



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**FRANCISCO ARNALDO VIANA LIMA**

**EFEITO NEUROPROTETOR DA *SPIRULINA PLATENSIS* NO PARKISIONISMO  
EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA 6-OHDA.**

**FORTALEZA**

**2018**

FRANCISCO ARNALDO VIANA LIMA

EFEITO NEUROPROTETOR DA *SPIRULINA PLATENSIS* NO PARKISIONISMO  
EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA 6-OHDA.

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

Orientador: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

**FORTALEZA**

**2018**

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

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

---

L1e LIMA, FRANCISCO ARNALDO VIANA LIMA.  
EFEITO NEUROPROTETOR DA SPIRULINA PLATENSIS NO  
PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA 6-OHDA / FRANCISCO  
ARNALDO VIANA LIMA LIMA. – 2018.  
107 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2018. Orientação: Profa. Dra. GLAUCE SOCORRO DE BARROS VIANA.

1. DOENÇA DE PARKINSON. 2. NEUROINFLAMAÇÃO. 3. ESTRESSE OXIDATIVO. 4. SPIRULINA PLATENSIS. 5. 6-OHDA. I. Título.

CDD 615.1

---

FRANCISCO ARNALDO VIANA LIMA

EFEITO NEUROPROTETOR DA *SPIRULINA PLATENSIS* NO PARKISIONISMO  
EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA 6-OHDA.

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

Aprovada em: 27/04/2018.

BANCA EXAMINADORA

---

**Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana** (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

**Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal**  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

**Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**  
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

---

**Profa. Dra. Iana Bantim Felício Calou**  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

**À meus pais (*in memoriam*).**

**Meu pai, seu tanino e seu mel.**

**E em tudo a voz de minha mãe e a minha voz na dela...**

## **AGRADECIMENTOS**

A Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, por ter me dado à oportunidade de cursar o doutorado e por todos os ensinamentos. Muito obrigado pela excelente orientação e por ser exemplo de pesquisadora dedicada ao ensino e a pesquisa.

A Profa Geanne Matos de Andrade pela amizade e convívio desde o meu ingresso na UFC, quando ela ainda era uma estudante de doutorado e eu ainda nem cursava Farmácia, mas que sempre me tratou com atenção e respeito.

Aos professores participantes da banca examinadora Profa Dra Kalyne Leal, Prof. Dr. Antonio Carlos Pinheiro, Profa. Dra. Iana Bantim por ter se disponibilizado em participar desta avaliação e pelas valiosas colaborações e sugestões.

A técnica Vilani (Vila), pelo convívio e pela amizade ao longo de muitos anos e por toda ajuda nos experimentos.

Aos colegas do LNC, Analu, Ana Paula, Juliana Pereira, Jéssica, Thais, Mara, Marta, Kelly Rose, Amanda, Priscila, Albert, Patrícia, Emerson, Neila, pelo convívio diário, pela ajuda nos experimentos, e pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

E por fim a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a concretização deste trabalho. O meu eterno agradecimento.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq , pelo suporte financeiro.

“Onde não puderes amar. Não te demores.”

Frida Kahlo

## RESUMO

### EFEITO NEUROPROTETOR DA *SPIRULINA PLATENSIS* NO PARKISIONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO PELA 6-OHDA.

A doença de Parkinson (DP) é um distúrbio neurodegenerativo do movimento afetando 1% da população na faixa etária de 65 anos, caracterizada pela degeneração dos neurônios nigroestriatais dopaminérgicos na substância negra pars compacta. O tratamento atual da DP está restrito ao alívio sintomático, e até o presente momento não existem agentes capazes de diminuir a degeneração neuronal. A *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) (SPI) é uma cianobactéria que pode conter até 74% de proteínas, apresentando ações anti-inflamatórias e antioxidantes. Considerando a importância da inflamação e do estresse oxidativo na doença de Parkinson (DP), os possíveis efeitos neuroprotetores SPI foram avaliados em um modelo de DP. Ratos *Wistar* machos foram divididos em: Falso operado (FO), 6-OHDA não tratado e 6-OHDA tratados com SPI (25 e 50 mg/kg, v.o.). A neurotoxina foi injetada no estriado direito através de cirurgia estereotáxica e os tratamentos com a SPI começaram 2 h depois da cirurgia com duração de 18 dias. FO e o grupo lesionado com 6-OHDA foram tratados apenas com água destilada, durante o mesmo período. Decorridos 15 (quinze) dias após a cirurgia, todos os animais foram submetidos a testes comportamentais; após os testes foram eutanasiados por decaptação para dissecação das seguintes áreas cerebrais: estriado direito (lesionado) e estriado esquerdo para a realização das análises neuroquímicas e bioquímicas ou perfundidos para os ensaios de imuno-histoquímica. A SPI (25 e 50 mg/kg) reduziu o comportamento rotacional induzido pela apomorfina, houve aumento dos níveis de DA e DOPAC e diminuição dos níveis de nitrito e TBARS. Além disso, as imunoreatividades para iNOS, COX-2 e GSK<sub>3</sub>β no estriado lesionado não tratado foram diminuídas significativamente após o tratamento com a SPI comparando com o grupo não tratado. A imunomarcagem para TH, DAT, SOD-2 foram aumentadas após o tratamento com a SPI no estriado lesionado, assim como a morte neuronal foi atenuada no estriado lesionado após o tratamento com a SPI como mostrou o teste histopatológico de coloração com o Fluoro-jade C. Em conclusão, mostramos que as alterações comportamentais e neuroquímicas em ratos hemiparkinsonianos foram significativamente revertidas pelo tratamento com a SPI, caracterizando o potencial neuroprotetor da *Spirulina* e estimulando estudos translacionais que dêem enfoque ao uso como um tratamento auxiliar para DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson, *Spirulina platensis*, Neuroinflamação, Estresse oxidativo, 6-OHDA.

## **NEUROPROTECTIVE EFFECT OF SPIRULINA PLATENSIS IN THE EXPERIMENTAL PARKINSONISM INDUCED BY 6-OHDA.**

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative movement disorder affecting 1% of the population in the 65-year age group, characterized by the degeneration of dopaminergic nigrostriatal neurons in the pars compacta substantia. The current treatment of PD is restricted to symptomatic relief, and to date there are no agents capable of reducing neuronal degeneration. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*) (SPI) is a cyanobacterium that can contain up to 74% of proteins, exhibiting anti-inflammatory and antioxidant actions. Considering the importance of inflammation and oxidative stress in Parkinson's disease (PD), the possible SPI neuroprotective effects were evaluated in a PD model. Male Wistar rats were divided into: False operated (FO), untreated 6-OHDA and 6-OHDA treated with SPI (25 and 50 mg / kg, v.o.). The neurotoxin was injected into the right striatum through stereotactic surgery and the treatments with SPI began 2 h after surgery lasting 18 days. FO and the 6-OHDA group were treated with distilled water only during the same period. After 15 (fifteen) days after surgery, all the animals were submitted to behavioral tests; after the tests were euthanized by decapitation for dissection of the following brain areas: right (injured) striatum and left striatum to perform the neurochemical and biochemical analyzes or perfused for the immunohistochemical assays. SPI (25 and 50 mg / kg) reduced the rotational behavior induced by apomorphine, increased levels of DA and DOPAC and decreased levels of nitrite and TBARS. In addition, the immunoreactivities for iNOS, COX-2 and GSK3 $\beta$  in the untreated injured striatum were significantly reduced after treatment with the SPI compared to the untreated group. Immunoblotting to TH, DAT, SOD-2 was increased following treatment with SPI in the injured striatum, as well as neuronal death was attenuated in the injured striatum after treatment with SPI as shown by histopathological staining with Fluoro-jade C. In conclusion, we have shown that behavioral and neurochemical changes in hemiparkinsonian rats were significantly reversed by treatment with SPI, characterizing the neuroprotective potential of *Spirulina* and stimulating translational studies that focus on the use as an adjunctive treatment for PD.

Key words: Parkinson's disease, *Spirulina platensis*, Neuroinflammation, Oxidative stress, 6-OHDA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Desenho esquemático mostrando o fluxo de dopamina no cérebro, neurônio normal e neurônio afetado pelo Parkinson.	16
Figura 2	– Desenho esquemático mostrando as conexões no cérebro normal e com doença de Parkinson	18
Figura 3	– Drogas utilizadas no tratamento da doença de Parkinson e seus mecanismos de ação	24
Figura 4	– Mecanismo hipotético da toxicidade da 6-OHDA	27
Figura 5	– Modelos experimentais da doença de Parkinson	28
Figura 6	– Foto da <i>Spirulina platensis</i>	30
Figura 7	– Teste da apomorfina	39
Figura 8	– Arena para o teste do campo aberto	40
Figura 9	– Cilindro para realização do teste do cilindro	41
Figura 10	– Arena do labirinto em Y	42
Figura 11	– Cilindro para realização do teste do nado forçado	43
Figura 12	– Número de rotações contralaterais induzidas pela Apomorfina em ratos parkinsonianos	50
Figura 13	– Gráfico do teste do campo aberto. A- Cruzamentos e B-Rearings	51
Figura 14	– Gráfico do número de toques durante do teste do cilindro	53
Figura 15	– Gráfico do número de alterações espontâneas corretas (Y-maze)	54
Figura 16	– Gráfico do tempo de imobilização no teste do nado forçado	55
Figura 17	A- Níveis de DA ( $\mu\text{g/g}$ de tecido) no estriado direito de animais com lesão estriatal por 6-OHDA B- Níveis de DOPAC ( $\mu\text{g/g}$ de tecido) no estriado direito de animais com lesão estriatal por 6-OHDA	56 57
Figura 18	– Dosagem dos níveis de peroxidação lipídica no estriado direito em ratos com lesão unilateral pela 6-OHDA expressas por MDA	58
Figura 19	– Níveis de nitrito/nitrato no estriado direito, em ratos com lesão unilateral pela 6-OHDA.	59
Figura 20	A- Fotomicrografias representativas da imunomarcagem para tirosina hidroxilase (TH) no estriado ipsilateral B- Densidade ótica da imunomarcagem para tirosina hidroxilase (TH) no	60

- estriado direito em ratos hemi-parkinsonianos
- Figura 21 A-Fotomicrografias representativas de imunomarcção para iNOS no 61  
estriado direito de ratos parkinsonianos  
B-Densidade ótica da imunomarcção para iNOS no estriado direito de  
ratos parkinsonianos
- Figura 22 A-Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para COX-2 no estriado direito 62  
de ratos hemi-parkinsonianos  
B- Densidade ótica de imunohistoquímica para COX-2 no estriado direito  
de ratos hemi-parkinsonianos
- Figura 23 A-Fotomicrografias representativas de imunomarcção para DAT no 63  
estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos  
B- Densidade ótica de imunohistoquímica para DAT no estriado direito de  
ratos parkinsonianos
- Figura 24 A-Fotomicrografias representativas de imunorreatividade para GSK<sub>3</sub> no 64  
estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos  
B- Densidade ótica de imunohistoquímica para GSK3 no estriado direito  
lesionado de ratos parkinsonianos
- Figura 25 A-Fotomicrografia da coloração por fluoro-jade C no estriado direito 65  
lesionado de ratos hemi-parkinsonianos  
B-Gráfico da densidade ótica da coloração por fluoro-jade C no estriado  
direito lesionado de ratos hemi-parkinsonianos
- Figura 26 A-Fotomicrografias da imunomarcção para SOD-2 no estriado direito 66  
lesionado de ratos hemi-parkinsonianos  
B-Número de células SOD-2 positivas no corpo estriado direito lesionado  
de ratos parkinsonianos
- Figura 27 Efeito da fração proteica da *Spirulina platensis* (FPS 1 e 5 mg/kg) sobre o 67  
tempo de lambadura da pata traseira direita na 1ª e 2ª fase no teste de  
formalina.
- Figura 28 Fotomicrografias (400x) e contagem de polimorfonucleares em 10 campos. 69

