1.1 Doença de Parkinson</b> .....	<b>23</b>
<i>1.1.1 Epidemiologia</i> .....	<i>23</i>
<i>1.1.2 Etiologia</i> .....	<i>24</i>
<i>1.1.3 Fisiopatologia</i> .....	<i>25</i>
<i>1.1.4 Patogênese da DP</i> .....	<i>29</i>
<i>1.1.4.1 Estresse Oxidativo na DP</i> .....	<i>29</i>
<i>1.1.4.2 Inflamação na DP</i> .....	<i>31</i>
<i>1.1.4.3 Apoptose</i> .....	<i>31</i>
<i>1.1.4.4 Metabolismo energético na DP</i> .....	<i>32</i>
<i>1.1.5 Modelos de Doença de Parkinson in vivo</i> .....	<i>33</i>
<i>1.1.6 Tratamentos para a Doença de Parkinson</i> .....	<i>36</i>
<b>1.2 Resveratrol</b> .....	<b>37</b>
<b>1.3 Relevância e justificativa</b> .....	<b>41</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>42</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>42</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1 Animais</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2 Drogas</b> .....	<b>43</b>
<b>3.3 Anestesia</b> .....	<b>43</b>
<b>3.4 Cirurgia Estereotáxica (UNGERSTEDT, 1968)</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5 Protocolos Experimentais</b> .....	<b>46</b>
<b>3.6 Testes Comportamentais</b> .....	<b>48</b>
<i>3.6.1 Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (UNGERSTEDT, 1970)</i> .....	<i>50</i>
<b>3.7 Avaliação do comportamento motor</b> .....	<b>52</b>
<i>3.7.1 Teste do Campo Aberto (Open Field) (BROADHURST, 1957)</i> .....	<i>52</i>
<i>3.7.2 Teste Rotarod (DUNHAM; MIYA, 1957; ALVES et al., 2011)</i> .....	<i>52</i>
<i>3.7.3 Teste do cilindro (Limb-use asymmetry test) (SCHALLER; WOODLEE; FLEMING, 2002)</i> .....	<i>53</i>
<b>3.8 Teste do Nado forçado (Forced Swim test) (PORSOLT et al., 1978)</b> .....	<b>54</b>
<b>3.9 Testes de Memória</b> .....	<b>55</b>
<i>3.9.1 Esquiva passiva (Passive avoidance test) (DeNOBLE et al., 1986)</i> .....	<i>55</i>
<i>3.9.2 Teste do labirinto aquático com plataforma sinalizada (Cued Water Maze) (PACKARD; McGAUGH, 1992; MIYOSHI et al., 2002)</i> .....	<i>56</i>
<b>3.10 Teste da discriminação olfativa (SOFFIÉ; LAMBERTY, 1988; PREDIGER et al., 2005 a, b)</b> .....	<b>57</b>
<b>3.11 Dosagem de monoaminas</b> .....	<b>58</b>

3.12 Análise Imunohistopatológica .....	59
3.12.1 Imunohistoquímica para TH, DAT, COX-2 e GSK-3 $\beta$ .....	59
3.12.2 Imunofluorescência para GFAP e CD11-b .....	60
3.12.3 Coloração por Fluorojade C .....	61
3.13 Western blot .....	61
3.14 Análises estatísticas.....	62
4 RESULTADOS .....	64
4.1 Efeito do resveratrol no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos parkinsonianos .....	64
4.2 Efeito do resveratrol sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em ratos parkinsonianos .....	67
4.3 Efeito do resveratrol sobre a assimetria dos membros anteriores (Teste do Cilindro) em ratos parkinsonianos .....	69
4.4 Efeito do resveratrol sobre o comportamento depressivo-símile (Teste do Nado forçado) em ratos parkinsonianos.....	72
4.5 Efeito do resveratrol sobre a de memória aversiva (Teste Esquiva Passiva) em ratos parkinsonianos .....	75
4.6 Efeito do resveratrol sobre a avaliação de memória espacial (Labirinto aquático sinalizado) em ratos parkinsonianos.....	79
4.7 Efeito do resveratrol sobre o equilíbrio e a coordenação motora (Teste do <i>Rotarod</i> ) em ratos parkinsonianos .....	82
4.8 Efeito do resveratrol sobre os prejuízos na discriminação olfativa (Teste da discriminação olfativa) em ratos parkinsonianos .....	84
4.9 Efeito do resveratrol sobre a determinação das concentrações de Dopamina (DA), seu metabólito (DOPAC), Noradrenalina (NE) e Serotonina (5-HT) em tecidos cerebrais de ratos parkinsonianos .....	86
4.10 Efeito do resveratrol sobre a imunorreatividade para a tirosina hidroxilase (TH) no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos.....	88
4.11 Efeito do resveratrol sobre a imunorreatividade para transportador de dopamina (DAT) no estriado lesionado e mesencéfalo de ratos parkinsonianos.....	91
4.12 Efeito resveratrol a imunomarcção de COX-2 no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos.....	94
4.13 Efeito resveratrol sobre a ativação dos astrocitos evidenciada através da imunomarcção com GFAP no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos .....	97
4.14 Efeito resveratrol sobre a imunorreatividade para a micróglia evidenciada através da imunomarcção com CD11-b no estriado lesionado na substância negra de ratos parkinsonianos .....	100
4.15 Efeito do resveratrol sobre a degeneração neuronal avaliada através da coloração por Fluorojade C no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos...	103
4.16 Efeito resveratrol sobre a expressão da GSK-3 $\beta$ no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos.....	106
4.17 Efeito resveratrol sobre a expressão do D1 no estriado lesionado e no mesencéfalo de ratos parkinsonianos .....	109

<b>4.18 Efeito resveratrol sobre a expressão do D2 no estriado lesionado e no mesencéfalo de ratos parkinsonianos .....</b>	<b>111</b>
<b>4.19 Efeito resveratrol sobre a expressão da IL-1<math>\beta</math> no estriado lesionado e no mesencéfalo de ratos parkinsonianos.....</b>	<b>113</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>131</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>147</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi primeiramente descrita em 1817, como uma síndrome neurológica, embora sintomas de parkinsonismo pode ser encontrado em descrições anteriores, pelo médico inglês James Parkinson que levaria o seu nome na doença no futuro.

O James Parkinson foi capaz de descrever o quadro clínico como o tremor involuntário, diminuição da força muscular e com propensão de dobrar o tronco pra frente, mas preservando os sentidos e o intelecto. Mas foi o médico francês Jean-Martin Chacot quem desempenhou um papel decisivo na descrição da DP, acrescentando várias contribuições na descrição do quadro clínico, definindo a presença dos quatro sinais cardiais da doença: tremor, bradicinesia, rigidez e dificuldades de equilíbrio, apresentando critérios para o diagnóstico diferencial e também sugerindo o primeiro tratamento da doença (GOETZ, 2011).

### 1.1.1 Epidemiologia

A DP é um distúrbio neurodegenerativo do movimento que afeta 1% da população na faixa etária de 65 anos, e aumentando para 4 - 5% na população acima de 85 anos (ELBAZ *et al.*, 2015; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Apesar de não possuir altas taxas de incidência e prevalência mundiais, estima-se que em 2030 o número de indivíduos com a doença suba para mais que o dobro (DORSEY *et al.*, 2007).

Segundo a Associação Européia de Doença de Parkinson (*European Parkinson Disease Association*), a estimativa é de 6,3 milhões de pessoas no mundo com DP. A idade do aparecimento é comumente após os 60 anos de idade, mas um entre dez indivíduos é afetado antes dos 50 anos. De acordo com as estatísticas, 1,2 milhões de pessoas na Europa tem DP: aproximadamente 260.000 na Alemanha, 200.000 na Itália, 150.000 na Espanha, 120.000 no Reino Unido e 117.000 na França. Estudos recentes acerca da incidência da doença apontam que ela atinge mais indivíduos brancos que negros que habitam grandes cidades nos Estados Unidos (WILLIS *et al.*, 2011). Alguns estudos epidemiológicos demonstraram ainda uma maior frequência no sexo masculino (MENESES; TEIVE, 2003). Na Ásia, a doença parece ser menos prevalente que em países do ocidente (MUANGPAISAN; HORI; BRAYNE, 2009)



Dados do CENSO2000, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), revelam que no Brasil a prevalência da DP em pessoas com idade entre 60 e 69 anos é de 700 a cada 100 mil indivíduos e entre 70 e 79 anos é de 1500 a cada 100 mil. De acordo com o estudo de Bovolenta e Felicio (2017) em 2015, o número de indivíduos com mais de 50 anos que já apresentavam sintomas de DP era de 220.000 casos. Além disso, 36 mil novos casos surgem por ano no país. A DP já ultrapassa 200 mil casos, sendo a maior parte concentrada nas regiões Sudeste e Sul, responsável por um total estimado de 64 mil casos (BRASIL, 2006). Estudos sobre o perfil epidemiológico de pacientes com DP no Brasil mostram que a maioria dos pacientes é homem com idade acima de 50 anos, e que o início da doença ocorre principalmente na faixa de idade entre 50-59 anos, seguido pela faixa de idade entre 60-69 anos e 70-79 anos (PALERMO *et al.*, 2009; CORIOLANO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016).

Trata-se da segunda principal doença neurodegenerativa depois da doença de Alzheimer (DA), mas ainda não se conhece completamente a sua etiologia, nem se dispõem de tratamentos efetivos para evitar a degeneração dopaminérgica progressiva acometida nesta doença (ABREU *et al.*, 2016).

### ***1.1.2 Etiologia***

Na DP ocorrem uma série de alterações funcionais, decorrentes de disfunções nos gânglios basais, relacionadas ao controle motor, repercutindo por meio de sinais e sintomas como tremor de repouso, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural (ELBAZ *et al.*, 2015; TYSNES; STORSTEIN, 2017; FAHN, 2000). Porém outros sintomas, classificados como sintomas não motores, são comuns. Estudo realizado no Estado de Pernambuco demonstrou que os pacientes com DP do Hospital das Clínicas do Estado apresentaram sintomas como constipação intestinal, insônia, dor muscular e articular, hipotensão ortostática, impotência sexual, dentre outros (CORIOLANO *et al.*, 2013).

Os parkinsonismos podem ser divididos em primária ou idiopática, secundário e atípico (COSTA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003; ANDRÉ, 2004). O tipo idiopático ou DP corresponde a 75% dos casos. Esta divide-se ainda em: DP juvenil (antes dos 21 anos), DP de início precoce (entre 21 e 40 anos de idade), DP com tremor predominante (DP

benigna) e DP com instabilidade postural e distúrbios de marcha (DP maligna) (TYSNES; STORSTEIN, 2017; PEREIRA *et al.*, 2003). No tipo secundário há uma causa específica ou reconhecida por condições suspeitas, como infecções, medicamentos, hidrocefalia, acidentes traumáticos, neoplasias e condições hereditárias (PEREIRA *et al.*, 2003). Conforme Guimarães e Alegria (2004), os casos mais comuns de parkinsonismo atípico são causados por: 1. paralisia supranuclear progressiva (PSP), caracterizado como um transtorno neurológico progressivo com rigidez, bradicinesia, dificuldade na marcha, paralisia bulbar e oftalmoplegia; 2. atrofia multissistêmica (AMS); e 3. demência de corpos de Lewy, caracterizada por alucinações visuais, declínio intelectual, flutuações no nível de atenção e parkinsonismo (CORIOLANO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016; STEIDL; ZIEGLER; FERREIRA, 2007).

A DP é uma doença neurodegenerativa frequente com uma fase pré-motora que pode durar muitos anos. Os principais fatores de risco envolvidos associados a DP são o tabaco, cafeína, chá preto, pesticidas e o bloqueio dos canais de cálcio (DELAMARRE; MEISSNER, 2017).

### ***1.1.3 Fisiopatologia***

A DP caracteriza-se clinicamente por tremor de repouso, acinesia, rigidez, instabilidade e problema postural (TYSNES; STORSTEIN, 2017; WHITE *et al.*, 2009; MORIGUCHI; YABUKI; FUKUNAGA, 2012). Morfologicamente, caracteriza-se por uma degeneração dos neurônios com a presença de corpúsculos de Lewy (inclusões de proteína no citoplasma intraneural) na substância negra *pars compacta* (SNpc) e outras estruturas, tais como, no *locus cerulus*, núcleos da base, hipotálamo, córtex cerebral, núcleos motores dos nervos cranianos e estruturas centrais e periféricas do sistema nervoso autônomo (SCHULZ; FALKENBURGER, 2004; PAL *et al.*, 2011). Os sintomas clássicos da DP manifestam-se após uma perda de 70 - 80% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, levando a uma grave redução nos níveis de dopamina estriatais (LEVY *et al.*, 2009). O diagnóstico definitivo requer tanto a identificação desta neurodegeneração, quanto a presença dos corpúsculos de Lewy. Os corpúsculos de Lewy, encontrados nos neurônios dopaminérgicos da substância negra e em outras regiões cerebrais, contêm agregados de muitas proteínas como a  $\alpha$ -sinucleína, que é a mais abundante, e as da família das quinases reguladoras de afinidade aos

microtúbulos (MARKs) (HENDERSON *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2016; WEINTRAUB; COMELLA; HORN, 2008).

A DP também pode ser de caráter genético/hereditário, portanto existem cerca de oito genes reconhecidos e relacionados à patologia, dos quais os mais importantes são a parkina e os genes que codificam a  $\alpha$ -sinucleína. A doença genética pode ser autossômica dominante, quando ocorre mutação do gene da  $\alpha$ -sinucleína; ou autossômica recessiva, com mutação no gene da parkina. O último subtipo frequentemente surge em doentes mais jovens, com menos de 35 anos (NUSSBAUM; ELLIS, 2003).

A DP resulta de anormalidades primárias nos núcleos da base, uma estrutura cerebral que atua em tarefas como a motivação crítica, planejamento motor e funções de aprendizagem (PRESCOTT, 2009). Sabe-se que os núcleos da base são parte de uma alça fechada que conectam sequencialmente todas as áreas corticais através do corpo estriado, globo pálido e tálamo com o córtex frontal. O córtex frontal se projeta para baixo em direção ao nível espinhal formando circuitos. Os componentes dos núcleos da base incluem além do corpo estriado (caudato e putamên) e os segmentos palidais internos e externos (globo pálido interno - GPi e externo - GPe), também o núcleo subtalâmico (NST) e a substância negra pars reticulata (SNr) e SNpc (ROSIN *et al.*, 2007; GALVAN; WICHMANN, 2008).

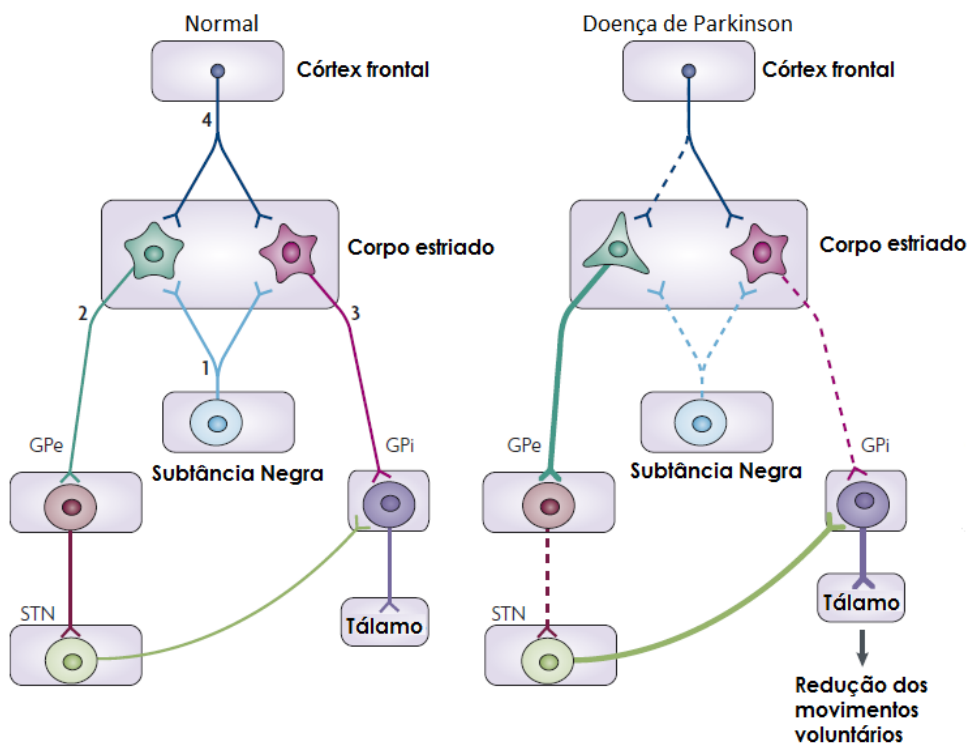
Os núcleos da base são formados pela substância negra, corpo estriado (regiões caudato e putamem), segmentos interno (GPi) e externo (GPe) do globo pálido e núcleo subtalâmico (STN). O estriado e NST recebem aferências glutamatérgicas de áreas específicas do córtex cerebral ou tálamo e transferem a informação para os núcleos de saída dos gânglios da base, que são o globo pálido interno e SNr.

A projeção entre o estriado e o GPe/SNr está dividida em duas vias separadas: uma via direta e uma via indireta, através da intercalação do globo pálido externo e do núcleo subtalâmico. Essa via é modulada por projeções advindas da substância negra *pars compacta*, chamada de via nigroestriatal. Esta via lança dopamina no corpo estriado, podendo ser excitatória, relacionada aos receptores D1, através da via direta, ou ainda inibitória, relacionada aos receptores D2, através da via indireta. A via direta consiste em projeções gabaérgicas, advindas do corpo estriado, em direção ao GPi e substância negra *pars reticulada*, que também emitem fibras gabaérgicas às regiões ventrolateral e ventroanterior do tálamo. Na via indireta neurônios estriatais lançam projeções gabaérgicas para o GPe, que por

sua vez, lança projeções gabaérgicas para o STN. O STN, então, envia projeções glutamatérgicas para o GPi e para a substância negra *pars reticulada* fechando assim o circuito (JENNER, 2008; HOUT *et al.*, 2013; MAGRINELLI *et al.*, 2016).

No modelo clássico da fisiopatologia da DP ocorre uma perda da projeção dopaminérgica advinda da substância negra levando a uma hiperatividade da via indireta e diminuição da atividade da via direta, assim como as projeções advindas do córtex para o corpo estriado também estão alteradas (JENNER, 2008; 2013) (Figura 1).

Figura 1 - Desenho esquemático representativo da organização clássica dos circuitos dos núcleos da base no cérebro normal e de indivíduos com DP.



Conexões no cérebro normal: (1) Projeções dopaminérgicas oriundas da substância negra no mesencéfalo para o corpo estriado. (2) Projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o GPe através da via indireta. (3) projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o GPi através da via direta. (4) Projeções glutamatérgicas excitatórias advindas do córtex frontal. Adaptado de JENNER, 2008.

Em circunstâncias fisiológicas normais, a DA é liberada pelos neurônios da via nigroestriatal, estimulando os receptores D1 pela via direta e os receptores D2 pela via indireta. A ativação de receptores D1 e D2 tem efeitos opostos, visto que os receptores D1

estão acoplados a proteína  $G\alpha_s$  que ativa adenilil ciclase levando a aumento de AMPc, enquanto que os receptores D2 estão acoplados à proteína  $G\alpha_i$ , que inibe a adenilil ciclase reduzindo AMPc citoplasmático (STOOF; KEBABIAN, 1981; ZHUANG *et al.*, 2000; CORVOL *et al.*, 2001). O AMPc regula a fosfoquinase A (PKA) que inicia a imediata expressão de genes. Quando os receptores D1 e D2 são co-estimulados ocorre à dissociação do receptor D1 da proteína  $G\alpha_s$ , se ligando então a proteína  $G\alpha_q$  que ativa a fosfolipase C, formado inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), levando ao aumento de cálcio intracelular a partir do retículo endoplasmático (HEUMANN *et al.*, 2014).

Os sintomas motores da DP são o foco da farmacoterapia, contudo os sintomas não motores, como demência, psicose, ansiedade, distúrbios de insônia, disfunção autonômica e distúrbios do humor, podem ser os aspectos mais incapacitantes, perturbadores e não compreendidos da doença (LIMA *et al.*, 2016; TYSNES; STORSTEIN, 2017; BAGLIO *et al.*, 2011).

Além dos prejuízos nos processos de aprendizado e memória já descritos, uma outra função que é extensamente comprometida em pacientes com a DP é a olfação. Embora já venham sendo relatados há mais de 30 anos os prejuízos apresentados por pacientes parkinsonianos na percepção, discriminação e reconhecimento de odores, o sintoma olfativo tem sido praticamente ignorado por pesquisadores e clínicos envolvidos com esta doença. A relativa escassez dos trabalhos nesta área deve-se, em parte, à falta de técnicas e procedimentos capazes de mensurar este comprometimento olfativo em humanos, somado à inexistência de modelos animais que reproduzam tais prejuízos (PREDIGER *et al.*, 2010).

O comprometimento da olfação parece não ser um sintoma exclusivo da DP, sendo que indivíduos portadores de outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, Coreia de Huntington e a atrofia de múltiplos sistemas, também apresentam tal comprometimento (MOBERG *et al.*, 1987; DOTY *et al.*, 1988; WENNING *et al.*, 1995; HAWKES *et al.*, 1998, MESHOLAM *et al.*, 1998).

Também foi demonstrado que havia uma correlação positiva entre a morte neuronal em áreas olfativas com o tempo que o paciente apresentava a doença (PEARCE *et al.*, 1997). Embora não seja consenso entre os pesquisadores, os prejuízos olfativos apresentados pelos pacientes parkinsonianos parecem não estar relacionados a um único odor específico, e ao contrário dos demais sintomas motores e cognitivos, não progridem com o avanço da doença (DOTY *et al.*, 1988, 1995; QUINN; ROSSOR; MARSDEN, 1987; HAWKES; SHEPHARD;

DANIEL, 1997). Outra característica interessante é que o comprometimento olfativo apresentado pelos pacientes com a DP não é alterado pelo tratamento com drogas anti-parkinsonianas, como a levodopa (L-dopa) (DOTY *et al.*, 1992).

Os sintomas depressivos ocorrem em aproximadamente metade dos pacientes e são uma causa significativa de prejuízos funcionais (McDONALD; RICHARD; DELONG, 2003). Duas teorias apontam para a etiologia da depressão na DP, uma argumenta que ela é reativa e secundária ao estresse psicossocial de uma doença crônica e incapacitante (COLE *et al.*, 1996), outra que ela é secundária a uma degeneração neuroanatômica subjacente, antes que simplesmente uma reação ao estresse psicossocial (McDONALD; RICHARD; DELONG, 2003). A depressão correlaciona-se com mudanças na função serotoninérgica e dopaminérgica e com a neurodegeneração de vias corticais e subcorticais específicas (BLANDINI *et al.*, 2000). Possivelmente, os sintomas depressivos iniciais no curso da DP relacionam-se a um declínio cognitivo mais rápido (STARKSTEIN *et al.*, 1990) e a um risco elevado do desenvolvimento de demência (HUGHES *et al.*, 2000). Por outro lado, o prejuízo cognitivo associa-se a um risco aumentado do desenvolvimento de depressão (LIMA *et al.*, 2016) e já foi observado que a combinação demência e depressão correlaciona-se com uma diminuição do metabólito da dopamina nos pacientes com DP (POLETTI; BONUCCELLI, 2012).

#### ***1.1.4 Patogênese da DP***

Vários fatores têm sido implicados na patogênese da morte celular na DP. A origem da degeneração neuronal é desconhecida e provavelmente envolve diversos eventos celulares e moleculares, incluindo aumento do estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade, processo inflamatório, mecanismos pró-apoptóticos e disfunção mitocondrial (NUSSBAUM; ELLIS, 2009).

##### ***1.1.4.1 Estresse Oxidativo na DP***

O estresse oxidativo tem sido discutido como um importante contribuinte na patologia das doenças neurodegenerativas (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Uma das idéias relacionadas à patogênese da doença de Parkinson baseia-se na formação de EROs e consequente início de estresse oxidativo, levando à lesão na *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (PAL *et al.*, 2011).

As evidências que dão suporte ao envolvimento de estresse oxidativo na patogênese da DP incluem alterações na quantidade de ferro no cérebro (GRUNBLATT *et al.*, 2004), que produz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando está numa forma reativa; deficiência no funcionamento mitocondrial, particularmente no complexo I da cadeia respiratória, alterações nos sistemas protetores antioxidantes do cérebro, notadamente na superóxido dismutase (SOD) e glutatona reduzida (GSH) (PEARCE *et al.*, 1997), além de evidências de dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA (KNEKT, 1996).

Modelos experimentais de parkinsonismo com toxinas que inibem a função mitocondrial foram a primeira indicação da existência de uma disfunção mitocondrial na DP. Os genes mutantes ligados ao parkinsonismo promovem alteração na estrutura ou na função de proteínas que estão direta ou indiretamente relacionadas à função mitocondrial (GODEIRO JUNIOR *et al.*, 2007).

A DP é uma doença neurodegenerativa que se associa com níveis aumentados de metais no cérebro. Altos níveis de ferro vistos durante autópsias de pacientes associam-se com degeneração nigral na DP e correlacionam-se com a gravidade das alterações neuropatológicas (GOTZ *et al.*, 2004). Deve ser lembrado que embora um aumento no ferro possa sinalizar um papel primário do estresse oxidativo na DP, alternativamente esse aumento pode ser uma consequência do seqüestro pelos eosinófilos dos agregados de proteínas.

O ferro tem sido implicado na promoção da agregação da  $\alpha$ -sinucleína tanto diretamente quanto via aumento do estresse oxidativo, sugerindo um papel importante para este na formação dos corpos de Lewy (KAUR; ANDERSEN, 2004). Os esforços para explicar os mecanismos que levam à morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos, têm sido focados nas consequências da oxidação da dopamina (DA). Assume-se que o estresse oxidativo desempenha um importante papel na causa da DP. Em cultura de células PC12, a DA é tóxica por aumento do estresse oxidativo, o que leva à apoptose (HATTORIA *et al.*, 2009), a desaminação metabólica da DA e seu metabólito metilado pela MAO resulta na formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Além disso, a oxidação da DA acompanha-se da inativação da tirosina hidroxilase (TH), enzima envolvida na síntese da DA (XU *et al.*, 1998).

#### 1.1.4.2 Inflamação na DP

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos na DP associa-se com uma grande atividade microglial (McGEER *et al.*, 1988), a qual pode ser consequência da morte neuronal ou pode refletir uma participação ativa da microglia no processo neurodegenerativo. Se essa ativação microglial protege ou exacerba a perda neuronal ainda é assunto de debate (HIRSCH *et al.*, 2008), embora a maioria das evidências sugirirem que ela exerce efeitos tóxicos para os neurônios.

Vários estudos em humanos e usando modelos experimentais mostram uma participação ativa da inflamação na DP (HIRSCH; HUNOT, 2009). Blum-Degen e colaboradores (1995) mostraram um aumento nos níveis de citocinas (IL-1 e IL-6) no estriado de pacientes com DP. Outros evidenciaram uma ativação microglial no cérebro destes pacientes (TANSEY; GOLDBERG, 2010).

Estudos usando modelos experimentais mostram que a ativação microglial induzida por LPS, com aumento na expressão de iNOS, leva a uma degeneração dopaminérgica (ARIMOTO; BING, 2003). Além disso, outros trabalhos evidenciaram uma diminuição dos riscos de desenvolvimento da DP em usuários regulares de drogas antiinflamatórias não-esteroidais (CHEN *et al.*, 2003).

#### 1.1.4.3 Apoptose

A apoptose tem sido implicada em várias doenças neurodegenerativas como um importante fator que contribui significativamente para a morte neuronal (BREDESEN, 2004).

O mecanismo celular de apoptose é caracterizado por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial, onde há formação de um canal de alta condutância com perda do potencial para a fosforilação oxidativa e extravasamento de citocromo c para o meio intracitoplasmático, com isso ocorreria ativação de uma série de substâncias serino-proteases como as caspases, transglutaminases, endonucleases e fosfatidilserina/trombospondina. Levando à fragmentação da cromatina e das organelas com posterior clivagem das mesmas. Deste modo os corpúsculos apoptóticos formados são fagocitados por macrófagos (DAMIANI, 2004).



As caspases são proteases, conhecidas por estarem envolvidas na apoptose. Foram descobertos mais de 14 tipos de caspases no tecido nervoso dos mamíferos. Elas podem agir como iniciadoras e executoras da apoptose ou como mediadores inflamatórios, dependendo do tipo de caspase. A ativação das caspases pode ser observada em várias doenças como no trauma (caspase-3), na DP (caspase-3) e na DA (caspase-3 e caspase 9) (WALDMEIER; TATTON, 2004).

A mitocôndria atua como um regulador central da via intrínseca da apoptose, além disso, também pode amplificar e mediar a via extrínseca. A mitocôndria tem um papel “chave” na integração e propagação dos sinais de morte originados intrinsecamente por danos ao DNA, por estresse oxidativo, extravasamentos de proteínas e outros. A maior parte dos sinais pró-apoptóticos é derivada da disrupção mitocondrial originada pela perda do potencial para fosforilação oxidativa, aumentando subitamente a permeabilidade da membrana mitocondrial com formação de um edema com grande influxo de água para a matriz mitocondrial e eventual ruptura da membrana. Proteínas são liberadas para o meio intracitoplasmático (extra-mitocondrial) incluindo fator indutor da apoptose (AIF), endonucleases (endoG) e o citocromo c, que ativa o apoptossomo e, conseqüentemente, a cascata de caspases (WALDMEIER; TATTON, 2004).

Vários estudos sugerem que o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a quinase glicogênio sintase 3 beta (GSK-3 $\beta$ ) ativam as vias extrínseca e intrínseca da indução da apoptose, e possuem um papel importante na patogênese de algumas doenças neurodegenerativas como a DP e a DA (WALDMEIER; TATTON, 2004; ZENG *et al.*, 2017).

#### *1.1.4.4 Metabolismo energético na DP*

Por causa do seu alto nível de atividade metabólica e estrutura complexa, as mitocôndrias são vulneráveis a uma série de fatores (FEARNLEY; LEES, 1991; MULLER-HOCKER, 1992), incluindo aqueles decorrentes de mutações no DNA nuclear e mitocondrial, fatores exógenos, como drogas, infecções, encargos metabólicos (como obesidade ou diabetes mellitus tipo II) e episódios de hipóxia cerebral. Finsterer e colaboradores (2006) mostraram que tecidos ou órgãos com alta demanda de oxigênio e energia, tais como o cérebro, coração, fígado, pele, intestino e túbulos renais, são aqueles mais afetados pelas mitocondriopatias.

Evidências sugerem que o complexo I mitocondrial tem importante papel na etiologia da DP. Em estudos *post mortem* a atividade do complexo I está reduzida em 35 – 40% na substância negra de pacientes com DP (SCHAPIRA *et al.*, 1989; SCHAPIRA *et al.*, 1990; SCHAPIRA *et al.*, 1990). Já foi relatada a ocorrência de uma mutação no DNA mitocondrial na forma idiopática da doença (PARKER JR ; PARKS, 2005) e uma redução associada da atividade do complexo I nas mitocôndrias do córtex frontal (PATHAK; DAVEY, 2008).

A exposição crônica a inibidores do complexo I, como pesticidas, pode contribuir para o desenvolvimento da forma idiopática da doença. No entanto, é improvável que somente a exposição à toxina seja responsável pela inibição seletiva no complexo I na população em geral. Pacientes com a DP sem qualquer história de exposição a toxinas também exibem inibição no complexo I de plaquetas (GU *et al.*, 1998).

#### ***1.1.5 Modelos de Doença de Parkinson in vivo***

A DP tem sido amplamente estudada através de modelos experimentais que são capazes de reproduzir a perda de neurônios dopaminérgicos. O emprego desses modelos tem contribuído para o conhecimento sobre os mecanismos patológicos da doença. Além disso, tem permitido o surgimento de várias hipóteses para explicar os processos neurodegenerativos do sistema nervoso central possibilitando a pesquisa por novos agentes terapêuticos que venham a ser úteis no tratamento dessa patologia.

Deste modo, foram desenvolvidos modelos animais utilizando-se neurotoxinas dopaminérgicas e modelos de linhagens genéticas com deleção genética para a doença. Assim, foram introduzidos agentes que seletivamente lesam e destroem os sistemas catecolaminérgicos tais como as toxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Além desses, alguns agentes químicos utilizados na agricultura como a rotenona e o paraquat, quando administrados sistemicamente, podem induzir algumas das características da DP, apesar de serem menos reproduzíveis (SPIVEY, 2011).

O MPTP é um inibidor do complexo I mitocondrial que foi acidentalmente descoberto após humanos serem expostos a ele e desenvolverem sintomas parkinsonianos em poucas semanas. Ele é altamente lipofílico e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. Para

exercer efeitos tóxicos, o MPTP deve ser convertido em MPP<sup>+</sup> pela enzima MAO-B. O MPP<sup>+</sup> é então transportado para dentro dos neurônios dopaminérgicos pelo sistema transportador de dopamina, onde inibe o sistema de transporte de elétrons do complexo I, resultando em falha de energia na célula e na formação de ânions superóxido (EMBORG, 2004). Os animais mais freqüentemente utilizados neste modelo são os camundongos e os macacos. Ratos são relativamente insensíveis à toxina (GIOVANNI *et al.*, 1994). Esta toxina tem a desvantagem de ser muito lipossolúvel e, portanto ser tóxica para o experimentador.

A 6-OHDA é uma das neurotoxinas mais frequentemente utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da substância negra, tanto *in vitro* como *in vivo* (SCHOBER, 2004). Ela é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesionar. A injeção bilateral de 6-OHDA na SNpc ou em outras regiões cerebrais provoca uma elevada destruição neuronal, principalmente dos neurônios catecolaminérgicos. Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos. Ela produz lesões na SNpc pela indução da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e EROs, como radical hidroxil, e também pela inibição do complexo I mitocondrial (BLUM *et al.*, 2001).

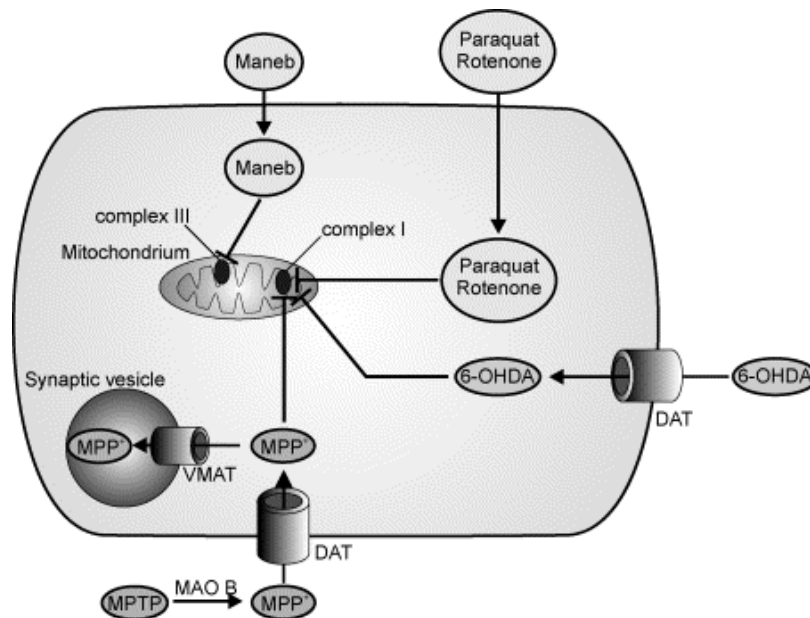
A 6-OHDA é usualmente injetada unilateralmente, enquanto o hemisfério intacto serve como controle interno. Esta injeção unilateral representa o modelo conhecido como “hemiparkinsoniano” (PERESE *et al.*, 1989), que se caracteriza por um comportamento de assimetria motora após a administração de drogas dopaminérgicas, devido ao desbalanço fisiológico de receptores entre o corpo estriado lesionado e o não-lesionado (BETARBET *et al.*, 2002). Por isso, os animais apresentarão um comportamento rotacional contralateral no sentido do hemisfério o qual a estimulação do receptor dopaminérgico for predominante. O comportamento rotacional pode ser quantificado e correlacionado com o grau da lesão, a maior vantagem desde modelo (BEAL, 2001).