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais sintomas motores e não motores .....	18
Tabela 2 – Sítios das lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA .....	36
Tabela 3 – Protocolo experimental 1 .....	37
Tabela 4 – Protocolo experimental 2 .....	38
Tabela 5 – Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímicas. ....	44
Tabela 6 – Anticorpos secundários utilizados para imunohistoquímicas.....	45
Tabela 7 – Teor de resíduos sólidos, polifenóis totais e proteína total do extrato aquoso de <i>S.platensis</i> .....	49
Tabela 8 – Média $\pm$ EPM do número de toques no teste do cilindro.....	53
Tabela 9 – Níveis de DA e DOPAC em ratos parkinsonianos.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3T3	Linhagem celular
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AIF	<i>Apoptosis Inducing Factor</i> /Fator Indutor de apoptose
CD11b	Anticorpo marcador de microglia
COMT	Catecol-o-metil Transferase
COX2	Ciclooxigenase 2
CX3CR1	Receptor de fractalina
D1	Receptor de Dopamina 1
D2	Receptor de Dopamina 2
DA	Dopamina
DAT	Dopamine Transporter/Transportador de Dopamina
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EndoG	Endonuclease G
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GABA	Ácido g-aminobutírico
GFAP	Glial Fibrillary Acid Protein/ Proteína Ácida Fibilar Glial
Gpe	Globo pálido externo
Gpi	Globo pálido interno
GSH	Glutationa
GSK3	Glycogenio sintase quinase 3
HClO <sub>4</sub>	Ácido Perclórico
HDAC	Histona desacetilase
HDL	High Densyded Lipoprotein/Lipoproteína de Alta Densidade
HPLC	High Perfomance Liquid Cromatographic/Cromatografia Líquida de Alta Performance
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1	Interleucina -1
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase/ Óxido Nítrico Sintase Induzível
L-DOPA	L-3,4-dihidroxiphenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo

MAO-B	Monoamina Oxidase B
MDA	Malonil Dialdeído
MPTP	1-metil-4-phenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NeuN	Antígeno neuronal nuclear
NIH	National Institutes of Health/Instituto Nacional de Saúde
NO <sub>2</sub> /NO <sub>3</sub>	Nitrito/Nitrato
NST	Núcleo subtalâmico
PBS	Phosphate Buffer Saline/ Salina Tampão Fosfato
RL	Radical Livres
SH-SY5Y	Linhagem celular de neuroblastoma
SNpc	Substância Negra pars compacta
SOD	Superóxido dismutase
SPI	Spirulina
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances/Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TH	Tirosina Hidroxilase
TNFR	Tumor Necrosis Factor receptor/ Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor- alpha/Fator de Necrose Tumoral-alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Doença de Parkinson</b>	
<b>1.1.1</b>	<b>Epidemiologia .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Fisiopatologia .....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Patogênese da doença de Parkinson .....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.3.1</b>	<b>Estresse oxidativo na doença de parkinson.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.3.2</b>	<b>Inflamação na doença de parkinson.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1.3.3</b>	<b>Apoptose .....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Tratamentos para doença de Parkinson .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Modelos de doença de Parkinson in vitro: células SH-SY5Y .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.6</b>	<b>Modelos de doença de Parkinson in vivo .....</b>	<b>26</b>
<b>1.1.7</b>	<b>Neuroproteção e produtos naturais .....</b>	<b>32</b>
<b>1.2</b>	<b><i>Spirulina platensis</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Vitaminas presentes na <i>Spirulina platensis</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Constituintes bioativos da <i>Spirulina</i> .....</b>	<b>37</b>
<b>1.2.2.1</b>	<b>Ácido gama-linolênico .....</b>	<b>37</b>
<b>1.2.2.2</b>	<b>Ficocianina C e Ficocianobilina .....</b>	<b>37</b>
<b>1.2.2.3</b>	<b>Polifenóis .....</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>Relevância e Justificativa .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Drogas.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Cultivo da <i>Spirulina</i>.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Preparação do extrato aquoso da <i>Spirulina</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Determinação do conteúdo de polifenóis totais .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Determinação do conteúdo de proteínas totais.....</b>	<b>42</b>
<b>4.3</b>	<b>Cirurgia estereotáxica.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>Protocolo experimental .....</b>	<b>43</b>

4.5	Testes comportamentais.....	44
4.5.1	Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina.....	45
4.5.2	Teste do campo aberto .....	46
4.5.3	Teste do cilindro .....	47
4.5.4	Teste do labirinto em Y .....	48
4.5.5	Teste do nado forçado .....	49
4.6	Avaliação do estresse oxidativo .....	50
4.6.1	Determinação da peroxidação lipídica TBARS.....	51
4.6.2	Dosagem do nitrito .....	51
4.7	Avaliação imunohistopatológica.....	52
4.7.1	Imunohistologia para Tirosina hidroxilase .....	52
4.7.2	Imunohistologia para Transportador de dopamina.....	53
4.7.3	Imunohistologia para GSK3.....	53
4.7.4	Fluoro-Jade C .....	53
4.8	Imunohistoquímica para determinação da resposta inflamatória.....	53
4.8.1	Imunohistologia para COX2 e iNOS.....	53
4.9	Imunohistoquímica para determinação do estresse oxidativo.....	54
4.9.1	Imunohistoquímica para SOD2.....	54
4.10	Dosagem de monoaminas por HPLC.....	54
4.10	Análise estatística.....	54
5	RESULTADOS.....	56
5.1	Composição do extrato aquoso da <i>Spirulina platensis</i> .....	56
5.2	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos parkinsonianos.....	56
5.3	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre a atividade locomotora (Teste do campo aberto) em ratos parkinsonianos .....	58
5.4	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre a assimetria dos membros anteriores (Teste do Cilindro) em ratos parkinsonianos.....	60
5.5	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre o aprendizado e a memória operacional (Teste do labirinto em Y) em ratos parkinsonianos.....	61
5.6	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre a atividade depressiva (Teste do nado forçado) em ratos parkinsonianos .....	62
5.7	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis de monoaminas (DA e 63	

	DOPAC) em ratos parkinsonianos .....	
5.8	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) em ratos hemi-parkinsonianos .....	65
5.9	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis de nitrito/nitrato em ratos hemi-parkinsonianos .....	66
5.10	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre a morte neuronal avaliada através da imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) no corpo estriado de ratos hemi-parkinsonianos .....	67
5.11	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em ratos hemi-parkinsonianos .....	68
5.12	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis de ciclooxigenase 2 (COX2) em ratos hemi-parkinsonianos .....	69
5.13	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis do transportador de dopamina (DAT) em ratos parkinsonianos .....	70
5.14	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre os níveis de Glicogênio sintase kinase (GSK <sub>3</sub> ) em ratos parkinsonianos .....	71
5.15	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre a degeneração neuronal avaliado através da coloração por fluoro-jade C no estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos .....	73
5.16	Efeito da <i>Spirulina platensis</i> sobre a degeneração neuronal avaliado através da imunomarcção para SOD 2 no estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos.....	74
6	Discussão. ....	75
7	Considerações finais. ....	87
8	Conclusão.....	88
9	Referências... ..	89
	ANEXO A – Documento de aprovação do CEPA.....	106
	ANEXO B- Artigo publicado	107

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson

### 1.1.1 Epidemiologia

A doença de Parkinson (DP) é o mais comum distúrbio neurodegenerativo do movimento, afetando 1% da população na faixa etária de 65 anos, e aumentando para 4% - 5% na população acima de 85 anos (ERIKSEN, 2003). A causa da DP ainda é desconhecida e até o momento não se dispõem de tratamentos efetivos para evitar a degeneração dopaminérgica progressiva que ocorre com os pacientes acometidos com essa doença (CHOI *et al.*, 1993).

No Brasil, dados do CENSO 2000, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), revelam que 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 (AGUIAR *et al.*, 2008). Além disso, 36 mil novos casos surgem por ano no país. A patologia DP já ultrapassa 200.000 casos (Associação Brasil Parkinson), sendo a maior parte dos casos concentrada nas regiões Sudeste e Sul, que são responsáveis 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).

### 1.1.2 Fisiopatologia

A DP caracteriza-se clinicamente por tremor de repouso, acinesia, rigidez musculr, instabilidade e problemas posturais (WHITE *et al.*, 2009; MORIGUCHI *et al.*, 2012). Os sintomas motores da DP são o foco da farmacoterapia, contudo os sintomas não motores, como demência, psicose, ansiedade, distúrbios do sono, disfunção autonômica e distúrbios do humor, podem ser os aspectos mais incapacitantes, perturbadores e não compreendidos da doença (MACHT *et al.*, 2005; BAGLIO *et al.*, 2011).

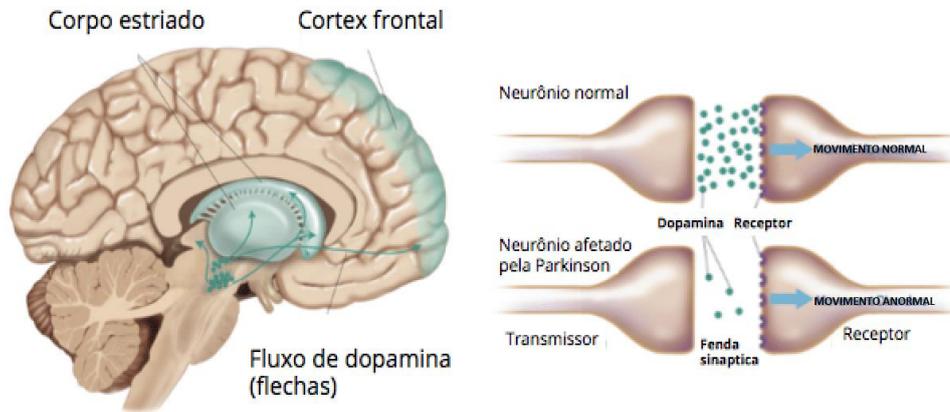
Morfologicamente, caracteriza-se por uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal, com a presença de corpúsculos de Lewy (inclusões da

proteína  $\alpha$ -sinucleína no citoplasma intraneural) na substância negra *pars compacta* (SNpc) e em outras estruturas cerebrais, tais como, no *locus cerulus*, núcleos da base, hipotálamo, córtex cerebral, núcleos motores dos nervos craniais e ainda em estruturas centrais e periféricas do sistema nervoso autonômico (SCHULZ;FALKENBURGER, 2004; PAL *et al.*, 2011). Os sintomas clássicos da doença de Parkinson manifestam-se após uma perda de 70-80% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, levando a uma grave redução nos níveis de dopamina estriatais. O diagnóstico definitivo da DP requer tanto a identificação desta neurodegeneração, quanto a presença dos corpúsculos de Lewy (LEVY *et al.*, 2009).

Enquanto a maioria dos casos de DP é de natureza idiopática, aproximadamente 10% dos casos são devidos a mutações genéticas (KELM-NELSON, *et al.*, 2018). Portanto a DP também pode ser de caráter genético/hereditário, e existem cerca de oito genes reconhecidos e relacionados à patologia, dos quais os mais importantes são a parkina e 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 de idade (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). Os componentes dos gânglios da base incluem além do corpo estriado (caudato e putamen) 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 gânglios 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. (Figura 1)

Figura 1 - Desenho esquemático mostrando o fluxo de dopamina no cérebro em um neurônio normal e outro afetado pela doença de Parkinson.



Fonte: <https://biosom.com.br/blog/saude/doenca-de-parkinson/>

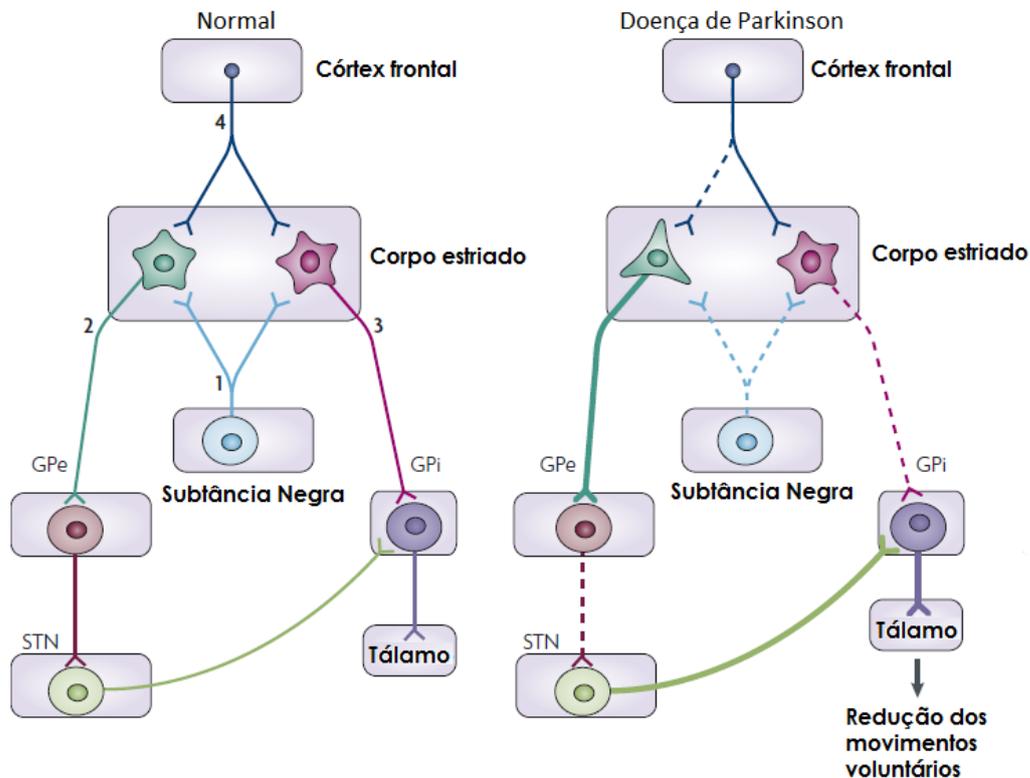
As estruturas dos gânglios da base formam circuitos paralelos que são divididos em alças motoras, associativas e límbicas, dependendo da função da área cortical envolvida (MIDDLETON & STRICK, 2000). O corpo estriado e o NST recebem aferências glutamatérgicas de áreas específicas do córtex cerebral ou 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 corpo estriado e o GPe/SNr está dividida em duas vias separadas: uma via direta e uma via indireta, através da intercalação do GPe e do NST. A via direta conecta diretamente o estriado aos núcleos de saída (GPi/SNr), e age facilitando o movimento pela desinibição do tálamo. A via indireta começa na projeção que vai do estriado ao GPe, segue então ao NST e só depois termina nos núcleos de saída (GPi/SNr) (GALVAN; WICHMANN, 2008).

Além das aferências corticais que chegam ao corpo estriado, existe outra projeção muito importante que é a via dopaminérgica nigro-estriatal. Essa projeção se inicia nos neurônios SNc, e termina diretamente nas projeções espinhais dendríticas dos neurônios médios espinhosos. São esses neurônios que dão origem à via direta e à via indireta. Nessa posição estratégica, a via nigro-estriatal é capaz de modular o afluxo de informações corticais que chegam aos neurônios de projeção no estriado. Assim, ela pode modular a atividade das vias direta e indireta. A dopamina, que é o neurotransmissor dessa via, atua como

neurotransmissor excitatório aos neurônios que vão formar a via direta, ligando-se aos receptores do tipo D1. Por outro lado, a dopamina é inibitória nos neurônios que vão formar a via indireta, ligando-se a receptores do tipo D2. Dessa forma, a via nigro-estriatal age facilitando o movimento, já que ela ativa a via direta e inibe a via indireta (GROENEWEGEN *et al.*, 2003).

Existem vários estudos acerca do papel da dopamina em nível estriatal, porém muitos aspectos ainda não foram compreendidos. Na DP, a degeneração de neurônios dopaminérgicos da SNpc inicia uma cascata de mudanças funcionais afetando todos os circuitos do gânglios da base. As alterações mais relevantes afetam o núcleo de saída do circuito, o globo pálido e a SNr, que se tornam hiperativos, levando a uma inibição excessiva dos sistemas motores tálamo-cortical e mesencefálico. Tal hiperatividade é sustentada pela entrada glutamatérgica acentuada que o núcleo de saída recebe do NST (CALABRESI *et al.*, 2000). A reduzida ativação dos receptores dopaminérgicos, causada pela deficiência de dopamina, resulta na inibição reduzida dos neurônios da via indireta e na diminuição da excitação dos neurônios da via direta. A redução da inibição da via indireta origina potente inibição do GPe, desinibição do NST e excitação aumentada dos neurônios do GPi e da SNr. Já a ativação diminuída da via direta causa redução de sua influência inibitória sobre o GPi e a SNr. O resultado final é uma ativação excessiva dos neurônios de saída dos gânglios da base, gerando excessiva inibição dos sistemas motores e ocasionando os prejuízos motores característicos da DP (SANTENS *et al.*, 2003). (Figura 2).

Figura 2- Desenho esquemático mostrando as conexões no cérebro normal e com Doença de Parkinson.



(1) Projeções dopaminérgicas oriundas da substância negra no mesencéfalo para o corpo estriado. (2) Projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o Globo Pálido externo, através da via indireta. (3) projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o Globo Pálido interno, através da via direta. (4) Projeções glutamatérgicas excitatórias advindas do córtex frontal. Adaptado de JENNER, 2008.

Os sinais cardinais da DP incluem tremor de descanso, lentidão de movimento, rigidez e instabilidade postural. No diagnóstico da doença, os sintomas são mais frequentemente unilaterais ou marcadamente assimétricos; eles se tornam mais pronunciados à medida que a doença progride e tornam-se uma fonte de deficiência motora. Uma variedade de sintomas não motores podem preceder os sintomas motores ou desenvolver ao longo da doença e incluem constipação, anosmia, depressão, psicose, disfunção cognitiva e demência (ELBAZ *et al.*, 2016).

Tabela 1- Principais sintomas não motores e sintomas motores

Sintomas não motores	Sintomas motores
Hiposmia	Bradicinesia
Prisão de ventre	Tremor de repouso
Comprometimento cognitivo	Instabilidade postural
Depressão	Rigidez

### **1.1.3 Patogênese da Doença de Parkinson**

Vários fatores têm sido implicados na patogênese da morte celular na DP. A origem da degeneração neuronal é desconhecida e provavelmente envolve muitos eventos celulares e moleculares, incluindo estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas, excitotoxicidade, processo inflamatório, mecanismos pró-apoptóticos e disfunção mitocondrial (NUSSBAUM; ELLIS, 2003).

#### **1.1.3.1 Estresse Oxidativo na DP**

O estresse oxidativo tem sido discutido como um importante contribuinte na patologia das doenças neurodegenerativas (CHEN *et al.*, 2009; TANSEY GOLDBERG, 2010). Uma das idéias relacionadas à patogênese da doença de Parkinson baseia-se na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequente início de estresse oxidativo, levando à lesão na substância negra *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 medeia a formação de 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), além de evidências de dano oxidativo a lipídeos, proteínas e DNA (PEARCE *et al.*, 1997).

Modelos experimentais de parkinsonismo com toxinas que inibem a função mitocondrial foram à 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 (SHIH *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 (GOTZ

*et al.*, 2004).

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma das responsáveis pelo sequestro de radicais livres, mais especificamente retirando o ânion superóxido com consequente formação de peróxido de hidrogênio (LU *et al.*, 2010). A SOD desempenha um papel importante na regulação da defesa antioxidante celular, catalisando a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Além disso, pode ser um iniciador de reações em cadeia de radicais livres, como a peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1989). Os ânions de superóxido também são conhecidos por reagir rapidamente para formar ânions de peroxinitrito que se decompõem para gerar espécies reativas ao radical hidroxilo (BECKMAN *et al.*, 1990). Os radicais de superóxido são capazes de inativar numerosas enzimas incluindo a NADH desidrogenase (complexo I da cadeia respiratória mitocondrial) (ZHANG *et al.*, 1990, CLEETER *et al.*, 1992). Foi relatado que o complexo I diminuiu em cérebros de pacientes com DP (MIZUNO *et al.*, 1989, SCHAPIRA *et al.*, 1989, HATTORI *et al.*, 1991).

A localização da enzima SOD2 e sua função celular tornam sua presença mais crítica para doenças neurodegenerativas do que as demais isoformas de superóxido dismutase encontradas em mamíferos. A localização da enzima determina a fonte particular de superóxido que cada isoforma atua contra nos tecidos neuronais. Por exemplo, a SOD3 é secretada na matriz extracelular na maioria dos tecidos, incluindo o sistema nervoso central (STRALIN *et al.*, 1995). Embora esta enzima não esteja diretamente localizada dentro da célula, ela pode participar da regulação metabólica das células no sistema nervoso central alterando o tônus vascular e o fluxo sanguíneo para o cérebro. Da mesma forma, a SOD1 também pode desempenhar um papel importante na prevenção de danos ao sistema nervoso central com sua localização citoplasmática (CRAPO *et al.*, 1992) e, em menor medida, no espaço intermembranar mitocondrial onde também pode ser encontrado (STURTZ *et al.*, 2001; OKADO-MATSUMOTO e FRIDOVICH, 2001).

#### *1.1.3.2 Inflamação na Doença de Parkinson*

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).

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 da microglia ativada no processo neurodegenerativo. Se essa ativação microglial protege ou exacerba a perda neuronal ainda é assunto de debate, embora a maioria das evidências sugere que ela exerce efeitos tóxicos para os neurônios. (HIRSCH *et al.*, 2003).

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). A COX-2 é regulada no SNC sob condições fisiopatológicas e tem sido associada a mecanismos neurodegenerativos (Yagami *et al.*, 2016). A expressão de COX-2 está aumentada em distúrbios neurológicos, presentes em lesões ativas crônicas de biópsias cerebrais em pacientes e de lesões da medula espinhal de camundongos com desmielinização induzida pelo vírus da encefalite murina (CARLSON *et al.*, 2006).

A desregulação da glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) desempenha um papel importante na patogênese de numerosos distúrbios, que afetam o sistema nervoso central (SNC) abrangendo a neuroinflamação e doenças neurodegenerativas. Várias linhas de evidência ilustram um papel fundamental da GSK-3 e sua cascatas de sinalização celular e molecular no controle da neuroinflamação. A GSK-3  $\beta$ , um dos isômeros GSK-3, desempenha um papel importante na apoptose neuronal e sua inibição diminui a expressão de alfa-sinucleína, o que torna esta quinase um alvo terapêutico atraente para distúrbios neurodegenerativos. Assim, entendendo o papel da GSK-3 $\beta$  na PD aumentará nosso conhecimento dos mecanismos básicos subjacente à patogênese deste transtorno e facilitará a identificação de novas vias terapêuticas (GOLPICH *et al.*, 2015).

A atividade da GSK-3 é dependente da fosforilação em sítios específicos da enzima, e é controlada pela fosforilação e interação com proteínas inibitórias. Ao contrário de outras proteínas quinases, a GSK-3 é constitutivamente ativa em condições de repouso e é inativada por sinais extracelulares através da fosforilação de um resíduo de serina N-terminal, Ser-9 em GSK-3 $\beta$  e Ser-21 em GSK-3 $\alpha$  (Cross *et al.*, 1995; Fang *et al.*, 2002). Em oposição à fosforilação da serina inibitória, a atividade da GSK-3 é aumentada pela fosforilação de um

resíduo de tirosina, Tyr-216 em GSK-3 $\beta$  e Tyr-279 em GSK-3 $\alpha$ , localizado no domínio das quinase. (Hughes *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994).