Alguns agentes químicos empregados na agricultura, como o pesticidas rotenona e o herbicida paraquat, quando administrados sistematicamente podem induzir algumas características da DP, apesar dos resultados serem menos reproduzíveis. Estes compostos atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, pois são bastante lipossolúveis, nos

neurônios e acumulam-se nas mitocôndrias, inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, provocando a morte neuronal (VON BOHLEN UND HALBACH *et al.*, 2004).

As toxinas lipossolúveis atravessam as membranas celulares e atingem diretamente a mitocôndria tanto no complexo I como no III. O MPTP, através dos transportadores de dopamina (DAT), pode ficar acumulado nas vesículas sinápticas ou alcançar o complexo I mitocondrial. A 6-OHDA atinge a cadeia respiratória mitocondrial, através do DAT, induzindo um colapso na membrana mitocondrial, no complexo I da cadeia respiratória, ocorrendo então a liberação de EROs e desacoplamento da fosforilação oxidativa, gerando prejuízo na função mitocondrial (SHOBER, 2004) (Figura 2).

Figura 2 - Modelos experimentais da Doença de Parkinson.



Fonte: VON BOHLEN UND HALBACH *et al.*, 2004.

Alguns modelos genéticos usando camundongos transgênicos já estão disponíveis, entretanto os que usam neurotoxinas específicas conseguem reproduzir algumas características específicas da doença. São mais simples e mais baratos e por este motivo são mais utilizados. Agentes que alteram ou destroem o sistema catecolaminérgico, incluindo o sistema nigroestriatal, como a 6-OHDA e o MPTP, são os mais utilizados.

### ***1.1.6 Tratamentos para a Doença de Parkinson***

O diagnóstico da DP deve ser realizado por exclusão pelo médico neurologista. O tratamento deve ser multidisciplinar composto por médicos, fisioterapeutas, psicólogos, fonoaudiólogos e nutricionistas. Até o momento, não existe cura para a DP. As terapias atualmente disponíveis não conseguem impedir a progressão da doença. No entanto, muitas opções de tratamento descobertas recentemente são capazes de controlar os sintomas, levando a uma melhora significativa do controle motor, tanto em estágio inicial, quanto nos estágios avançados da doença. Porém, os tratamentos disponíveis não alteram a progressão do processo neurodegenerativo. As drogas utilizadas no tratamento da DP agem aumentando os níveis de dopamina no cérebro ou imitando os efeitos da DA (SINGH *et al.*, 2016).

O tratamento atual para a DP consiste essencialmente na reposição do precursor da dopamina (levodopa), inibição de sua degradação ou o uso de agonistas dopaminérgicos. Apesar disso, com a progressão da doença, observa-se uma redução da eficácia, bem como piora de sintomas incapacitantes não responsivos ao tratamento (EMBORG, 2004).

A maioria dos pacientes faz uso da levodopa, considerada o padrão ouro no tratamento da DP. Para minimizar os efeitos indesejáveis, como flutuações na resposta motora, confusões, alucinações e fadiga, inicialmente são usadas baixas doses com elevação gradual. Além da levodopa, drogas que são prescritas atualmente no tratamento da DP incluem agonistas dos receptores de DA, tais como, rasanginina, selegilina (inibidor de MAO-B), amantadina (anti-viral com ação na síntese da DA), inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT) (NAGATSU; SAWADA, 2009).

Outra opção terapêutica seriam os agentes neuroprotetores, cuja importância está nas suas propriedades antioxidantes, estes poderiam ser capazes de mudar o curso da doença, barrando a neurodegeneração dopaminérgica. Muitos agentes potencialmente neuroprotetores tem sido identificados e requerem testes clínicos (HART *et al.*, 2009; SCHAPIRA *et al.*, 2006). O deprenil e a nicotina vêm sendo bastante estudados (AGUIAR *et al.*, 2006). Agentes anti-inflamatórios, melatonina, coenzima Q10, ácido fólico, selênio, vitaminas A, C e E são algumas substâncias promissoras e que podem contribuir para o tratamento da DP (SINGH *et al.*, 2006; KLIVENYI; VECSEI, 2010).

Tendo em vista os estudos com regeneração celular pretende-se descobrir novas terapias para patologias que permanecem sem tratamento efetivo. Esta evolução é verdadeira para a maioria das doenças neurodegenerativas. O transplante de novos neurônios no cérebro foi realizado nas doenças de Parkinson e Huntington. O implante de tecido mesencefálico embrionário foi testado de forma experimental e clínicas, mostrando uma eficácia limitada. Nos dias de hoje já parece ser possível gerar neurônios funcionais dopaminérgicos ou estriatal formados por uma variedade de células tronco, incluindo células tronco embrionárias ou neurais, bem como células tronco pluripotentes (SCHWARZ; SCHWARZ, 2011).

As intervenções cirúrgicas para DP mostraram-se benéficas para alguns sintomas refratários. No entanto estas cirurgias apresentam indicações específicas e um papel é limitado como "último recurso", devido ao custo elevado. A eficácia a longo prazo é limitada. Recentes avanços nessa área têm levado a uma maior quantidade de procedimentos cirúrgicos. Estes avanços são agora examinados com um renovado interesse devido ao advento das novas tecnologias na forma de neurocirurgia estereotáxica, os avanços da neuroimagem e o desenvolvimento da Estimulação Cerebral Profunda (DBS). Atualmente a DBS é a intervenção de escolha, melhorando resultados, devido ao fato de que essa técnica é potencialmente mais segura do que outras opções disponíveis (SCHAPIRA *et al.*, 2006; SINGH; PILLAY; CHOONARA, 2007).

## 1.2 Resveratrol

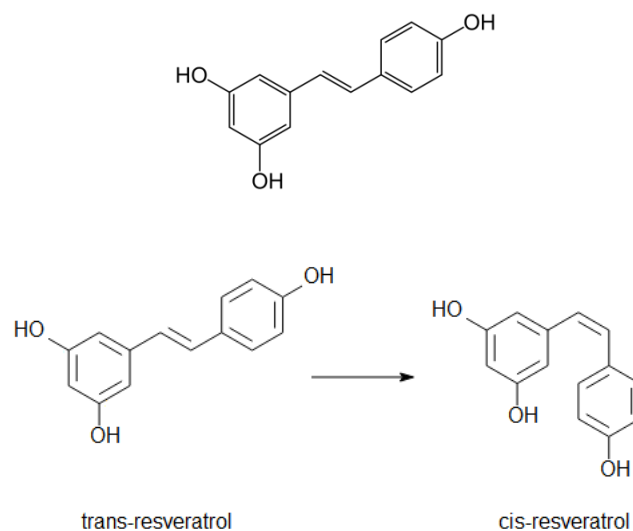
Os medicamentos à base de plantas podem ser uma fonte alternativa e valiosa para descoberta anti-Parkinsoniana. Os compostos classificados em stilbenoides, flavonóides, catecol e terpenos podem ser os candidatos mais promissores para uma investigação mais aprofundada. Alguns compostos bem-estudados, como baicaleína, puerarin, resveratrol, curcumina e ginsenosídeos, merecem maior consideração em ensaios clínicos. Estudos experimentais em profundidade ainda são necessários para avaliar a eficácia de extratos e formulações de ervas em modelos de DP (SONG *et al.*, 2012).

O resveratrol (3, 4, 5-trihidroxi-trans-estilbeno) é uma fitoalexina de natureza polifenólica (FRÉMONT, 2000). Seu peso molecular é de 228,24 g/mol e sua fórmula molecular  $C_{14}H_{12}O_3$ . Está presente em mais de 70 espécies de plantas. Comumente é

encontrado em grande quantidade na casca de uva, vinho tinto e em baixas quantidades no amendoim e em várias outras plantas (LU *et al.*, 2008). O composto foi identificado pela primeira vez em 1940 nas raízes de *Veratrum grandiflorum* O. Loes (TAKAOKA, 1940), cuja função biológica atribui-se à proteção contra agentes potencialmente lesivos à estrutura da planta e estresse ambientais. A raiz de *Polygonum cuspidatum*, erva usada na medicina popular chinesa e japonesa, também apresenta níveis elevados de resveratrol (SOLEAS; DIAMANDIS; GOLDBERG, 1997).

Quimicamente, trata-se de um composto polifenólico derivado da fenilalanina, que contém dois anéis aromáticos com hidroxilas reativas em sua estrutura e que pode se apresentar sob duas formas isoméricas: *cis* e *trans*-resveratrol. O processo de isomerização ocorre pela ação da luz e o isômero *trans* é o principal responsável pelos efeitos biológicos do resveratrol em mamíferos (SOLEAS *et al.*, 1997) (Figura 3).

Figura 3 - Fórmulas moleculares do resveratrol.



Fonte: SOLEAS *et al.*, 1997.

Muitos estudos sobre o resveratrol são direcionados aos vinhos (em especial, ao vinho tinto) e apontam a presença da molécula nessa bebida, sob suas duas formas isoméricas (WANG *et al.*, 2006). O efeito do resveratrol já foi testado e apresentou benefício na

prevenção e tratamento de muitas doenças, dentre elas câncer, diabetes, distúrbios cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, autoimunes e metabólicas (BAUR; SINCLAIR, 2006).

A diversidade dos efeitos biológicos do resveratrol deriva de sua capacidade de afetar diversos alvos moleculares. Estes alvos podem ser divididos em duas categorias: aqueles modulados por interação física direta com o resveratrol e aqueles modulados indiretamente, através da mudança nos níveis de expressão de diversos genes (HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008).

Nos últimos anos, a molécula do trans-resveratrol recebeu atenção considerável por seu poder antiinflamatório, antiapoptótico, antioxidante, antidiabéticos, antivirais e cardioprotetor (SINGH *et al.*, 2013).

Tem sido especulado que o consumo de resveratrol na dieta pode funcionar como antioxidante, induzir a produção de óxido nítrico, induzir a agregação plaquetária e aumentar os níveis de HDL (BHAT *et al.*, 2001). Os primeiros achados do uso de extratos de uva na saúde humana datam mais de 1.000 anos atrás. Na Índia, a medicina ayurvédica já prescrevia *Vitis vinifera L.*, o qual possui como principal componente o resveratrol, como droga cardiotônica (BHAT *et al.*, 2001). O resveratrol é preferencialmente produzido nas cascas das uvas maduras como resposta à infecções fúngicas e encontra-se praticamente ausente em plantas não estimuladas. Esse composto não é o único estilbeno envolvido na resposta às infecções, porém é o precursor da viniferina, composto utilizado na síntese de diversos outros estilbenos (BHAT *et al.*, 2001).

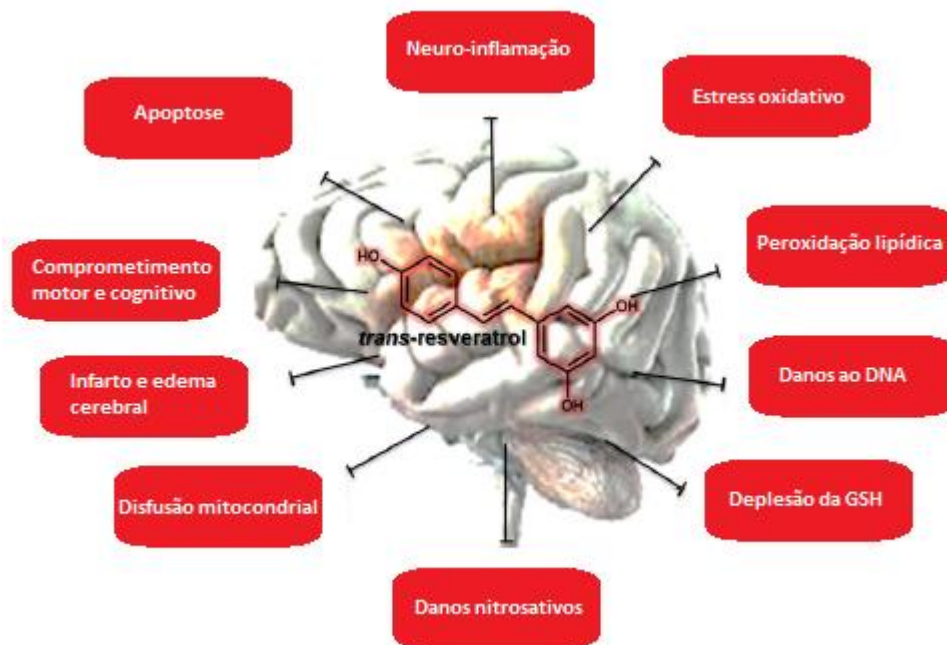
O resveratrol ganhou considerável atenção por suas propriedades anticâncer. Por sua atividade antiproliferativa, o resveratrol pode suprimir a invasão de metástases em carcinoma hepatocelular (YU *et al.*, 2008) e induzir apoptose (ROCCARO *et al.*, 2008).

O efeito neuroprotetor do resveratrol já foi demonstrado em modelos de lesão cerebral com o peptídeo  $\beta$ -amilóide em culturas de células PC12, atribuindo esse resultado à sua capacidade antioxidante (JANG; SURH, 2003). Também apresenta neuroproteção em modelo crônico de esclerose múltipla em camundongos (FONSECA-KELLY *et al.*, 2012). O resveratrol é um antioxidante bem reconhecido que pode modular os resultados da desregulação de íons metálicos, bem como as principais características do cérebro da DA (GRANZOTTO ; ZATTA, 2014).



Estudos recentes demonstram esta atividade anti-inflamatória do resveratrol no modelo de isquemia global em ratos, com a diminuição da expressão dos transportadores de glutamato tipo 1, das micróglias e dos astrócitos no hipocampo após sete dias de tratamento após a isquemia (GIBOVAN; PLAMADON, 2015)

Figura 4 - Ações do trans-resveratrol.



Fonte: Adaptado de SINGH *et al.*, 2013.

O resveratrol bloqueia a produção de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais bovinas (LU *et al.*, 2008) e inibe a colinesterase e a agregação do peptídeo beta amiloide (JANG ; SURH, 2003), além de proteger contra a cardiotoxicidade induzida por trióxido de arsênio (ZHAO *et al.*, 2008) e contra a apoptose (ANTONIO ; DRUSE, 2008).

Também já está demonstrado que o resveratrol protege contra a toxicidade induzida por glutamato, através do aumento de sua recaptação sináptica em cultura de astrócitos (De ALMEIDA *et al.*, 2007). Inibe também os receptores pós-sinápticos de glutamato (GAO *et al.*, 2009) e protege contra o dano cerebral isquêmico (DELLA-MORTE *et al.*, 2009). Inibe a ativação microglial e a liberação de citocromo c em ratos isquemiados (CSISZAR, 2011) e

previne contra déficits de memória, aumentando a atividade da acetilcolinesterase em ratos diabéticos (SCHMATZ *et al.*, 2009). Tais efeitos podem atuar de forma convergente com sua ação antioxidante, para reduzir o dano cerebral durante vários tipos de injúrias e fornecem substrato para o seu uso futuro em várias doenças neurodegenerativas.

Em um estudo anterior, o nosso grupo conseguiu demonstrar que o resveratrol foi capaz de proteger os neurônios dopaminérgicos da ação da neurotoxina 6-OHDA em ratos, nos testes de comportamento motor, comportamento depressivo preservando os níveis de dopamina e serotonina, e na memória tanto aversiva com espacial. Também foi capaz de evitar a formação das EROs, demonstrando o seu efeito antioxidante (MENEZES, 2012).

### **1.3 Relevância e justificativa**

A Doença de Parkinson é uma doença degenerativa progressiva que atinge aproximadamente 1% da população mundial com idade acima de 65 anos. É descrita como um distúrbio motor em que os pacientes apresentam tremor, rigidez muscular, bradicinesia, depressão e distúrbios posturais. Além desses déficits motores, pode ocorrer também disfunção cognitiva e, em alguns casos, demência, provavelmente pelo fato de que o processo degenerativo não se limita aos gânglios da base, afetando também outras áreas de cérebro.

Os dados recentes, mostrando um aumento alarmante na incidência da DP no Brasil (36 mil casos surgem por ano no país), estimulam a procura de novas terapias, não somente que reduzam a perda dopaminérgica, e os conseqüentes distúrbios motores, como também que vise diminuir as complicações associadas como a demência e a depressão que agravam as complicações associadas à doença. Novas drogas estão sendo testadas, e compostos com atividade antioxidante e anti-inflamatória podem ser promissores no tratamento adjuvante, na prevenção e/ou na inibição da progressão da DP.

Assim, como já obtivemos resultados promissores usando o resveratrol no modelo de parkinsonismo animal induzido por 6-OHDA, decidimos aprofundar estudo avaliando os possíveis mecanismos de ação envolvidos e também mostrar se o resveratrol reverte os danos motores induzidos pela toxina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Este trabalho objetivou estudar o efeito neuroprotetor do resveratrol, em ratos com lesão estriatal produzida pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA), num modelo experimental de DP. Foram analisados os aspectos comportamentais, os efeitos motores, sintomas depressivos, a memória; bem como os possíveis mecanismos de ação envolvidos nos processos inflamatórios.

### **2.2 Objetivos Especificos**

- Estudar, através de três protocolos de tratamento (dois protetores e um reversivo), o efeito protetor do resveratrol, usando o modelo de parkinsonismo em ratos, pela injeção intra-estriatal de 6-OHDA, avaliando os efeitos sobre a atividade motora, o comportamento depressivo, perda olfatória e a memória;
- Estudar o efeito neuroprotetor do resveratrol, no modelo citado, avaliando a depleção de monoaminas (HPLC), a degeneração neuronal (imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) e Fluorojade C)
- Avaliar as alterações e na proteína transportadora de dopamina (DAT) e a expressão dos receptores dopaminérgicos D1 e D2
- Avaliar o efeito neuroprotetor do resveratrol sobre a resposta inflamatória produzida pelo modelo de parkinsonismo, através da análise da ativação glial (GFAP, CD11b), pela imunorreatividade para COX-2 e GSK-3 $\beta$ , e pela expressão de IL-1 $\beta$ ;

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Foram utilizados ratos *Wistar* albinos (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea entre 180-240 gramas, provenientes do biotério central do *Campus* do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC) e transferidos para o biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas apropriadas, forradas com raspas de madeira, com ciclo de claro/escuro de 12h/12h e alimentados com ração padrão e água à vontade.

No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal, estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número de registro 95/2013 (Anexo A).

#### **3.2 Drogas**

As seguintes drogas foram utilizadas: 6-OHDA (Sigma Aldrich®, USA), Resveratrol (Sigma Aldrich®, USA), Xilazina (König®, Argentina), Quetamina (König®, Argentina), Tiopental (Richmond®, Chile) e Apomorfina (Sigma Aldrich®, USA). Os demais reagentes eram de grau analítico.

#### **3.3 Anestesia**

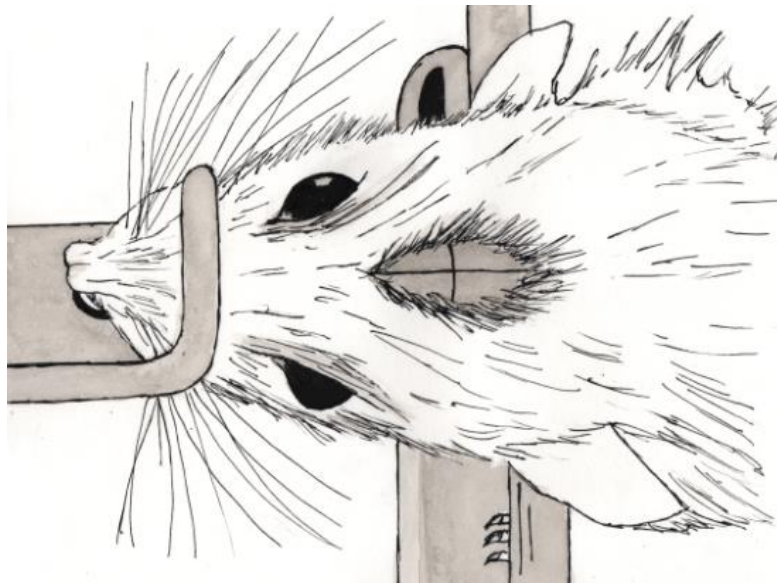
Os animais foram pesados e anestesiados com xilazina (10 mg/kg via intraperitoneal, i.p.) e quetamina (50 mg/kg via intramuscular, i.m.). Foram considerados devidamente sedados quando constatada a perda da reação aos estímulos mecânicos, desaparecimento dos reflexos palpebrais e de endireitamento, retirada do membro após estímulo doloroso provocado por prensão e ritmo respiratório constante.

### 3.4 Cirurgia Estereotáxica (UNGERSTEDT, 1968)

Os procedimentos de lesão do corpo estriado foram realizados através de cirurgia estereotáxica. Esse modelo de parkinsonismo com 6-OHDA foi proposto por Ungerstedt (1968). Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina 6-OHDA, foi somente introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas, seguido de infusão de salina estéril com ácido ascórbico a 0,01% (veículo para 6-OHDA).

Foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma (Figura 5).

Figura 5 - Animal posicionado no aparelho estereotáxico com as suturas ósseas expostas.



Fonte: Desenho de Jéssica Rabelo, 2016.

Três coordenadas de acesso ao corpo estriado foram escolhidas de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1984). O modelo experimental de lesão do corpo estriado foi proposto por Ungerstedt (1968). Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel®), permitindo entrada da seringa *Hamilton*® com a 6-OHDA

diretamente no corpo estriado. As lesões foram feitas unilateralmente, apenas no hemisfério direito dos animais. Os animais receberam três microinjeções de 6-OHDA na dose de 6  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em cada sítio, perfazendo um total de 18  $\mu\text{g}/3\mu\text{L}$ . Os sítios onde a lesão foi realizada situavam-se nas coordenadas descritas na Tabela 1. Na figura 6 podemos visualizar o local com as coordenadas utilizadas neste estudo, aonde ocorreu a injeção da 6-OHDA nos três planos ântero-posteriores, caracterizando uma lesão difusa do complexo caudado-putâmen (CPu).

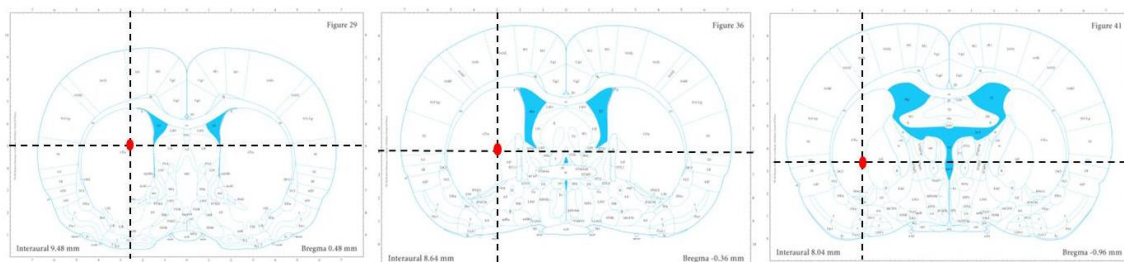
Após as injeções, os animais foram suturados com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 - 15 x 45cm) e desinfetados com povidine. Inicialmente ficaram mantidos em caixas isoladas e aquecidas até acabar o efeito da anestesia e posteriormente foram acondicionando nas gaiolas com no máximo 3 (três) animais em estantes ventiladas.

Tabela 1 - Sítios das lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA.

Coordenadas estriatais	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
Antero-posterior (A-P)	+ 0,5	- 0,5	- 0,9
Medio-lateral (M-L)	- 2,5	- 3,0	- 3,7
Dorso-ventral (D-V)	+ 5,0	+ 6,0	+ 6,5

Fonte: PAXINOS; WATSON, 1986.

Figura 6 – Figura esquemática representativa das 3 coordenadas estereotáxicas para injeção intracraniana de 6-OHDA no corpo estriado.



De acordo com a tabela 1 o ponto vermelho indica, de acordo com a tabela 1. Os tracejados indicam as coordenadas médio-lateral e dorso-ventral. Coordenadas ântero-posteriores aproximadas, de acordo com as lâminas disponíveis no atlas (PAXINOS; WATSON, 1986).

### 3.5 Protocolos Experimentais

Os animais foram submetidos à lesão nigroestriatal com injeção estereotáxica de 6-OHDA, e tratados com o resveratrol na dose 50 mg/kg. O resveratrol foi dissolvido salina com 1% dimetilsulfóxido (DMSO) e administrada por via oral (v.o.). Essa foi a dose escolhida como a mais eficiente após trabalho realizado no mestrado, onde utilizamos o mesmo modelo da 6-OHDA em ratos e testamos as doses de 5, 10 e 50 mg/kg de resveratrol por gavagem, neste trabalho iniciamos o tratamento dos animais 24 (vinte e quatro) horas após a cirurgia até o 15º (décimo quinto) dia de tratamento quando foi iniciado os testes comportamentais, e a eutanásia ocorreu no 18º (décimo oitavo) dia após a cirurgia (MENEZES, 2012).

O tratamento foi dividido em 3 (três) protocolos: no primeiro os animais iniciaram o tratamento três dias antes da cirurgia para a lesão com 6-OHDA (Protocolo experimental I ou Neuroprotetor), no segundo os animais foram tratados 1 (uma) hora antes da cirurgia (Protocolo experimental II ou Neuroprotetor) e, no terceiro os animais só iniciaram o tratamento (sete) dias depois da cirurgia em ratos parkinsonianos, após a realização do teste rotacional induzido por apomorfina, utilizamos um ponto de corte de 80 (oitenta) rotações contralaterais à lesão estriatal em 60 (sessenta) minutos e selecionamos os animais parkinsonianos (Protocolo experimental III ou Reversivo); e continuaram o tratamento até o último dia de testes comportamentais (Figura 7).

Os animais ainda foram subdivididos em 4 (quatro) grupos dentro de cada protocolo de tratamento, cada um com 16 (dezesesseis) animais da seguinte forma (Tabelas 2, 3 e 4):

Tabela 2 – Protocolo experimental I (Neuroprotetor).

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
1	Salina 3 $\mu$ L, intrastriatal + Veículo v.o. durante 22 dias.
2	Salina 3 $\mu$ L, intrastriatal + Resveratrol 50 mg/kg, v.o., 22 dias.
3	6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L, intrastriatal) + Veículo, v.o., 22 dias.
4	6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L, intrastriatal) + Resveratrol 50 mg/kg, v.o., 22 dias.

Tabela 3 – Protocolo experimental II (Neuroprotetor).

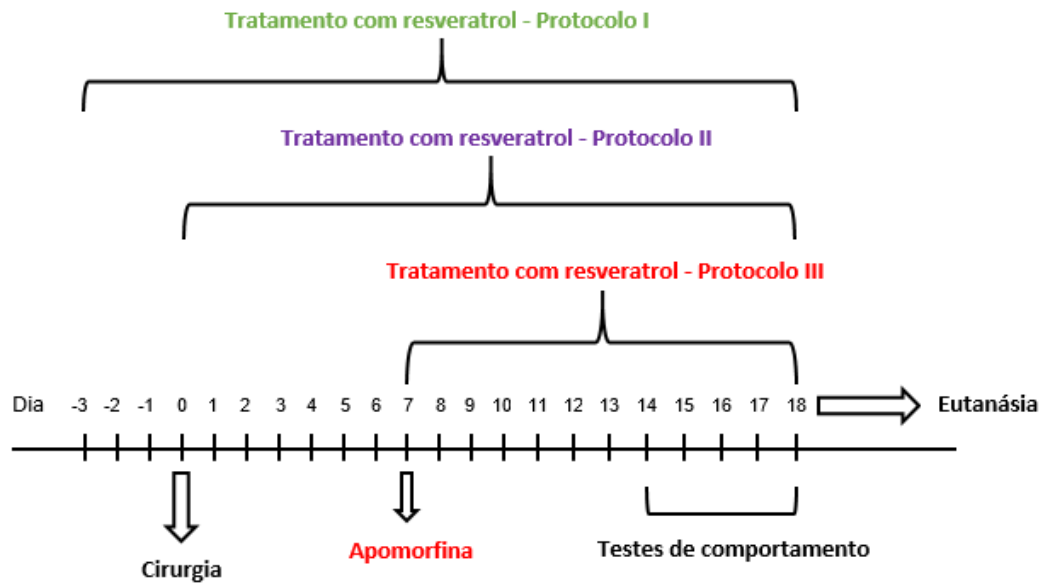
<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
1	Salina 3 $\mu$ L, intrastriatal + Veículo v.o. durante 19 dias.
2	Salina 3 $\mu$ L, intrastriatal + Resveratrol 50 mg/kg, v.o., 19 dias.
3	6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L, intrastriatal) + Veículo, v.o., 19 dias.
4	6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L, intrastriatal) + Resveratrol 50 mg/kg, v.o., 19 dias

Tabela 4 – Protocolo experimental III (Reversivo).

<b>Grupo</b>	<b>Tratamento</b>
1	Salina 3 $\mu$ L, intrastriatal + Veículo v.o. durante 12 dias.
2	Salina 3 $\mu$ L, intrastriatal + Resveratrol 50 mg/kg, v.o., 12 dias.
3	6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L, intrastriatal) + Veículo, v.o., 12 dias.
4	6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L, intrastriatal) + Resveratrol 50 mg/kg, v.o., 12 dias



Figura 7 – Desenho experimental dos três protocolos experimentais.



Após a realização dos testes comportamentais, os animais foram subdivididos dentro dos grupos e eutanasiados por decaptação e tiveram as áreas cerebrais (estriado direito, estriado esquerdo e mesencéfalo) dissecadas e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para a realização da dosagem de monoaminas e análises de *western blot*; ou foram perfundidos para realização das imunohistoquímicas e análises histopatológicas.

Os animais foram anestesiados com uma superdosagem de tiopental (100 mg/kg i.p.) e perfundidos através de punção cardíaca com paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato 0,1 M contendo salina 0,9%, pH 7,4). Os cérebros foram removidos, fixados em paraformaldeído tamponado a 10% por 24 (vinte e quatro) horas e posteriormente preservados em solução crioprotetora de sacarose a 30% em PBS a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para realização das imunohistoquímicas os cérebros foram congelados e fatiados no criostato na espessura de 50  $\mu\text{m}$ .

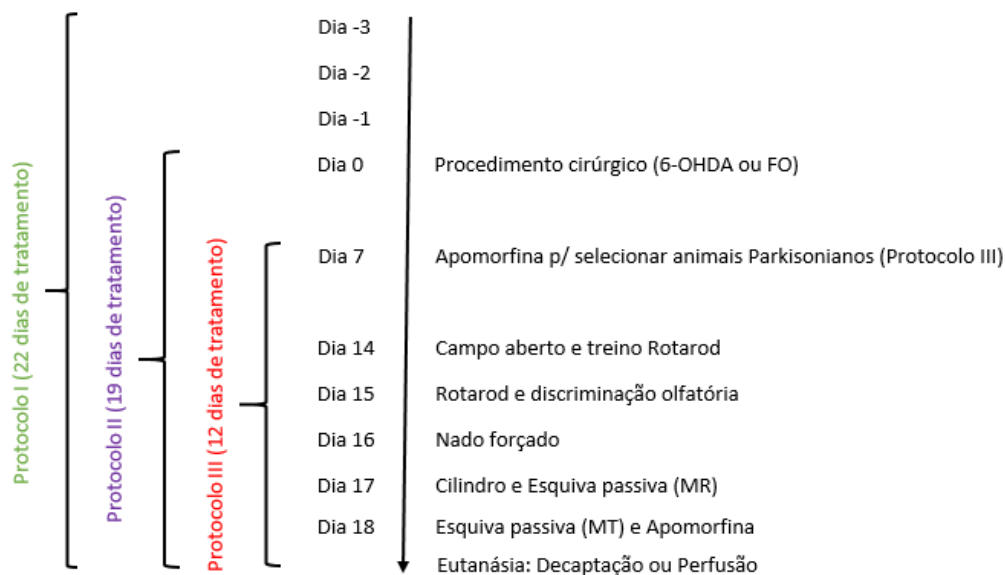
### 3.6 Testes Comportamentais

Após 14 (quatorze) dias da cirurgia, os animais foram divididos em dois grupos de 8 (oito) animais para a realização dos testes comportamentais. Os animais do primeiro grupo

foram submetidos ao teste da apomorfina, atividade locomotora (teste do campo aberto e *rotarod*) e assimetria dos membros anteriores (teste do cilindro), comportamento depressivo (teste do nado forçado) e memória (teste da esquiva passiva e labirinto aquático sinalizado); e função olfativa (discriminação olfativa). Os animais do segundo grupo foram submetidos ao teste do campo aberto, labirinto aquático sinalizado e apomorfina (Figuras 8 e 9).

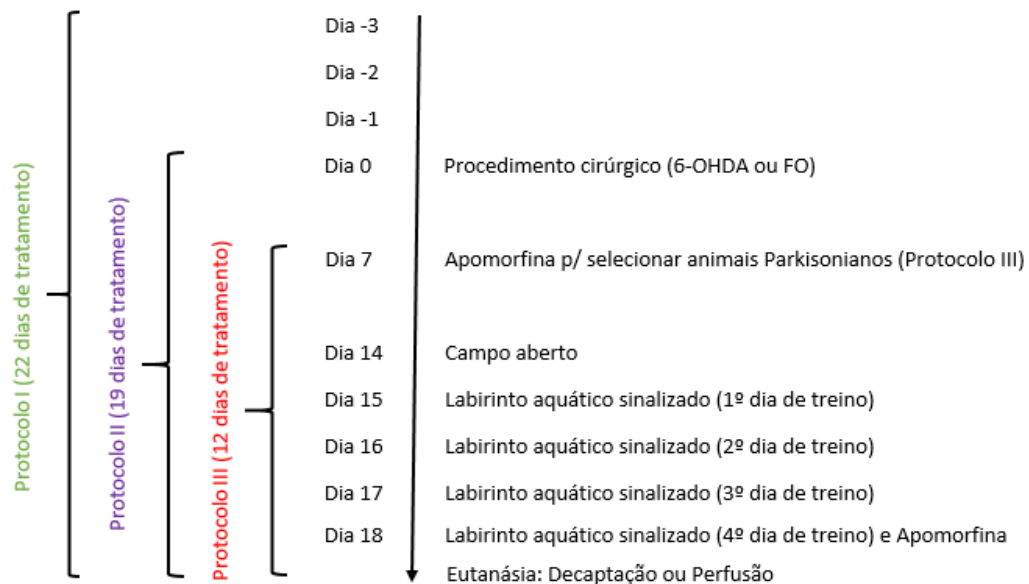
Os testes comportamentais foram realizados no Laboratório de Neurociências e Comportamento (LNC), no horário de 9 (nove) as 16 (dezesesseis) horas, para experimento cego aos grupos e sempre pelos mesmo pesquisadores. Os animais foram submetidos a, no máximo, dois testes por dia, e o último teste realizado foi o teste rotacional induzido por apomorfina.

Figura 8 - Desenho experimental –1º grupo.



Os animais sofreram a lesão estriatal pela 6-OHDA no dia zero seguindo os protocolos de tratamentos I, II e III. Os animais que seguiram o protocolo III de tratamento realizaram o teste da apomorfina no 7º dia para selecionar os animais parkinsonianos. No 14º dia, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e ao treino do *rotarod*. No 15º dia: testes do *rotarod* e discriminação olfatória. No 16º dia: teste do nado forçado. No 17º dia: teste do cilindro e esquiva passiva (memória recente - MR). E no 18º dia: segunda parte do teste da esquiva passiva (memória tardia – MT) e ao teste de rotacional induzido por apomorfina, em seguida foram eutanasiados por decaptação ou perfusão.

Figura 9 - Desenho experimental – 2º grupo.

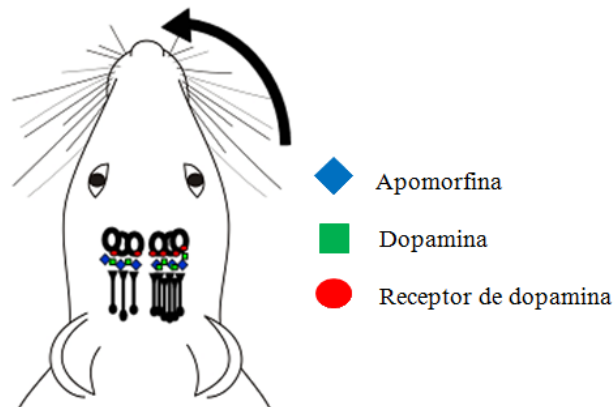


Os animais sofreram a lesão estriatal pela 6-OHDA no dia zero seguindo os protocolos de tratamentos I, II e III. Os animais que seguiram o protocolo III de tratamento realizaram o teste da apomorfina no 7º dia para selecionar os animais parkinsonianos. No 14º dia: teste do campo aberto. No 15º dia: primeiro dia do treino do labirinto aquático sinalizado. No 16º dia: segundo dia do treino do labirinto aquático sinalizado. No 17º dia: terceiro dia do teste do labirinto aquático sinalizado. E no 18º dia: quarto dia do teste do labirinto aquático sinalizado e ao teste de rotacional induzido por apomorfina, em seguida eutanasiados por decaptação ou perfusão.

### ***3.6.1 Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (UNGERSTEDT, 1970)***

A gravidade da depleção de dopamina foi avaliada pelo comportamento rotacional induzido por apomorfina, conforme descrito por Ungerstedt e Arbuthnott (1970). Este é um teste sensível a lesões estriatais com extensões maiores que 80% (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002) (Figura 10).

Figura 10 - Desenho esquemático de rato com perda parcial de neurônios dopaminérgicos nigrostriatal após um desafio com a apomorfina.



O animal gira em direção ao site que apresenta o sinal sináptico mais fraco, devido a uma assimetria nos hemisférios cerebrais, decorrente de uma *up regulation* dos receptores dopaminérgicos no lado lesionado (adaptado de DA CUNHA *et al.*, 2008).

Após 18 dias da lesão estriatal, foi administrada uma dose de 0,6 mg/kg de apomorfina i.p. (dissolvidos em salina) em cada animal, estes foram observados por 60 minutos em bacias plásticas (Figura 11). O comportamento rotacional foi observado e determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina, onde foram contabilizadas o número de rotações na direção contrária à lesão (lado contralateral) e o número de rotações na direção da lesão (ipsilaterais).

Figura 11 - Animal no teste rotacional induzido por apomorfina.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.7 Avaliação do comportamento motor

#### 3.7.1 Teste do Campo Aberto (*Open Field*) (BROADHURST, 1957)

Neste teste foi possível avaliar a atividade exploratória do animal, foi usado o modelo do Campo Aberto. O Campo aberto consiste de uma arena quadrada de acrílico preto (50 x50 cm), iluminada com luz vermelha (Figura 12). O piso da arena foi dividido em quatro quadrados iguais. No teste, os animais foram colocados na arena e deixados para explorar o ambiente por 5 (cinco) minutos, sendo registrado o número de quadrantes atravessados pelo animal (*crossings*). Também foi avaliado o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório vertical (*rearing*) (Figura 14). Após cada animal ser retirado a arena foi limpa com uma solução de álcool a 20% e secada com toalhas de papel, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem no teste, este procedimento foi feito após cada teste comportamental. O ambiente foi iluminado com luz vermelha.

Figura 12 - Arena do teste de campo aberto dividido em quatro quadrantes iguais.



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 3.7.2 Teste Rotarod (DUNHAM; MIYA, 1957; ALVES et al., 2011)

Neste teste foi avaliado a atividade motora demonstrando alterações de equilíbrio e coordenação dos animais. O teste do *rotarod* baseia-se na habilidade de roedores em manter o

equilíbrio e a caminhada em um cilindro em rotação. O aparelho utilizado no teste consiste de uma barra circular estriada que girava em torno do seu próprio eixo, com diâmetro de 3 (três) cm, separados em quatro compartimentos com 5 (cinco) cm de largura e 20 (vinte) cm de altura a partir de quatro pranchas de inclinação (Figura 13). Os animais foram submetidos ao teste que conforme o modelo descrito inicialmente por Dunham e Miya (1957) e adaptado por Alves e colaboradores (2011). Foi realizado um treino onde os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 3,5 cm de diâmetro e com uma rotação de 16 rotações por minuto (rpm), durante 3 (três) minutos. Após 24 (vinte e quatro) horas foi realizado o teste, onde foi registrando, em segundos, o tempo de permanência na barra, em um período máximo de 3 (três) minutos.

Figura 13 – Aparelho do *rotarod*.



Fonte: Insight®

### 3.7.3 Teste do cilindro (*Limb-use asymmetry test*) (SCHALLER; WOODLEE; FLEMING, 2002)

Neste teste foi avaliada a assimetria dos membros anteriores, que foi determinada durante o comportamento de *rearing* (o animal fica em pé sobre as patas posteriores – exploração vertical). O animal foi colocado em um cilindro de acrílico (60 cm de altura e 18 cm de diâmetro) e observado por 5 (cinco) minutos (Figura 14). Durante o comportamento exploratório de *rearing* o contato com a parede do cilindro foi contado de acordo com o membro anterior que tocava o cilindro, contralateral (membro afetado), ipsilateral (membro não afetado) ou ambos (simultaneamente).

Figura 14 - Animal durante o movimento de *rearing* no teste do cilindro.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.8 Teste do Nado forçado (*Forced Swim test*) (PORSOLT *et al.*, 1978)

Este modelo experimental foi utilizado para o estudo da atividade depressiva através do chamado “desespero comportamental”. Neste teste, os roedores foram submetidos a um período de nado forçado, uma situação inescapável de estresse como o objetivo de identificar nos animais o “desespero comportamental”, considerando aqui este comportamento depressivo-símile. Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico (60 cm de altura e 23 cm de diâmetro), contendo 25 cm de água durante 6 (seis) minutos, com o primeiro minuto de adaptação e registrado o tempo de imobilidade nos 5 (cinco) minutos posteriores (Figura 15). O tempo de imobilidade (apenas com pequenos movimentos que os impediam de submergir) foi registrado em segundos.

Figura 15 - Animal durante o teste do nado forçado.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.9 Testes de Memória

#### 3.9.1 Esquiva passiva (*Passive avoidance test*) (DeNOBLE et al., 1986)

No 17º (décimo sétimo) e 18º (décimo oitavo) dia após a cirurgia foi realizado o teste da esquiva passiva com o objetivo de avaliar a memória aversiva recente (MR) e tardia (MT). O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (35 x 28 x 50 cm) com uma plataforma não eletrificada e um piso eletrificado (Insight® EP 104MR) (Figura 16). O teste foi realizado em uma sala isolada e com luz vermelha.

O animal foi deixado para ambientação no aparelho durante um 1 (um) minuto, e retirado. Após 30 (trinta) segundos, o animal foi colocado novamente sobre a plataforma. A tendência de o animal é explorar todos os lados do aparelho, ao descer da plataforma o mesmo recebeu um choque de 1,0 (um) mA, com a duração de 1 (um) segundo, com o tempo de latência para descer registrado, até um máximo de 300 (trezentos) segundos (treino). O animal foi retirado e após 15 (quinze) minutos, foi colocado novamente na plataforma sendo registrada a latência da descida (memória recente). A retenção do aprendizado foi testada após 24 (vinte e quatro) horas, quando os animais foram recolocados na plataforma e o tempo de latência para a descida para o piso eletrificado foi registrado (os animais nesta fase não levaram choque) (memória tardia).

Figura 16 - Aparelho de esquiva passiva.





### ***3.9.2 Teste do labirinto aquático com plataforma sinalizada (Cued Water Maze) (PACKARD; McGAUGH, 1992; MIYOSHI et al., 2002)***

O teste do labirinto aquático sinalizado utilizado para a avaliação de memória espacial em animais parkinsonianos, consiste em realizar quatro dias de treinamento, com quatro treinos consecutivos por dia, durante os quais os animais são colocados na piscina (180 cm de diâmetro e 60 cm de profundidade) de frente para a parede da piscina, permitindo que nadem livremente para uma plataforma de escape, transparente, de acrílico (11 cm × 14 cm) submersa 2 (dois) cm na água turva. Presa no topo da plataforma e saliente a água é colocada uma bola de 7 (sete) cm de diâmetro (Figura 17). Além disso, nesta versão a posição da plataforma é modificada em cada treino do dia, variando de acordo com o quadrante. Se o animal não encontrar a plataforma durante um período de 60 (sessenta) segundos este é gentilmente guiado para a plataforma e permaneceu lá por 20 (vinte) segundos e depois foi removido da piscina por 30 (trinta) segundos antes de ser colocado na próxima posição inicial aleatória. O tempo de latência para encontrar o local da plataforma foi registrado, em segundos, em todos os treinos, nos quatro dias.

Figura 17 - Labirinto aquático sinalizado e o animal sobre a plataforma.



Fonte: Arquivo pessoal.

### **3.10 Teste da discriminação olfativa (SOFFIÉ; LAMBERTY, 1988; PREDIGER *et al.*, 2005 a, b)**

A discriminação olfativa dos animais foi avaliada através do teste de discriminação olfativa, originalmente descrito por Soffié e Lamberty (1988) e, posteriormente, modificado por Pregiger e colaboradores (2005a, b). O teste avalia a capacidade do animal de diferenciar os odores.

A caixa da discriminação olfativa consiste em duas gaiolas semelhantes as que os animais habitam (40 x 30 x 20), separados por uma porta aberta que permite o acesso dos animais para os dois compartimentos (Figura 18).

Para a realização do teste os animais foram mantidos em suas gaiolas por uma semana sem trocar a maravalha para que haja uma padronização da impregnação do odor, após este período as maravalhas sujas foram retiradas e colocadas em um dos lados do aparelho (compartimento familiar) e no outro lado foi colocada maravalha limpa e inodora (compartimento não-familiar).

Os animais foram colocados na posição central das duas gaiolas de forma que possam escolher entre um compartimento contendo a maravalha retirada da gaiola previamente ocupada por ele (odor familiar) e outro contendo maravalha nova (odor desconhecido). O tempo que o animal gastou explorando cada um dos compartimentos foi registrado em segundos, durante um período de 5 (cinco) minutos. Geralmente ratos adultos saudáveis são capazes de discriminar entre os dois ambientes, e apresentam preferência pelo compartimento familiar, impregnado com o seu próprio odor em relação ao local com odor neutro (CARR *et al.*, 1976; PREDIGER *et al.*, 2005 a,b).

Figura 18 – Animal na caixa da discriminação olfativa.



Fonte: Arquivo pessoal.

### 3.11 Dosagem de monoaminas

Para a detecção dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) por detecção eletroquímica, como descrito previamente por Aguiar e colaboradores (2006).

Os tecidos foram homogeneizados a 10% em ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) por 30 (trinta) segundos, sendo em seguida centrifugados na temperatura de  $4^\circ\text{C}$  por 15 (quinze) minutos a 15000 rpm. O sobrenadante foi separado e filtrado através de uma membrana de  $0,2\ \mu\text{m}$  (Millipore®). Uma alíquota de  $20\ \mu\text{l}$  foi injetada no equipamento de HPLC, sendo utilizada uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 cm e diâmetro da partícula de  $3\ \mu\text{m}$  (Waters®, Estados Unidos da América). A fase móvel utilizada é composta por tampão ácido crítico  $0,163\ \text{M}$ , pH 3,0 contendo ácido octanosulfônico sódico  $0,69\ \text{M}$  (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7% v/v.

A dopamina (DA) e o seu metabólito ácido diidroxifenilacético (DOPAC), a serotonina (5-HT) e a noradrenalina (NE) foram eletroquimicamente detectados usando um detector eletroquímico 2465 (Waters®, Modelo Alliance, Estados Unidos da América) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em  $0,85\text{V}$  relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. As concentrações das amostras foram calculadas a partir da área dos picos dos padrões utilizados, e os resultados expressos em ng/mg de tecido.

### 3.12 Análise Imunohistopatológica

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (100 mg/kg i.p.) e perfundidos através de punção cardíaca pelo ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4% em PBS (tampão fosfato 0,1 M contendo salina 0,9%, pH 7,4). Os cérebros foram removidos, fixados em paraformolaldeído tamponado a 10% por 24 (vinte e quatro) horas e posteriormente preservados em solução crioprotetora de sacarose a 30% em PBS a 4°C. Para realização das imunohistoquímicas os cérebros foram congelados e cortados no criostato (Leica® CM3050 S, Alemanha) na espessura de 50 (cinquenta) µm, e armazenados *free-floating* em placas de 24 (vinte e quatro) poços com azida a 0,01% em PBS a 4°C até o dia da análise.

#### 3.12.1 Imunohistoquímica para TH, DAT, COX-2 e GSK-3β

Para a realização da imunohistoquímica visível TH, DAT, COX-2 e GSK-3β as fatias foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos, a peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio 0,3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 10 (dez) minutos e depois as fatias foram lavadas mais 2 (duas) vezes por 5 (cinco) minutos em PBS. As fatias foram incubadas com os anticorpos primários anti-TH (*mouse*, 1:800, Sigma®), anti-DAT (*goat*, 1:500, Santa Cruz®), anti-GSK-3β (*goat*, 1:500, Sigma®) e anti-COX-2 (*goat*, 1:200, Santa Cruz), para a COX-2 foi realizada a etapa de recuperação antigênica utilizando o banho maria a 95°C por 30 (trinta) minutos, em albumina bovina 5% (BSA) durante a noite a 4°C. No outro dia, as fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 (dez) minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com os anticorpos secundários biotinizado diluído na solução de bloqueio *goat anti-mouse* IgG (1:200; Vector labs®), *dunkey anti-goat* (1:300, Vector Labs®), respectivamente para TH, DAT, GSK-3β e COX-2, por 2 (duas) horas e temperatura ambiente (TA), e enxaguados novamente três vezes com PBS. O método ABC (Vector Labs®) foi utilizado por 40 (quarenta) minutos a TA para a amplificação do sinal, sendo a marcação revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB Peroxidase Substrate Kit; Vector labs®). A reação foi interrompida, lavando-se as fatias em PBS antes de realizar a montagem em lâminas gelatinizadas. Após secagem, as fatias foram desidratadas em gradiente de etanol (50, 70 e 100%) e clarificadas com xileno, sendo finalmente cobertas com

lamínulas utilizando-se o meio de montagem à base de xilol (Entelan®) e posteriormente examinadas.

Os cortes foram visualizados no microscópio Zeiss® Imager Z2 e a imunorreatividade para TH, DAT, GSK-3 $\beta$  e COX-2 mensuradas pela análise semi-quantitativa da densidade óptica utilizando-se o software Image J®. Foi feita uma média para os valores obtidos para o grupo controle (FO) e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor.

### **3.12.2 Imunofluorescência para GFAP e CD11-b**

Para a realização da imunofluorescência para GFAP e CD11-b as fatias foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos. Em seguida foram bloqueadas com PBS contendo 5 % de soro de cavalo durante 45 (quarenta e cinco) minutos. Depois se realizou a incubação de dupla marcação por 48 (quarenta e oito) horas a 4°C com anticorpo anti-GFAP (*rabbit*, 1:1000, Dako Cytomation®) em combinação com anti-CD11b (*mouse*, 1:200, Serotec®) diluídos em PBS com 0,25% de Triton-X100 e 5% de soro de cavalo. Após o período de incubação as fatias foram então lavadas 3 (três) vezes por 10 (dez) minutos em PBS com 0,25% de Triton-X100 e subseqüentemente incubadas por 2 (duas) horas a TA com os anticorpos secundários *donkey anti-mouse* IgG conjugado com Alexa Fluor 594 (Life Tech®) e *donkey anti-rabbit* IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (Life Tech®), diluídos 1:500 em PBS com 0,25% de Triton-X100 e 5% de soro de cavalo. Após lavar 3 (três) vezes em PBS por 10 (dez) minutos cada, os núcleos foram corados com DAPI (2 $\mu$ g/mL, Molecular Probes®) por 10 (dez) minutos e, posteriormente as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas com o meio de montagem fluorescente Dako (Dako®, USA). Os cortes foram visualizados em microscópio confocal (Laser scanning, LSM 510 META, Zeiss®).

A imunorreatividade para GFAP e CD11b foram quantificadas em fatias (50 $\mu$ m de espessura e espaçamento de 300 $\mu$ m) representativas do estriado e mesencéfalo. A média de intensidade de fluorescência (MIF) utilizada para mensurar a imunorreatividade foi calculada através do programa Image J®, sendo representados como média do controle  $\pm$  EPM.

### 3.12.3 Coloração por Fluor Jade C

Foi utilizada a técnica de marcação fluorescente com Fluoro Jade C, o qual liga-se especificamente à neurônios em processo de degeneração (SCHMUED *et al.*, 2005). Os cortes cerebrais inicialmente foram hidratados em água destilada. Depois, colocados em solução de permanganato de potássio 0,06% por 6 (seis) minutos. Em seguida, foram então lavados em banho de água destilada durante 1 (um) minuto. Posteriormente, foram incubados em solução de Fluoro Jade C 0,001%, em ácido acético 0,1%, por 15 (quinze) minutos. Após esse período, os cortes foram lavados 3 (três) vezes com água destilada por 3 (três) minutos e, posteriormente as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas com o meio de montagem fluorescente Dako (Dako®, USA). Os cortes foram visualizados em microscópio confocal (Laser scanning, LSM 510 META, Zeiss®). A quantificação da intensidade de fluorescência utilizada para mensurar a imunorreatividade foi calculada através do programa Image J®, sendo representados como média do controle  $\pm$  EPM.

### 3.13 Western blot

As amostras de tecido do corpo estriado e mesencéfalo foram homogeneizadas separadamente por homogeneizador elétrico com 1 mL de tampão RIPA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, EDTA 1 mM, EGTA 1 Mm, Triton X-1001%, PMSF 1 mM, Inibidor de protease 0,1%). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 13.000 g durante 15 (quinze) minutos a 4°C. A quantidade de proteína total presente na amostra foi determinada usando o sobrenadante através do método de Lowry, e a albumina sérica bovina utilizada como padrão.

As amostras foram desnaturadas por adição de um tampão contendo – Tris 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, SDS4%, e de Azul de Bromofenol 0,02% - seguida de aquecimento a 90°C durante 5 (cinco) minutos. Quantidades iguais de proteínas totais (65  $\mu$ g por linha) serão aplicadas em cada poço de gel de poliacrilamida-SDS 12,5%, utilizando-se o sistema *Mini Protean3Cell* (Bio-Rad®, EUA). Adicionou-se tampão de corrida (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e SDS0,1%) e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem e de miliamperagem por 2 (duas) horas. Após a separação protéica se deu o início da transferência (*overnight*, 100 V, 395 mA) para a membrana PVDF (Bio-

Rad®), previamente ativada por imersão em metanol durante 5 (cinco) segundos, seguida de um a imersão de 5 (cinco) minutos em água, e finalmente em tampão de eletrotransferência (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e Metanol 20 %) por 5 (cinco) minutos.

Após a transferência as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% em TBS-T por uma hora, sob agitação em TA. Em seguida as membranas foram incubadas em TBS-T *overnight* contendo os seguintes anticorpos primários: D1 (*rabbit*, 1:500, ABCAM®) e D2 (*rabbit*, 1:800, ABCAM®) e IL-1 $\beta$  (*rabbit*, 1:500, Santa Cruz®).

A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 lavagens) e incubadas com anticorpos secundários marcados com peroxidase: anti-IgG de camundongo (1:2000; Millipore®) e anti-IgG de cabra (1:2000; Sigma-Aldrich®) por 1 (uma) hora. Após a incubação de uma hora a membrana foi novamente lavada com TBS-T (3 lavagens) e foram então incubadas com ECL (*Enhanced Chemi-Luminescent substrate*, Bio-Rad®, EUA) de acordo com especificações do fabricante. A detecção foi realizada utilizando o aparelho fotodocumentador Quemi-Doc (Bio-Rad®) e analisadas pelo software Image Lab (Bio-Rad®). O valor final de intensidade relativa será expresso em porcentagem em relação ao grupo FO de todos os experimentos realizados.

### 3.14 Análises estatísticas

Foram realizados testes de análise de variância (ANOVA), para comparação entre médias, seguido do teste de Tukey ou do teste de Bonferroni. Para a análise dos testes comportamentais da apomorfina, cilindro, labirinto aquático sinalizado e discriminação olfativa. Para o teste labirinto aquático sinalizado também foram realizados o teste ANOVA de medidas repetidas e para comparações dentro dos grupos, o teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

Também foi realizado testes de análise de variância (ANOVA), para comparação entre médias, seguido do teste de Tukey ou do teste de Bonferroni para avaliação da imunorreatividade para TH, DAT, COX-2, GFAP, CD11-b, flourojade C e GSK-3 $\beta$ , e análise das concentrações das monoaminas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM.

A avaliação dos outros testes comportamentais: nado forçado, esquiva passiva e *rotarod* utilizamos o teste de Kruskal-Wallis e, fizemos a comparação entre os grupos utilizado o teste de Mann-Whitney. Estes resultados foram expressos como mediana (percentil: 10-90).

A análise das bandas de *western blot* (D1, D2 e IL-1 $\beta$ ) foi realizada através do teste de ANOVA, seguido do teste de Tukey e os valores expressos como média  $\pm$  EPM. O critério de significância utilizado em todo o estudo foi de  $p < 0,05$ . O programa computacional de estatística utilizado foi o *GraphPad Prism*® 5.0.



## 4 RESULTADOS

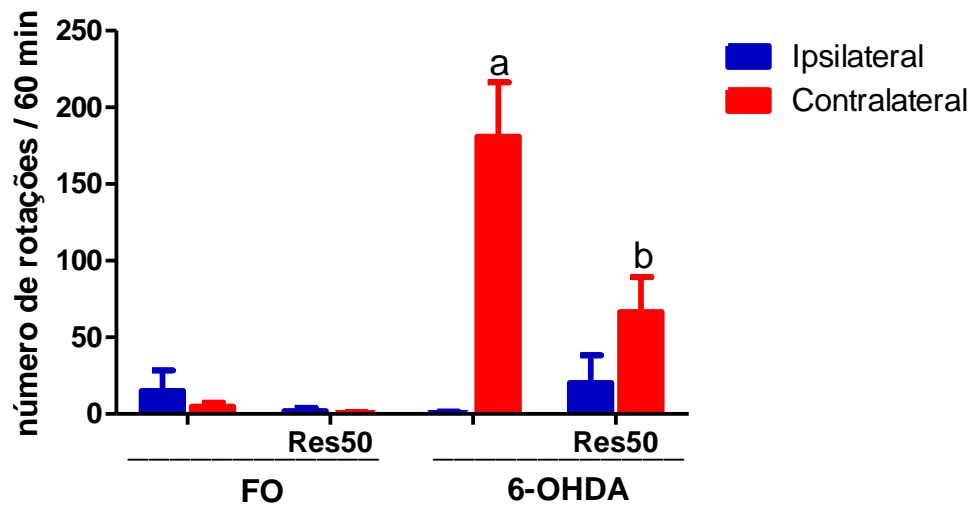
### 4.1 Efeito do resveratrol no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos parkinsonianos

A gravidade da depleção de dopamina foi avaliada através do comportamento rotacional no teste da apomorfina, onde observamos um aumento no número de rotações significativo do grupo 6-OHDA, no sentido contralateral, em relação ao grupo FO nos três protocolos de tratamento preventivos e de reversão (Protocolo I - número de rotações: FO:  $4,90 \pm 2,56$ ; 6-OHDA:  $180,90 \pm 35,38$ ; Protocolo II - número de rotações: FO:  $5,08 \pm 2,21$ ; 6-OHDA:  $190,40 \pm 28,01$ ; e Protocolo III - número de rotações: FO:  $3,00 \pm 1,92$ ; 6-OHDA:  $216,80 \pm 35,19$ ) (Figuras 19, 20 e 21).

Nos grupos tratados com resveratrol houve redução significativa no número de rotações contralaterais na dose de 50 mg/kg em relação ao grupo 6-OHDA nos protocolos de tratamento preventivos (Protocolo I - número de rotações: 6-OHDA + Res50:  $66,60 \pm 22,77$ ; Protocolo II - número de rotações: 6-OHDA + Res50:  $76,67 \pm 34,45$ ), significando que o resveratrol apresentou uma neuroproteção nos protocolos preventivos (Figuras 19 e 20).

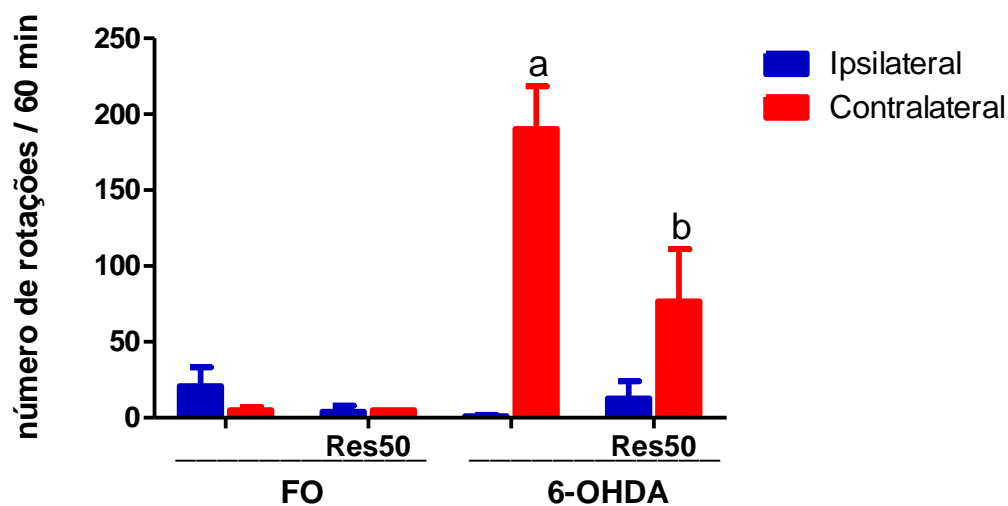
Não houve diferença significativa no número de rotações contralaterais nos animais que seguiram o protocolo de reversão (Protocolo III - número de rotações: 6-OHDA + Res50:  $193,80 \pm 24,00$ ) (Figura 21), significando que o resveratrol não conseguiu reverter o dano neuronal produzido pela toxina.

Figura 19 - Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (0,6 mg/kg) em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I).



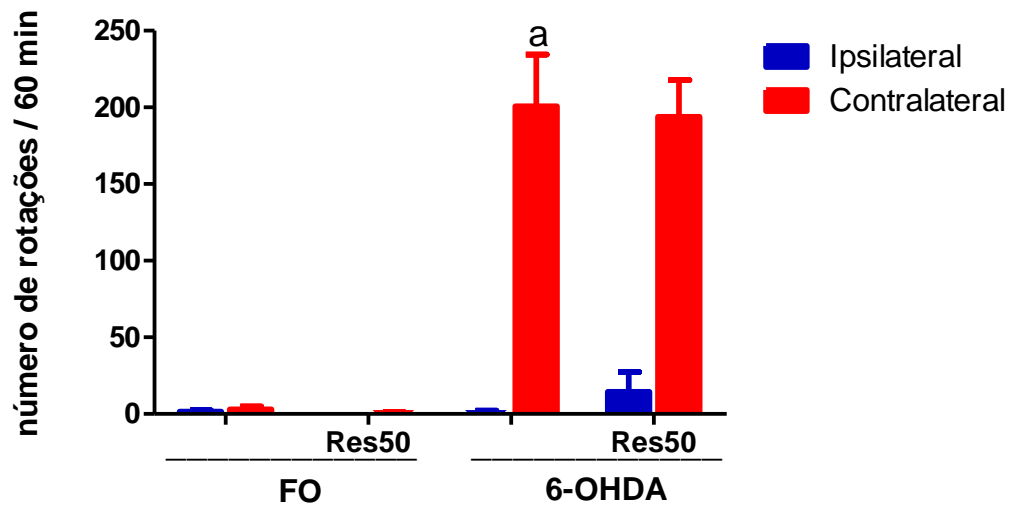
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 12 animais/grupo, a vs FO contralateral, p < 0,0001 e b vs 6-OHDA contralateral, p < 0,0001. ANOVA de uma via e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 20 - Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (0,6 mg/kg) em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 12 animais/grupo, a vs FO contralateral, p < 0,0001 e b vs 6-OHDA contralateral, p < 0,01. ANOVA de uma via e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 21 - Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (0,6 mg/kg) em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III).



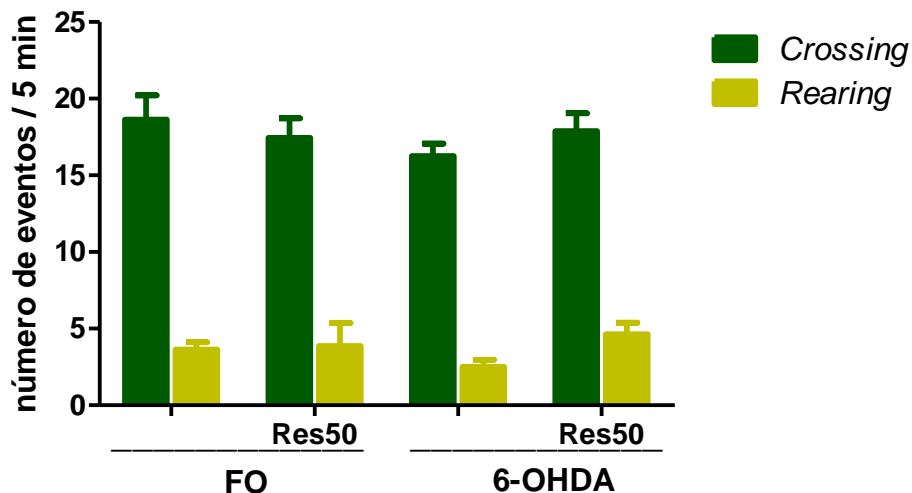
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 12 animais/grupo, a vs FO contralateral, p < 0,0001. ANOVA de uma via e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### 4.2 Efeito do resveratrol sobre a atividade locomotora (Teste do Campo aberto) em ratos parkinsonianos

Os resultados obtidos no teste de campo aberto mostraram não haver diferenças estatísticas significativas entre o grupo falso operado e o grupo operado na atividade locomotora em nenhum dos três protocolos de tratamento (Protocolo I - *crossing*: FO:  $18,63 \pm 1,58$ ; 6-OHDA:  $16,25 \pm 0,82$ ; Protocolo II - *crossing*: FO:  $17,50 \pm 1,52$ ; 6-OHDA:  $14,80 \pm 1,22$ ; Protocolo III - *crossing*: FO:  $17,50 \pm 2,34$ ; 6-OHDA:  $15,50 \pm 1,03$ ) e exploratória (Protocolo I - *rearing*: FO:  $3,62 \pm 0,50$ ; 6-OHDA:  $2,50 \pm 0,46$ ; Protocolo II - *rearing*: FO:  $3,50 \pm 0,43$ ; 6-OHDA:  $2,20 \pm 0,42$ ; Protocolo III - *rearing*: FO:  $2,87 \pm 0,29$ ; 6-OHDA:  $4,00 \pm 1,31$ ) (Figuras 22, 23 e 24).

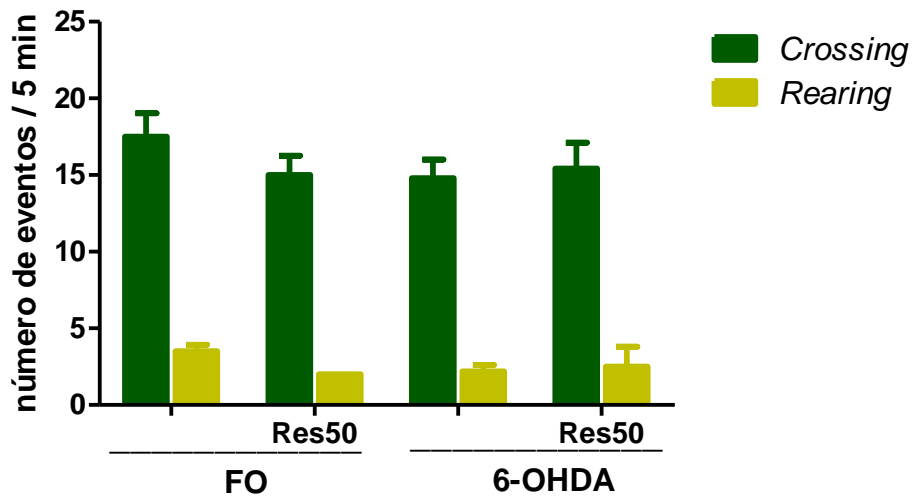
Não foi verificada diferença estatística nos animais tratados com resveratrol, nas doses 50 mg/kg em nenhum dos três protocolos (Protocolo I - *crossing*: 6-OHDA + Res50:  $17,88 \pm 1,17$  e *rearing*: 6-OHDA + Res50:  $4,62 \pm 0,75$ ; Protocolo II - *crossing*: 6-OHDA + Res50:  $15,42 \pm 1,69$  e *rearing*: 6-OHDA + Res50:  $2,50 \pm 1,31$ ; Protocolo III - *crossing*: 6-OHDA + Res50:  $14,62 \pm 1,55$  e *rearing*: 6-OHDA + Res50:  $3,77 \pm 0,76$ ) (Figuras 22, 23 e 24).

Figura 22 - Avaliação da atividade locomotora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I).



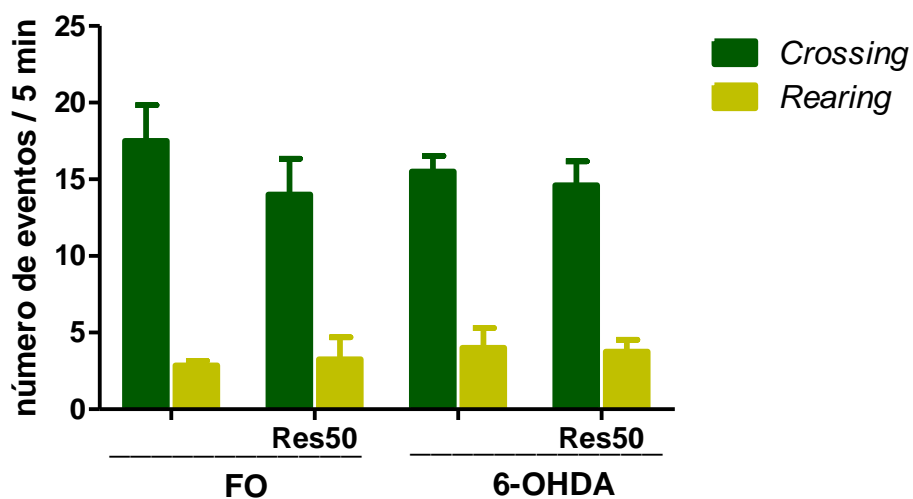
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA ( $18\mu\text{g}/3\mu\text{L}$ )  $n = 12$  animais/grupo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 23 - Avaliação da atividade locomotora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 12 animais/grupo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 24 - Avaliação da atividade locomotora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 12 animais/grupo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

### **4.3 Efeito do resveratrol sobre a assimetria dos membros anteriores (Teste do Cilindro) em ratos parkinsonianos**

No teste do cilindro foi observada uma assimetria dos membros anteriores nos animais parkinsonianos (6-OHDA) em relação ao grupo falso operado (FO), o que demonstra um comprometimento motor unilateral no grupo que sofreu a lesão com a 6-OHDA nos três protocolos de tratamento.

Observou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo parkinsoniano. Os animais que seguiram o protocolo I de tratamento de proteção apresentaram maior número de toques ipsilaterais e menor número de toques contralaterais em comparação ao grupo FO, enquanto que todos os animais que seguiram os três protocolos de tratamento apresentaram um menor número de toques com ambas as patas dianteiras (Figuras 25, 26 e 27).