### *1.1.3.3 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 marcado por alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial onde há formação de um canal de alta condutância com perda do potencial para a fosforilação oxidativa; há extravasamento de citocromo c para o meio intracitoplasmático; ativação de uma série de substâncias serino-proteases como as caspases, transglutaminases, endonucleases e fosfatidilserina/trombospondina. O processo implica na fragmentação da cromatina e das organelas com posterior clivagem das mesmas. Os corpúsculos apoptóticos formados são fagocitados por macrófagos, que reconhecem suas sinalizações (DAMIANI, 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 disfunção 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 aptossomo e, conseqüentemente, a cascata de caspases (WALDMEIER;TATTON, 2004).

Vários estudos sugerem que o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e a ativação dos receptores TNFR ativam a via extrínseca da indução da apoptose, e possuem um papel importante na patogênese de algumas doenças neurodegenerativas como a DP e a DA (WALDMEIER;TATTON, 2004).

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

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 principais drogas utilizadas no tratamento da DP age aumentando os níveis de dopamina (DA) no cérebro ou imitando os seus efeitos (SINGH *et al.*, 2006).

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. Contudo com a progressão da doença, observa-se uma redução da eficácia, bem como sintomas incapacitantes não responsivos ao tratamento (EMBORG *et al.*, 2004).

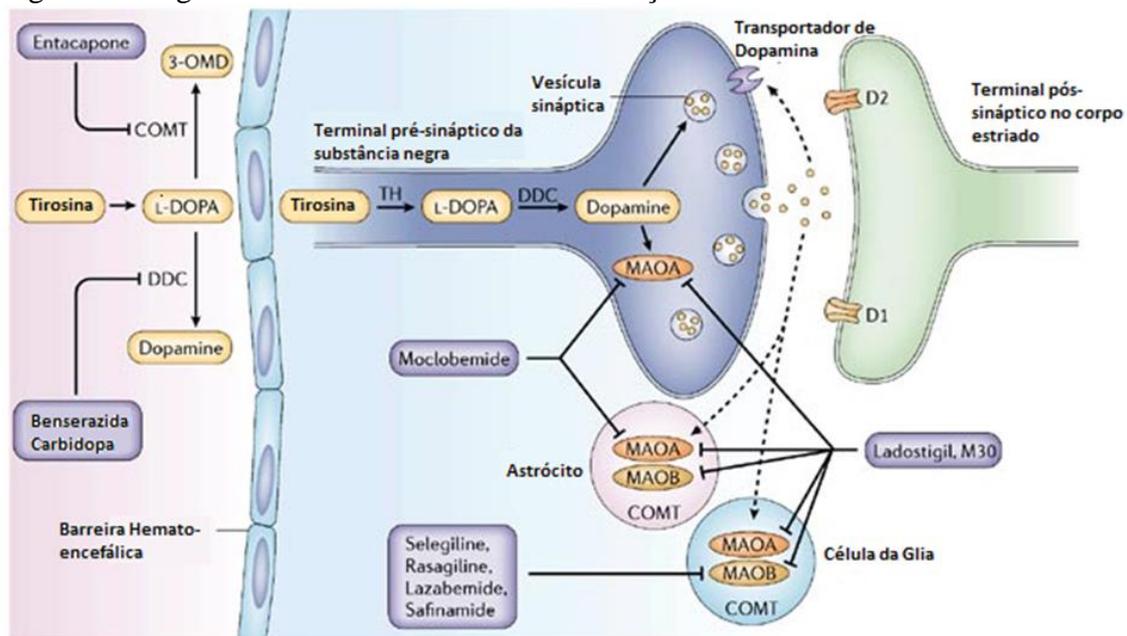
A maioria dos pacientes faz uso da levodopa, considerada o padrão ouro no tratamento da DP. Para minimizar os efeitos indesejáveis, como flutuações na resposta motora, confusões, alucinações e fadiga, inicialmente são usadas baixas doses e tendo elevação gradual. Além da levodopa, drogas que são prescritas atualmente no tratamento da DP incluem agonistas dos receptores de DA, tais como, selegilina (inibidor de MAO-B), amantadina (anti-viral com influência na síntese da DA), inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT) e anticolinérgicos (NAGATSU e 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). A vitamina E, o deprenil e a nicotina vêm sendo bastante estudados (AGUIAR *et al.*, 2006). Agentes anti-inflamatórios, melatonina, coenzima Q10, ácido fólico, selênio, vitaminas A, C e E são algumas substâncias promissoras e que podem contribuir para o tratamento da DP (KLIVENYI; VECSEI, 2009).

Em resumo, as terapias atuais consistem essencialmente em três estratégias: a reposição de dopamina, a inibição de sua degradação e o uso de agonistas dopaminérgicos (Figura 2). A reposição da perda de dopamina cerebral através do uso da 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) associada a inibidores da dopa-descarboxilase periférica, como a carbidopa e a benserazida, é o tratamento de primeira escolha (HUOT *et al.*, 2013). O tratamento de reposição de dopamina por L-DOPA foi introduzido em meados dos anos 60,

inicialmente sem o uso de inibidores da dopa-descarboxilase periférica, utilizando doses bem maiores que as praticadas atualmente. Os inibidores da dopa-descarboxilase periférica foram introduzidos na terapia na segunda metade dos anos 60, permitindo a redução das doses de L-DOPA, diminuindo assim complicações relacionadas à sua metabolização periférica, dentre estes, os problemas gastrointestinais como náuseas e vômitos, e cardiovasculares como a hipotensão postural (HOUT *et al.*, 2013).

Figura 3. Drogas utilizadas no tratamento da doença de Parkinson e seus mecanismos de ação.



Adaptado de Youdim; Edmondson e Tipton (2006)

O tratamento crônico com L-DOPA não é capaz de impedir a morte neuronal ocorrida, é eficaz no controle dos sintomas motores, porém não tem eficácia contra os sintomas não-motores.

Os efeitos adversos relacionados ao aumento de dopamina no SNC podem variar desde flutuações clínicas até discinesia, o que muitas vezes leva à redução da medicação, ou até mesmo a interrupção do tratamento (LEENTJENS, 2011; FABBRINI *et al.*, 2007; CHAPUIS *et al.*, 2005).

A terapia de L-DOPA enfrenta vários desafios resultantes das interações complexas entre a farmacocinética da própria L-DOPA e as alterações neuronais progressivas induzidas pela neurodegeneração na DP. A L-DOPA é metabolizada em dopamina já na periferia permitindo que apenas 30 % da dose administrada cheguem à circulação. O uso dos inibidores da dopa-descarboxilase periférica melhora a

biodisponibilidade da L-DOPA, reduzindo a dose terapêutica administrada. No início do tratamento com L-DOPA o efeito terapêutico de cada dose pode durar em média de 8 a 12 horas após a administração, apesar da meia-vida ser de apenas 4 horas (BASTIDE *et al.*, 2015). Flutuações clínicas são caracterizadas por encurtamento ou inconsistência do efeito da L-DOPA. Cerca de 80 % dos pacientes apresentam este tipo de complicação após 5 anos de tratamento. As flutuações clínicas mais comuns são o fenômeno de “wearing-off”, que representa o encurtamento da resposta, o fenômeno de “on-off”, onde o paciente flutua entre os estados “on”, no qual ocorre a ação da L-DOPA, e estado “off”, onde a L-DOPA para de ter ação. Outra forma de flutuação bastante comum é o fenômeno de “freezing”. Este fenômeno corresponde a incapacidade momentânea de iniciar ou de executar um movimento que pode comprometer a locomoção, a fala e a movimentos das mãos (JENNER, 2013; LEWITT; FAHN, 2016).

Muitos estudos clínicos pesquisam novas estratégias que possuam a mesma eficácia no controle dos sintomas motores e que não causem tantos efeitos adversos, porém sem sucesso. Formulações alternativas de L-DOPA aparecem como as mais promissoras alternativas, especialmente para melhorar as flutuações motoras, seja promovendo efeitos benéficos através de formulações de liberação controlada ou ainda através de melhor controle das complicações motoras do tipo “off”, através do uso de L-DOPA inalatória (LEWITT; FAHN, 2016; LOTIA, JANKOVIC *et al.*, 2016; DHALL; KREITZMAN, 2016). Estudo experimental demonstrou que nanopartículas de metilester-levodopa associada à benserazida diminuiu os movimentos involuntários anormais de ratos hemi-parkinsonianos (YANG, *et al.*, 2012), demonstrando assim que a liberação controlada de L-DOPA pode diminuir a incidência da discinesia.

#### ***1.1.5 Modelo de Doença de Parkinson in vitro: células SH-SY5Y***

A linhagem de neuroblastoma humano SH-SY5Y é um subclone derivado de células SK-N-SH que foram obtidas originalmente de um sítio metastático da medula óssea (BIEDLER *et al.*, 1978). Essa linhagem celular tem sido bastante utilizada como um modelo *in vitro* de DP, visto que as células possuem muitas características de neurônios dopaminérgicos, como a expressão de DAT (transportador de dopamina) e a capacidade de sintetizar dopamina e noradrenalina, pois expressam tirosina e dopamina  $\beta$ -hidroxilases (XIE; HU; LI 2010).

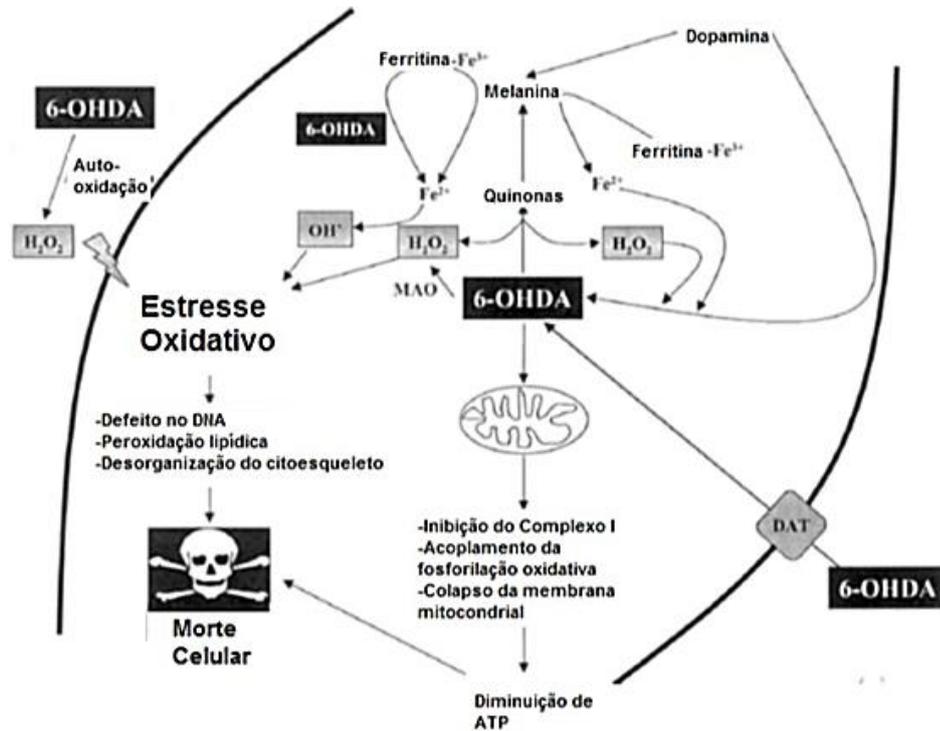
Diversos estudos, entretanto, demonstram que após diferenciação com alguns agentes, como o ácido retinóico, as células adquirem um fenótipo neuronal dopaminérgico mais pronunciado, com a exibição de longos processos neuríticos e interrupção do crescimento celular (LOPES *et al.*, 2010).