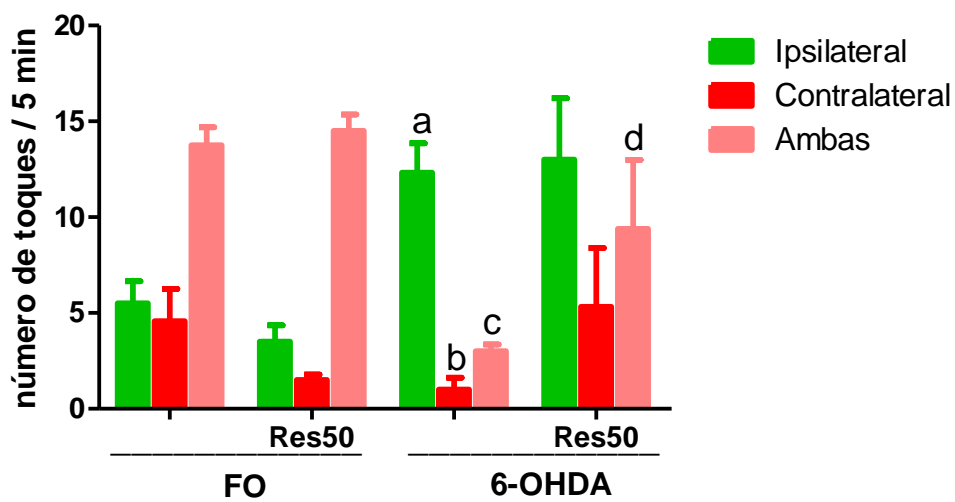
Os animais parkinsonianos que seguiram o protocolo I de tratamento apresentam um aumento significativo no número de toques ipsilateral (nº de toques ipsilateral: FO:  $5,50 \pm 1,15$ ; 6-OHDA:  $12,33 \pm 1,52$ ), uma diminuição significativa nos toques contralaterais e com ambas as patas (nº de toques contralateral: FO:  $4,57 \pm 1,69$ ; 6-OHDA:  $1,00 \pm 0,63$  e nº de toques com ambas as patas: FO:  $13,75 \pm 0,94$ ; 6-OHDA:  $3,00 \pm 0,36$ ). E o resveratrol foi capaz de aumentar significativamente o número de toques com ambas as patas (Protocolo I – nº de toques com ambas as patas: 6-OHDA + Res50:  $9,40 \pm 3,59$ ) (Figura 25).

Os animais parkinsonianos que seguiram o protocolo II de tratamento apresentam uma diminuição significativa no número de toques com as duas patas (nº de toques ipsilateral: FO:  $5,50 \pm 1,76$ ; 6-OHDA:  $6,25 \pm 1,93$ ; nº de toques contralateral: FO:  $3,66 \pm 2,67$ ; 6-OHDA:  $0,75 \pm 0,75$  e nº de toques com ambas as patas: FO:  $8,75 \pm 1,43$ ; 6-OHDA:  $3,00 \pm 0,01$ ). Este efeito foi revertido significativamente pelo resveratrol (Protocolo II - nº de toques com ambas as patas: 6-OHDA + Res50:  $10,33 \pm 3,93$ ) (Figura 26).

E, finalmente os animais parkinsonianos que seguiram o protocolo de tratamento de reversão apresentam uma diminuição significativa no número de toques com as duas patas (Protocolo III - nº de toques ipsilateral: FO:  $6,67 \pm 0,88$ ; 6-OHDA:  $10,33 \pm 0,88$ ; nº de toques contralateral: FO:  $4,66 \pm 0,88$ ; 6-OHDA:  $2,00 \pm 1,00$  e nº de toques com ambas as patas: FO:  $12,67 \pm 0,88$ ; 6-OHDA:  $2,33 \pm 0,67$ ). O resveratrol não foi capaz de proteger os animais sobre a assimetria dos membros anteriores quando seguiu um protocolo de tratamento reversivo (nº

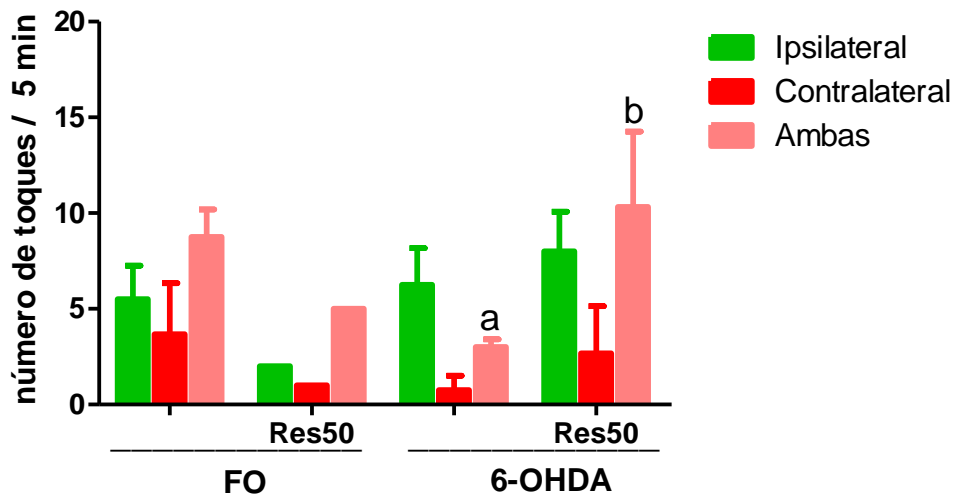
de toques ipsilateral: 6-OHDA + Res50:  $9,25 \pm 0,62$ ; nº de toques ipsilateral contralateral: 6-OHDA + Res50:  $3,25 \pm 0,25$  e nº de toques ipsilateral com ambas as patas: 6-OHDA + Res50:  $4,25 \pm 1,25$ . (Figura 27).

Figura 25 - Avaliação da simetria dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I).



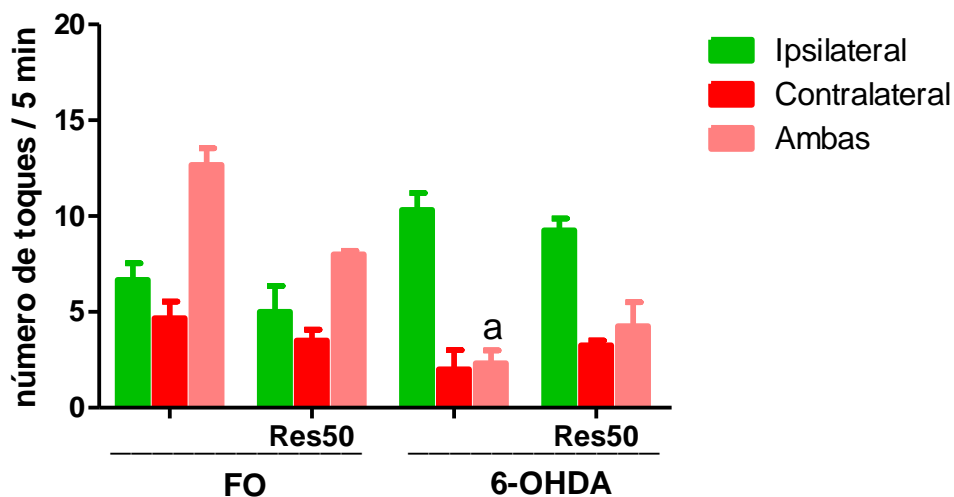
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA ( $18\mu\text{g}/3\mu\text{L}$ )  $n = 8$  animais/grupo, a vs FO (ipsilateral)  $p < 0,01$ ; b vs FO (contralateral),  $p < 0,05$ ; c vs FO (ambas),  $p < 0,01$ ; d vs 6-OHDA (ambas),  $p < 0,05$ . ANOVA de uma via e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 26 - Avaliação da simetria dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO (ambas) p < 0,05; b vs 6-OHDA (ambas), p < 0,05. ANOVA de uma via e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 27 - Avaliação da simetria dos membros anteriores em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO (ambas) p < 0,01. ANOVA de uma via e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



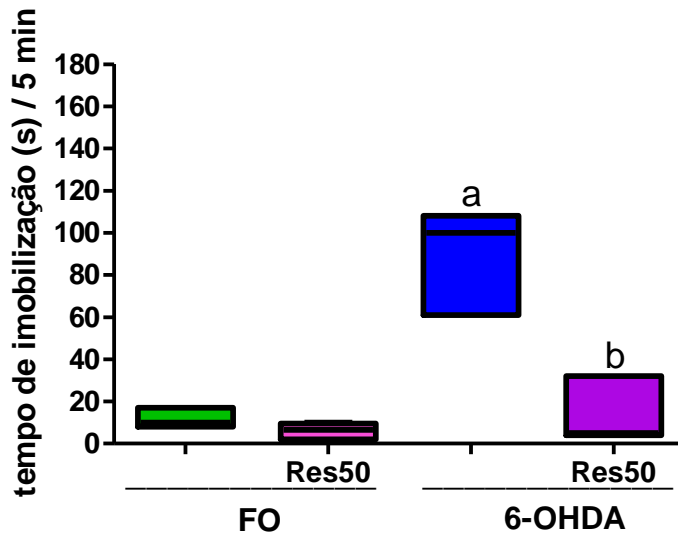
#### **4.4 Efeito do resveratrol sobre o comportamento depressivo-símile (Teste do Nado forçado) em ratos parkinsonianos**

Os animais que sofreram lesão por 6-OHDA apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade, quando comparados ao grupo falso operado nos três protocolos de tratamento (Protocolo I - FO:  $11,67 \pm 1,36$  s; 6-OHDA:  $89,67 \pm 7,26$  s; Protocolo II - FO:  $13,22 \pm 2,81$ ; 6-OHDA:  $78,14 \pm 13,61$ ; e Protocolo III - FO:  $13,50 \pm 4,50$ ; 6-OHDA:  $88,30 \pm 12,81$ ), significando que os animais parkinsonianos estavam com um comportamento depressivo-símile (Figuras 28, 29 e 30).

O tratamento com resveratrol na dose 50 mg/kg protegeu significativamente os animais que seguiram os protocolos de proteção, diminuindo o tempo de imobilidade em relação ao grupo 6-OHDA (Protocolo I - 6-OHDA + Res50:  $13,67 \pm 4,59$  s; Protocolo II - 6-OHDA + Res50:  $23,09 \pm 6,55$  s), significando que o resveratrol foi capaz de diminuir o comportamento depressivo-símile dos animais parkinsonianos (Figuras 28 e 29).

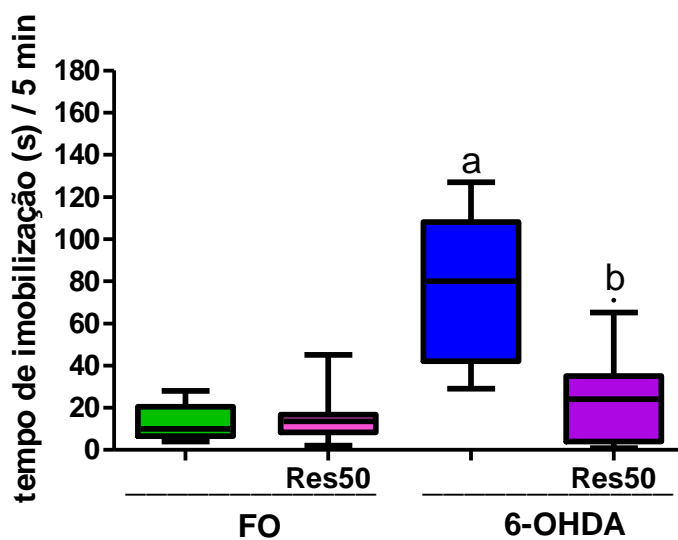
Não houve diferença significativa no tempo de imobilidade nos animais que seguiram o protocolo de reversão (Protocolo III: 6-OHDA + Res50:  $66,67 \pm 15,20$  s) (Figura 30).

Figura 28 - Avaliação do comportamento depressivo-símile em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I).



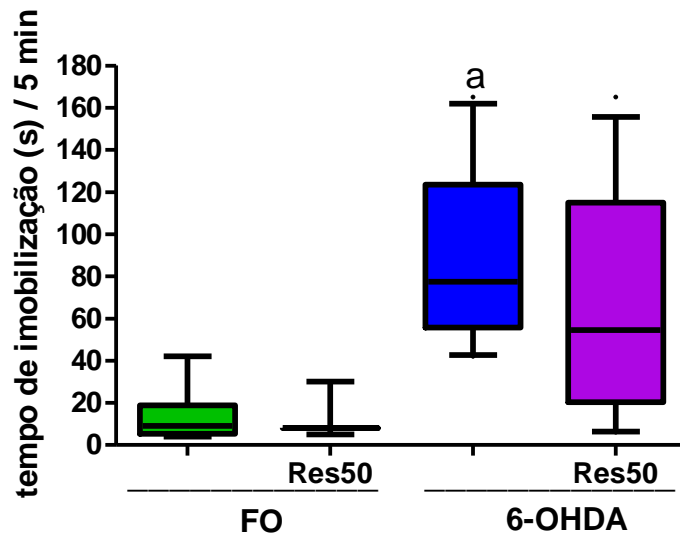
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO, p < 0,001 e b vs 6-OHDA, p < 0,001. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a mediana (percentil: 10-90).

Figura 29 - Avaliação do comportamento depressivo-símile em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO p < 0,001 e b vs 6-OHDA, p < 0,01. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a mediana (percentil: 10-90).

Figura 30 - Avaliação do comportamento depressivo-símile em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO, p < 0,001. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a mediana (percentil: 10-90).

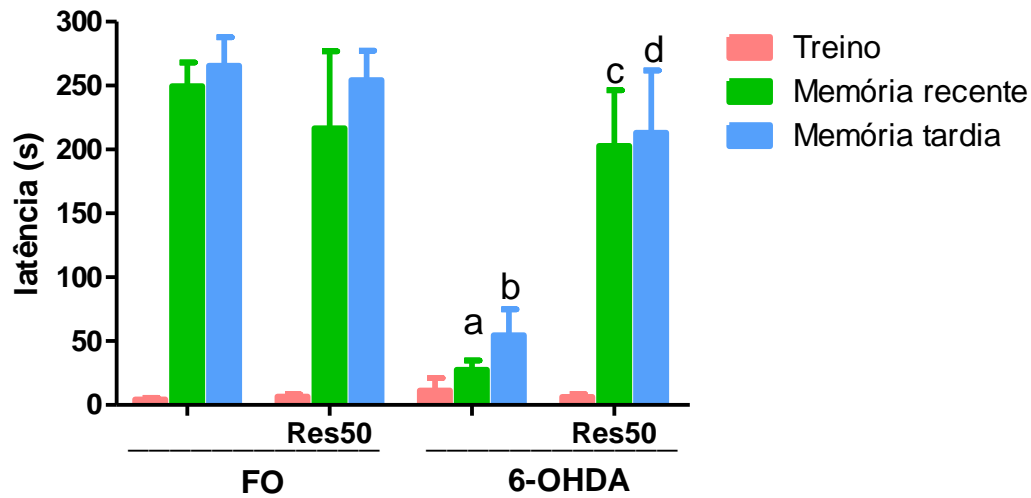
#### **4.5 Efeito do resveratrol sobre a de memória aversiva (Teste Esquiva Passiva) em ratos parkinsonianos**

A avaliação da memória aversiva foi realizada através do teste da esquiva passiva, onde observamos um déficit na memória recente e memória tardia no grupo 6-OHDA em relação ao grupo FO em todos os protocolos de tratamento protetores e reversivo (Protocolo I - Memória recente: FO:  $249,70 \pm 18,44$  s; 6-OHDA:  $27,50 \pm 7,27$  s; Memória tardia: FO:  $256,70 \pm 22,15$  s; 6-OHDA:  $54,67 \pm 20,19$  s; Protocolo II - Memória recente: FO:  $259,90 \pm 40,14$  s; 6-OHDA:  $64,33 \pm 22,46$  s; Memória tardia: FO:  $230,80 \pm 45,37$  s; 6-OHDA:  $50,33 \pm 27,08$  s; Protocolo III - Memória recente: FO:  $260,40 \pm 33,66$  s; 6-OHDA:  $38,80 \pm 7,93$  s; Memória tardia: FO:  $258,70 \pm 36,38$  s; 6-OHDA:  $38,17 \pm 17,51$  s) (Figuras 31, 32 e 33).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg foi capaz de proteger dos déficits observados tanto na memória recente como na memória tardia nos animais que seguiram os protocolos de proteção (Protocolo I - Memória recente: 6-OHDA + Res50:  $202,90 \pm 43,57$  s; Memória tardia: 6-OHDA + Res50:  $213,00 \pm 48,95$  s; Protocolo II - Memória recente: 6-OHDA + Res50:  $255,00 \pm 45,00$  s; Memória tardia: 6-OHDA + Res50:  $246,40 \pm 53,60$  s), quando comparado ao grupo dos animais parkinsonianos (Figuras 31 e 32).

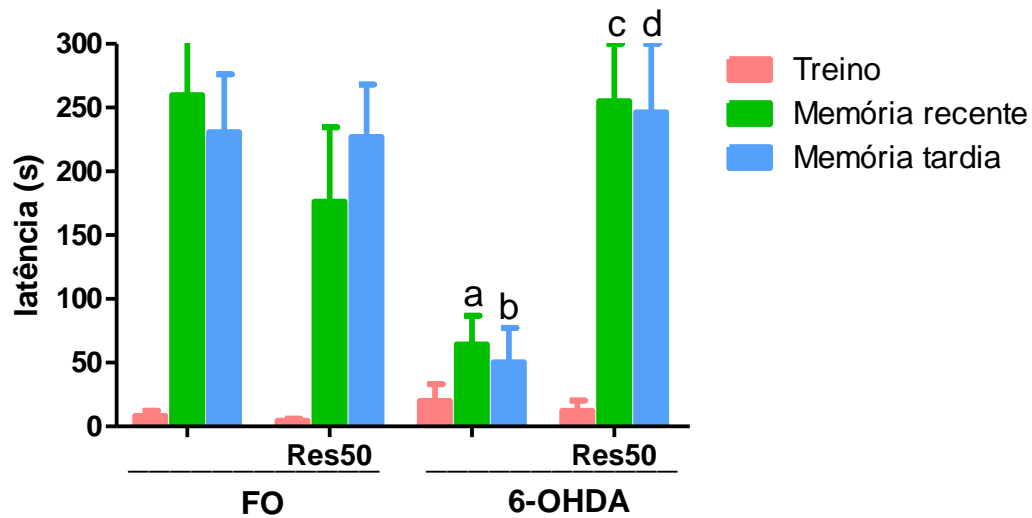
Não houve diferença significativa nos déficits de memória recente nem na memória tardia nos animais que seguiram o o protocolo de reversão (Protocolo III- Memória recente: 6-OHDA + Res50:  $73,60 \pm 56,97$  s; Memória tardia: 6-OHDA + Res50:  $32,17 \pm 10,72$  s) (Figura 33).

Figura 31 - Avaliação da memória aversiva em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I).



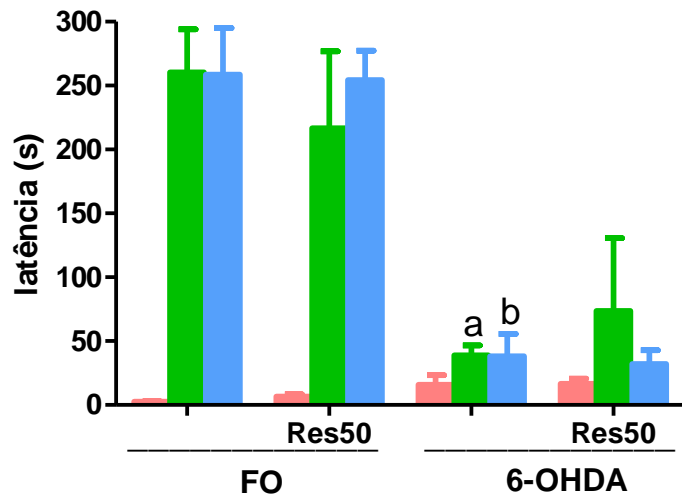
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO (memória recente),  $p < 0,01$ ; b vs FO (memória tardia),  $p < 0,01$ ; c vs 6-OHDA (memória recente),  $p < 0,01$  e d vs 6-OHDA (memória tardia),  $p < 0,001$ . Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 32 - Avaliação da memória aversiva em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO (memória recente),  $p < 0,05$ ; b vs FO (memória tardia),  $p < 0,05$ ; c vs 6-OHDA (memória recente),  $p < 0,001$  e d vs 6-OHDA (memória tardia),  $p < 0,05$ . Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 33 - Avaliação da memória aversiva em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L), a vs FO (memória recente) ) n = 8 animais/grupo, p < 0,05; b vs FO (memória tardia), p < 0,01. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### 4.6 Efeito do resveratrol sobre a avaliação de memória espacial (Labirinto aquático sinalizado) em ratos parkinsonianos

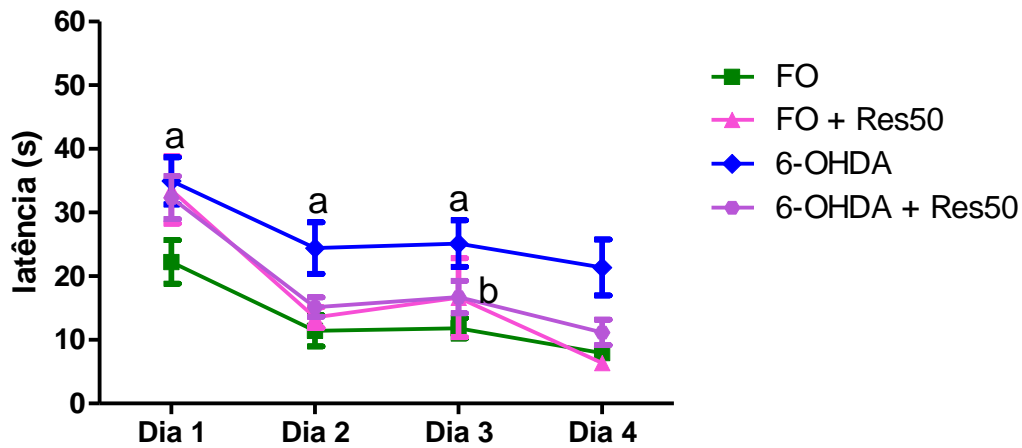
A avaliação da memória espacial foi realizada através do teste do labirinto aquático sinalizado (*Cued Water Maze*), onde observamos um déficit significativo na memória espacial no grupo 6-OHDA em relação ao grupo FO nos dias 1, 2 e 3 de treino em todos os protocolos de tratamento preventivos e de reversão (Protocolo I - Dia 1: FO:  $22,24 \pm 3,42$  s; 6-OHDA:  $34,97 \pm 3,70$  s; Dia 2: FO:  $11,42 \pm 2,46$  s; 6-OHDA:  $24,42 \pm 4,03$  s; Dia 3: FO:  $11,83 \pm 1,60$  s; 6-OHDA:  $22,13 \pm 3,67$  s; Dia 4: FO:  $7,92 \pm 1,03$  s; 6-OHDA:  $21,38 \pm 4,39$  s. Protocolo II - Dia 1: FO:  $22,24 \pm 3,42$  s; 6-OHDA:  $34,97 \pm 3,70$  s; Dia 2: FO:  $11,42 \pm 2,46$  s; 6-OHDA:  $29,50 \pm 4,20$  s; Dia 3: FO:  $11,83 \pm 1,60$  s; 6-OHDA:  $30,11 \pm 3,91$  s; Dia 4: FO:  $7,92 \pm 1,03$  s; 6-OHDA:  $26,89 \pm 4,57$  s. Protocolo III - Dia 1: FO:  $22,19 \pm 2,03$  s; 6-OHDA:  $37,52 \pm 3,10$  s; Dia 2: FO:  $13,88 \pm 1,30$  s; 6-OHDA:  $23,36 \pm 2,22$  s; Dia 3: FO:  $10,00 \pm 1,93$  s; 6-OHDA:  $23,95 \pm 2,36$  s; Dia 4: FO:  $7,18 \pm 0,60$  s; 6-OHDA:  $16,20 \pm 1,94$  s) (Figuras 34, 35 e 36)

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg foi capaz de proteger significativamente dos déficits observados na memória espacial nos animais que seguiram os protocolos I (no dia 3) e II (nos dias 3 e 4) de tratamento (Protocolo I - Dia 3: 6-OHDA + Res50:  $16,72 \pm 2,54$  s; Protocolo II - Dia 3: 6-OHDA + Res50:  $14,31 \pm 1,92$  s; Dia 4: 6-OHDA + Res50:  $9,77 \pm 1,33$  s). Quando comparamos dentro dos grupos observamos que houve um aprendizado entre os dias 1 e 4 no grupo tratado com o resveratrol seguindo os protocolos de proteção, melhorando assim a memória espacial nos animais parkinsonianos tratados com o resveratrol (Figuras 34 e 35).

Não houve proteção do resveratrol na memória espacial nos animais que seguiram o o protocolo de reversão (Protocolo III - Dia 1: 6-OHDA + Res50:  $40,84 \pm 3,73$  s; Dia 2: 6-OHDA + Res50:  $22,59 \pm 3,33$  s; Dia 3: 6-OHDA + Res50:  $20,53 \pm 3,43$  s; Dia 4: 6-OHDA + Res50:  $22,72 \pm 3,18$  s) (Figura 36).

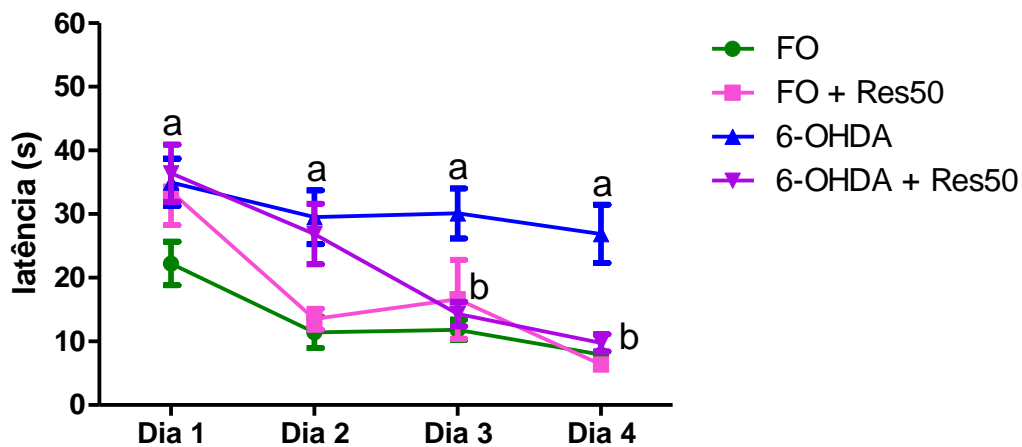


Figura 34 - Avaliação da memória espacial em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 22 dias (Protocolo I).



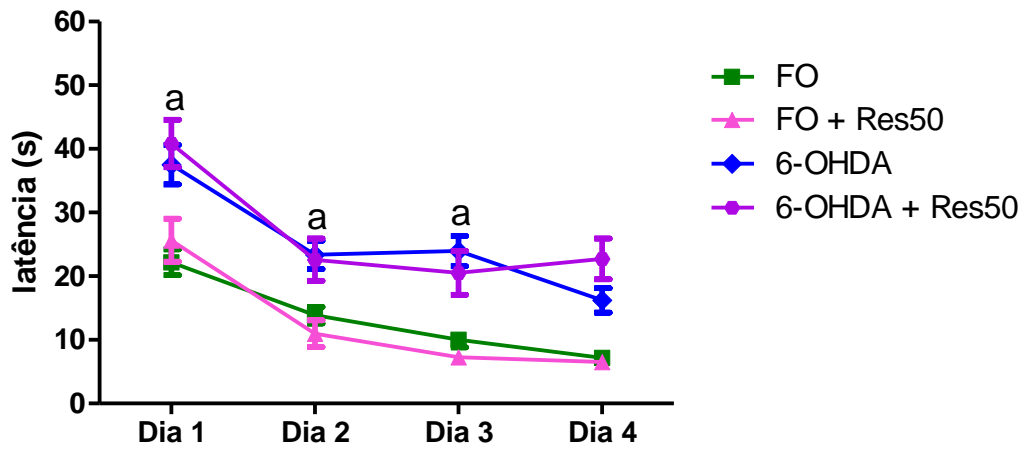
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO, p (Dia 1) < 0,05, p (Dia 2) < 0,01, p (Dia 3) < 0,01; b vs 6-OHDA, p (Dia 3) < 0,05. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 35 - Avaliação da memória espacial em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias (Protocolo II).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO, p (Dia 1) < 0,05, p (Dia 2) < 0,01, p (Dia 3) < 0,01, p (Dia 4) < 0,05; b vs 6-OHDA, p (Dia 3) < 0,01, p (Dia 4) < 0,05. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 36 - Avaliação da memória espacial em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 12 dias (Protocolo III).



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO, p (Dia 1) < 0,05, p (Dia 2) < 0,05, p (Dia 3) < 0,05. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

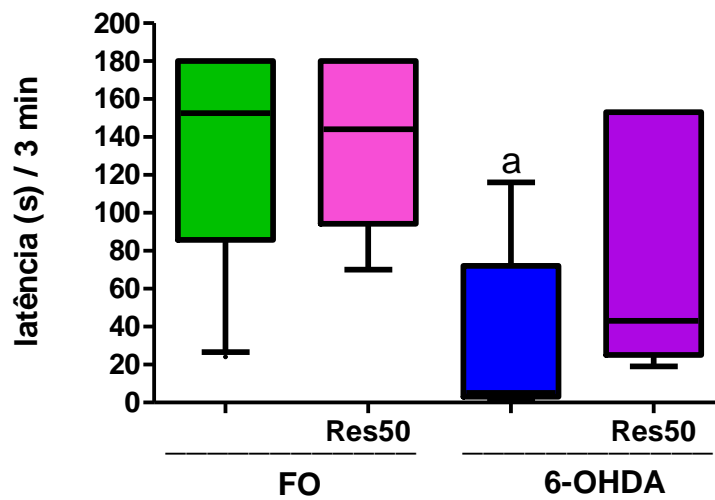
#### **4.7 Efeito do resveratrol sobre o equilíbrio e a coordenação motora (Teste do *Rotarod*) em ratos parkinsonianos**

Após os resultados até este momento apresentados foi decidido continuar somente com o protocolo II de tratamento avaliando o efeito neuroprotetor do resveratrol nos animais parkinsonianos lesionados pela 6-OHDA, para evitar o uso de um número maior de animais e o custo com as drogas utilizadas. Pois ficou comprovado que o protocolo de proteção II foi o que apresentou os melhores resultados e o que se gastava uma quantidade menor de resveratrol para tratar os animais. Portanto, todos os resultados e análises de agora em diante serão somente do protocolo de tratamento neuroprotetor nº II.

Os animais que sofreram lesão por 6-OHDA apresentaram uma diminuição significativo no tempo de latência sobre a barra do aparelho de rotarod com uma velocidade de 16 rpm, quando comparados ao grupo falso operado (latência: FO:  $128,70 \pm 17,96$  s; 6-OHDA:  $34,00 \pm 16,88$  s) significando que os animais parkinsonianos apresentaram um comprometimento no equilíbrio e na coordenação motora (Figura 37).

O tratamento com resveratrol na dose 50 mg/kg não foi capaz de proteger os animais que seguiram o protocolo II de tratamento, ocorreu um aumento no tempo de latência de queda desses animais, mas não foi estatisticamente significante em relação aos animais parkinsonianos (latência: 6-OHDA + Res50:  $91,22 \pm 24,16$ s ) (Figura 37).

Figura 37 - Avaliação do equilíbrio e da coordenação motora em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA ( $18\mu\text{g}/3\mu\text{L}$ )  $n = 8$  animais / grupo,  $a$  vs FO,  $p < 0,01$ . Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Os valores representam a mediana (percentil: 10-90).

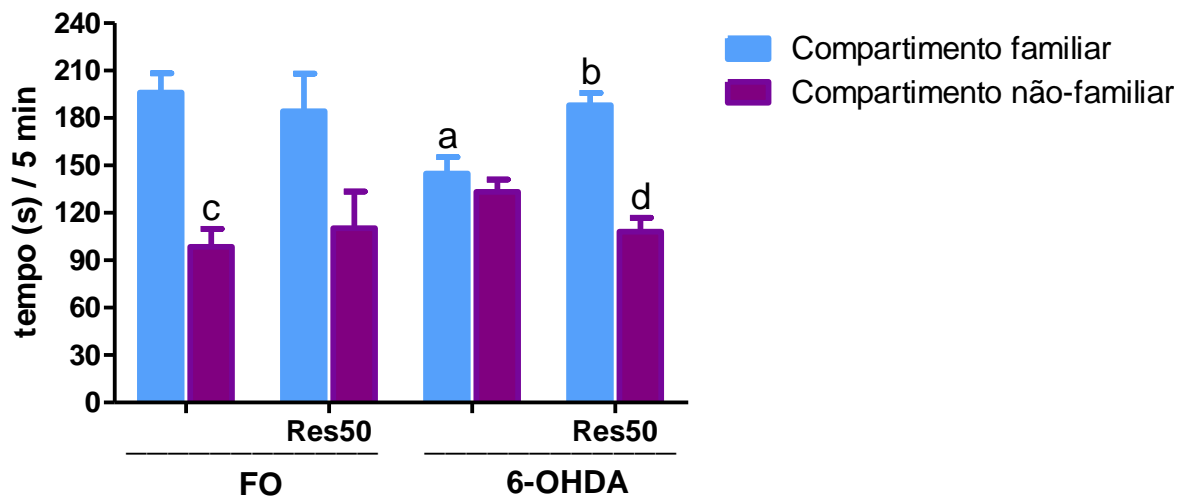
#### **4.8 Efeito do resveratrol sobre os prejuízos na discriminação olfativa (Teste da discriminação olfativa) em ratos parkinsonianos**

O prejuízo na discriminação olfativa foi avaliado através do teste da discriminação olfativa, onde observamos uma diminuição significativa do tempo no compartimento familiar no grupo 6-OHDA em relação ao grupo FO (Compartimento familiar: FO:  $196,10 \pm 12,27$  s; 6-OHDA:  $144,90 \pm 10,39$  s) (Figura 38).

Observamos também que houve uma diferença significativa no tempo de permanência em cada ambiente entre os animais falso-operados (Compartimento familiar FO:  $196,10 \pm 12,27$  s e Compartimento não-familiar FO:  $98,42 \pm 11,48$  s), devido a capacidade de discriminação olfativa que permaneceu preservada nestes animais. O mesmo não foi observado entre os animais parkinsonianos, devido ao prejuízo olfativo provado pela lesão com a neurotoxina (Compartimento familiar 6-OHDA:  $144,90 \pm 10,39$  s e Compartimento não-familiar 6-OHDA:  $133,40 \pm 7,63$  s) (Figura 38).

Os animais que foram tratados com resveratrol na dose de 50 mg/kg seguindo o protocolo II de tratamento foram capazes de discriminar entre os dois compartimentos, permanecendo tempos significativamente maiores no compartimento familiar (Compartimento familiar 6-OHDA + Res50:  $188,00 \pm 7,98$  s e Compartimento não-familiar 6-OHDA + Res50:  $108,00 \pm 8,89$  s) (Figura 38).

Figura 38 - Avaliação do prejuízo olfativo em ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 8 animais/grupo, a vs FO (compartimento familiar), p < 0,01; b vs 6-OHDA (compartimento familiar), p < 0,05; c vs FO (compartimento familiar), p < 0,0001; d vs 6-OHDA + Res50 (compartimento familiar), p < 0,001. ANOVA de uma via e teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### **4.9 Efeito do resveratrol sobre a determinação das concentrações de Dopamina (DA), seu metabólito (DOPAC), Noradrenalina (NE) e Serotonina (5-HT) em tecidos cerebrais de ratos parkinsonianos**

A injeção intraestriatal de 6-OHDA produziu uma diminuição significativa da concentração de monoaminas no estriado lesionado e no mesencéfalo quando comparados aos animais controles (FO). Houve uma redução de aproximadamente 72,58% nos níveis de dopamina no estriado lesionado e 63,70% no mesencéfalo dos animais que sofreram lesão estriatal. Também houve uma redução de aproximadamente 80,58% nos níveis de noradrenalina (NE) no estriado lesionado e 76,37% no mesencéfalo, e uma redução de aproximadamente 77,37% nos níveis de serotonina (5-HT) no estriado lesionado e 73,96% no mesencéfalo dos animais que sofreram lesão estriatal (Tabelas 5 e 6).

O resveratrol protegeu significativamente contra a depleção dopaminérgica induzida pela 6-OHDA no estriado lesionado e no mesencéfalo. Ocorreu um aumento de 77,99% no estriado lesionado e de 74,51% no mesencéfalo. O tratamento com o resveratrol também protegeu os animais parkinsonianos da depleção noradrenérgica, estes apresentaram um aumento de 83,70% no estriado lesionado e de 75,62% no mesencéfalo. A depleção serotoninérgica foi protegida com um aumento de 65,61% no estriado lesionado e de 73,74% no mesencéfalo. (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Efeito do resveratrol na concentração de monoaminas no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.