#### ***1.1.4.2 Modelo de Doença de Parkinson in vivo***

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 grande 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 peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e EROs, como radical hidroxil, e também pela inibição do complexo I mitocondrial (BLUM *et al.*, 2001). A 6-OHDA atinge a cadeia respiratória mitocondrial, através do DAT, induzindo um colapso na membrana mitocondrial, no complexo I da cadeia respiratória, ocorre então a liberação de EROs e desacoplação da fosforilação oxidativa, gerando prejuízo na função mitocondrial, consequentemente prejudicando a respiração celular e a geração de energia (SHOBER, 2004). (Figura 4).

A 6-OHDA é usualmente injetada unilateralmente no estriado, 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).

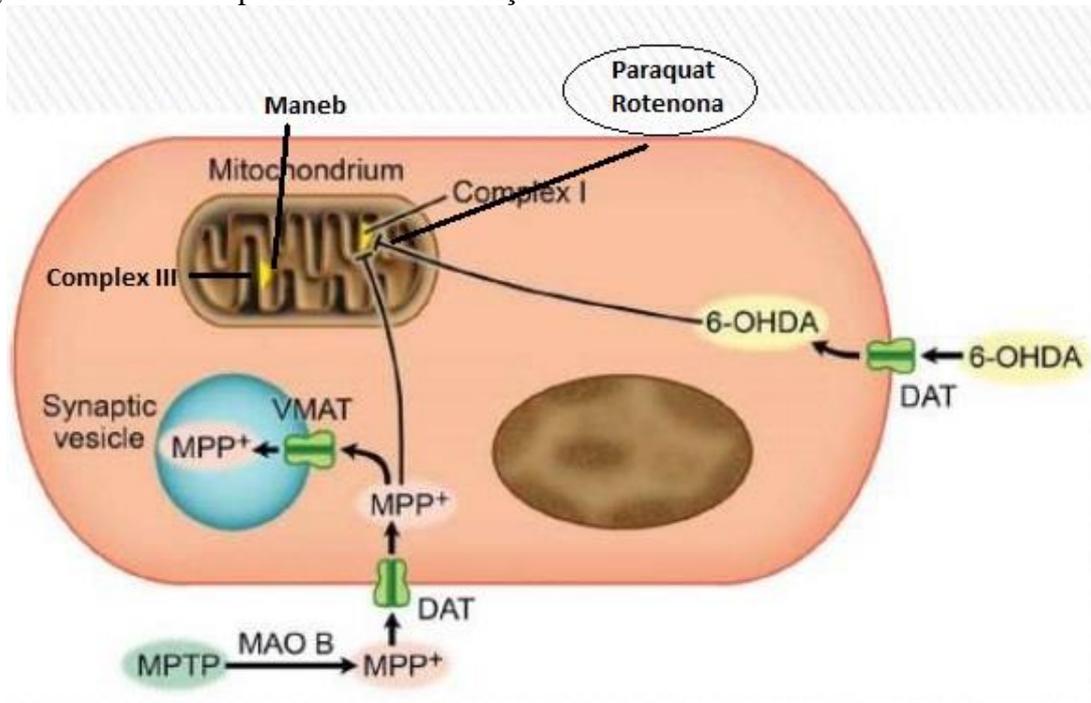
Figura 4-Mecanismo hipotético da toxicidade da 6-OHDA



A 6-OHDA pode induzir a morte celular por três mecanismos principais: formação de EROs pela auto-oxidação, formação de peróxido de hidrogênio induzida pela atividade da MAO ou inibição direta da cadeia respiratória mitocondrial. Fonte: adaptada de BLUM *et al.* (2001).

Existem também modelos que usam as toxinas lipossolúveis como MPTP que 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.

Figura 5- Modelos experimentais da Doença de Parkinson.



Adaptado de Oliver Von Bohlen und Halbach. (2007)

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. Além desses modelos, 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 modelos menos reprodutíveis (SPIVEY, 2011). (Figura 5).

### 1.1.7 Neuroproteção e produtos naturais

Neuroproteção é um termo usado para se referir a estratégias e mecanismos que protegem o sistema nervoso central (SNC) de lesões neuronais causadas por doenças crônicas (doenças de Alzheimer e Parkinson) ou por doenças neurodegenerativas agudas (derrame cerebral) (Iriti *et al.*, 2010). Cada uma dessas doenças afeta os neurônios e/ou regiões específicas do cérebro e envolve características patológicas e moleculares. Assim, vários modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* específicos para cada doença têm sido empregados para o

estudo de doenças neurodegenerativas (DNs) com o objetivo de compreender seus mecanismos subjacentes e identificar novas estratégias terapêuticas (Elufioye, *et al.*, 2017).

Não há cura para as DNs e todas as intervenções terapêuticas atuais visam administrar os sintomas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Terapias para DA, DP e outras doenças neurodegenerativas fornecem melhoria sintomática por vários mecanismos, como a restauração dos níveis de neurotransmissores ou o controle do metabolismo dos neurotransmissores envolvidos nas doenças (Iriti *et al.*, 2010; Waite, 2015; Chen, 2014; Patnaik, 2015).

Várias pessoas que vivem em países em desenvolvimento dependem de medicamentos fitoterápicos não apenas porque são considerados seguros, mas os custos associados a medicamentos modernos estão fora do alcance de muitas dessas pessoas. A crescente prevalência de doenças metabólicas e neurodegenerativas complexas nas sociedades ocidentais que não têm drogas curativas, fortalece a idéia que as plantas medicinais ainda podem ser exploradas como uma valiosa fonte de compostos, como tem sido feito ao longo da história da humanidade. (Elufioye, *et al.*, 2017).

A natureza continua a ser uma verdadeira fonte de medicamentos para a humanidade. Muitas drogas importantes, como vincristina, artemisinina e gentamicina, que ainda estão em uso hoje, são obtidas de fontes naturais ou são sintetizadas a partir de estruturas de moléculas que ocorrem naturalmente (Rates, 2001; Harvey, 2008). Por isso, nos últimos anos, uma grande parte do foco de pesquisa tem sido dada às ervas e outros produtos naturais usados na etnomedicina em todo o mundo para doenças do SNC relacionadas à idade. Inúmeros produtos naturais, mas principalmente extratos de plantas, têm sido relatados como sendo usados na medicina tradicional para fins neuroprotetores, de melhoramento de memória e antienvelhecimento. Exemplos de tais plantas incluem *Ginkgo biloba*, *Panax ginseng*, *Curcuma longa*, *Bacopa monnieri* e *Salvia officinalis* (Iriti *et al.*, 2010; Kumar; Khanum, 2012).

## 1.2 *Spirulina platensis*

*Spirulina platensis* (Nordest.) Geitler ou *Arthrospira platensis* (Nordest.) Gomont é uma cianobactéria multicelular filamentosa que pode conter até 74% de proteínas (Figura 6). Cresce fotoautotroficamente, mas complementando o meio adicionando o carbono orgânico ao meio pode estimular seu crescimento (ANDRADE; COSTA, 2008). Embora a *Spirulina platensis* seja atualmente comercializada em muitos países como um suplemento nutricional, devido ao seu elevado teor de proteínas e vitaminas, recentemente foi dada mais atenção ao seu potencial terapêutico. *S.platensis* (SPI) mostra potentes efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em roedores, entre outros vários efeitos biológicos (PATRO *et al.*, 2011; ISMAIL *et al.*, 2015)

A SPI é considerada fonte mais rica e mais completa da natureza de nutrição orgânica, possuindo atividade antiviral (HAYASHI *et al.*, 1996; ROSS *et al.*, 1994), anti-câncer (PANG *et al.*, 1988), hipocolesterolêmica (IWATA *et al.*, 1990; DEVI *et al.*, 1981; CHEONG *et al.*, 2010), anti-diabético (RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2001) e a atividades antioxidantes (KIM *et al.*, 2010; CHU *et al.*, 2010), tornando-se uma droga de uso potencial, especialmente no manejo terapêutico de doenças crônicas, como diabetes e hipertensão (PARIKH *et al.*, 2001).

A *Spirulina platensis* é também conhecida por ter propriedades anti-oxidantes que são atribuídos à presença de moléculas como ficocianina,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -tocoferol, ácido  $\gamma$ -linolênico e de compostos fenólicos (KUHAD *et al.*, 2006). O trabalho de Chu e colaboradores, 2010, mostrou que o extrato aquoso de *Spirulina platensis* tem um efeito protetor contra a morte celular por apoptose, devido aos radicais livres. Por outro lado, o papel das citocinas pró-inflamatórias na regulação da ação da insulina e homeostase da glicose, e a sua função no Diabetes Mellitus de tipo 2 (DM2) foi sugerida por várias linhas de evidência (BADAWI *et al.*, 2010). Assim, em comparação com indivíduos saudáveis, os indivíduos com fatores de risco para DM2, tais como hipertrigliceridemia, obesidade ou colesterol elevado (HDL-colesterol), apresentam maiores níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias do que aqueles que não são tão predispostos ao DM2.

Figura 6- *Spirulina platensis*



Fonte: [medindia.net/patients/lifestyleandwellness/spirulina-the-wonder-food.htm](http://medindia.net/patients/lifestyleandwellness/spirulina-the-wonder-food.htm)

A presença da inflamação no cérebro desempenha um papel importante em doenças neurodegenerativas. Em particular, acredita-se que a ativação de células da microglia está associada com a patogênese de doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Parkinson (DP). Um aumento da ativação da microglia foi mostrado na substância negra pars compacta (SNpc) de modelos animais de DP quando houve uma diminuição nas células tirosina hidroxilase positivas (TH+). Isto pode ser um sinal de neurotoxicidade devida à ativação prolongada de microglia em fases precoce e tardia da progressão da doença. Produtos naturais, tais como a *Spirulina*, derivados de algas verdes azuis, são utilizados para ajudar a reverter esse efeito devido às suas propriedades anti-inflamatória/anti-oxidante. Uma dieta rica em *Spirulina* proporciona neuroproteção em um modelo de doença de Parkinson induzido por  $\alpha$ -sinucleína (PABON *et al.*, 2012). Como hipótese, a *Spirulina platensis* poderia ser neuroprotetora neste modelo de DP induzida pela  $\alpha$ -sinucleína à medida que mais células TH+ e NeuN+ foram observadas; A *Spirulina platensis*, concomitantemente, promoveu uma diminuição do número de células microgliais ativadas. Esta diminuição da ativação da microglia pode ter sido devido, em parte, ao efeito da *Spirulina* de aumentar a expressão do receptor de fractalcina (CX3CR1) na microglia. O receptor de quimiocinas CX3CR1 é um receptor acoplado a proteína G13 (GPR13) uma proteína que em seres humanos é codificada pelo gene CX3CR1. Com este estudo, a hipótese de que a neurotoxicidade por  $\alpha$ -sinucleína é mediada, pelo menos em parte, através de uma interação com microglia. Observou-se uma diminuição na microglia ativada nos ratos que receberam uma dieta com *Spirulina* e apresentou uma neuroproteção. O aumento da expressão do CX3CR1 nos grupos que receberam *Spirulina* sugere um potencial mecanismo de ação. (PABON *et al.*, 2012).

Bermejo-Bescós e colaboradores (2008) observaram em seu estudo, a neuroproteção do extrato proteico de *Spirulina platensis* e da ficocianina (isolado desta cianobactéria) contra toxicidade induzida pelo ferro (Fe) em células SH-SY5Y. O ferro é um dos mais importantes agentes que produzem estresse oxidativo e declínio de funções neuronais. O extrato proteico da *S. platensis* e ficocianina mostrou ter atividade antioxidante, protegendo a atividade das enzimas celulares, GPx total, GPx-Se e GR e pelo aumento da glutatona reduzida em células contra o estresse oxidativo induzido pelo ferro. Estes resultados sugerem que o extrato proteico da *S. platensis* é um poderoso antioxidante capaz de interferir na morte celular. A *S. platensis* pode ser útil em doenças que estão relacionadas com espécies reativas de oxigênio e no desenvolvimento de novos tratamentos para doenças neurodegenerativas, em que o ferro tem sido implicado na neuropatologia de diversas doenças neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer ou de Parkinson. (BERMEJO-BÉSCOS, *et al.*,2008)

### **1.2.1 Vitaminas presentes na *Spirulina platensis***

Graças a sua natureza autotrófica e unicelular, a biomassa de microalgas pode ser uma fonte valiosa de vitaminas essenciais (A, B1, B2, B6, B12, C, E, nicotinato, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico). Em termos de conteúdo vitamínico eles são comparáveis a leveduras e carne e são superiores à alguns vegetais, como a soja e cereais (Becker, 2004). O teor de vitamina das microalgas está correlacionado com o genótipo, a fase de crescimento, o estado nutricional da alga e a intensidade da luz. Além disso, os tratamentos pós-colheita e processos de secagem podem ter um efeito considerável sobre a conteúdo, especialmente sobre o calor instável de vitaminas como B1, B2, C e iodo nicotico. (Brown *et al.*,1999; Borowitzka,1988).