Grupos	NE	DA	DOPAC	5-HT
<b>FO</b>	226,70 ± 15,20	147,70 ± 19,78	420,10 ± 61,54	119,90 ± 39,37
<b>FO + Res50</b>	367,80 ± 222,60	212,40 ± 32,16	463,40 ± 120,90	92,38 ± 20,69
<b>6-OHDA</b>	44,01 ± 9,77 <sup>a</sup>	40,50 ± 6,83 <sup>a</sup>	445,10 ± 51,94	27,13 ± 12,54 <sup>a</sup>
<b>6-OHDA + Res50</b>	269,50 ± 53,50 <sup>b</sup>	184,00 ± 31,52 <sup>b</sup>	528,70 ± 33,03 <sup>b</sup>	78,89 ± 29,80 <sup>b</sup>

O resveratrol foi administrado na dose 50 mg/kg, v.o por 19 dias (n = 6 animais/grupo). Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18µg/3µL), a vs FO, p < 0,05 e b vs 6-OHDA, p < 0,05. Testes ANOVA e teste de Tukey. Os valores representam a média ± EPM em ng/mg de tecido.

Tabela 6 - Efeito do resveratrol na concentração de monoaminas no mesencéfalo de ratos parkinsonianos.

Grupos	NE	DA	DOPAC	5-HT
<b>FO</b>	261,61 ± 31,61	219,80 ± 37,42	545,50 ± 29,60	232,30 ± 51,27
<b>FO + Res50</b>	239,70 ± 102,60	223,50 ± 24,08	596,30 ± 65,64	145,80 ± 47,46
<b>6-OHDA</b>	61,82 ± 43,12 <sup>a</sup>	79,79 ± 16,85 <sup>a</sup>	518,40 ± 21,34	60,48 ± 22,71 <sup>a</sup>
<b>6-OHDA + Res50</b>	253,60 ± 28,00 <sup>b</sup>	313,50 ± 17,22 <sup>b</sup>	598,50 ± 37,88	230,30 ± 45,53 <sup>b</sup>

O resveratrol foi administrado na dose 50 mg/kg, v.o. por 19 dias (n = 6 animais/grupo). Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18µg/3µL), a vs FO, p < 0,05 e b vs 6-OHDA, p < 0,05. Testes ANOVA e teste de Tukey. Os valores representam a média ± EPM em ng/mg de tecido.



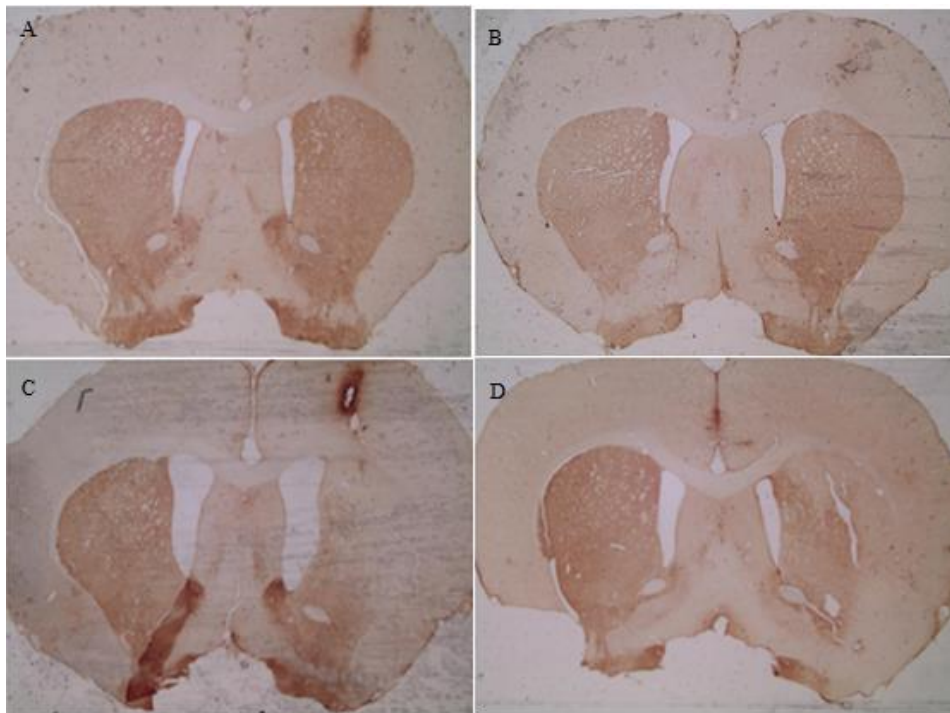
#### **4.10 Efeito do resveratrol sobre a imunorreatividade para a tirosina hidroxilase (TH) no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos**

Nas figuras 39C e 40 podemos observar uma diminuição significativa da imunoreatividade para a TH no estriado lesionado dos animais parkinsonianos quando comparada ao grupo FO (controles) (% da média dos controles: 6-OHDA:  $55,72 \pm 8,46\%$ ).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg aumentou significativamente a imunorreatividade para a TH, quando comparada com o grupo parkinsoniano (% da média dos controles: 6-OHDA + Res50:  $94,19 \pm 4,99\%$ ), prevenindo a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA (Figuras 39D e 40).

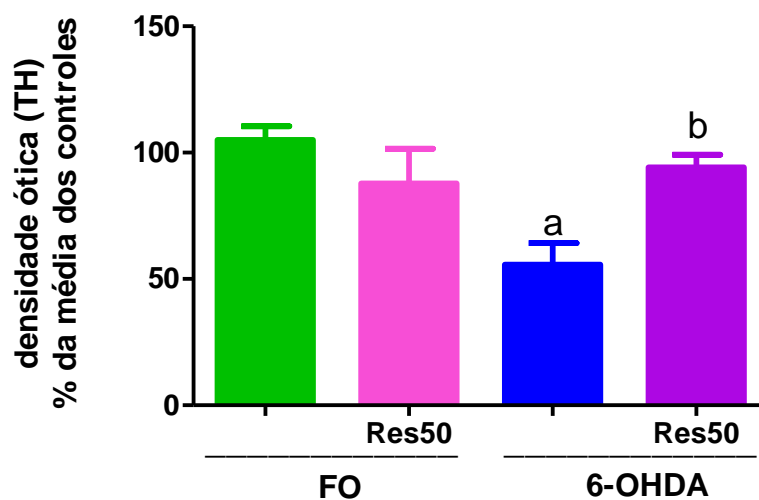
Na substância negra podemos observar uma diminuição significativa da área marcada pela TH nos animais parkinsonianos quando comparada ao grupo FO (% da média dos controles: 6-OHDA:  $77,32 \pm 4,47\%$ ) (Figuras 41C e 42) . O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg não aumentou significativamente a imunorreatividade para a TH, quando comparada com o grupo parkinsoniano (% da média dos controles: 6-OHDA + Res50:  $93,97 \pm 5,79\%$ ) (Figuras 41C e 42).

Figura 39 - Efeito do resveratrol sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.



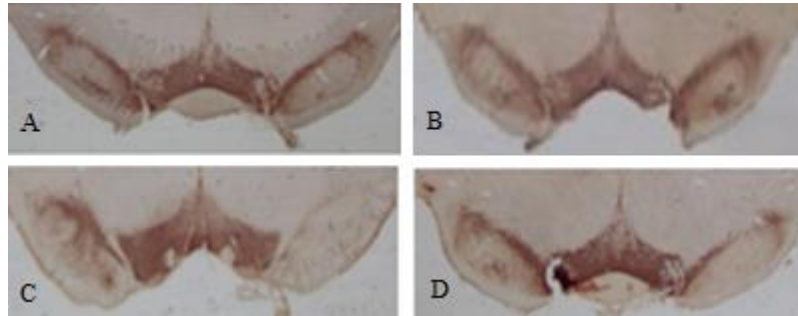
Microfotografias (aumento de 10x) representativas da imunomarcção para TH em secções coronais do estriado de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). Coloração marrom representa células imunorreativas a tirosina-hidroxilase no estriado. **A:** FO; **B:** FO + Res50; **C:** 6-OHDA e **D:** 6-OHDA + Res50.

Figura 40 - Imunomarcção para TH no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



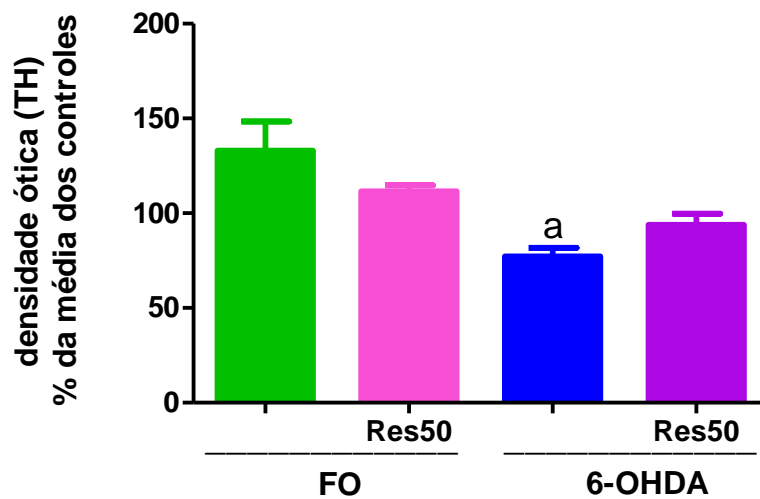
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,01 e b vs 6-OHDA, p < 0,05. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 41 - Efeito do resveratrol sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcação para TH na substância negra de ratos parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 10x) representativas da imunomarcação para TH em secções coronais da substância negra ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). Coloração marrom representa células imunorreativas a tirosina-hidroxilase no estriado. **A:** FO; **B:** FO + Res50; **C:** 6-OHDA e **D:** 6-OHDA + Res50.

Figura 42 - Imunomarcação para TH na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,01. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### **4.11 Efeito do resveratrol sobre a imunorreatividade para transportador de dopamina (DAT) no estriado lesionado e mesencéfalo de ratos parkinsonianos**

As figuras 43B e 44 mostram que a 6-OHDA provocou uma redução na quantidade de transportadores de dopamina nos neurônios dopaminérgicos no estriado lesionado, quando comparados ao grupo FO (controle) (% da média dos controles: 6-OHDA:  $69,34 \pm 5,70\%$ ).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg segundo o protocolo II aumentou significativamente a imunorreatividade para DAT no estriado lesionado, quando comparada com o grupo parkinsoniano (% da média dos controles: 6-OHDA + Res50:  $119,40 \pm 12,32\%$ ), prevenindo a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA (Figuras 43C e 44).

As figuras 45B e 46 mostram que a 6-OHDA causou uma redução na quantidade de transportadores de dopamina nos neurônios dopaminérgicos na substância negra, quando comparados ao grupo FO (controle) (% da média dos controles: 6-OHDA:  $56,83 \pm 6,45\%$ ).

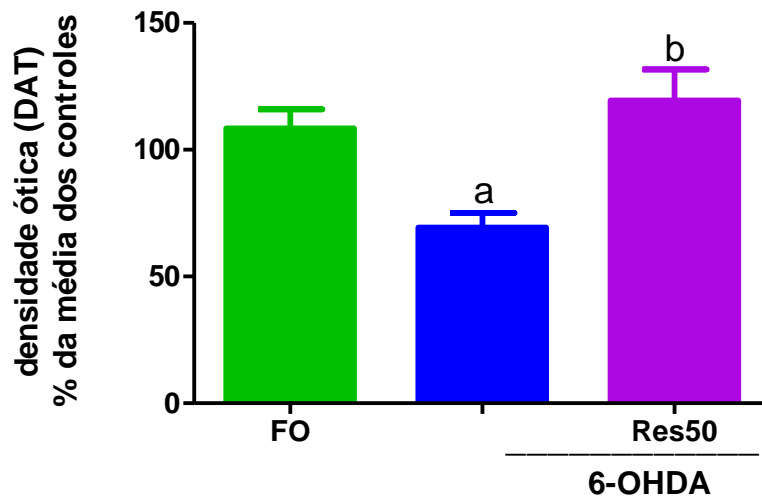
O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg aumentou significativamente a imunorreatividade para DAT na substância negra, quando comparada com o grupo parkinsoniano (% da média dos controles: 6-OHDA + Res50:  $109,20 \pm 3,96\%$ ), prevenindo a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA (Figuras 45C e 46).

Figura 43 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcação para DAT no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 10x) representativas da imunomarcação para DAT em secções coronais do estriado de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). Coloração marron representa células imunorreativas para o DAT no estriado. A: FO; B: 6-OHDA e C : 6-OHDA + Res50.

Figura 44 - Imunomarcação para DAT no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



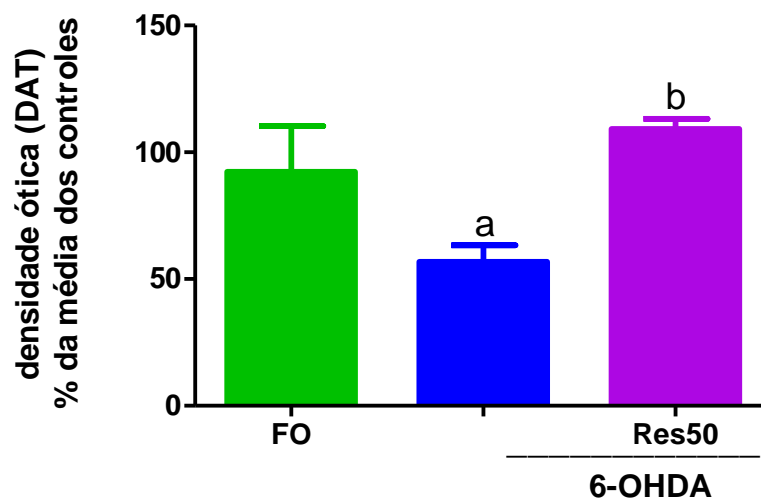
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,01 e b vs 6-OHDA, p < 0,05. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 45 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para DAT na substância negra de ratos parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 10x) representativas da imunomarcção para DAT em secções coronais da substância negra de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). Coloração marron representa células imunorreativas para o DAT no estriado. **A**: FO; **B**: 6-OHDA e **C**: 6-OHDA + Res50.

Figura 46 - Imunomarcção para DAT na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,05 e b vs 6-OHDA, p < 0,05. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### **4.12 Efeito resveratrol a imunomarcção de COX-2 no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos**

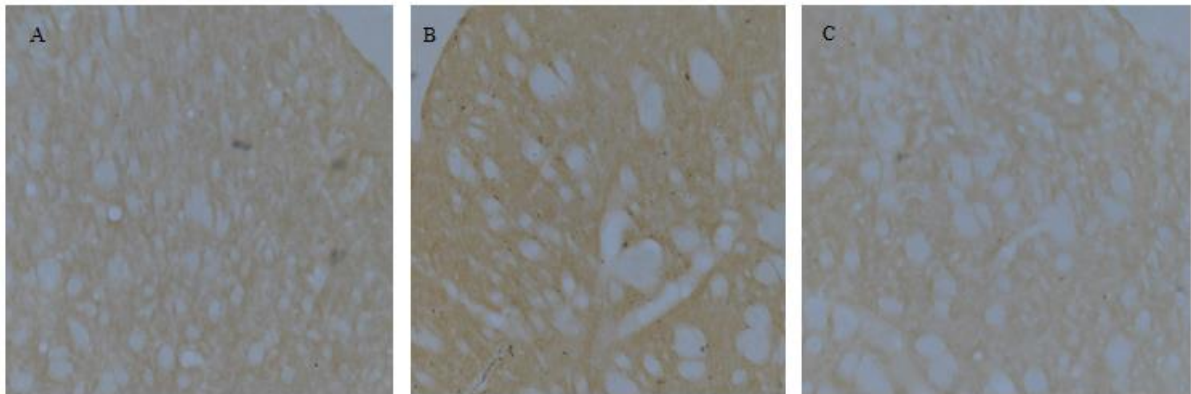
As figuras 47B e 48 mostram que a 6-OHDA provocou um aumento significativo das células COX-2 positivas no estriado lesionado, quando comparados ao grupo FO (número de células: FO:  $56,50 \pm 5,27$ ; 6-OHDA:  $240,20 \pm 34,95$ ).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg diminuiu significativamente a quantidade de células COX-2 positivas no estriado lesionado, quando comparada com o grupo parkinsoniano (número de células: 6-OHDA + Res50:  $89,18 \pm 11,70$ ), prevenindo o aumento da expressão da enzima COX-2 (Figuras 47C e 48).

As figuras 49B e 50 mostram que a 6-OHDA provocou um aumento significativo das células COX-2 positivas na substância negra, quando comparados ao grupo FO (número de células: FO:  $52,63 \pm 6,30$ ; 6-OHDA:  $224,60 \pm 19,00$ ).

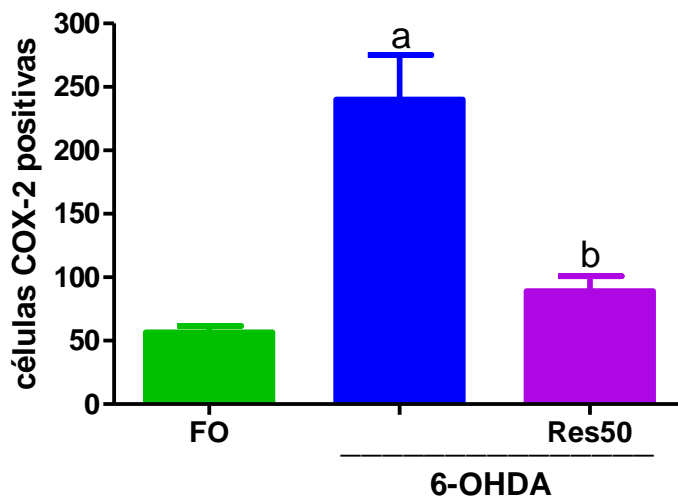
O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg diminuiu significativamente a quantidade de células COX-2 positivas na substância negra, quando comparada com o grupo parkinsoniano (número de células: 6-OHDA + Res50:  $124,90 \pm 12,81$  %), prevenindo a expressão da enzima COX-2 nos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA (Figuras 49C e 50).

Figura 47 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para COX-2 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcção para COX-2 em secções coronais do estriado de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). Coloração marron representa células imunorreativas para o DAT no estriado. **A**: FO; **B**: 6-OHDA e **C** : 6-OHDA + Res50.

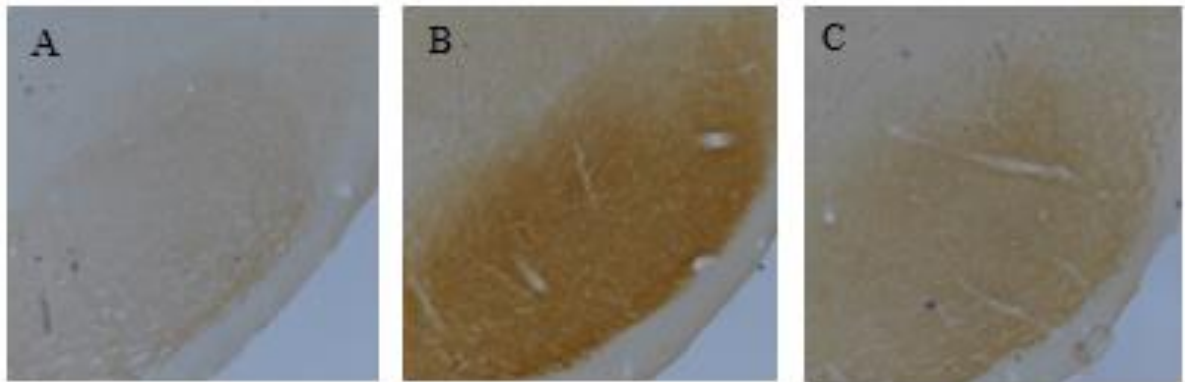
Figura 48 - Imunomarcção para COX-2 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,0001 e b vs 6-OHDA, p < 0,001. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

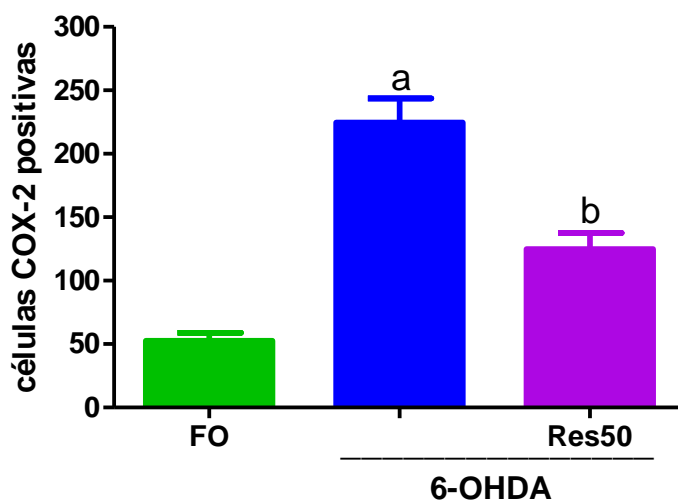


Figura 49 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcação para COX-2 a substância negra de ratos parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunomarcação para COX-2 em secções coronais da substância negra de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18µg/3µL). Colora o marron representa células imunorreativas para o DAT no estriado. **A**: FO; **B**: 6-OHDA e **C** : 6-OHDA + Res50.

Figura 50 - Imunomarcação para COX-2 na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18µg/3µL) n = 4 animais/grupo, a vs FO,  $p < 0,0001$  e b vs 6-OHDA,  $p < 0,001$ . ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média ± EPM.

#### **4.13 Efeito resveratrol sobre a ativação dos astrócitos evidenciada através da imunomarcção com GFAP no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos**

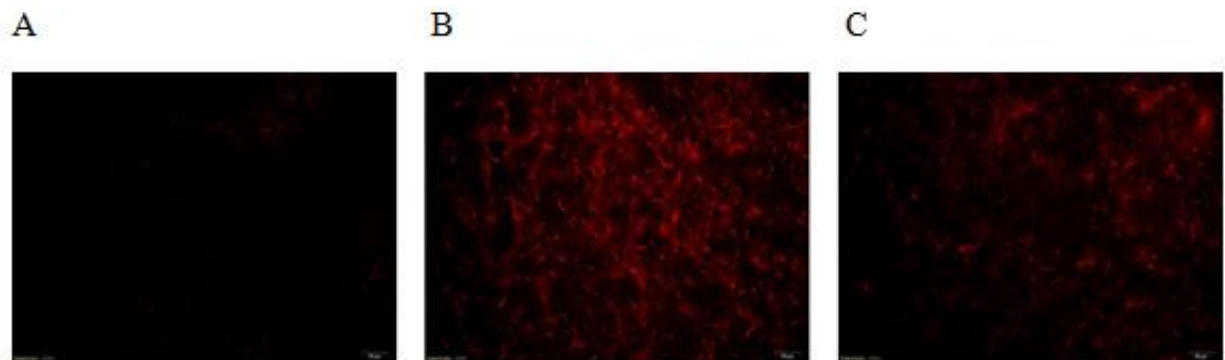
Nas figuras 51B e 52 podemos observar um aumento significativo dos astrócitos ativados no estriado lesionado dos animais parkinsonianos quando comparada ao grupo FO (FO:  $40,05 \pm 1,13$ ; 6-OHDA:  $54,80 \pm 1,84$ ).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg diminuiu significativamente o aumento da ativação dos astrócitos no estriado lesionado, quando comparada com o grupo parkinsoniano (6-OHDA + Res50:  $40,33 \pm 2,37$ ) (Figuras 51C e 52).

Na figuras 53B e 54 também observamos um aumento significante dos astrócitos ativados na substância negra dos animais parkinsonianos quando comparada ao grupo FO (FO:  $41,61 \pm 1,38$ ; 6-OHDA:  $59,47 \pm 2,07$ ).

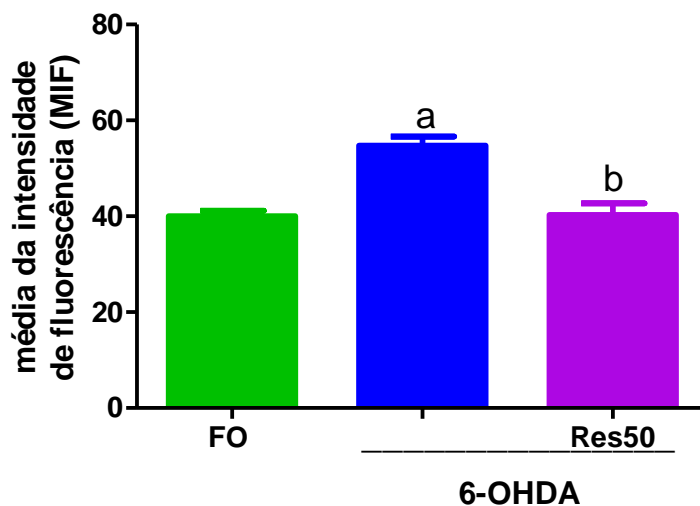
O resveratrol na dose de 50 mg/kg foi capaz de diminuir a astrogliose na substância negra quando comparada com o grupo parkinsoniano (6-OHDA + Res50:  $31,69 \pm 1,33$ ) (Figuras 53C e 54).

Figura 51 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para GFAP no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.



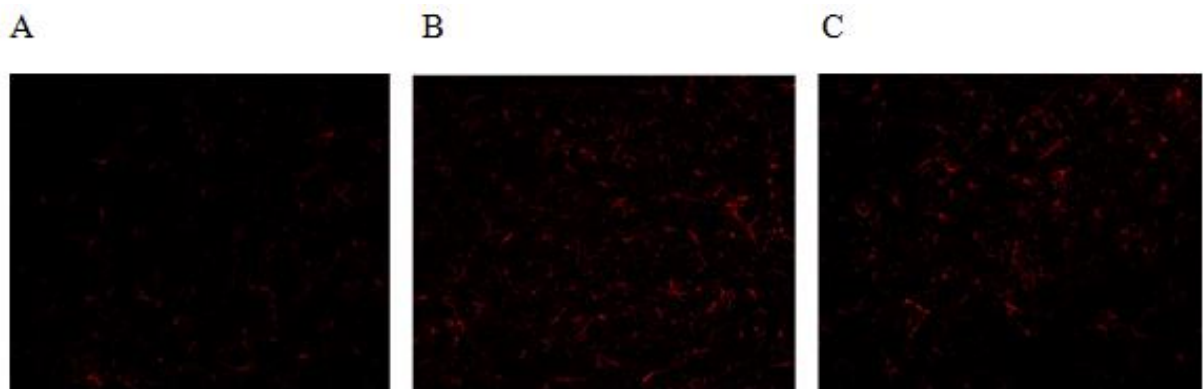
Imagens representativas do efeito do resveratrol (50 mg/kg) sobre a ativação dos astrócitos (GFAP) no estriado lesionado dos ratos parkinsonianos. A (FO), B (6-OHDA) e C (6-OHDA + Res50 mg/kg). Aumento de 200x.

Figura 52 - Imunomarcção para ativação astrocitária (GFAP) no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



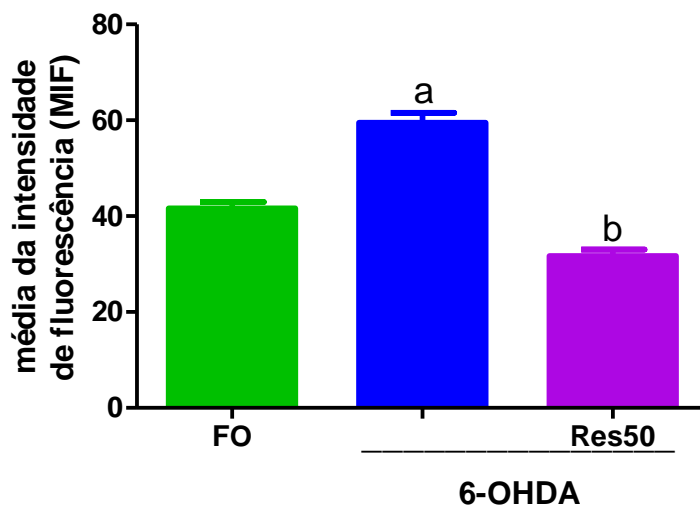
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18µg/3µL) n = 4 animais/grupo, a vs FO,  $p < 0,0001$  e b vs 6-OHDA,  $p < 0,0001$ . ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 53 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para GFAP na substância negra de ratos parkinsonianos.



Imagens representativas do efeito do resveratrol (50 mg/kg) sobre a ativação dos astrócitos (GFAP) na substância negra dos ratos parkinsonianos. A (FO), B (6-OHDA) e C (6-OHDA + Res50 mg/kg). Aumento de 200x.

Figura 54 - Imunomarcção para ativação astrocitária (GFAP) na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,0001 e b vs 6-OHDA, p < 0,0001. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### **4.14 Efeito resveratrol sobre a imunorreatividade para a micróglia evidenciada através da imunomarcção com CD11-b no estriado lesionado na substância negra de ratos parkinsonianos**

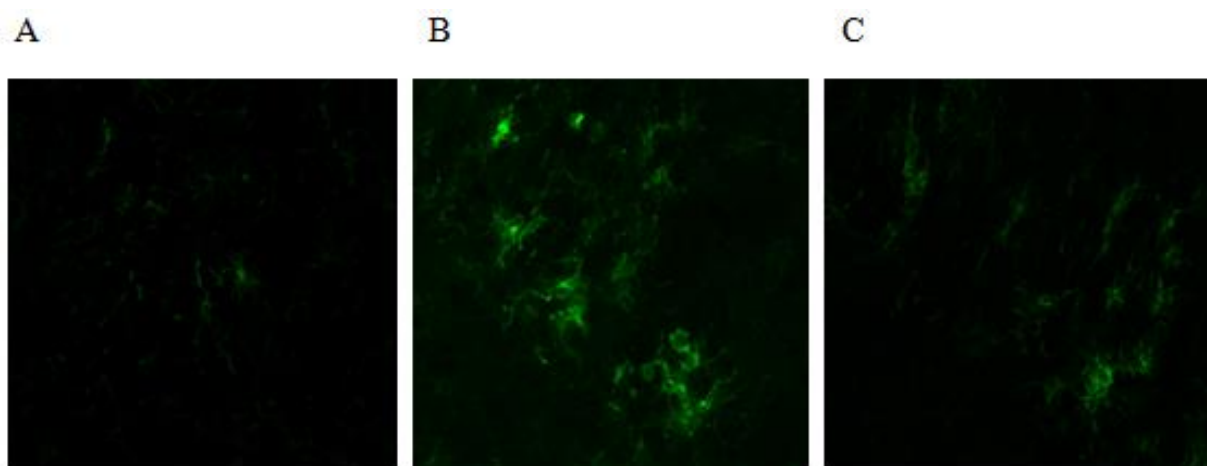
Nas figuras 55B e 56 podemos observar um aumento da marcação fluorescente verde, significando um aumento das micróglia ativas no estriado direito dos animais parkinsonianos quando comparada ao grupo FO (FO:  $27,95 \pm 2,81$ ; 6-OHDA:  $48,59 \pm 4,19$ ).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg segundo o protocolo II diminuiu significativamente o aumento da ativação das micróglia no estriado direito, quando comparada com o grupo parkinsoniano (6-OHDA + Res50:  $29,88 \pm 1,02$ ) (Figuras 55C e 56).

Na substância negra também observamos um aumento da marcação fluorescente verde, mostrando aumento significante das micróglia ativas nos animais parkinsonianos quando comparada ao grupo FO (FO:  $23,60 \pm 0,91$ ; 6-OHDA:  $30,36 \pm 2,06$ ) (Figuras 57B e 58).

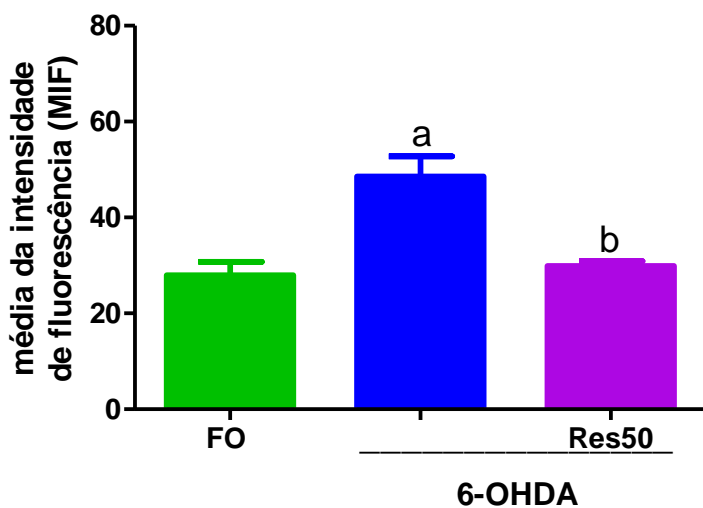
O resveratrol na dose de 50 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente a microgliose na substância negra quando comparada com o grupo parkinsoniano (6-OHDA + Res50:  $22,70 \pm 0,88$ ) (Figuras 57C e 58).

Figura 55 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para CD11-b no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.



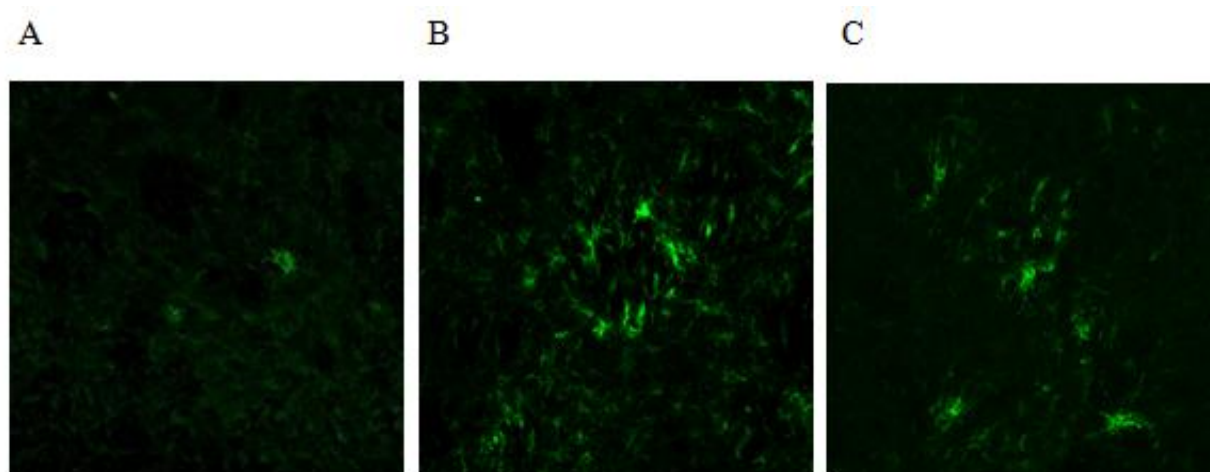
Imagens representativas do efeito do resveratrol (50 mg/kg) sobre a ativação das micróglias (CD11-b) no estriado lesionado dos ratos parkinsonianos. A (FO), B (6-OHDA) e C (6-OHDA + Res50 mg/kg). Aumento de 400x.

Figura 56 - Imunomarcção para ativação da microgliose (CD11-b) no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



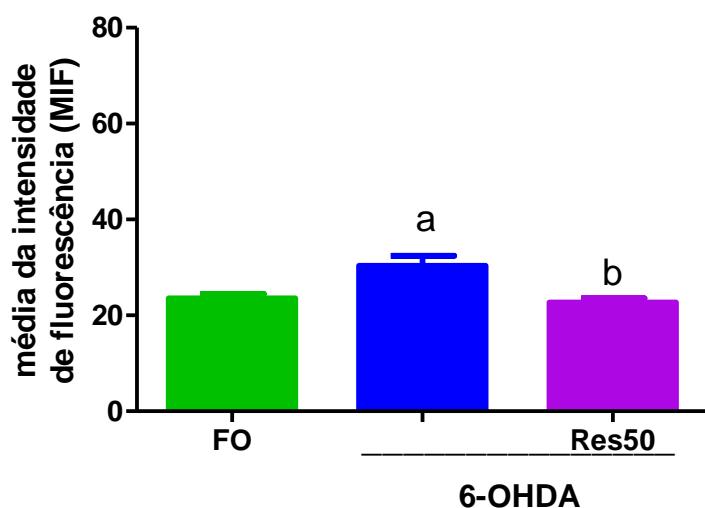
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18µg/3µL) n = 4 animais/grupo, a vs FO,  $p < 0,0001$  e b vs 6-OHDA,  $p < 0,001$ . ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 57 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcação para CD11-b na substância negra de ratos parkinsonianos.



Imagens representativas do efeito do resveratrol (50 mg/kg) sobre a ativação das micróglias (CD11-b) na substância negra dos ratos parkinsonianos. A (FO), B (6-OHDA) e C (6-OHDA + Res50 mg/kg). Aumento de 400x.

Figura 58 - Imunomarcação para ativação da microgliose (CD11-b) na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18µg/3µL) n = 4 animais/grupo, a vs FO,  $p < 0,0001$  e b vs 6-OHDA,  $p < 0,001$ . ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### **4.15 Efeito do resveratrol sobre a degeneração neuronal avaliada através da coloração por Fluorojade C no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos**

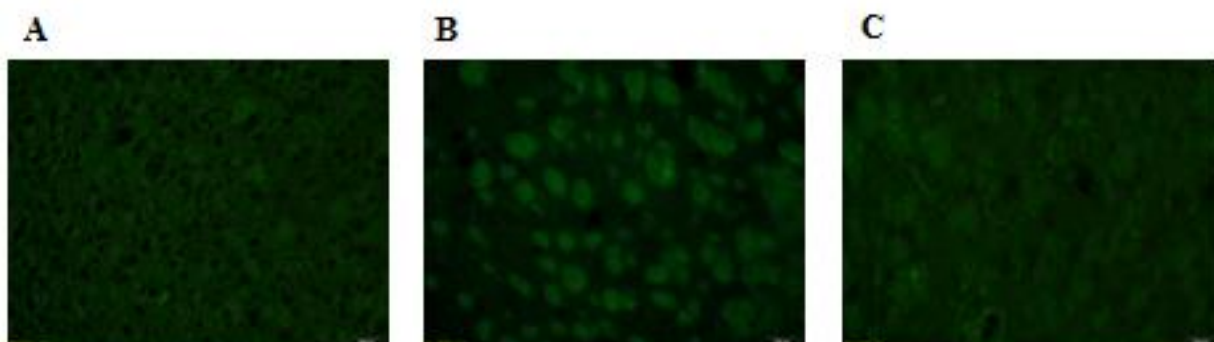
Nas figuras 59B e 60 não observamos degeneração neuronal no estriado lesionado dos ratos parkinsonianos, quando comparado ao grupo controle (FO:  $29,92 \pm 1,21$ ; 6-OHDA:  $32,72 \pm 1,64$ ). Também não foi observado efeito neuroprotetor do resveratrol na dose de 50 mg/kg sobre a degradação neuronal, quando comparada com o grupo parkinsoniano (6-OHDA + Res50:  $29,27 \pm 1,60$ ) (Figuras 59C e 60).

Entretanto na substância negra observamos um aumento significativo da marcação fluorescente verde, mostrando aumento da morte neuronal nos animais parkinsonianos quando comparada ao grupo FO (FO:  $37,17 \pm 1,97$ ; 6-OHDA:  $50,58 \pm 2,25$ ) (Figuras 61B e 62).

O resveratrol na dose de 50 mg/kg foi capaz de diminuir significativamente a degradação neuronal na substância negra quando comparada com o grupo parkinsoniano (6-OHDA + Res50:  $37,00 \pm 1,70$ ) (Figuras 61C e 62).

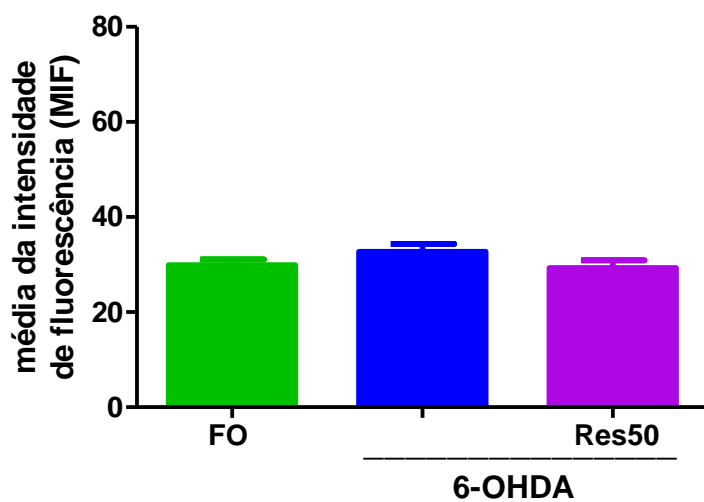


Figura 59 - Efeito do resveratrol sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluorojade C no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.



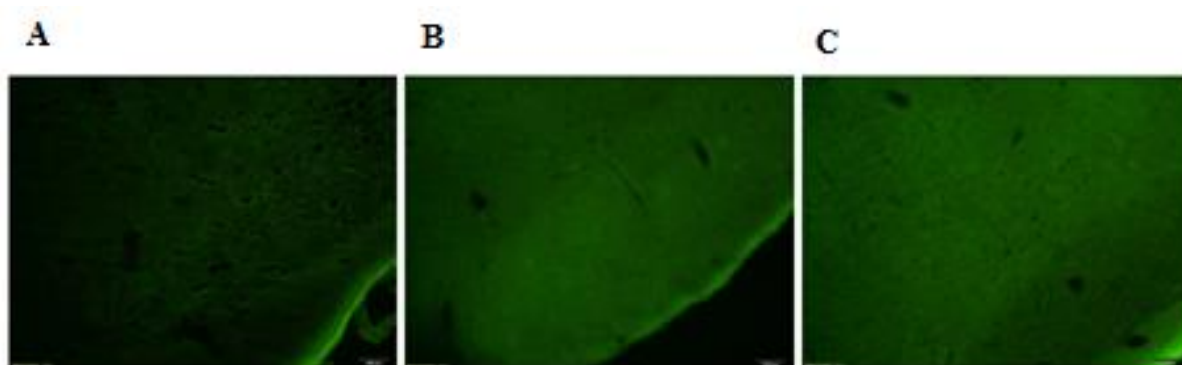
Microfotografias (aumento de 100x) representativas da coloração por fluorojade C em secções coronais do estriado lesionado de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). **A**: FO; **B**: 6-OHDA e **C** : 6-OHDA + Res50.

Figura 60 - Coloração por Fluorojade C no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



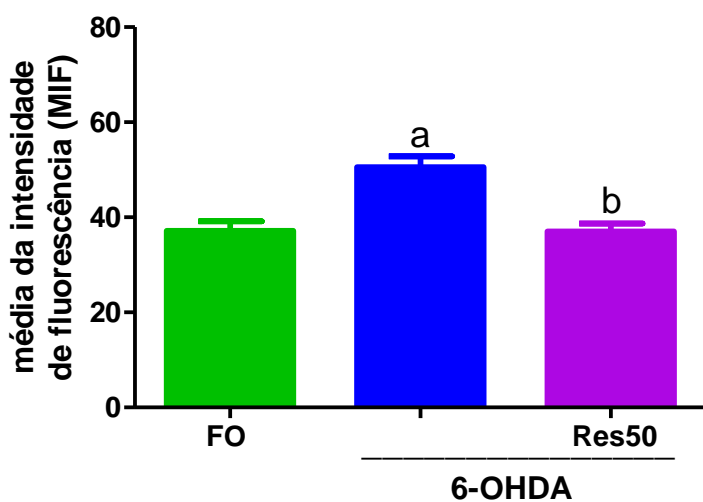
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 61 - Efeito do resveratrol sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluorojade C na substância negra de ratos parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 100x) representativas da coloração por fluorojade C em secções coronais da substância negra de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). **A**: FO; **B**: 6-OHDA e **C**: 6-OHDA + Res50.

Figura 62 - Coloração por Fluorojade C na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,0001 e b vs 6-OHDA, p < 0,0001. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### **4.16 Efeito resveratrol sobre a expressão da GSK-3 $\beta$ no estriado lesionado e na substância negra de ratos parkinsonianos**

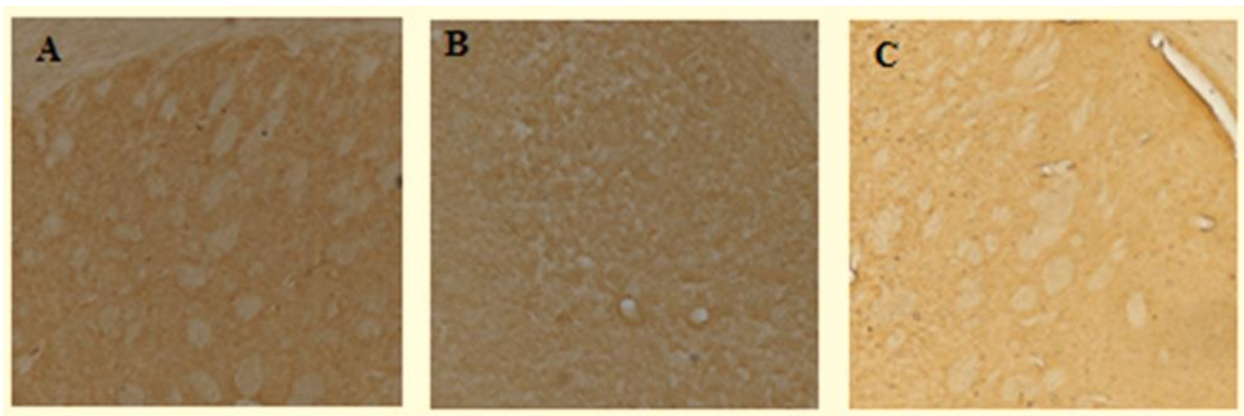
As figuras 63B e 64 mostram que a 6-OHDA provocou uma redução significativa na imunomarcção para o GSK-3 $\beta$  no estriado lesionado, quando comparados ao grupo FO (% da média dos controles: 6-OHDA:  $74,39 \pm 1,04\%$ ).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg segundo o protocolo II aumentou significativamente a imunorreatividade para o GSK-3 $\beta$  no estriado direito, quando comparada com o grupo parkinsoniano (% da média dos controles: 6-OHDA + Res50:  $105,60 \pm 5,25\%$ ), prevenindo a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA (Figuras 63C e 64).

As figuras 65B e 66 mostram que a 6-OHDA causou uma redução significativa na imunomarcção para o GSK-3 $\beta$  na substância negra, quando comparados ao grupo FO (% da média dos controles: 6-OHDA:  $61,05 \pm 9,66\%$ ).

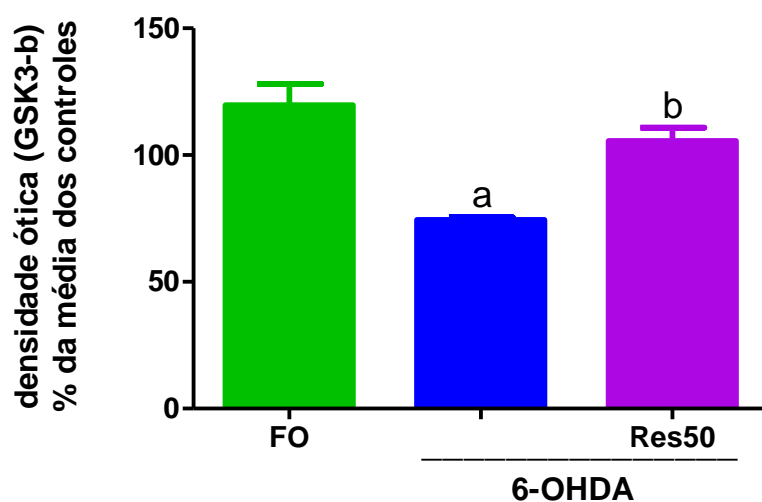
O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg aumentou significativamente a imunorreatividade para o GSK-3 $\beta$  na substância negra, quando comparada com o grupo parkinsoniano (% da média dos controles: 6-OHDA + Res50:  $122,30 \pm 4,13\%$ ), prevenindo a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA (Figuras 65C e 66).

Figura 63 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcação para GSK-3 $\beta$  no estriado lesionado de ratos parkinsonianos.



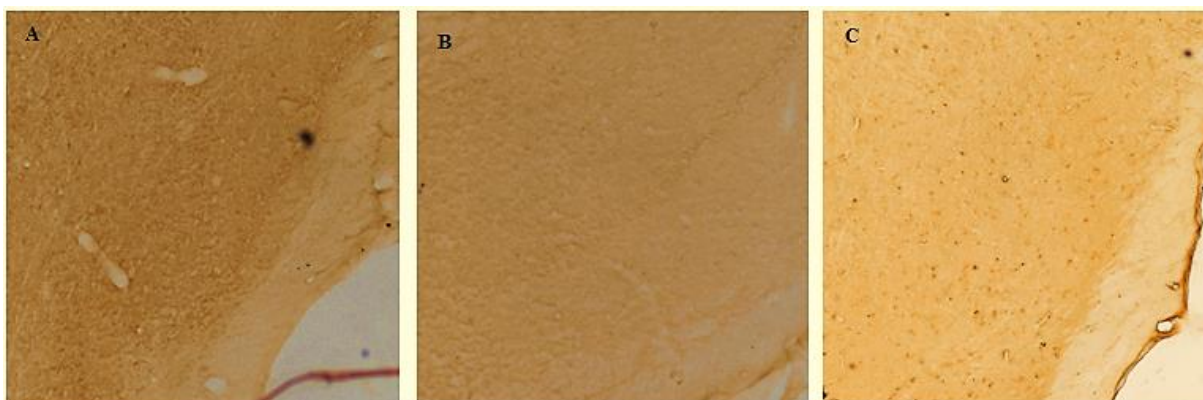
Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunorreatividade para GSK-3 $\beta$  em secções coronais de estriado lesionado de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). A: FO; B: 6-OHDA e C : 6-OHDA + Res50.

Figura 64 - Imunomarcação para GSK-3 $\beta$  no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



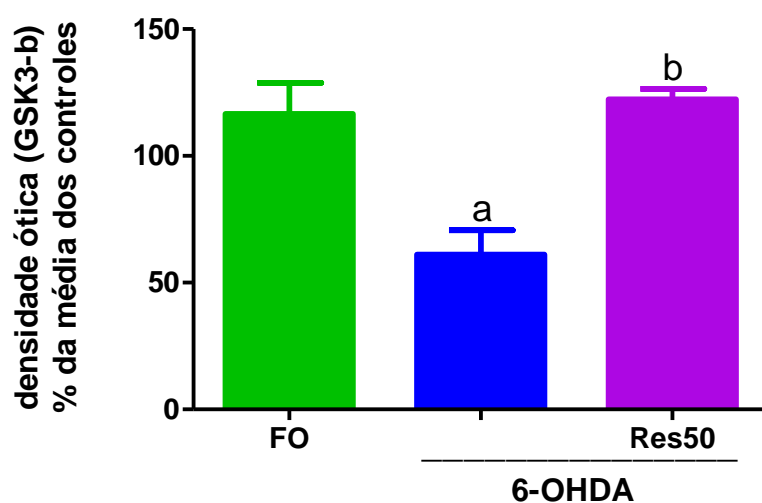
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,001 e b vs 6-OHDA, p < 0,001. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 65 - Efeito do resveratrol sobre a imunomarcção para GSK-3 $\beta$  na substância negra de ratos parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 100x) representativas da imunorreatividade para GSK-3 $\beta$  em secções coronais de substância negra de ratos submetidos a lesão estriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L). **A:** FO; **B:** 6-OHDA e **C:** 6-OHDA + Res50.

Figura 66 - Imunomarcção para GSK-3 $\beta$  na substância negra de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



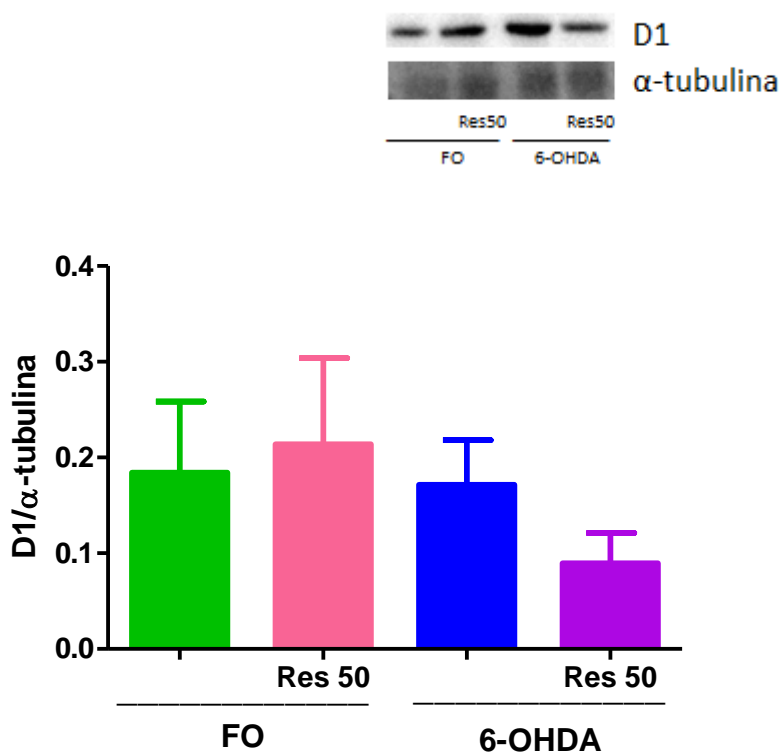
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,05 e b vs 6-OHDA, p < 0,01. ANOVA de uma via e teste de Bonferroni. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### 4.17 Efeito resveratrol sobre a expressão do D1 no estriado lesionado e no mesencéfalo de ratos parkinsonianos

As figuras 67 e 68 mostram que a 6-OHDA provocou um aumento da expressão do receptor D1 no estriado lesionado e um aumento significativo no mesencéfalo quando comparados ao grupo FO (relação D1/ $\alpha$ -tubulina no estriado lesionado: FO:  $0,18 \pm 0,07$ ; 6-OHDA:  $0,17 \pm 0,05$  e no mesencéfalo: FO:  $0,77 \pm 0,16$ ; 6-OHDA:  $2,34 \pm 0,46$ ).

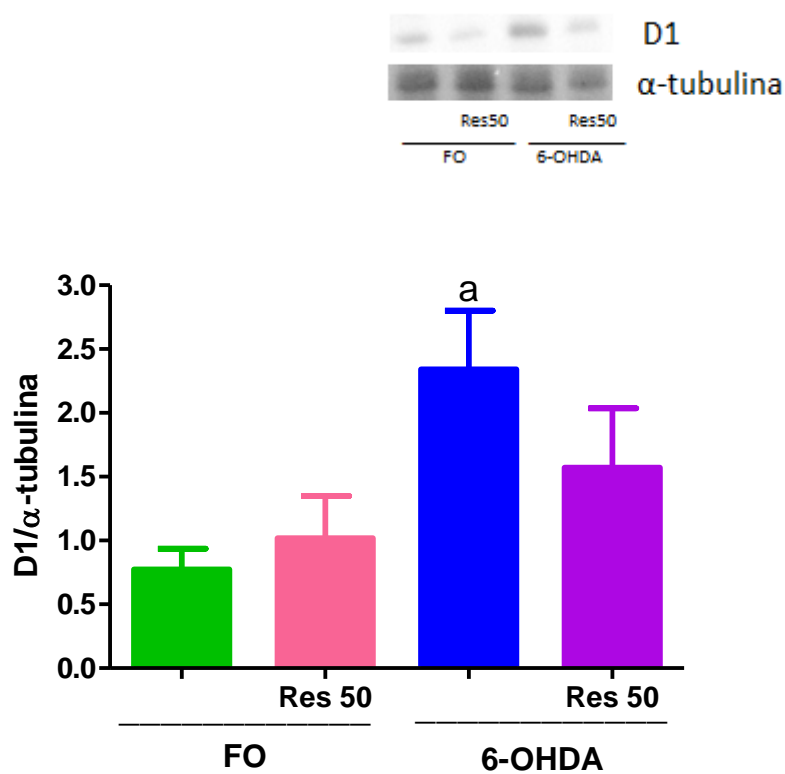
O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg segundo o protocolo II não diminuiu significativamente a expressão de receptor D1 quando comparada com o grupo parkinsoniano no estriado lesionado e no mesencéfalo (relação D1/ $\alpha$ -tubulina no estriado lesionado: 6-OHDA + Res50:  $0,09 \pm 0,03$  e no mesencéfalo: 6-OHDA + Res50:  $1,57 \pm 0,46$ ) não conseguindo prevenir a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA (Figuras 67 e 68).

Figura 67 – Expressão do receptor D1 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA ( $18\mu\text{g}/3\mu\text{L}$ )  $n = 4$  animais/grupo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 68 – Expressão do receptor D1 no mesencéfalo de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



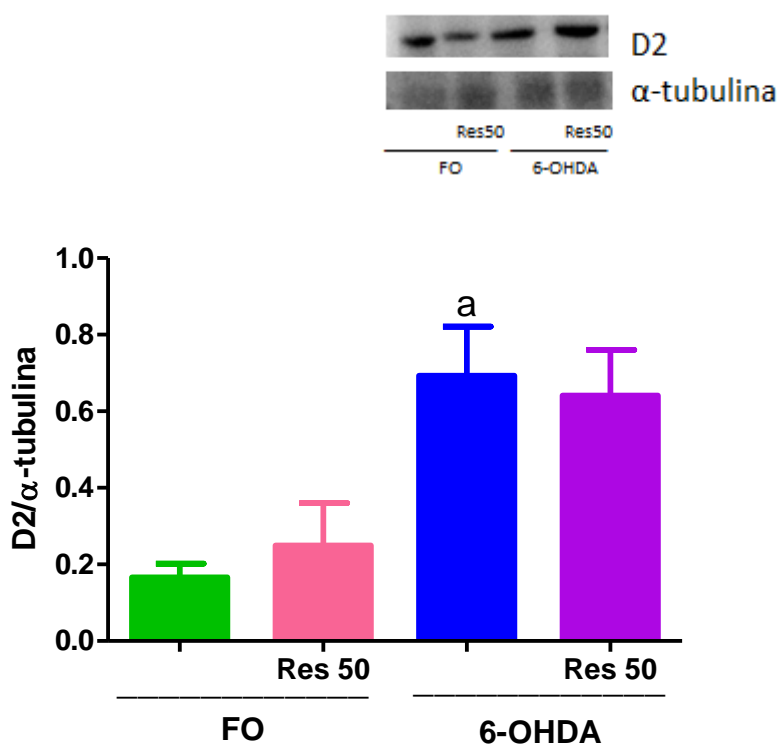
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,05. ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### 4.18 Efeito resveratrol sobre a expressão do D2 no estriado lesionado e no mesencéfalo de ratos parkinsonianos

As figuras 69 e 70 mostram que a 6-OHDA provocou um aumento significativo da expressão do receptor D2 no estriado lesionado e no mesencéfalo quando comparados ao grupo FO (relação D2/ $\alpha$ -tubulina no estriado lesionado: FO:  $0,17 \pm 0,04$ ; 6-OHDA:  $0,69 \pm 0,13$  e no mesencéfalo: FO:  $1,50 \pm 0,36$ ; 6-OHDA:  $6,47 \pm 1,54$ ).

O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg segundo o protocolo II só foi capaz de diminuir significativamente a expressão de receptor D2 no mesencéfalo quando comparada com o grupo parkinsoniano (relação D2/ $\alpha$ -tubulina no estriado lesionado: 6-OHDA + Res50:  $0,64 \pm 0,12$  e no mesencéfalo: 6-OHDA + Res50:  $1,19 \pm 0,22$ ), conseguindo prevenir a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA somente na substância negra (Figuras 69 e 70).

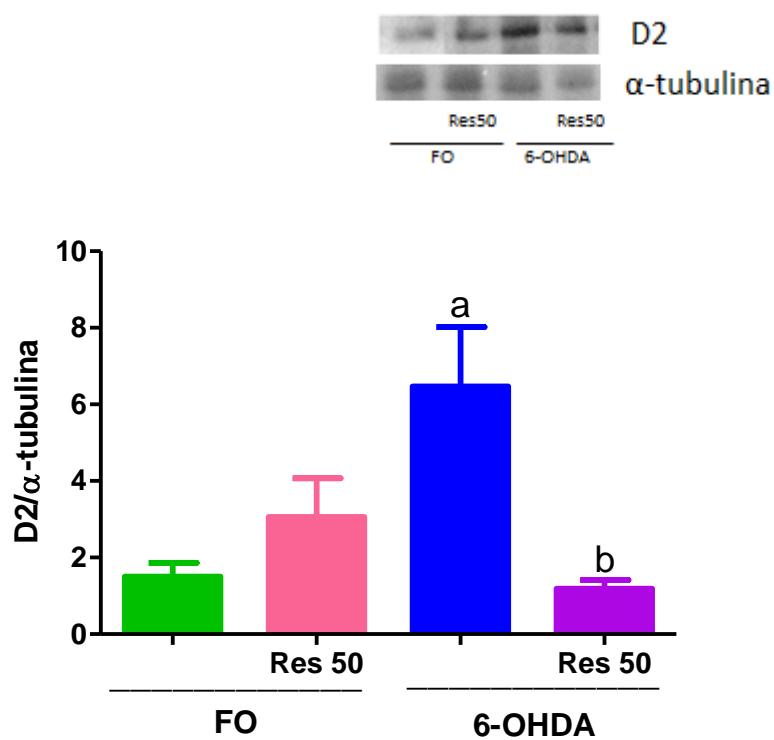
Figura 69 – Expressão do receptor D2 no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA ( $18\mu\text{g}/3\mu\text{L}$ )  $n = 4$  animais/grupo, a vs FO,  $p < 0,05$ . ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.



Figura 70 – Expressão do receptor D2 no mesencéfalo de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



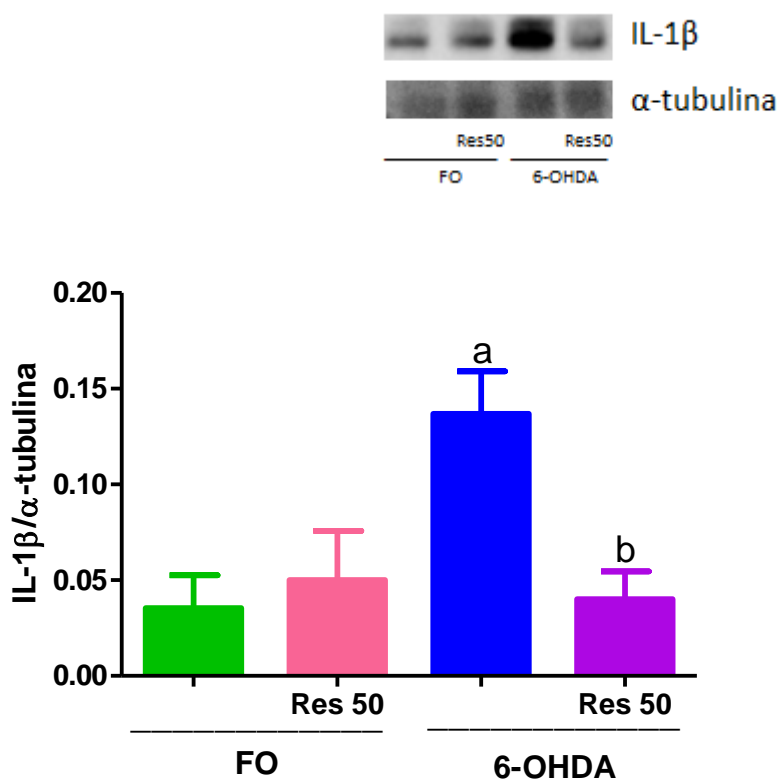
Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO,  $p < 0,05$  e b vs 6-OHDA,  $p < 0,05$ . ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

#### 4.19 Efeito resveratrol sobre a expressão da IL-1 $\beta$ no estriado lesionado e no mesencéfalo de ratos parkinsonianos

A figura 71 mostra que a 6-OHDA provocou um aumento significativo da expressão da IL-1 $\beta$  no estriado lesionado quando comparados ao grupo FO (relação IL-1 $\beta$  / $\alpha$ -tubulina no estriado lesionado: FO:  $0,04 \pm 0,02$ ; 6-OHDA:  $0,14 \pm 0,02$ ). Esse aumento não foi observado no mesencéfalo (relação IL-1 $\beta$  / $\alpha$ -tubulina no mesencéfalo: FO:  $0,62 \pm 0,11$ ; 6-OHDA:  $0,84 \pm 0,07$ ) (Figura 72).

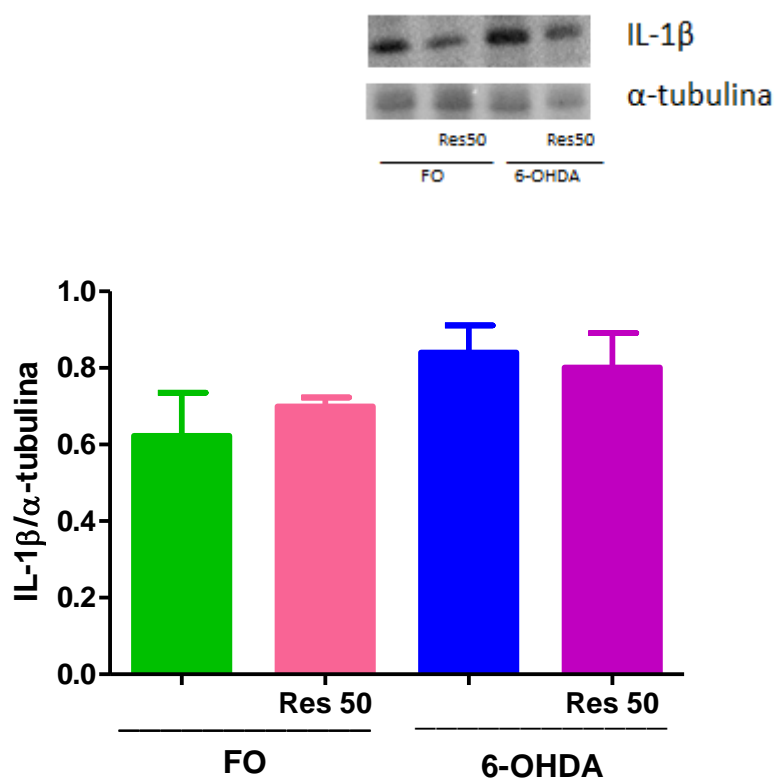
O tratamento com o resveratrol na dose de 50 mg/kg segundo o protocolo II só foi capaz de diminuir significativamente a expressão da IL-1 $\beta$  no estriado lesionado quando comparada com o grupo parkinsoniano (relação IL-1 $\beta$  / $\alpha$ -tubulina no estriado lesionado: 6-OHDA + Res50:  $0,04 \pm 0,01$ ), protegendo assim a inflamação induzida pela neurotoxina. Essa proteção não foi observada no mesencéfalo (relação IL-1 $\beta$  / $\alpha$ -tubulina no mesencéfalo: 6-OHDA + Res50:  $0,80 \pm 0,09$ ) (Figuras 71 e 72).

Figura 71 – Expressão da IL-1 $\beta$  no estriado lesionado de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo, a vs FO, p < 0,05 e b vs 6-OHDA, p < 0,05. ANOVA, seguido do teste de Tukey. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

Figura 72 – Expressão da IL-1 $\beta$  no mesencéfalo de ratos parkinsonianos tratados com resveratrol 50 mg/kg v.o. por 19 dias.



Os animais sofreram lesão intraestriatal com 6-OHDA (18 $\mu$ g/3 $\mu$ L) n = 4 animais/grupo. Os valores representam a média  $\pm$  EPM.

## 5 DISCUSSÃO

A Doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa associada com a perda de neurônios na SNpc (LIMA *et al.*, 2015). A etiologia da doença ainda não está completamente conhecida, mas, ao que parece, o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e a inflamação têm papel importante (MACHADO *et al.*, 2016; PATHAK; DAVEY, 2008). A DP ainda é considerada incurável apesar de existirem inúmeros tratamentos para melhorar a qualidade de vida dos pacientes tais como, a L-dopa, um precursor de dopamina; inibidores da MAO-B, que atuam melhorando flutuações motoras; agonistas dopaminérgicos, que mimetizam o efeito da dopamina; anticolinérgicos, que são indicados para diminuição de tremores e amantadina, um antiviral que promove a liberação de dopamina, aliviando os sintomas motores (LILL; KLEIN, 2017).

Um modelo experimental para a indução de parkinsonismo em rato é através da injeção intraestriatal de 6-hidroxydopamina (6-OHDA). O dano neuronal induzido por 6-OHDA é principalmente devido ao estresse oxidativo maciço causado pela toxina. Sendo semelhante à dopamina, a 6-OHDA mostra alta afinidade para o DAT, que carrega a toxina para dentro dos neurônios dopaminérgicos. Uma vez no neurônio, 6-OHDA acumula-se no citosol e sofre rápida auto-oxidação, levando à alta taxa de formação de radicais livres (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008). Como um mecanismo adicional, a 6-OHDA pode acumular-se na mitocôndria, onde inibe a atividade da cadeia de transporte de elétrons através do bloqueio do complexo I, gerando mais radicais livres (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008). A 6-OHDA possui a desvantagem de não atravessar a barreira hematoencefálica, sendo necessária a cirurgia estereotáxica para administração intraestriatal da toxina, o que nem sempre leva a uma perda maciça das células dopaminérgicas (IANCU *et al.*, 2005). Este modelo não imita todas as características patológicas e clínicas da DP, como por exemplo, a formação de inclusões citoplasmáticas (corpúsculos de Lewy), no entanto é o modelo mais útil e seguro para o estudo de substâncias neuroprotetoras (HIRSCH *et al.*, 2008). Apesar da disponibilidade de novos modelos, a 6-OHDA permanece sendo a ferramenta experimental mais utilizada para induzir a lesão nigroestriatal em ratos (BLANDINI *et al.*, 2008).

O resveratrol é uma fitoalexina polifenólica comumente encontrada em grande quantidade na casca de uva e vinho tinto (FREMONT *et al.*, 2000). Ele tem sido o foco de

muitos estudos que visam investigar os seus efeitos biológicos, incluindo sua atividade antioxidante (OLAS *et al.*, 1999; MARTINEZ; MORENO, 2000). Estudos *in vivo* mostram que o resveratrol pode exercer neuroproteção contra isquemia (SINGH *et al.*, 2015), convulsões (GIBOVAN; PLAMADON, 2015), doenças neurodegenerativas (SINGH *et al.*, 2015; MARKUS; MORRIS, 2008) e possui efeitos benéficos em modelos experimentais de DP (CHAO *et al.*, 2008). Além disso, estudos também demonstraram que o resveratrol na dose de 40 mg/kg possui efeito neuroprotetor em ratos *Sprague–Dawley* que foram lesionados unilateralmente pela 6-OHDA (JIN *et al.*, 2008) e em estudos *in vitro* o resveratrol apresenta a capacidade de exercer efeito neuroprotetor sobre os neurônios dopaminérgicos (BLANCHET *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2008).

O principal mecanismo de neuroproteção pelo resveratrol seria a sua capacidade sequestradora de radicais livres (ZHUANG *et al.*, 2003). O resveratrol quando administrado i.p. conseguiu reduzir convulsões induzidas por FeCl<sub>3</sub> e ácido caínico, além de restaurar parcialmente a cognição em ratos com défices de memória induzido por estreptozotocina (GUPTA *et al.*, 2002). Estes resultados levam a crer que o resveratrol é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e que exerce de maneira eficaz efeitos neuroprotetores, mesmo em doses baixas. (LU *et al.*, 2008). Nos últimos anos, a molécula do trans-resveratrol recebeu atenção considerável por seu poder antiinflamatório, antiapoptótico, antioxidante, antidiabético, antiviral e cardioprotetor (SINGH *et al.*, 2013).