O beta-caroteno (Pro-Vitamina A) é responsável por 80% dos carotenóides presentes na *Spirulina*, o restante consiste principalmente de fitoxantina e criptoxantina (Palla; Busson, 1969). Cada quilo de *Spirulina* seca contém entre 700 e 1700 mg de beta-caroteno e cerca de 100 mg de criptoxantina; estes dois carotenóides são convertíveis em vitamina A por mamíferos. Para adultos o conteúdo diário de vitamina A ao dia é estimado em menos de 1mg por dia, deste modo, um a dois gramas de *Spirulina* são facilmente suficientes para cobrir a necessidade diária dessa vitamina. (Evets *et al.*, 1994)

*Spirulina* seca contém 50-190 mg/kg de Vitamina E (tocoferóis) (Challem,1981; Earthise Farms *Spirulina*, 1986, Nippon Ink & Chemicals, 1977), um nível comparável ao do germe de trigo. As necessidades diárias de vitamina E é estimada em 15 UI ou 12 mg de tocoferóis livres (Guyton, 1986).

Vale ressaltar o teor excepcionalmente alto de vitamina B12 (cobalamina), uma vez que a vitamina é de longe a mais difícil de obter em uma dieta sem carne porque nenhuma planta ou alimento comum contém essa vitamina. A *Spirulina* é quatro vezes mais rica em compostos B12 que o fígado cru, há muito tempo a melhor fonte dessa vitamina. A deficiência de vitamina B12 (anemia perniciosa) deriva de um déficit na ingestão (como acontece em dietas vegetarianas estritas) ou de absorção defeituosa. Além disso, parece que certas condições patológicas originam sistematicamente deficiência de vitamina B12, como no caso de infecções por HIV que levam à AIDS (Harriman, 1989, Rule, 1994).

## **1.2.2 Constituintes bioativos da *Spirulina***

### **1.2.2.1 Ácido gama-linolênico**

O ácido gama-linolênico representa apenas 10-20% de ácidos graxos em *S. maxima*, ou seja, 1-2% matéria seca (Hudson, Karis,1974; Nichols, Wood, 1968), em comparação com 40% em *S. platensis*, ou cerca de 4% de peso seco. Portanto a *Spirulina* pode ser considerada uma das fontes mais conhecidas de ácido gama-linolênico, após o leite e alguns óleos vegetais pouco usados (prímula, semente de groselha e particularmente óleo de cânhamo) (Ciferri, 1983). A presença de ácido gama-linolênico (18: 3 ômega-6) merece destaque devido à sua raridade nos alimentos diários e seu alto valor nutricional. Normalmente sintetizado em humanos do ácido linoléico (18: 2 ômega-6) de origem vegetal, o ácido gama-linolênico pode ser bem assimilado diretamente mesmo em casos de distúrbios ou déficits na síntese endógena. A importância desses ácidos graxos está na sua evolução bioquímica: eles são os precursores das prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos que atuam como mediadores de reações inflamatórias e imunes (Manual Merck, 1994).

### **1.2.2.2 Ficocianina-C e Ficocianobilina**

A ficocianina-C (FC-C), a principal biliproteína da cianobactéria *Spirulina platensis* e

seu cromóforo a Ficocianobinina (FCB) (Pratoomyot, Srivilas, Noiraksar, 2005; Hu, 2004) exibem uma série de propriedades biológicas, antioxidante e anti-inflamatórias, além de ações imunomoduladoras (Markou, Nerantzis, 2013). Por mais de uma década, vem sendo explorado diferentes abordagens experimentais para identificar as propriedades farmacológicas de FC-C e FCB, incluindo suas atividades neuroprotetora e neurorestauradora. Estes estão ligados não só a sua conhecida ação antioxidante, e propriedades de eliminação de radicais livres e propriedades anti-inflamatórias, mas também à modulação da expressão de vários genes associados a outros processos biológicos. (Fox, 1980; Fukino, *et al.*, 1990),

### ***1.2.2.3 Polifenóis***

Os polifenóis são diversos grupos de metabólitos secundários de plantas presentes em frutas, vegetais, legumes, cereais e bebidas como chá, café e vinho. As outras classes principais de compostos polifenólicos naturais são os flavonóides. Uma das características estruturais mais importantes dos polifenóis é o seu potencial para tratar uma gama diversificada de doenças, incluindo DNs e distúrbios metabólicos (por exemplo, diabetes) (Karavita *et al.*, 2007). Décadas de pesquisa mostraram que os compostos polifenólicos retiram diretamente as EROS e oferecem efeitos antioxidantes que são benéficos para várias condições de doença, incluindo DNs. A fração estrutural fenólica desempenha um papel vital para o efeito antioxidante, com o grupo funcional catecólico sendo otimizado para essa atividade e a fração ácido gálico é ainda muito melhor na indução de efeitos antioxidantes gerais (Kim, 2006; Viskari ; Colyer, 2003). Muito além dos efeitos antioxidantes, os polifenóis também possuem inúmeras outras atividades biológicas relacionadas à inibição enzimática, expressão gênica e transdução de sinais que atribuem a inúmeros efeitos farmacológicos, incluindo efeitos anti-inflamatórios que desempenham um papel significativo nas doenças neurodegenerativas (Kim, 2006; Brown *et al.*, 1999).

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva que atinge aproximadamente 1 % da população mundial com idade acima de 65 anos. O número de casos da doença tem aumentado a cada ano devido ao envelhecimento da população. A DP é descrita como um distúrbio motor em que os pacientes apresentam tremor, rigidez muscular, bradicinesia e distúrbios posturais. Deste modo a DP constitui um importante problema de saúde pública no mundo e seu impacto aumenta a medida que aumenta a expectativa de vida população. O principal tratamento atual é baseado na reposição dopaminérgica com o precursor da dopamina (L-DOPA) e ocasiona importantes efeitos colaterais que podem levar a interrupção do tratamento.

Apesar de extensas pesquisas, ainda não há cura e nem um tratamento definitivo para a DP levando cada vez mais pesquisadores em todo mundo a buscar novas terapias capazes de retardar ou, idealmente, parar a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos. É evidente a importância de mais estudos sobre a DP e sobre novas ações terapêuticas que venham a melhorar ou até mesmo substituir a terapia com levodopa. Portanto, faz-se necessária a investigação de novos fármacos para que possamos partir em busca de terapias de suporte que diminuam os efeitos adversos causados pelo tratamento e melhorem a qualidade de vida desses pacientes.

A *Spirulina platensis* vem sendo muito utilizada com suplemento nutricional devido seu alto teor proteico e já possui ações anti-inflamatórias e antioxidantes comprovados através de diversos estudos e tem-se mostrado um candidato potencial à terapia coadjuvante da DP por ser capaz de atuar em diversos mecanismos patogênicos da doença. Contudo, mais estudos adicionais são necessários para se determinar os mecanismos neuroprotetores envolvidos o que justifica a importância desta pesquisa.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o possível efeito neuroprotetor do extrato aquoso da *Spirulina platensis*, em ratos com lesão estriatal produzida pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA), um modelo experimental de DP.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Estudar o efeito neuroprotetor do extrato aquoso da *Spirulina platensis*, usando o modelo de parkinsonismo em ratos, pela injeção intra-estriatal de 6-OHDA, no que se refere ao/aos efeito (s):

- Sobre o comportamento rotacional, a atividade motora, o comportamento depressivo e memória;
- No estresse oxidativo por meio da imunomarcagem para SOD-2, efeitos na peroxidação lipídica e liberação de nitrito no corpo estriado.
- Na resposta inflamatória produzida pelo modelo de parkinsonismo, por GSK<sub>3</sub> β, iNOS, COX2, no corpo estriado;
- Nos níveis de monoaminas (DA, DOPAC e HVA) por HPLC, no corpo estriado;
- Sobre o dano neuronal causado pela lesão com 6-OHDA (imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) e Transportador de Dopamina (DAT) e coloração com o Fluoro Jade C, no corpo estriado.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar albinos (*Rattus norvegicus*), com massa corpórea entre 150-240 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 de Experimentação Animal (CONCEA). O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o número de registro 27/2013 (Anexo I).

### 4.2 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: 6-OHDA (Sigma Aldrich, USA), *Spirulina platensis* (Spirulina Brasil G&F Ltda, Brasil), Quetamina (König, Argentina), Xilazina (König, Argentina) e Apomorfina (Sigma Aldrich, USA). Os demais reagentes foram de grau analítico. Os anticorpos primários e secundários utilizados nas análises imunohistoquímicas estão descritos nos seus respectivos sub-itens e nas tabelas 5 e 6.

#### 4.2.1 Cultivo de *Spirulina platensis* (SPI)

O inóculo veio como doação do Dr. Denis Von der Weid da Antenna Technologies Foundation (Genebra, Suíça) onde foi previamente identificado. E aqui foi cultivado em laboratório da empresa Spirulina Brasil G&F Ltda, sob supervisão da Profa Francisca P. Joventino, utilizando o meio de cultura Zarrouk, e arejado com uma iluminação de 3000 lux por um período fotográfico de 12 h. Os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos foram sempre determinados, com um procedimento visando controlar a intensidade da luz e diminuir a taxa de evaporação. A *Spirulina* é retirada dos tanques e após a filtração para retirar o excesso de água, o material foi pesado para determinar a biomassa úmida e submetido à dessecação durante 5 h. O material seco foi pesado novamente para medir a biomassa seca e,

em seguida, mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o uso. Foi suspenso em água destilada para administração oral aos animais.

#### **4.2.2 Preparação e caracterização do extrato aquoso da SPI para determinação de fenóis totais e proteínas totais**

O extrato aquoso de *Spirulina* a 10% (p/v) foi preparado a partir de uma amostra seca. A extração foi obtida com o auxílio de ultra-som durante 40 minutos à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ), e o teor de resíduo sólido foi determinado de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010).

#### **4.2.3 Conteúdo de polifenóis totais do extrato aquoso de *S. platensis***

Para a análise dos teores de polifenóis totais, uma alíquota (1 mL) do extrato a 10% foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL para diluição. As amostras do extrato diluído (4 mL) foram transferidas para um balão volumétrico de 10 mL contendo 0,25 mL de Folin-Ciocalteu e 4 mL de água Milli-Q. Após a alcalinização do meio (3 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10%), o volume foi completado para 10 mL com água Milli-Q e leituras realizadas por espectrofotometria a 785 nm. A curva de calibração foi preparada com ácido gálico padrão em concentrações variando de 1 a 6  $\mu\text{g/mL}$ . Os resultados do conteúdo de fenóis totais, foram expressos como equivalente de ácido gálico por grama de peso seco, *Spirulina*.

#### **4.2.4 Conteúdo de Proteínas Totais do extrato aquoso de *S. platensis***

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo ensaio colorimétrico usando um kit de determinação de proteína CC<sup>TM</sup> da Bio Rad (Califórnia, EUA). As amostras (5  $\mu\text{L}$  de extrato de *S. platensis*) foram transferidas para uma placa de 96 poços, seguida da adição de 25  $\mu\text{L}$  de reagente A (tartarato alcalino de cobre) e 200  $\mu\text{L}$  de reagente B (Folin) em cada poço, protegido da luz). Após 15 minutos em repouso à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ) no escuro, a proteína total foi quantificada espectrofotometricamente a 750 nm em um leitor de microplacas. A curva de calibração para a determinação de proteínas foi preparada usando albumina de soro bovino (0,5; 1,0; 1,5; 2,0, 2,5, 3,0, 4,0  $\text{mg/mL}$ ).

### **4.3 Cirurgia Estereotáxica para indução do Parkinsonismo**

Os procedimentos de lesão do corpo estriado foram realizados através de cirurgia estereotáxica. Os animais foram anestesiados com xilazina (10  $\text{mg/kg}$  via intraperitoneal, i.p.)

e quetamina (50 mg/kg via intramuscular, i.m.) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). 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 (junção entre as suturas saginal e coronal). Duas coordenadas de acesso ao corpo estriado foram marcadas 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* diretamente no corpo estriado. As lesões foram feitas unilateralmente, apenas no hemisfério direito dos animais. Os animais receberam duas microinjeções de 6-OHDA na dose de 6 µg/µL em cada sítio, perfazendo um total de 12 µg/2µL, conforme as coordenadas descritas na Tabela 2. Após as injeções, os animais foram suturados com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4/15x45 cm) e desinfetada com povidine.

Tabela 2 - Sítios das lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA.

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

Fonte: PAXINOS & WATSON, 1984.

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 0,1% (veículo para 6-OHDA)

#### **4.4 Protocolos Experimentais**

Os animais foram divididos em 5 (cinco) grupos, da seguinte forma (Tabela 3):

Tabela 3 - Protocolo experimental 1

<b>Grupo</b>	<b>Cirurgia</b>	<b>Tratamento</b>
1	Salina 3 $\mu$ L- intrastriatal	Veículo v.o.
2	Salina 3 $\mu$ L-intrastriatal	SPI 50 mg/kg, v.o.
3	6-OHDA (12 $\mu$ g/2 $\mu$ L, intrastriatal)	Veículo, v.o.
4	6-OHDA (12 $\mu$ g/2 $\mu$ L, intrastriatal)	SPI 25 mg/kg, v.o.
5	6-OHDA (12 $\mu$ g/2 $\mu$ L, intrastriatal)	SPI 50 mg/kg, v.o.

Os animais foram submetidos à lesão nigroestriatal com injeção estereotáxica de 6-OHDA ou salina, e tratados com a SPI nas doses 25 e 50 mg/kg por 18 (dezoito) dias, 2 h após a cirurgia. Decorridos 15 (quinze) dias após a cirurgia, todos os animais foram submetidos a testes comportamentais. Após a realização de todos os testes, no 18º dia de tratamento, os animais foram eutanaziados por decaptação para dissecação das seguintes áreas cerebrais: estriado direito (lesionado), estriado esquerdo ou perfundidos.

#### 4.5 Testes Comportamentais

No período que compreendeu entre o 15º dia após a cirurgia e até o 18º dia, os animais foram submetidos a testes comportamentais para serem avaliados com relação ao comportamento rotacional (teste da apomorfina), a atividade locomotora exploratória vertical e horizontal (campo aberto), assimetria dos membros anteriores (teste do cilindro), comportamento depressivo-símile (nado forçado) e memória operacional (labirinto em Y), conforme descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Protocolo experimental 2

<b>Dias</b>	<b>Procedimento</b>	<b>Grupos</b>
1º	Cirurgia (6-OHDA ou salina)	Todos
1º ao 18º	Tratamento com <i>Spirulina</i> ou salina	SPI 25 e 50 mg/kg
15º	Teste do campo aberto e cilindro	Todos
16º	Teste do nado forçado	Todos
17º	Labirinto em Y	Todos
18º	Teste da Apomorfina	Todos
18º	Dissecação	Animais destinados aos testes bioquímicos e HPLC
18º	Perfusão	Animais destinados a Imunohistoquímica

Após os testes, os animais foram subdivididos dentro dos grupos eutanaziados por decaptação e tiveram as áreas cerebrais (estriado direito e esquerdo) dissecadas para a realização das análises bioquímicas e dosagem de monoaminas. Para a análise imunohistológica, os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg i.p.) e quetamina (100mg/kg i.m.) e perfundidos com paraformaldeído a 4%, os cérebros foram retirados e mantidos em paraformoldeído tamponado *over night*, posteriormente preservados em solução de sacarose a 30%. Para realização das imunohistoquímicas os cérebros foram congelados e fatiados no criostato (50  $\mu$ m).

#### ***4.5.1 Avaliação do comportamento rotacional induzido por apomorfina (MARSHALL & UNGERSTEDT, 1976).***

O teste rotacional induzido por apomorfina é utilizado como parâmetro para a determinação da extensão da lesão estriatal em animais submetido à injeção estriatal unilateral de 6-OHDA e se caracteriza por movimentos estereotipados de rotação na direção contralateral à lesão realizada. Este é um teste sensível para lesões estriatais com extensões maiores que 80% (DEUMENS *et al.*, 2002).

Após 18 dias da lesão estriatal e do tratamento com SPI foi injetada uma dose de 1 mg/kg de apomorfina (dissolvido em salina, i.p.) em cada animal, e estes foram colocados em bacias plásticas por 60 minutos e observado o comportamento rotacional que é determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina, tanto no número de rotações na direção contrária à lesão (lado contralateral), quanto no número de rotações na direção da lesão (ipsilateral). (Figura 7).

Figura 7-Teste do coportamento rotacional induzido por Apomorfina

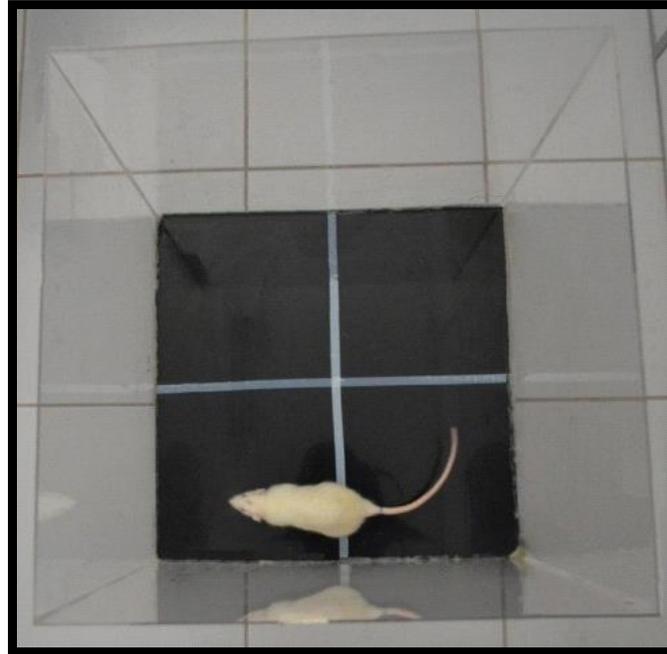


Fonte- arquivo do Laboratório de Neurociências e Comportamento

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

Neste teste é possível avaliar a atividade exploratória vertical e horizontal do animal. O campo aberto consiste de uma arena quadrada de acrílico preto (50 x50 cm). O piso da arena é dividido em quatro quadrantes iguais. Durante o teste os animais foram colocados na arena e deixados para explorar o ambiente por 5 (cinco) minutos, e 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*). Manteve-se o cuidado de limpar a arena após cada animal ser retirado com uma solução de álcool a 20% e secada com toalhas de papel, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste, este procedimento foi feito após cada teste comportamental. O ambiente foi iluminado com luz vermelha. (Figura 8).

Figura 8- Arena do teste do campo aberto



Fonte- arquivo do Laboratório de Neurociências e Comportamento

#### 4.5.3 Teste do cilindro (*Limb-use asymmetry test*) (SCHALLERT *et al.*, 2002)

O teste do cilindro visa avaliar a assimetria dos membros, que é determinada durante o comportamento de *rearing*, quando o animal fica em pé sobre as patas posteriores – exploração vertical. Para tanto o animal foi colocado em um cilindro de acrílico (60 cm de altura e 18 cm de diâmetro) e observados por 5 (cinco) minutos . Durante o comportamento exploratório de *rearing* o contato com a parede do cilindro foi contabilizado de acordo com o membro anterior que tocar o cilindro, contralateral (membro afetado), ipsilateral (membro não afetado) ou ambos (simultaneamente). (Figura 9).

A assimetria foi calculada pelas fórmulas:

- Percentual ipsilateral  $[(\text{ipsilateral}/\text{Total}) \times 100]$ ;
- Percentual contralateral  $[(\text{contralateral}/\text{Total}) \times 100]$ ;
- Percentual de ambas  $[(\text{ambas}/\text{Total}) \times 100]$ ;

Figura 9- Aparato usado no Teste do cilindro



Fonte- arquivo do Laboratório de Neurociências e Comportamento

#### 4.5.4 Teste do Labirinto em Y (*Y-maze*)

Esse teste avalia o aprendizado e a memória operacional, que tem como principal área envolvida o córtex pré-frontal. O labirinto em forma de Y consiste de uma caixa de acrílico com os três braços iguais, cada um medindo 22 x 7cm. O teste dura 8 minutos e consiste em avaliar a capacidade do animal em alternar as entradas dos braços espontaneamente.

Neste teste, o animal foi colocado em um braço e o seu movimento de entradas alternadas em cada braço foram anotadas, de acordo com as sequencias escolhidas, bem como o número total de entradas em cada braço. Foi considerado acerto cada vez que o animal entrou em 3 diferentes braços sem repetição. O resultado foi expresso em porcentagem e obtido através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{Alterações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de acertos}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrarem em qual braço eles entraram por último. Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel. (Figura 10).

Figura 10- Aparato do teste do Labirinto em Y



Fonte- arquivo do Laboratório de Neurociências e Comportamento

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

Este teste tem como objetivo avaliar o comportamento tipo depressivo-símile. Consiste em expor os roedores a uma situação aversiva, como nadar em um tanque cilíndrico com água, onde eles não podem tocar o fundo do cilindro ou fugir (escape).

Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico (60 cm de altura e 23 cm de diâmetro), contendo 25 cm de água por 6 (seis) minutos, com o primeiro minuto de adaptação e registrado o tempo de imobilização nos 5 (cinco) minutos posteriores. O tempo de imobilização foi registrado, sendo considerado toda vez em que o animal permanece parado sem deslocamento do corpo pela água, somente com movimentos das patas suficientes para manter a cabeça fora da água. (Figura 11).

Figura 11- Cilindro usado para o teste do nado forçado



Fonte- arquivo do Laboratório de Neurociências e Comportamento

## 4.6 Avaliação do Estresse oxidativo

### 4.6.1 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) formadas (DRAPER; HADELY, 1990). O método mais empregado para determinação das TBARS, representado pelo malonil dialdeído (MDA) em amostras biológicas é baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo, que tem absorvância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm. Os tecidos estriatais foram homogeneizados a 10% em tampão fosfato 50 mM (pH 7,4) gelado. Duzentos e cinquenta microlitros (250  $\mu$ L) do homogenato foram incubados no banho de água a temperatura de 37°C por uma hora. Após a incubação, 400  $\mu$ L de ácido perclórico (35%) foram adicionados, para interromper a peroxidação, e centrifugados a 12000 rotações por minuto (rpm), a 4°C por dez minutos. Em seguida, 600  $\mu$ L do sobrenadante foram retirados e adicionados a 400  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 0,6%. A mistura foi levada ao banho de água, por 30 (trinta) minutos, a uma temperatura variável de 95 a 100°C. A solução então é retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após isso, foi feita a leitura em 532 nm, utilizando um leitor de ELISA. A curva-padrão foi obtida mediante a leitura das concentrações de malonaldeído (MDA-10 mM) e os pontos da curva foram: 1mM;100

$\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 12,5  $\mu\text{M}$ ; 6,25  $\mu\text{M}$ ; 3,125  $\mu\text{M}$  e 1,56  $\mu\text{M}$ .