Estudos recentes demonstram atividade antiinflamatória do resveratrol no modelo de isquemia global em ratos, com a diminuição expressão dos transportadores de glutamato tipo 1 e da ativação das micróglia e dos astrócitos no hipocampo, após sete dias de tratamento (GIBOVAN; PLAMADON, 2015)

O modelo de “hemiparkinsonismo” pela 6-OHDA é um modelo robusto, reprodutível, que leva a uma assimetria motora evidenciada após a administração de agonistas dopaminérgicos resultando em um comportamento rotacional contralateral à lesão (BETARBET *et al.*, 2002). Este é o clássico teste da apomorfina ou rotacional, primeiramente descrito por Ungerstedt e Arbuthnott (1970), que proporciona a verificação de alterações motoras induzidas por grandes lesões nigroestriatais.

Nesse trabalho testamos três protocolos de tratamento diferentes, sendo dois deles protetores, com o tratamento começando antes da lesão com a 6-OHDA e o terceiro de

reversão, quando iniciamos o tratamento com a lesão nigroestriatal estabelecida. A diferença entre os dois tratamentos protetores foi basicamente o início do tratamento, o primeiro iniciava o tratamento três dias antes da lesão e o segundo apenas uma hora antes da lesão. Assim, pudemos concluir após os testes preliminares que não houve diferença entre eles, e decidimos seguir somente com o protocolo que iniciava o tratamento uma hora antes da lesão, pois o importante foi a proteção do resveratrol no momento da lesão. Pelos testes motores observamos que o resveratrol não teve efeito reversivo, deste modo este protocolo não foi continuado nos demais testes.

Neste trabalho mostramos que animais lesionados com a 6-OHDA apresentaram um grande número de rotações contralaterais à lesão. Em estudos anteriores do nosso grupo demonstramos este comportamento rotacional nos animais parkinsonianos (MENEZES, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2013; CARMO *et al.*, 2014). Este resultado também está em concordância com a literatura (RIZELIO *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2010) que demonstra que lesões extensas promovidas pela 6-OHDA acarretam esse tipo de comportamento durante a realização do teste. O agonista dopaminérgico, apomorfina, induz rotações contralaterais ao lado lesionado, uma vez que no lado lesionado ocorre uma “up regulation” dos receptores D1 e D2. O resveratrol conseguiu diminuir estas rotações, resultado de acordo com alguns trabalhos que utilizaram o mesmo modelo (ZHANG *et al.*, 2002; RIZELIO *et al.*, 2010). Wang e colaboradores (2011) em modelo de lesão estriatal unilateral de 6-OHDA em ratos demonstraram a mesma proteção com uma dose de 20 mg/kg de resveratrol por 14 (quatorze) dias via oral.

Pacientes com DP apresentam uma dificuldade para iniciar os movimentos e um comprometimento da marcha, estes sintomas podem aparecer na fase inicial da doença e piora com a evolução da mesma (SUAREZ *et al.*, 2011)

A locomoção no teste do campo aberto reflete a atividade exploratória do animal (KONTINEN *et al.*, 1999). O presente estudo demonstrou que a 6-OHDA não induziu déficit na atividade exploratória no teste do campo aberto, corroborando com o estudo anteriores utilizando os mesmos animais (MENEZES, 2012). Alguns estudos existentes (RIZELIO *et al.*, 2010) demonstraram uma diminuição no número total de movimentos de exploração vertical e também em outros teste para avaliação a atividade locomotora. Estas alterações motoras são mais evidenciadas em outros modelos de parkinsonismo animal, como nos

modelos do MPTP e rotenona, pois no modelo da 6-OHDA não são observados alterações visíveis como a bradicinesia (SCHOBER, 2004).

Distúrbios do equilíbrio em pacientes com DP se manifestam em diferentes estágios da doença, mesmo no estado inicial, assim aumentando a incapacidade física do paciente com quedas e imobilizações da marcha. Apesar do equilíbrio estar geralmente preservado no início da DP idiopática, muitas pesquisas têm mostrado maior incidência de quedas (e suas consequências), com taxas próximas de 70% nos pacientes nos estágios iniciais da classificação de Boher (SUAREZ *et al.*, 2011).

Os animais parkinsonianos apresentaram um comprometimento no comportamento motor, especialmente no equilíbrio no teste do *rotarod*. Em estudos anteriores Iancu e colaboradores (2005) demonstram que, os animais lesionados unilateralmente pela 6-OHDA, apresentavam comprometimento na atividade locomotora no teste do *rotarod* e no teste do cilindro, mas não no teste do campo aberto. O resveratrol não foi capaz de proteger os animais parkinsonianos desse desequilíbrio quando desafiados no teste do *rotarod* provavelmente devido a ser um sintoma que pode acontecer nos estágios iniciais dessa patologia e progredir com a evolução da doença.

Na clínica, os pacientes com DP que apresentam alterações do movimento, também demonstram um importante comprometimento na atividade motora fina, quando avaliados com base na função total de extremidades, através da avaliação das atividades da vida diária (AVD), na coordenação fina de equilíbrio na mão e na marcha (RAH *et al.*, 2009). Os sintomas sensoriais são uma queixa frequente dos pacientes com DP, o que piora sua qualidade de vida e interfere na capacidade deste paciente participar das atividades da vida diária, contribuindo para a perturbação do sono ou depressão (YOSHII, 2012).

O presente estudo demonstrou que a 6-OHDA foi capaz de produzir danos motores finos avaliado através do teste do cilindro, o que já tinha sido mostrado em achados anteriores nossos (MENEZES, 2012). Woodlee e colaboradores (2008) observaram em ratos *Sprague-Dawley* lesionados unilateralmente pela 6-OHDA, um comprometimento da atividade motora fina através dos testes do cilindro e da instabilidade postural provocando o desequilíbrio nos animais lesionados.

O resveratrol mostrou proteção no teste do cilindro nos animais parkinsonianos que seguiram o protocolo de tratamento neuroprotetor, os animais que seguiram o protocolo de tratamento reversivo não apresentaram proteção nesse teste, uma vez que a lesão já estava estabelecida e resveratrol não foi capaz de reverter estes danos.

A depressão freqüentemente acompanha a PD. Esta depressão pode ser funcional, pelo conhecimento do diagnóstico da DP pelo paciente, ou fisiológica devido à diminuição das catecolaminas, principalmente dopamina e serotonina. Pesquisas anteriores sugeriram que os sistemas de dopamina (DA) e serotonina estão intimamente ligados à depressão na DP. (LEE *et al.*, 2015). O modelo de “hemiparkinsonismo” induzido pela 6-OHDA causou um comportamento depressivo-símile nos animais lesionados, este comportamento também é observado na clínica, onde ocorre um alto índice de depressão entre os pacientes com DP. (KASTEN *et al.*, 2012).

Mais de 90% dos pacientes com DP idiopática sofrem ou já sofreram de complicações psiquiátricas, dentre elas a mais comum é a depressão. A depressão na DP se mostra subdiagnosticada, principalmente pela sobreposição dos próprios sintomas da doença. A prevalência de depressão e sua relação com os sintomas motores pode possibilitar o desenvolvimento de práticas direcionadas ao tratamento da depressão e a melhora na qualidade de vida dos pacientes (GONÇALVES, 2012).

Lee e colaboradores (2015) demonstraram que a destruição do sistema dopaminérgico causa a redução do sistema serotoninérgico, resultando na expressão do comportamento depressivo. O grau de disfunção dopaminérgica foi correlacionado positivamente com o comprometimento do sistema de serotonina. A gravidade dos sintomas motores também foi intimamente relacionada ao comportamento depressivo.

Casas e colaboradores (2011) também observaram o comportamento depressivo-símile em ratos *Sprague-Dawley* que sofreram lesão unilateral pela 6-OHDA, através do teste no nado forçado. Outro estudo com este mesmo modelo demonstrou que o comportamento depressivo está relacionado com a diminuição principalmente de DA e 5-HT na substância negra daqueles animais (JAUNARAJIS *et al.*, 2014).

O resveratrol protegeu os animais do comportamento depressivo-símile induzido pela 6-OHDA corroborando com o nosso estudo anterior (MENEZES, 2012), porém como neste



novo estudo continuamos o tratamento com o resveratrol até o ultimo dia de testes comportamentais observamos uma proteção mais significativa. No modelo de depressão induzido por um inibidor da síntese de serotonina (p-clorofenilalanina) em camundongos, o trans-resveratrol nas doses de 40 e 80 mg/kg i.p. também protegeu do comportamento depressivo nos testes do nado forçado e suspensão da cauda (XU *et al.*, 2010).

O presente trabalho mostrou que a injeção unilateral de 6-OHDA no corpo estriado causou uma diminuição significativa nas concentrações de dopamina (DA), noradrenalina (NE) e serotonina (5-HT) no estriado lesionado e mesencéfalo corroborando com outros estudos (MENEZES, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2013; CARMO *et al.*, 2014).

A 6-OHDA foi injetada no corpo estriado, ocasionando uma lesão retrógrada, atingindo a substância negra e depletando as monoaminas. As lesões estriatais pela 6-OHDA induzem neurodegeneração retrógrada dos neurônios da SNpc, que são progressivas nas primeiras semanas da lesão (BLANDINI *et al.*, 2008). Além da perda massiva de DA, são descritas alterações em outros neurotransmissores, o que inclui redução dos níveis de 5-HT no corpo estriado e SNpc e redução do conteúdo de NA na SNpc pela 6-OHDA (READER; DEWAR, 1999).

Lee e colaboradores (2015) avaliaram em seu estudo o efeito da diminuição dopaminérgica no sistema, a interconexão entre comportamento motor e depressão em ratos. Para avaliação eles realizaram duas varreduras de PET nos ratos lesionados pela 6-OHDA e desafiados para transportadores DA e de serotonina 1 (5-HT (1A)), e concluíram que o grau de depleção de DA estava correlacionado com o comportamento rotacional. Assim, quanto maior o número de rotações menor a quantidade de DA disponível no cérebros dos ratos. Assim a diminuição da ligação do receptor 5-HT (1A) também foi correlacionado com a gravidade da depressão.

O resveratrol conseguiu diminuir significativamente a perda de dopamina, noradrenalina e serotonina induzida pela 6-OHDA no estriado lesado e no mesencéfalo nos animais parkinsonianos que seguiram o protocolo de neuroproteção, mas não no protocolo de neuroresgate. Wang e colaboradores (2011) observaram a mesma neuroproteção encontrada em um modelo de parkinsonismo animal induzido pela 6-OHDA, neste o resveratrol na dose de 20 mg/kg v.o., por 14 (quatorze) dias, protegeu os neurônios dopaminérgicos da depleção de DA, diminuindo a atividade das EROs possivelmente por sua capacidade antioxidante.

Corroborando com nossos achados já foi mostrado que a administração de uma dieta ou tratamento à base de resveratrol para camundongos adultos antes de serem lesionados pela neurotoxina MPTP exerce efeito neuroprotetor sobre os neurônios dopaminérgicos, aumentando os níveis da dopamina no estriado e na SNpc (BLANCHET *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2008). Xu e colaboradores (2010) demonstraram em que o *trans*-resveratrol nas doses de 40 e 80 mg/kg i.p. restaurou os níveis de noradrenalina e serotonina no córtex frontal e no hipocampo de camundongos submetidos à um modelo de depressão induzido por um inibidor da síntese de serotonina.

A DA é um dos principais neurotransmissores e participa de várias funções como coordenação motora, emoções, memória, mecanismos de recompensa, regulação neuroendócrina. A DA exerce seus efeitos através de cinco receptores DA que são subdivididos em 2 famílias D1 e D2. A família D1 apresenta os receptores D1 e D5, a família D2 os receptores D2, D3 e D4. Todos os receptores DA são amplamente expressos no sistema nervoso central (SNC) e desempenham um papel importante não só em condições fisiológicas, mas também em cenários patológicos. As anormalidades no sistema dopaminérgico e nos seus receptores nos gânglios da base caracterizam a DP, porém a DA também participa de outros distúrbios neurodegenerativos como a doença de Huntington (HD) e a esclerose múltipla (MS) (RANGEL-BARAJAS; CORONEL; FLORAN, 2015).

Os receptores D1 e D2 são mediadores importantes da sinalização dopaminérgica no cérebro, principalmente no estriado e na substância negra e estão associados com as manifestações das patologias relacionadas à dopamina, como na DP (ORENDAIN-JAIME; ORTEGA-IBARRA; LOPEZ-PEREZ, 2016). No presente trabalho observamos que houve um aumento na expressão dos receptores D1 e D2 caracterizando o modelo de parkinsonismo no animal, justificando o aumento do número de rotações no teste da apomorfina. O resveratrol foi capaz de proteger significativamente somente o aumento da expressão de D2 no mesencéfalo, quanto ao D1 observamos uma diminuição, mas não significativa.

Pacientes com DP apresentam a perda da memória, principalmente a memória prospectiva (PM). A PM é essencial para uma vida produtiva e independente e necessária para o cumprimento dos comportamentos das AVD. A DP pode causar déficits de PM associados à limitações de atividade e redução de qualidade de vida dos pacientes (FOSTER; McDANIEL; RENDELL, 2017).

O presente estudo constatou que a 6-OHDA promoveu danos significativos na memória aversiva de curta duração (memória recente) e de longa duração (memória tardia). Corroborando com o nosso estudo anterior (MENEZES, 2012) e com o estudo de Fernandez Espejo (2003) onde demonstraram que as lesões com a neurotoxina 6-OHDA i.c.v afetam a memória aversiva e espacial, principalmente por prejudicarem as funções cognitivas dependente do córtex pré-frontal e do núcleo *accumbens*. Outro estudo com modelo de parkinsonismo em camundongos C57/BL induzido por MPTP i.p. demonstrou um déficit na memória aversiva avaliada através do teste da esquiwa passiva, devido à diminuição da DA no mesencéfalo (MORIGUCHI *et al.*, 2012).

O resveratrol protegeu tanto a memória aversiva recente quanto a tardia nos protocolos neuroprotetores, corroborando com o estudo de Gacar e colaboradores (2011) que utilizaram um modelo de perda de memória induzido por escopolamina em ratos, onde o resveratrol nas doses de 25 e 50 mg/kg v.o. protegeu tanto a memória aversiva como a espacial. Karalis e colaboradores (2011) demonstraram que o resveratrol foi capaz de proteger a memória aversiva e espacial de animais submetidos à isquemia por traumatismo. Também em modelo dos ratos *Wistar* diabéticos pela administração da estreptozotocina i.v. o resveratrol nas doses de 10 e 20 mg/kg protegeu contra os déficits de memória aversiva no teste da esquiwa passiva, devido a sua atividade antiinflamatória (SCHMATZ *et al.*, 2009).

No teste do labirinto aquático com plataforma sinalizada (*Cued Water Maze*) avaliamos a memória espacial dependente de estriado através do aprendizado nos quatro dias de testes. Os animais parkinsonianos apresentaram um déficit de memória espacial em todos os dias, corroborando com o nosso estudo anterior onde utilizamos o mesmo modelo (MENEZES, 2012). Tadaiesky e colaboradores (2008) também observaram este déficit em modelo de parkinsonismo em ratos induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA, e justificam os achados pela depleção de dopamina, noradrenalina e serotonina nas áreas cerebrais afetadas destes animais.

O resveratrol conseguiu reverter o dano de memória em animais parkinsonianos no terceiro e quarto dia de teste provavelmente por restaurar os níveis de DA, 5-HT e NE em áreas relacionadas com a memória. No modelo de isquemia por traumatismo craniano em ratos jovens o *trans*-resveratrol na dose de 90 mg/kg i.p. foi capaz de proteger também a memória espacial (KARALIS *et al.*, 2011)

Grande parte dos estudos realizados até o presente momento utilizando estes modelos animais da DP tem sido focada em seus efeitos sobre a via dopaminérgica nigrostriatal e a indução de comprometimentos motores nos animais. Entretanto, como a DP em humanos está associada com alterações em uma variedade de funções, incluindo alterações afetivas, cognitivas e olfativas (BRAAK *et al.*, 2004), torna-se importante avaliar se estes modelos animais são também capazes de reproduzir algumas destas alterações.

O comprometimento olfatório é uma manifestação precoce da DP, os pacientes relatam que não apresentam mais a capacidade de diferenciar os odores. A análise cerebral completa através de duas técnicas de imagem não invasiva que permitem a detecção de alterações microestruturais na substância branca cerebral, detectou alterações microestruturais na substância branca adjacente a áreas olfativas em pacientes com DP (GEORGIPOULOS *et al.*, 2017).

No presente estudo observamos que a neurotoxina 6-OHDA provocou um prejuízo olfativo nos ratos parkinsonianos em ratos. Corroborando com o estudo de Prediger e colaboradores (2010) que utilizaram a neurotoxina MPTP intranasal em camundongos e observaram que a depleção temporária nos níveis de monoaminas nas terminações nervosas pode provocar este prejuízo olfatório. Os animais que receberam o tratamento neuroprotetor do resveratrol demonstraram uma manutenção dessa capacidade olfatória, até o momento não foi encontrada na literatura nenhuma referência com o resveratrol avaliando este tipo de deficiência olfativa.

Recentemente, o estresse oxidativo tem sido discutido como um importante contribuinte na patologia das doenças neurodegenerativas (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Uma das idéias relacionadas à patogênese da doença de Parkinson baseia-se na formação de EROs e conseqüente início de estresse oxidativo, levando à lesão na *substancia nigra pars compacta* (SNpc) (PAL *et al.*, 2011).

Em um estudo anterior mostramos que ocorre um aumento significativo nos níveis de estresse oxidativo nos animais parkinsonianos. Observamos o aumento das concentrações de MDA, dos níveis de nitrito/nitrato e uma diminuição significativa da SOD. O tratamento com o resveratrol foi capaz de prevenir o aumento nos níveis de MDA e de nitrito/nitrato no estriado lesionado e no mesencéfalo, como também foi capaz restaurar os níveis de SOD no estriado, protegendo contra o aumento das EROs e o estresse oxidativo (MENEZES, 2012).

Uma das mais conhecidas propriedades do resveratrol é a antioxidante, atenuando a acumulação de EROs. Dados da literatura mostram que o resveratrol é capaz de impedir aumento das EROs e a morte por apoptose causada por um dano oxidativo (LIMA *et al.*, 2016). Assim é possível que parte da neuroproteção do resveratrol observada no nosso estudo se deva às propriedades antioxidantes do resveratrol.

Pangeni e colaboradores comprovaram em estudos histopatológicos que as alterações degenerativas presentes no modelo de DP foram diminuídas nos grupos tratados com a nanoemulsão de resveratrol em associação com a vitamina E. Eles observaram que os níveis de GSH e SOD foram significativamente maiores e o nível de MDA foi significativamente menor no grupo tratado com nanoemulsão de resveratrol.

Além dos estudos *in vivo*, estudos *in vitro* em cultura de células SN4741 também demonstraram o efeito neuroprotetor do resveratrol, protegendo do estresse oxidativo, em modelos experimentais utilizando o MPTP (ZENG *et al.*, 2017).

Estudo recente provou que o resveratrol restaurou o equilíbrio redox como evidenciado pela supressão da atividade da xantina oxidase e da formação de carbonilos protéico, além da preservação do estado dos antioxidantes intracelulares através da ativação da glutathiona peroxidase e da via de sinalização Nrf2. Neste estudo foi utilizado o modelo da rotenona (1,5 mg/kg, s.c.) administrada diariamente por 21 (vinte e um) dias e o tratamento foi realizado com o resveratrol na dose de 20 mg/kg/dia por gavagem em um período de 3 (três) semanas (GABALLAH *et al.*, 2016).

A TH é uma enzima envolvida na síntese de dopamina e um marcador molecular de neurônios dopaminérgicos. Na DP ocorre uma deficiência de TH, assim como baixos níveis de dopamina, assim ela tem sido usada como um marcador para neurônios que contêm catecolaminas e tem sido utilizada para proporcionar mapas de sistemas contendo catecolaminas (CUELLO, 1978; Da CUNHA *et al.*, 2008; BLANDINI *et al.*, 2000). No presente trabalho a lesão pela 6-OHDA promoveu a diminuição da imunorreatividade para TH no corpo estriado e no mesencéfalo. Estes resultados estão em concordância com a literatura (SONG *et al.*, 2012; MENEZES, 2012; CARMO *et al.*, 2014) que demonstraram que a 6-OHDA é capaz de diminuir a expressão de TH em neurônios dopaminérgicos.

O resveratrol promoveu uma proteção nos neurônios dopaminérgicos contra a 6-OHDA, demonstrado pelo aumento da imunorreatividade para TH no estriado lesionado, corroborando com estudos anteriores (MENEZES, 2012), mas não teve efeito de neuroresgate ou reversivo, demonstrando que depois que a lesão já está instalada o resveratrol não consegue reverter o efeito. Assim, como tratamentos disponíveis na clínica que só fazem a reposição da dopamina, mas não conseguem reverter a lesão nos neurônios dopaminérgicos.

Srivastava e colaboradores (2012) observaram no modelo de parkinsonismo experimental, em camundongo *Swiss*, induzido por paraquat (10 mg/kg) que sozinho ou em combinação com maneb (30 mg/kg), duas vezes por semana, por 9 (nove) semanas, o resveratrol na dose de 10 mg/kg i.p. diariamente aumentou a imunorreatividade para tirosina hidroxilase na SNpc. Em outro estudo, Blanchet e colaboradores (2008) observaram a ação neuroprotetora do pré-tratamento com resveratrol nas doses de 50 e 100 mg/kg por duas semanas, no modelo de parkinsonismo induzido pelo MPTP i.p em camundongos C57BL, onde foi visto uma diminuição da depleção de estriatal DA, e manutenção da imunorreatividade para TH estriatal.

Também observamos que ocorreu a degeneração neuronal no estriado lesionado e no mesencéfalo, Zeng e colaboradores (2017) observou que as células neuronais morreram por apoptose após a injeção da neurotoxina. Neves e colaboradores (2015) também observaram a morte dos neurônios dopaminérgicos em um modelo de DP induzida pela 6-OHDA em ratos. No nosso estudo o tratamento com o resveratrol seguindo um protocolo neuroprotetor protegeu contra a degeneração neuronal no mesencéfalo. O resveratrol, no modelo de traumatismo craniano em camundongos, diminuiu a expressão protéica de p-JNK e Bcl-2, diminuiu a expressão de Bax e o número de neurônios positivos de fluorojade C, atenuando a apoptose e a inflamação neuronal induzida por lesões na via nigrostriatal via ativação da sinalização c-JNK (LI *et al.*, 2017). Assim é possível que no nosso trabalho o resveratrol tenha protegido os neurônios por inibir o processo de apoptose induzido pela 6-OHDA.

O DAT é o transportador transmembrana de dopamina que fica localizado na terminação nervosa pré-sináptica, onde é responsável por capturar a dopamina que fica disponível na fenda sináptica, através da recaptação pré-sináptica desse neurotransmissor. Os receptores dopaminérgicos apresentam alterações na DP. A perda de dopamina mesencefálica

na doença de Parkinson é acompanhada de uma perda do DAT (TYSNES; STORSTEIN, 2017).

O DAT é um componente vital para manutenção dos níveis de DA, sendo responsável pela recaptação da DA pela membrana pré-sináptica no estriado. Assim, a diminuição do DAT estriatal na DP é considerado o principal fator do prejuízo motor (CHOTIBUT *et al.*, 2012). Observamos uma diminuição do DAT no estriado lesionado e na substância negra dos animais parkinsonianos e o resveratrol reduziu este déficit de DAT possivelmente pelo aumento na sobrevivência neuronal, favorecendo a recaptação da DA, colaborando para a manutenção dos níveis dopaminérgicos e contribuindo para a manutenção do padrão motor do animal (SINGH *et al.*, 2013).

Existem evidências de que a neuroinflamação pode desempenhar um papel importante na patogênese da DP. Na verdade, a ativação da microglia e a astrogliose na SNc e outras áreas afetadas, foram detectados em cérebro *post mortem* de pacientes com DP, além do aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Assim como clinicamente já se sabe que pacientes com DP apresentam aumento de interleucinas inflamatórias, das ciclooxigenases e de micróglia ativada (BORTOLANZA *et al.*, 2015). Porém, poucos estudos avaliaram os possíveis aumentos de citocinas pró-inflamatórias no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DP, surgindo assim um possível valor no diagnóstico ou rastreamento no progresso da DP pela análise dessas citocinas (DELGADO-ALVARADO *et al.*, 2017).

O dano nigro-estriatal causado pela infusão neurotoxina 6-OHDA está associado com uma resposta inflamatória. A ativação microglial é detectável no estriado. A partir da primeira semana após a infusão de 6-OHDA seguindo até a terceira semana. Na substância negra a microglia já é ativada na primeira semana pós-injeção, antes da perda de células e com a degeneração neuronal, esta tende a diminuir (BLANDINI *et al.*, 2008). Dessa forma a ação anti-inflamatória do resveratrol pode influenciar na sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos através da redução da geração de EROs.

Modelos animais de DP através da injeção da 6-OHDA levam ao aumento da ativação de micróglia e astrócitos, aumentando a neuroinflamação (CARMO *et al.*, 2014; NEVES *et al.*, 2015; KEMPURAK *et al.*, 2016; GHADERY *et al.*, 2017). Nossos resultados mostraram que os animais parkinsonianos apresentaram aumento da expressão de CD11b e GFAP, ou

seja, de micróglia e astrócitos ativados no estriado lesionado e na substância negra, corroborando com o estudo anteriormente citado.

O controle da inflamação está associado com a neuroproteção em diferentes doenças neurodegenerativas (MARCHETTI; ABBRACCHIO, 2005). Tanto as células microgliais quanto os astrócitos respondem rapidamente a uma situação adversa mudando sua morfologia, multiplicando-se e migrando para o sítio de injúria. Essas reações são nomeadas de gliose reativa (microgliose e astrogliose) e envolve a expressão de proteínas estruturais específicas e receptores de superfície celular. A astrogliose é caracterizada pelo aumento de filamentos intermediários, como a vimentina e o a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), que é acompanhado pela hipertrofia e aumento do número de astrócitos (ZHANG *et al.*, 2009). A microgliose aumenta a expressão *de novo* de marcadores moleculares como CD11b e antígenos MHC (complexo principal de histocompatibilidade) (McGEER; McGEER, 2002), assim como a liberação de espécies reativas de oxigênio, proteases e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que ocasionam um ciclo de auto-propagação da neuroinflamação e neurodegeneração (MONIF *et al.*, 2009).

A ciclooxigenase-2 (COX-2) também conhecida como *prostaglandin-endoperoxide synthase 2* é uma enzima que em humanos é codificada pelo gene *Ptgs2*. A COX-2 é altamente expressa em tecidos inflamados e acredita-se que produzem prostaglandinas (PGs) envolvidas em processos inflamatórios (LEE; YANG, 2013). A expressão do gene COX-2 pode ser induzida por muitas citocinas e fatores de crescimento, por meio da ativação de proteínas reguladoras da transcrição que atuam sobre esses locais promotores (LEE; YANG, 2013; LEE *et al.*, 2013). Assim, a COX-2 parece ser a principal responsável pela síntese de PGE2 em resposta à inflamação. A inibição da via inflamatória mediada por COX-2 pode, portanto, proporcionar uma abordagem terapêutica para doenças inflamatórias. Na DP ela está envolvida diretamente na neuroinflamação (TYSNES; STORSTEIN, 2017).

No nosso trabalho comprovamos um aumento das células COX-2 positivas no estriado lesionado e na substância negra, corroborando com outros estudos usando camundongos expostos a neurotoxina MPTP (LIMA *et al.*, 2016). O resveratrol protegeu contra o aumento dessas células marcadoras de neuroinflamação nas áreas analisadas.

Tsai e colaboradores (2017) demonstraram que a regulação positiva COX-2 e o seu metabolito a PGE2 estão implicados em várias doenças inflamatórias, e que o resveratrol em



um modelo de artrite reumatóide *in vitro* em células FLSs humanas, foi capaz de reduzir a expressão de COX-2 / PGE2, a atividade de NADPH oxidase e a geração de EROs.

Jin e colaboradores (2008) demonstraram o efeito antiinflamatório do resveratrol em modelo animal de parkinsonismo induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA em ratos *Sprague-Dawley* onde ocorreu diminuição dos níveis de COX-2, TNF $\alpha$  e NO<sub>2</sub> na substância negra dos animais dos animais lesionados. A regulação ascendente da COX-2 e o seu metabolito PGE2 estão implicados em várias doenças inflamatórias, inclusive as neurodegenerativas com a DP (TSAI *et al.*, 2017)

A interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) é uma citocina pró-inflamatória, sua liberação promovida pelo ATP é capaz de induzir ou aumentar a liberação de óxido nítrico, ativar a COX-2, a formar o ânion superóxido e outros mediadores inflamatórios (ARULKUMARAN *et al.*, 2011). Na DP ocorre a liberação de EROs que irá mediar a ativação da caspase-1 e IL-1  $\beta$ , e isto pode esta correlacionado com o processo inflamatório no modelo da 6-OHDA. As EROs iniciam a sinalizaçoa de p38/JNK via ativação de ASK1 com posterior morte por apoptose dos neurônios na DP (JHA *et al.*, 2015)

No presente trabalho observamos que houve um aumento da IL-1 $\beta$  no estriado lesionado, levando à neuroinflamação dessa regioa nos animais parkinsonianos. O resveratrol foi capaz de proteger esse processo inflamatório diminuindo a expressão da citocina pró-inflamatória, corroborando com outro estudo de modelo de DP induzido por rotenona em ratos onde o resveratrol na dose de 20 mg/kg/dia por três semanas protegeu do aumento dos níveis de caspase-3 e de IL-1 $\beta$  no cerebro desses animais (GABALLAH *et al.*, 2016).

Li e colaboradores (2017) mostraram que o reseveratrol também está envolvido na diminuição nos níviés de outros marcadores inflamatórios, além do IL-1 $\beta$  , como a IL-6 e TNK- $\alpha$  , e na expressão de outras proteínas (Bax e Bcl-2) associadas com a morte neuronal por apoptose.

Gibovan e Plamondon (2015) demonstram uma atividade antiinflamatória do resveratrol no modelo de isquemia global em ratos, com a diminuição expressão dos transportadores de glutamato tipo 1, das micróglias e dos astrócitos no hipocampo após sete dias de tratamento após a isquemia.

A glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) tem um papel crítico em funções celulares substanciais, incluindo sinalização celular, proliferação e apoptose. O GSK-3 consiste em duas isoformas, GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ , este último é encontrado em maior quantidade no cérebro (GRIMES; JOPE, 2001). O GSK-3 $\beta$  é uma proteína quinase citosólica constitutivamente ativa, sua ativação participa na patogênese de muitos distúrbios, incluindo câncer, neuroinflamação e doenças neurodegenerativas. Recentemente, uma grande variedade de investigações sugerem que o GSK-3 $\beta$  pode regular a apoptose celular e a sobrevivência através de vias de morte celular mediadas por mitocôndrias, como a que ocorre no modelo de DP induzido pela neurotoxina 6-OHDA (ZENG *et al.*, 2017).

Jha e colaboradores (2015) mostraram que a via PIK3/AKT está ativada nos neurônios degenerados, assim o AKT ativado interage com vários mediadores como JNK, FoxO, GSK-3 limitando a apoptose, impedindo ativação de microglia e neuroinflamação, evitando o acúmulo de EROs e mantendo níveis de estresse oxidativo controlados. Esta via a PIK3/AKT também pode desempenhar um papel fundamental na apoptose, no modelo de *in vitro* de neuroblastoma humano SH-EP1 expostas ao MPP +, a via foi capaz diminuir ainda mais a regulação do JNK e a atividade apoptótica relacionada, resultando na inativação do GSK-3 $\beta$ . Assim, ocorre um efeito citoprotetor da via PIK3/AKT/GSK-3 $\beta$  por inativação da morte celular por apoptose.

A inativação da GSK-3 $\beta$  pela via de sinalização PIK3/AKT também participa da regulação de caminhos inflamatórios, foi demonstrado que a indução pela Akt da GSK-3 $\beta$  modulava negativamente a via NF- $\kappa$ B. Além disso, demonstrou-se que a GSK-3 $\beta$  inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ) e aumenta a liberação de citocinas anti-inflamatórias (como IL-10) (GOLPICH *et al.*, 2015).

Observamos no nosso estudo uma diminuição do GSK-3 $\beta$  no estriado lesionado e na substância negra dos animais parkinsonianos, corroborando com estudos recentes que demonstram que a desregulação da GSK-3 $\beta$  está associada à patogênese de algumas doenças neurodegenerativas, tais como a DP (ZENG *et al.*, 2017).

Quando ocorre a lesão neuronal esta via PIK3/AKT é ativada positivamente e diminui a concentração do GSK-3 $\beta$  e, conseqüentemente ocorre um aumento na morte celular por apoptose (GOLPICH *et al.*, 2015). Assim o reestabelecimento dos níveis de GSK-3 $\beta$  pelo resveratrol como observado no nosso estudo sugere um efeito antiapoptótico deste. O resveratrol conseguiu proteger esta diminuição nas duas áreas cerebrais analisadas.

Em vista do exposto podemos afirmar que o resveratrol exerceu uma ação neuroprotetora contra os danos motores, cognitivos e danos olfativos no modelo experimental de DP induzido pela neurotoxina 6-OHDA em ratos. Mantendo os níveis das monoaminas, principalmente a dopamina, noradrenalina e serotonina, e diminuindo a degeneração neuronal. Este efeito neuroprotetor ocorreu por um mecanismo que envolve a diminuição da inflamação e da apoptose, o aumento da proteína transportadora de DA, e possivelmente seu efeito antioxidante.

## 6 CONCLUSÃO

- O resveratrol protegeu os animais parkinsonianos de danos motores induzidos pela 6-OHDA.

- No modelo de parkinsonismo utilizado não observamos déficit na atividade locomotora, porém foi visto um déficit no equilíbrio e no comportamento motor fino e na discriminação olfatória nos testes do rotarod e no cilindro. O resveratrol protegeu os animais desses déficits.

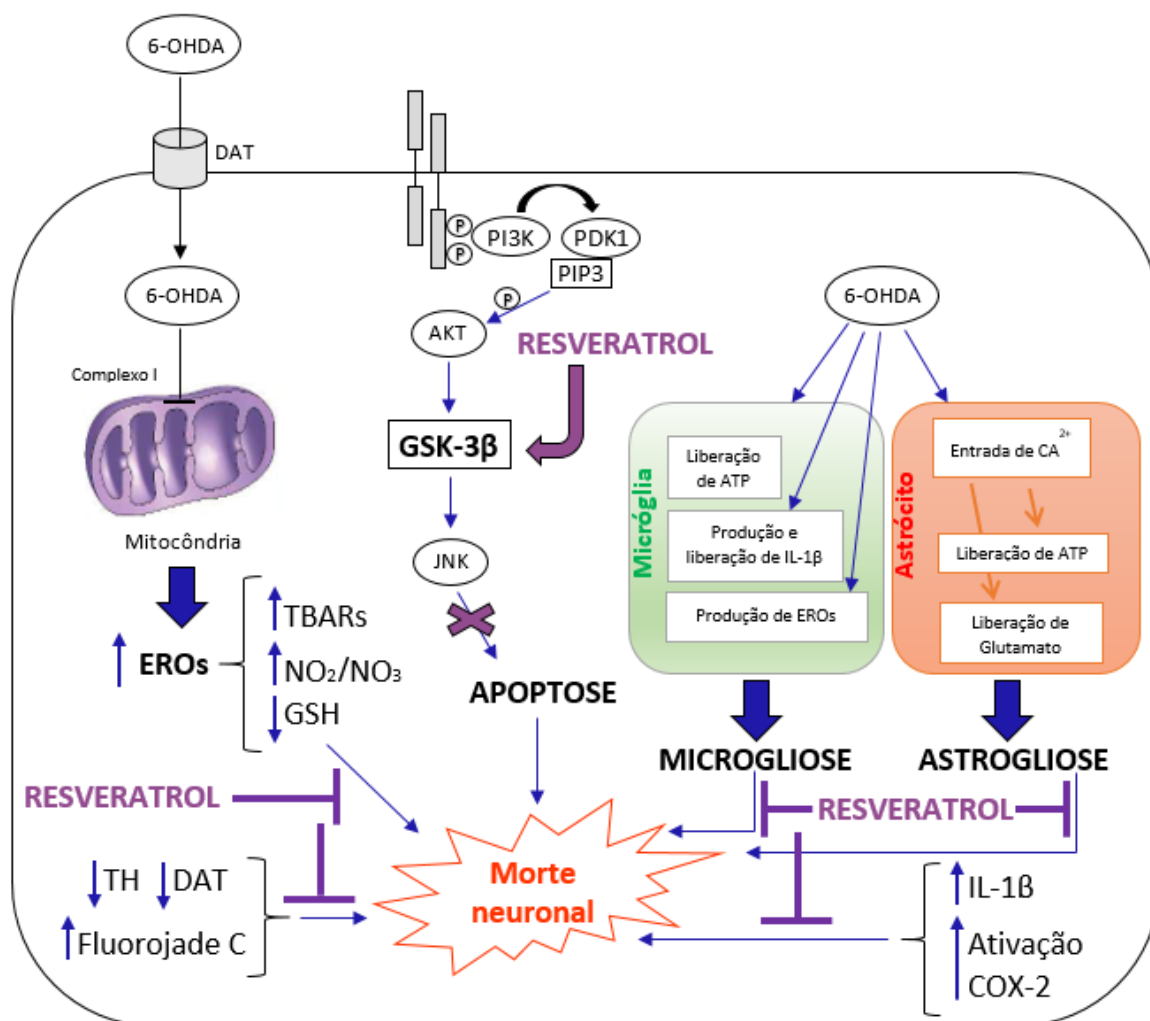
- Os animais parkinsonianos apresentaram um comportamento depressivo-símile com depleção das monoaminas (dopamina, serotonina e noradrenalina) e que foi protegido pelo tratamento com resveratrol. Também diminuiu a expressão do receptor dopaminérgico D2.

- A 6-OHDA promoveu déficit na memória aversiva e espacial. O resveratrol protegeu os animais parkinsonianos contra os déficits nas memórias aversiva recente e tardia, como também na espacial.

- A degeneração dos neurônios dopaminérgicos pela 6-OHDA foi demonstrada através da diminuição da imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase e pelo aumento da coloração FluorojadeC. O resveratrol protegeu da degeneração dos neurônios e aumentou os níveis da proteína transportadora de dopamina no estriado lesionado e na substância negra

- O resveratrol apresentou efeito neuroprotetor sobre a resposta inflamatória produzida pela neurotoxina 6-OHDA diminuindo a astrogliose (GFAP), a microgliose (CD11-b), restaurando os níveis de COX-2, IL-1 $\beta$  e GSK-3 $\beta$  possivelmente diminuindo a apoptose das células neuronais.

Figura 73 – Modelo proposto dos possíveis mecanismos de ação neuroprotetor do resveratrol em animais parkinsonianos.



O resveratrol diminui a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio) diminuindo o estresse oxidativo; atenuou a degeneração neuronal através do aumento da TH (tirosina hidroxilase) e DAT (transportador de dopamina) e diminuindo o fluorojade C; aumentou a expressão do GSK-3β (quinase glicogênio sintase 3 beta) promovendo um efeito antiapoptótico; diminuiu a ativação de microglia e de astrócitos promovendo a diminuição da liberação de mediadores inflamatórios, como IL-1β (interleucina 1 beta); também diminuiu a ativação de COX-2 (ciclooxigenase 2) atenuando o processo inflamatório.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.M.; NOBRE, H.V. JR.; MACÊDO, D.S.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.; CUNHA, G.M.; SOUSA, F.C.; VIANA, G.S. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 84, n.3, p.415-419, 2006.
- ANTONIO, A. M.; DRUSE, M. J. Antioxidants prevent ethanol-associated apoptosis in fetal rhombencephalic neurons. **Brain Res.**, v. 14, n. 1204, p. 16-23, 2008.
- ARIMOTO, T.; BING, G. Up-regulation of inducible nitric oxide synthase in the substantia nigra by lipopolysaccharide causes microglial activation and neurodegeneration. **Neurobiol Dis.**, v. 12, p. 35-45, 2003.
- ARULKUMARAN, N.; UNWIN, R.J.; TAM, F.W. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. **Expert Opin Investig Drugs.**, v. 20, n. 7, p. 897-915, 2011.
- BAGLIO, F.; BLASI, V.; FALINI, A.; FARINA, E.; MANTOVANI, F.; OLIVOTTO, F.; SCOTTI, G.; NEMNI, R.; BOZZALI, M. Functional brain changes in early Parkinson's disease during motor response and motor inhibition. **Neurobiology of Aging.**, v. 32, p. 115-124, 2011.
- BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the *in vivo* evidence. **Nature Reviews/Drug Discovery.**, v. 5, p. 493-506, 2006.
- BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 325-332, 2001.
- BETARBET, R. ; SHERER, T.B.; DI MONTE, D.A. ; GREENAMYRE, J.T. Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. **Brain Pathol.**, v.12, p.499-510, 2002.
- BHAT, K.P.L.; KOSMEDER II, J.W.; PEZZUTO, J.M. Biological Effects of Resveratrol. **Antioxidants & Redox Signaling.**, v.3, n. 6, p.1041-1064, 2001.
- BLANDINI, F.; NAPPI, G.; TASSORELLI, C.; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** v.62(1). p. 63-88. 2000.
- 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.
- BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, p. 135-172, 2001.
- BLUM-DEGEN, D.; MULLER, T.; KUHN, W.; GERLACH, M.; PRZUNTEK, H.; RIEDERER, P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. **Neurosci Lett.**, v.29; p. 17-20, 1995.

BORTOLANZA, M.; CAVALCANTI-KIWIATKOSKI, R.; PADOVAN-NETO, F. E.; DA-SILVA, C. A.; MITKOVSKI, M.; RAISMAN-VOZARI, R; DEL-BEL, E. Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*. v. 73, p. 377-387, 2015.

BRAAK, H.; GHEBREMEDHIN, E.; RUB, U.; BRATZKE, H.; DEL TREDICE, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**. v. 318. p. 121–134. 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

BREDESEN, D.E. Neural apoptosis, **Ann. Neurol.**, v. 38, p. 679–686, 2004.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **Br J Psychol.**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 1957.

CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; GUBELLINI, P.; MARFIA, G.A.; PISANI, A.; SANCESARIO, G.; BERNARDI, G. Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. **Prog Neurobiol.**, v. 61, n.3, p.231-265, 2000.

CARMO, M. R. S.; MENEZES, A. P. F.; NUNES, A. C. L.; PLIÁSSOVA, A.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M.; CUNHA, R. A.; CANA, P. M.; ANDRADE, G. M. The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. *Neuropharmacology*, v. 81, p. 142-152, 2014.

CARR, W.J.; YEE, L.; GABLE, D.; MARASCO, E. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 90, p. 821–828, 1976.

CASAS, S.; GARCIA, S.; CABRERA, R.; NANFARO, F.; ESCUDERO, C.; YUNES, R. Progesterone prevents depression-like behavior in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in male rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.**, v. 99, p. 614–618, 2011.

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

COLE, S.A.; WOODARD, J.L.; JUNCOS, J.L.; KOGOS, J.L.; YOUNGSTROM, E.A.; WATTS, R.L. Depression and disability in Parkinson's disease **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.**, v.8, p.20-25, 1996.

CORIOLOANO, M.G.W.S.; SILVA, E.G.; FORTUNA, E.S.; ASANO, A.; MONTEIRO, D.; LINS, O.G. Epidemiological profile of patients with Parkinson's disease (PD) IN THE Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco. *Neurobiologia*, v. 76, n. 1-2, p. 19-27, 2013.

CORVOL, J. C.; STUDLER, J. M.; SCHONN, J. S.; GIRAULT, J. A.; HERVÉ, D. Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. **J Neurochem**, v. 76, p. 1585–1588, 2001.

CSISZAR, A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. **NIH Public Access**, v. 1215, p. 117-122. 2011.

CUELLO, A. C.; IVERSEN, L. L.; IVERSEN, S. D.; SNYDER, S. H. Immunocytochemical studies of the distribution of neurotransmitters and related substance in CNS. **In Handbook of Psychopharmacology**, v. 9, p. 69-137, 1978.

Da CUNHA et al. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioural Brain Research**. v. 189. p. 364–372. 2008.

DAMIANI, D. Mecanismos da Apoptose. **Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica 2004**. www.sistemanervoso.com.

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

DE ALMEIDA, L. M.; PIÑEIRO, C. C.; LEITE, M. C.; BROLESE, G.; TRAMONTINA, F.; FEOLI, A. M.; GOTTFRIED, C.; GONÇALVES, C.A. Resveratrol increases glutamate uptake, glutathione content, and S100B secretion in cortical astrocyte cultures. **Cell Mol Neurobiol**. v. 27, n. 5, p. 661-8, 2007.

DELAMARRE, A.; MEISSNER, W. G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. **La Presse Médicale**., v. 46, p. 175–181. 2017

DELLA-MORTE, D., DAVE, K.R., DEFAZIO, R.A., BAO, Y.C., RAVAL, A.P., PEREZ-PINZON, M.A. Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin 1-uncoupling protein 2 pathway. **Neuroscience**, 31 . V.159, p. 993-1002, 2009.

DELGADO-ALVARADO, M. *et al.*, Tau/a-Synuclein Ratio and Inflammatory Proteins in Parkinson's Disease: An Exploratory Study. **Movement Disorders**. v. 00. n.00. 2017.

DeNOBLE, V.J.; REPETTI, S.J.; GELPKE, L.W.; WOOD, L.M.; KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 1123-1128, 1986.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Review. Exp Neuro**, v.175, p.303-317,. 2002.



DORSEY, E. R. *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384-386, 2007.

DOTY, R.L.; BROMLEY, S.M.; STERN, M. Olfactory testing as an aid in the diagnosis of Parkinson's disease: development of optimal discrimination criteria. **Neurodegeneration**, v. 4, p 93-97, 1995.

DOTY, R.L.; DEEMS, D.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: A general deficit unrelated to neurologic signs, disease state, or disease duration. **Neurology**, v. 38, p. 1237-1244, 1988.

DOTY, R.L.; STERN, M.B.; PFEIFFER, C.; GOLLOMP, S.M.; HURTIG, H.I. Bilateral olfactory dysfunction in early stage treated and untreated idiopathic Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 55, p. 138-142, 1992.

DUNHAM, M. W.; MIYA, T. S. A note of a simple apparatus detecting neurological deficit in rats and mice. **J Am Pharm Sci.**, v. 46, p. 208-209, 1957.

ELBAZ, A.; CARCAILLON, L.; KAB, S.; MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **RevueNeurologique.**, v. 172, n. 1, p. 14-26, 2015.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, p. 121-143, 2004.

FAHN, S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. **AnnNeurol**, v. 47, p. S2-9-11, 2000.

FEARNLEY, J.M.; LEES, A.J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain.**, v.114, p. 2283-2301, 1991.

FERNANDEZ ESPEJO, E. Prefrontocortical Dopamine Loss in Rats Delays Long- Term Extinction of Contextual Conditioned Fear, and Reduces Social Interaction Without Affecting Short-Term Social Interaction memory. **Neuropsychopharmacology**, v.28, p. 490-498, 2003.

FINSTERER, J.; FÖLDY, D.; FERTL, E. Topiramate resolves headache from pseudotumor cerebri. **J Pain Symptom Manage.**, v. 32, n. 5, p. 401-2, 2006.

FOSTER, E. R.; McDANIEL M. A.; RENDELL, P. G. Improving Prospective Memory in Persons With Parkinson Disease: A Randomized Controlled Trial. **Neurorehabil Neural Repair**. v. 31(5). p. 451-461. 2017.

FONSECA-KELLY, Z.; NASSRALLAH, M.; URIBE, J.; KHAN, S. R.; DINE, K.; DUTT, M.; SHINDLER, K. Resveratrol neuroprotection in achronic mouse model of multiple sclerosis. **Frontiers in Neurology.**, v. 3, art. 84, p. 1-9, 2012.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life sci.**, v.66, p. 663-673, 2000.

GABALLAH, H. H.; ZAKARIA, S. S.; ELBATSH, M. M.; TAHOON, N. M. Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat model of rotenone-induced Parkinson's disease. **Chemico-Biological Interactions**. v. 251. p. 10-16. 2016.

GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of Parkinsonism. Invited review. **Clinical Neurophysiology**, v.119, p.1459–1474, 2008.

GAO, X. M.; ELMER, G. I.; ADMS-HUET, B.; TAMMINGA, C. A. Social memory in mice: Disruption with an NMDA antagonist and attenuation with antipsychotic drugs Pharmacology. **Biochemistry and Behavior**., v. 92, p. 236–242, 2009.

GEORGIOPOULOS *et al.* Olfactory Impairment in Parkinson's Disease Studied with Diffusion Tensor and Magnetization Transfer Imaging. **J Parkinsons Dis**. v. 7(2). p.301-311. 2017.

GHADERY ,C.; KOSHIMORI, Y.; COAKELEY, S.; HARRIS, M.; RUSJAN, P.; KIM, J.; HOULE, S.; STRAFELLA, A.P. Microglial activation in Parkinson's disease using [18F]-FEPPA. **J Neuroinflammation**., v. 14, n. 1, p. 8, 2017.

GIOVANNI, A.; SIEBER, B.A.; HEIKKILA, R.E.; SONSALLA, P.K. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1. Systemic administration. **Journal of Pharmacology Experimental Therapy**., v.270, p.1000-1007, 1994.

GONÇALVES, M. Doença de Parkinson e transtornos depressivos. **Psiquiatria na Prática Médica**. v. 17. n. 6. 2012.

GODEIRO JUNIOR, C.O.; AGUIAR, P.M.C.; FELIZ, A.C.; FERRAZ, H.B.. Mitochondria and Parkinson's Disease: genetic contributions to understanding the pathogenic process. **Einstein**, v.2, p. 177-181, 2007.

GOLPICH *et al.* Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3  $\beta$ ) signaling: Implications for Parkinson's disease. **Pharmacological Research**. v. 97. p.16–26. 2015.

GOTZ, M. E., DOUBLE, K., GERLACH, M., YODIM, M. B., AND RIEDERER, P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1012, p.193–208, 2004.

GRANZOTTO, A.; ZATTA, P. Resveratrol and Alzheimer's disease: message in a bottle on red wine and cognition. **Front Aging Neurosci**. v. 14. p. 6:95. 2014.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase3beta in cellular signaling, **Prog. Neurobiol**. v. 65. p. 391–426. 2001.

GROENEWEGEN, H.J. The basal ganglia and motor control. **Neural Plast.**, v.10, n.1-2, p.107-120, 2003.

GRIMES, C. A.; JOPE, R. S. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase3beta in cellular signaling, **Prog. Neurobiol.** v. 65. p. 391–426. 2001.

GRUNBLATT, E.; MANDEL, S.; JACOB-HIRSCH, J.; ZELIGSON, S.; AMARIGLO, N.; RECHAVI, G.; LI, J.; RAVID, R.; ROGGENDORF, W.; RIEDERER, P.; YODIM, M.B. Gene expression profiling of parkinsonian substantia nigra pars compacta; alterations in ubiquitin-proteasome, heat shock protein, iron and oxidative stress regulated proteins, cell adhesion/cellular matrix and vesicle trafficking genes. **J Neural Transm.**, v.111. p.73, 2004.

GU, M.; COOPER, J.M.; TAANMAN, J.W.; SCHAPIRA, A.H. Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, v.44, p.177–186, 1998.

HARIKUMAR, K. B.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic disease. **Cell Cycle.**, v. 7, p. 1020-1035, 2008.

HART, R.G.; PEARCE, L.A.; RAVINA, B.M.; YALTHO, T.C.; MARLER, J.R. Neuroprotection Trials in Parkinson's Disease: Systematic Review. **Mov Disord.**, v. 24, n.5, p.647-654, 2009.

HATTORIA, N.; WANGA, M.; TAKA, H.; FUJIMURA, T.; YORITAKA, A.; KUBO, S.; MOCHIZUKI, H. Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease. **Parkinsonism. Relat Disord.**, v. 15, p. 35-38, 2009.

HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; DANIEL, S.E. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 62, p. 436-446, 1997.

HAWKES, C.H.; SHEPHARD, B.C.; GEDDES, J.F.; BODY, G.D.; MARTIN, J.E. Olfactory disorder in motor neuron disease. **Exp. Neurol.**, v. 150, p. 248–253, 1998.

HENDERSON et al. Unbiased proteomics of early Lewy body formation model implicates active microtubule affinity-regulating kinases (MARKs) in synucleinopathies. **J Neurosci.** v. 17. p. 2705-16. 2017.

HEUMANN, R.; MORTALLA, R.; HERRERO, M. T.; CHAKRABARTY, K. *et al.*. Dyskinesia in Parkinson's disease: mechanisms and current non-pharmacological interventions. **J. Neurochem.** v. 130, p. 472–489, 2014.

HIRSCH, E. C., HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurol.**, v. 8, p. 382-397, 2009.

HIRSCH, E.C.; HOGLINGER, G.; ROUSSELET, E.; BREIDERT, T.; PARAIN, HRITCU, L.; CIOBICA, A.; ARTENIE, V. Effects of right unilateral 6-hydroxydopamine infusion-induced memory impairment and oxidative stress: relevance for Parkinson's disease. **Cent Eur J Biol.**, v.3, p.250-257, 2008.

- HUGHES, T.A.; ROSS, H.F.; MUSA, S.; BHATTACHERJEE, S.; NATHAN, R.N.; MINDHAM, R.H.; SPOKES, E.G. A 10-year study of the incidence of and factors predicting dementia in Parkinson's disease. **Neurology.**, v.25, p.1596-1602, 2000.
- IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research.**, v.162, p.1-10, 2005.
- JANG, J. H.; SURH, Y. J. Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death. **Free Radic Biol Med.**, v. 15, n. 34, p. 1100-10. 2003.
- JHA, S. K. et al. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades in Parkinson's Disease. **Int J Mol Cell Med Spring.** v. 4, n° 2, p. 67-86. 2015.
- JENNER, P. M. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature Reviews**, v. 9, p. 665-677, 2008.
- JENNER, P. M. Wearing Off, dyskinesia, and the use of continuous drug delivery in Parkinson's disease. **NeurolClin**, v. 31, p. s17-35, 2013.
- JHA et al. p38 MAPK and PI3K/AKT Signalling Cascades in Parkinson's Disease. **Int J Mol Cell Med Spring.** v. 4. n. 2. p.67-86 .2015
- KASTEN, *et al.* Depression and Quality of Life in Monogenic Compared to Idiopathic, Early-Onset Parkinson's Disease. **Movement Disorders.**, v.000, n. 000, 2012.
- KAUR, D.; ANDERSEN, J. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? **Ageing Research Reviews.**, v. 3, p. 327–343. 2004.
- KLIVENYI, P.; VECSEI, L. Novel therapeutic strategies in Parkinson's disease. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 66, n. 2, p. 119-25, 2010.
- KONTINEN, V.K; KAUPPILA, T.; PAANANEN, S.; PERTOVAARA, A.; KALSO,E. Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. **Pain**, v.80, pp. 341–346, 1999.
- LANG, A.E.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. Part 1. **N Engl J Med.** v.339, p.1044-1053, 1998.
- LAVOIE, M. J., OSTASZEWSKI, B. L., WEIHOFEN, A., SCHLOSSMACHER, M. G., AND SELKOE, D. J. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. **Nat. Med.**, v. 11, p. 1214–1221, 2005.
- LEE et al. Relationship between dopamine deficit and the expression of depressive behavior resulted from alteration of serotonin system. **Synapse.** v. 69(9). p. 453-60. 2015.
- LEVY, O. A.; MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis.** v. 14. p. 478-500. 2009.

LI, D.; LIU, N.; ZHAO, L., TONG, L., KAWANO, H.; YAN, H.; LI, H. Protective effect of resveratrol against nigrostriatal pathway injury in striatum via JNK pathway. **Brain Research**. v. 1654. p. 1-8. 2017.

LIMA, L.O.; CARDOSO, F.; TEIXEIRA-SALMELA, L.F.; RODRIGUES-DE-PAULA, F. Work and power reduced in L-dopa naïve patients in the early-stages of Parkinson's disease. **Arq Neuropsiquiatr.**, v.74, n. 4, p. 287-92, 2016.

LÜ, J. M.; LIN, P.H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med.**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.

LU, K.T; KO, M.C; CHEN, B.Y; HUANG, J.C, HSIEH; C.W; LEE, M.C; CHIOU, R.Y; WUNG, B.S; PENG, C.H; YANG, Y.L. Neuroprotective effects of resveratrol on MPTP-induced neuron loss mediated by free radical scavenging. **J Agric Food Chem.**, v.56, p.6910-6913, 2008.

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.doi: 10.1155/2016/9832839.

MARTIN, L.J. Mitochondriopathy in Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. **J Neuropathol Exp Neurol.** v.65, p.1103-1110, 2006.

MCDONALD, W.M.; RICHARD, I.H.; DELONG, M.R. Prevalence, etiology, and treatment of depression in Parkinson's disease. **Biol Psychiatry.** v.54, p. 363-375, 2003.

MENESES, M.S., TEIVE, H. A. G. *Doença de Parkinson*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 348 p. 2003.

MENEZES, Ana Paula Fontenele. **Efeitos da curcumina e do resveratrol em ratos com parkinsonismo experimental induzido por 6-hidroxidopamina: um estudo comportamental e neuroquímico**. 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MESHOLAM, R.I.; MOBERG, P.J.; MAHR, R.N.; DOTY, R.L. Olfaction in neurodegenerative disease: a meta-analysis of olfactory functioning in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Arch. Neurol.**, v. 55, p. 84-90, 1998.

MIDDLETON, F.A.; STRICK, P.L. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. **Brain Res Ver.**, v.31, p.236–250. 2000.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, S.; CAMPLESSEI, M.; SILVEIRA, R.; TAKAHASHI, R.N.; DA CUNHA, C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced mesencephalic dopaminergic lesions. **Brain Research Bulletin.**, v. 58, n. 1, p. 41-47, 2002.

- MOBERG, P.J.; PEARLSON, G.D.; SPEEDIE, L.J.; LIPSEY, J.R.; STRAUSS, M.E.; FOLSTEIN, S. E. Olfactory recognition: differential impairments in early and late Huntington's and Alzheimer's disease. **J. Clin. Exp. Neuropsychol.**, v. 9, p. 650-664, 1987.
- MORAES, C.T.; SCHON, E. A. Detection and analysis of mitochondrial DNA and RNA in muscle by in situ hybridization and single-fiber PCR. **Methods Enzymol.** v. 264, p. 522-40, 1996.
- MORIGUCHI, S.; YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. **Journal of Neurochemistry.**, v. 120, p.541-551, 2012.
- MORRIS, M.E. Movement Disorders in people with Parkinson disease: A model for physical therapy. **Phys Ther.**, v.80, n.6, p.578-597, 2000.
- MUANGPAISAN, W.; HORI, H.; BRAYNE, C. Systematic review of the prevalence and incidence of Parkinson's disease in Asia. **J Epidemiol.** v.19, n.6, p.281-293, 2009.
- MULLER-HOCKER, J. Mitochondria and ageing. **Brain Pathol.**, v.2, p.149-58, 1992.
- NEVES, K.R.; NOBRE, H.V. JR.; LEAL, L.K.; DE ANDRADE, G.M.; BRITO, G.A.; VIANA, G.S. Pentoxifylline Neuroprotective Effects Are Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and TNF-Alpha Inhibitory Properties, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Parkinsons Dis.**, v. 2015, p. 108179, 2015.
- NUSSBAUM, R. L.; ELLIS, C. E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Engl J Med.**, v. 348, p. 1356–1364, 2003.
- ORENDAIN-JAIME, E. N.; ORTEGA-IBARRA, J. M.; LOPEZ-PEREZ, S. J. Evidence of sexual dimorphism in D1 and D2 dopaminergic receptors expression in frontal cortex and striatum of young rats. **Neurochemistry International.** v. 100. p. 62-66. 2016.
- PACKARD, M. G.; McGAUGH, J. L. Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. **Behav Neurosci.**, v. 106, n.3, p. 439-46, 1992.
- PAL, R.; MIRANDA, M.; NARAYAN, M. Nitrosative stress-induced Parkinsonian Lewy-like aggregates prevented through polyphenolic phytochemical analog intervention. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 404, p. 324–329, 2011.
- PALERMO, S.; BASTOS, I. C.C.; MENDES, M.F.X.; TAVARES, E.F.T.; SANTOS, D.C.L.; RIBEIRO, A.F. C. Avaliação e intervenção fonoaudiológica na doença de Parkinson. Análise clínica-epidemiológica de 32 pacientes. *Rev Bras Neurol*, v. 45, n. 4, p. 17-24, 2009
- PARKER, W.D. JR.; PARKS, J.K. Mitochondrial ND5 mutations in idiopathic Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v.326, n.3, p.667-669, 2005.
- PATHAK, R.U.; DAVEY, G .P. Complex I and energy thresholds in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1777, p. 777–782, 2008.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, London, 1986.

PEARCE, R.K.; OWEN, A.; DANIEL, S.; JENNER, P.; MARSDEN, C.D. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. **J Neural Transm.**, v. 104, p.661-677, 1997.

PEARCE, R.K.B.; HAWKES, C.H.; DANIEL, S.E. The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, v. 10, p. 283-287, 1995.

PERESE, D. A.; ULMAN, J.; VIOLA, J.; EWING, S. E.; BANKIEWICZ, K.S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Research.** v. 494, p. 285-293, 1989.

POLETTI, M.; BONUCCELLI, U. Impulse control disorders in Parkinson' disease: the role of personality and cognitive status. **J Neurol.**, v. 12, p. 6506-6, 2012.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol.**, v.47, n.4, p. 379-391, 1978.

PREDIGER, R. D. S.; AGUIAR Jr, S. A.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; FIGUEIREDO, C. P.; MATHEUS, F. C.; GINESTET, L.; CHEVARIN, C.; DEL BEL, E.; MONGEAU, R.; HAMON, M.; LANFUMEY, L.; RAISMAN-VOZARI, R. Single Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase of Parkinson's Disease. **Neurotox Res.** v. 17. p. 114–129. 2010.

PREDIGER, R.D.S.; BATISTA, L.C.; TAKAHASHI, R.N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors. **Neurobiol. Aging.**, v. 26, p. 957-964, 2005a.

PREDIGER, R.D.S.; FERNANDES, D.; TAKAHASHI, R.N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. **Behav. Brain Res.**, v. 159, p. 197-205, 2005b.

PRESCOTT, I.A. Synaptic plasticity in basal ganglia output neurons in parkinson's disease patients. **Thesis. Master of Science.** Department of Physiology, University of Toronto. 2009.

RANGEL-BARAJAS, C.; CORONEL, I.; FLORAN, B. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. **Aging and Disease.** v. 6. n. 5. p. 349-368. 2015. 2015.

QUINN, N.P.; ROSSOR, M.N.; MARSDEN, C.D. Olfactory threshold in Parkinson's disease. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, v. 50, p. 88-89, 1987.

RACHAKONDA, V.; PAN, T. H.; LE, W. D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they? **Cell Res.** v.14, n.5, p.347-358. 2004. Review.

RAH, U. W.; BAIK, J. S.; JANG, S. H.; PARK, D. S. Development of the Korean Academy of Medical Sciences Guideline for rating the impairment in the brain injured and brain diseased persons with motor dysfunction. **Korean Academy of Medical Sciences.**, v. 24, p. S247-51, 2009.

READER, A.; DEWAR, K.M. Effects of denervation and hyperinnervation on dopamine and serotonin systems in the rat neostriatum: implications for human **Parkinson's disease**, **Neurochem Int.**, v. 34, p. 1–21, 1999.

ROCCARO, A. M.; LELEU, X.; SACCO, A.; MOREAU, A. S.; HATJIHARISSI, E.; JIA, X.; XU, L.; CICCARELLI, B.; PATTERSON, C. J.; NGO, H. T.; RUSSO, D.; VACCA, A.; DAMMACCO, F.; ANDERSON, K. C.; GHOBRIAL, I. M.; TREON, S. P. Resveratrol Exerts Antiproliferative Activity and Induces Apoptosis in Waldenstrom's Macroglobulinemia. **Clin. Cancer Res.**, v. 14, n. 6, p. 1849-1858, 2008.

ROSIN, B.; NEVET, A.; ELIAS, S.; RIVLIN-ETZIONA, M.; ISRAEL, Z.; BERGMAN, H. Physiology and pathophysiology of the basal ganglia–thalamo–cortical networks. **Parkinsonism and Related Disorders.**, v.13, p. 437–439, 2007.

SANTENS, P.; BOON, P.; VAN ROOST, D; CAEMAERT, J. The pathophysiology of motor symptoms in Parkinson's disease. **Acta neurol.belg.**, v.103, p.129-134, 2003.

SCHALLERT, T.; WOODLEE, M.T.; FLEMING, S.M. Disentangling multiple types of recovery from brain injury. In: Krieglstein, J., Klumpp, S. (Eds.), *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. **Medpharm Scientific Publishers**, Stuttgart. 2002.

SCHAPIRA, A.H. Neuroprotection in PD- a role for dopamine agonists? **Neurology**. v.61, n.6, p.34–42. 2003.

SCHEFFER, I. E. Mitochondria: make a come back. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 49, p.3-26, 2001.

SCHMATZ, R., MAZZANTI, C.M., SPANEVELLO, R., STEFANELLO, N., GUTIERRES, J., CORRÊA, M., DA ROSA, M.M., RUBIN, M.A., CHITOLINA SCHETINGER, M.R.; MORSCH, V.M. Resveratrol prevents memory deficits and the increase in acetylcholinesterase activity in streptozotocin-induced diabetic rats. **Eur J Pharmacol.**, v.610, n 1-3, p.42-48, 2009.

SCHMUED, L.C.; STOWERS, C.C.; SCALLET, A.C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res.**, v. 1035, n. 1, p. 24-31, 2005.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease. 6-OHDA and MPTP **Cell Tissue Res.**, v. 318, p. 215–224, 2004.

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



SCHWARZ, T.; SCHWARZ, A. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced immunosuppression. **European Journal of Cell Biology.**, v. 90, p. 560–564, 2011.

SHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res.**, v. 318, p. 215–224, 2004.

SINGH, N. et al. Role of PGE2 EP1 receptor in intracerebral hemorrhage induced brain injury. **Neurotox Res.**, v. 24, n° 4, p. 549–559, 2013.

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

SOFFIÉ, M.; LAMBERTY, Y. Scopolamine effects on juvenile conspecific recognition in rats: possible interaction with olfactory sensitivity. **Behav. Process.**, v. 17, p. 181-90, 1988.

SOLEAS, G.J; DIAMANDIS, E.P; GOLDBERG, D.M. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry.**, v.30, p.91-113, 1997.

SONG et al. Anti-Parkinsonian drug discovery from herbal medicines: what have we got from neurotoxic models? **J Ethnopharmacol.** v. 139(3). p. 698-711. 2012.

SPIVEY, A. Rotenone and paraquat linked to Parkinson's disease: human exposure study supports years of animal studies. **Environ Health Perspect.**, v. 119, n. 6, p. A259, 2011.

STARKSTEIN, S.E.; PREZIOSI, T.J.; FORRESTER; A.W.; ROBINSON, R.G.. Specificity of affective and autonomic symptoms of depression in Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.53, p.869-870, 1990.

STOOF, J.C.; KEBABIAN, J.W. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. **Nature.**, v. 294, n. 5839, p. 366-368, 1981.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; CUNHA, C. DA; TAKAHASHI, R. N. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v. 156, p. 830–840, 2008.

TAKAOKA, M. J. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil). **J. Faculty Sci Hokkaido Imperial University.**, v. 3, p. 1-16, 1940.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiology of Disease.**, v. 37, p. 510–518, 2010.

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.

TEPPER, J. M.; ABERCROMBIE, E.D.; BOLAM, J.P. Basal ganglia macrocircuits. **Progress in Brain Research.**, v.160, 2007.

TSAI, M-H.; HSU, L-F.; LEE, C-W.; CHIANG, Y-C.; LEE, M-H.; HOW, J-M.; WU, C-M.; HUANG, C-L.; LEE, I-T. Resveratrol inhibits urban particulate matter-induced COX-2/PGE2 release in human fibroblast-like synoviocytes via the inhibition of activation of NADPH oxidase/ROS/NF-Kb. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology.** v. 88. p. 113–123. 2017.

TYSNES, O.B.; STORSTEIN, A.; Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna).** 2017. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.** v. 5, p.107–110, 1968.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. Quantitative recording of rotational behaviour in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Res.** v. 24, p. 485–493, 1970.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v.39, p. 44-84, 2007.

WALDMEIER, P. C.; TATTON, W. G. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease:

WANG, J.; HO, L.; ZHAO, Z.; SEROR, I.; HUMALA, N.; DICKSTEIN, D. L.; THIYAGARAJAN, M.; PERCIVAL, S. S.; TALCOTT, S. T.; PASINETTI, G. M. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates A<sub>β</sub> neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **The FASEB Journal.**, v. 20, p. 2313-2320, 2006.

WEINTRAUB, D.; COMELLA, C.L.; HORN, S. Parkinson's disease-Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. **Am J Manag Care.**, v.14, p. 40-48, 2008.

WENNING, G.K.; SHEPHARD, B.; HAWKES, C.; PETRUCKEVITCH, A.; LEES, A.; QUINN, N. Olfactory function in atypical parkinsonian syndromes. **Acta Neurol. Scand.**, v. 91, p. 247-250, 1995.

WHITE, D.K., WAGENAAR, R.C., ELLIS, T.D., TICKLE-DEGNEN, L. Changes in walking activity and endurance following rehabilitation for people with Parkinson disease. **Arch Phys Med Rehabil.**, v.90, n. 1, p.43-50, 2009.

WILLIS, A. W.; SCHOOTMAN, M.; EVANOFF, B.A.; PERLMUTTER, J. S.; RACETTE, B. A. Neurologist care in Parkinson disease: a utilization, outcomes, and survival study. **Neurology.**, v. 30, n. 77, p. 851-7, 2011.

WOODLEE, M. T.; KANE, J. R.; CHANG, J.; CORMACK, L. K.; SCHALLERT, T. Enhanced function in the good forelimb of hemi-parkinson rats: Compensatory adaptation for contralateral postural instability? **Experimental Neurology.**, v. 211, n. 2, p. 511-7, 2008.

XU, Y.; STOKES, A. H.; ROSKOSKI, R.; J.R., AND VRANA, K. E. Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. **J. Neurosci. Res.**, v.54, p.691–697, 1998.

YOSHII, F. Pain and sensory disturbance in Parkinson disease. **Brain Nerve.**, v. 64, n. 4, p. 364-72, 2012.

YU, H.B.; PAN, C.E.; WU, W.J.; ZHAO, S.H.; ZHANG, H.F. Effects of resveratrol on matrix metalloproteinase-9 expression in hepatoma cells. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.** V.6, n. 3, p.270-273, 2008.

ZENG et al. Resveratrol attenuates MPP<sup>+</sup>-induced mitochondrial dysfunction and cell apoptosis via AKT/GSK-3<sub>β</sub> pathway in SN4741 cells. **Neuroscience Letters.** v. 637. p. 50–56. 2017.

ZHANG, K.; TARAZI, F.I.; DAVIDS, E.; BALDESSARINI, R.J. Plasticity of dopamine D4 receptors in rat forebrain: temporal association with motor hyperactivity following neonatal 6-hydroxydopamine lesioning. **Neuropsychopharmacology.**, v. 26, p.625-633, 2002.

ZHAO, X. Y.; LI, G. Y.; LUI, Y.; CHAI, L. M.; CHEN, J. X.; ZHANG, Y.; DU, Z. M.; LU, Y. J.; YANG, B. F. Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. **Br J Pharmacol.**, v. 154, n. 1, p. 105-13, 2008.

ZHUANG, X., BELLUSCIO, L., HEN, R. G(olf)α mediates dopamine D1 receptor signaling. **J Neurosci**, v. 20, n. 16, p. 91, 2000.

## ANEXO A



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

## DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 95/2013, sobre o projeto intitulado: **“ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO NEUROPROTETOR DO RESVERATROL EM RATOS PARKNSONIANOS LESIONADOS PELA 6-HIDROXIDOPAMINA”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 18 de março de 2013.

Fortaleza, 06 de maio de 2014

  
Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Profa. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar  
Coordenadora da CEPA/DFP/FAMED/UFC  
MAT. SIAPE 2166369