#### **4.6.2 Dosagem de Nitrito (GREEN et al., 1982)**

O reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água bidestilada/ sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%, ácido fosfórico 5%, 1:1:1, v/v/v) revela a presença de nitrito/nitrato ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) em uma amostra que pode ser (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor róseo, com um pico de absorvância em 560 nm.

Para realização do ensaio foram usados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess e adicionados 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante (amostras previamente centrifugadas) do homogenato a 10% do corpo estriado dos ratos em salina ou 100  $\mu\text{L}$  do padrão de  $\text{NaNO}_2$  nas várias concentrações. Para o branco foram usados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess adicionados a 100  $\mu\text{L}$  de salina. A leitura da absorvância foi feita em 540 nm. As leituras da absorvância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentração de cada padrão (x), então determinada a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de nitrito em cada amostra. A curva de calibração foi feita com Nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 10 mM e os pontos da curva foram: 1mM; 100  $\mu\text{M}$ ; 50  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$ ; 12,5  $\mu\text{M}$ ; 6,25  $\mu\text{M}$ ; 3,125  $\mu\text{M}$  e 1,56  $\mu\text{M}$ .

#### **4.7 Análise Imunohistopatológica**

Os animais foram perfundidos através do coração, pelo ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado (overnight), após esse período foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30%. O tecido foi cortado no criostato e montado em lâminas gelatinizadas. Os cortes histológicos de 50  $\mu\text{m}$  na região do estriato, foram então corados pela técnica Fluoro Jade (fluorescência) para a verificação de morte neuronal. Também foi feita imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH), transportador de dopamina (DAT), iNOS, COX<sub>2</sub>, SOD-2 e GSK<sub>3</sub>  $\beta$ .

Os dados das fotomicrografias foram quantificados em densidade óptica (DO) relativa pelo software ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, USA). Foi realizada uma análise semi-quantitativa de densidade óptica das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imunomarcados. Após obter quatro imagens do corpo estriado lesionado e quatro do lado não lesionado, com objetiva de 40X, foi calculada a porcentagem da densidade óptica do lado não

lesionado em relação ao lado lesionado do mesmo animal. O valor final da percentagem da DO de cada grupo advém de uma média das DOs de cada animal.

Tabela 5- Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica

<b>Anticorpos primários</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>	<b>País</b>
Anti-iNOS	1:400	Santa Cruz®	USA
Anti-COX 2	1:200	Santa Cruz®	USA
Anti-SOD 2	1:300	Abcam®	USA
Anti-GSK <sub>3</sub> β	1:200	Abcam®	USA
Anti-DAT	1:100	Sigma®	USA
Anti-TH	1:500	Millipore®	Alemanha

Tabela 6 -Anticorpos secundários utilizados para imunohistoquímica

<b>Anticorpos Secundários</b>	<b>Diluição</b>	<b>Marca</b>	<b>País</b>
Anti-Rabbit	1:200	Abcam®	USA
Anti-goat	1:200	Abcam®	USA

#### 4.7.1 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase

A Tirosina Hidroxilase (TH) é uma enzima limitante envolvida na síntese de dopamina e um marcador molecular de neurônios dopaminérgicos (BÉZARD *et al.*, 2013). Na doença de Parkinson há uma deficiência de TH, assim como baixos níveis de dopamina. A detecção imunohistoquímica foi realizada sobre cortes estriatais, o lado lesionado e não lesionado, para examinar a extensão da desnervação presente na substância negra.

Os cortes foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 0,3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 10 (dez) minutos durante e depois lavado mais 2 (duas) vezes por 5 (cinco) minutos em PBS. Foram incubados com o anticorpo primário (1:500, anti-TH; anticorpo produzido em coelho, Millipore®, USA) em albumina bovina 5% (BSA) durante a noite a 4°C. No dia seguinte as lâminas foram lavadas 3 (três) vezes em PBS por 5 (cinco) minutos, em seguida os cortes foram incubados com um anticorpo secundário (anti-côelho de cabra biotilado, IgG – ABC, Santa Cruz®) por 1 (uma) hora, enxaguados novamente 3 (três) vezes com PBS por 5 (cinco) minutos. Posteriormente os cortes foram cobertos com o

conjugado enzimático avidina/biotina (AB) durante 30 (trinta) minutos, lavados novamente 3 (três) vezes com PBS por 5 (cinco) minutos, em seguida os cortes foram incubados com um anticorpo secundário (anti-coelho de cabra biotilado, IgG – ABC, Santa Cruz®), seguindo as especificações do fabricante. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em álcool (50, 70 e 100%), diafanizadas e montadas em meio à base de xilol (Entelan®), e posteriormente examinadas.

#### **4.7.2 Imunohistoquímica para Transportador de dopamina (DAT)**

O procedimento para a imunohistoquímica do transportador transmembrana de dopamina (DAT) seguiu o mesmo para TH, sendo o anticorpo anti-DAT diluído em 1:100.

#### **4.7.3 Imunohistoquímica para GSK<sub>3</sub>β**

O procedimento experimental para a imunohistoquímica para a enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3) seguiu o anterior descrito para TH e a diluição 1:200 da mesma maneira descrita anteriormente.

#### **4.7.4 Coloração com Fluoro Jade C**

Foi utilizada a técnica de marcação fluorescente com Fluoro Jade C, este liga-se especificamente à neurônios em processo de degeneração (SCHMUEDE *et al.*, 2005). Os cortes cerebrais foram hidratados em água destilada. Depois colocados em solução de permanganato de potássio 0,06% por 6 minutos. Foram então lavados em banho de água destilada durante 1 minuto. Em seguida, foram incubados em solução de Fluoro Jade C 0,001%, em ácido acético 0,1%, durante 15 minutos. Após esse período, os cortes foram lavados 3 vezes com água destilada por 3 minutos. Para a montagem das lâminas foram feitas a desidratação com álcool nas concentrações de (50, 70 e 100%), diafanizadas e montadas em meio à base de xilol (Entelan®).

### **4.8 Imunohistoquímica para determinação da resposta inflamatória**

#### **4.8.1 Imunohistoquímica para o iNOS e a COX2**

Pesquisas indicam que os níveis de COX2 e iNOS encontram-se aumentados em cérebros de pacientes com DP, e isso pode ser reproduzido também no modelo de 6-OHDA. As técnicas de imunohistoquímica seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os

anticorpos primários anti-COX2 e anti-iNOS foram usados na diluição 1:200 , de acordo com as instruções do fabricante), durante 24 h a 4 ° C.

#### **4.9 Imunohistoquímica para determinação do estresse oxidativo**

##### **4.9.1 Imunohistoquímica para a SOD-2**

A SOD desempenha um papel importante na regulação da defesa antioxidante celular, catalisando a dismutação de radicais superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Além disso, pode ser um iniciador de reações em cadeia de radicais livres, como a peroxidação lipídica (HALLIWELL, 1989). As técnicas de imunohistoquímica seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente, e foi utilizado para análise o anticorpo primário Anti-SOD2 da Abcam, na diluição de 1:300 de acordo com as instruções do fabricante, durante 24 h a 4 ° C.

##### **4.10 Dosagens de monoaminas por HPLC**

Para a detecção dos níveis de catecolaminas foi utilizado o equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho) por detecção eletroquímica da SHIMADZU . Os tecidos foram sonicados em ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) à 1% por aproximadamente 30 segundos e o homogenato foi colocado em tubos Eppendorf (2mL) para centrifugação por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 14000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi então injetada no equipamento de HPLC para serem analisadas. Para as análises de monoaminas Dopamina (DA) e seus metabólitos, ácido diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), foi utilizada uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25cm, calibre 4,6cm e diâmetro da partícula de 0,3 um, da Shimadzu-Japão. A fase móvel utilizada foi composta por ácido crítico 0,163 M e NaCl (pH 3,0) contendo ácido octanosulfônico sódico 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahydrofurano 1,7% v/v. DA e DOPAC foram eletroquimicamente detectados usando-se um detector amperométrico da SHIMADZU. Foi injetado padrões de DA, DDOPAC e HVA para obtenção de cromatograma padrão para estas monoaminas citadas.

##### **4.10 Análises Estatísticas**

Na avaliação dos testes comportamentais, no teste da Apormorfina e nas análises de imunohistoquímica (TH, DAT, COX2, iNOS, GSK3 e SOD), foi utilizado o teste de análise de

variância (ANOVA) unidirecional, seguido por Tukey para comparações múltiplas.

Foram usados, em todos os testes, o critério de significância de  $p < 0,05$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). O programa de computador usado foi o GraphPad Prism® 5.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Composição e caracterização do extrato aquoso de *Spirulina platensis*.

Os valores obtidos na caracterização do extrato aquoso de *Spirulina platensis* a 10 %, como o teor de resíduo sólido, conteúdo de polifenóis totais e conteúdo de proteína total estão descrito na tabela 7, abaixo.

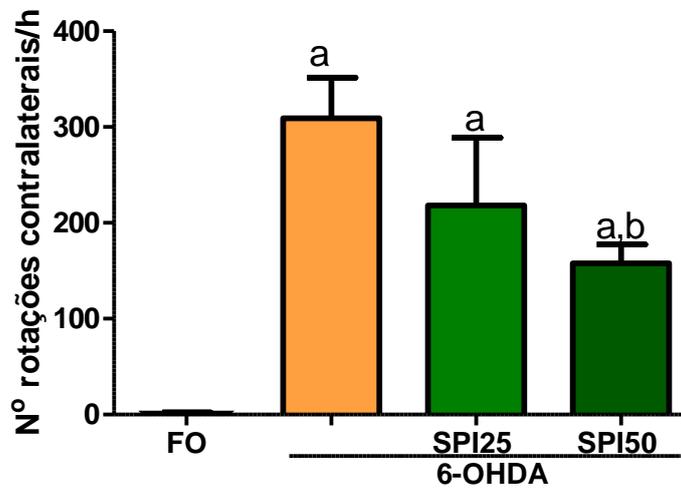
Tabela 7-Teor de resíduo sólido, polifenóis totais e proteína total do extrato aquoso de *Spirulina platensis*.

<b>Teor de resíduo sólido</b>	17,8 mg/mL
<b>Polifenóis totais</b>	16,5 mg/g
<b>Proteína total</b>	455 mg/g (45,5%)

### 5.2 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* no comportamento rotacional induzido por apomorfina em ratos parkinsonianos.

O grau de depleção de dopamina foi avaliado através da análise do comportamento rotacional utilizando o teste da apomorfina que é considerando um teste padrão para confirmação da reprodutibilidade do modelo de parkinsonismo experimental unilateral induzido pela 6-OHDA. Os resultados demonstraram que o grupo lesionado 6-OHDA não tratado apresentou um aumento de mais de 250 vezes no número de rotações contralaterais/h, comparados ao grupo FO (FO:  $1,23 \pm 0,87$ ; 6-OHDA:  $309,1 \pm 42$ ). A SPI (25 e 50 mg/kg ) (6-OHDA+SPI25:  $218,9 \pm 70,8$ ; 6-OHDA+SPI50:  $157,8 \pm 19,71$ ) reduziu de forma significativa o número de rotações contralaterais a lesão, sugerindo um efeito neuroprotetor (Figura 12).

Figura 12. Número de rotações contralaterais induzidas pela apomorfina em ratos parkinsonianos.



Os animais receberam a 6-OHDA através de cirurgia estereotáxica (12 ug/2ul) e foram tratados com SPI (25 e 50 mg/kg) durante 18 dias e após este período foi feito o teste de apomorfina 1mg/kg, i.p. (n=8). Os valores estão expressos como média ± EPM,  $p < 0,001$ , <sup>a</sup> vs FO;  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> vs 6-OHDA ; (ANOVA unidirecional e Tukey como teste post hoc).

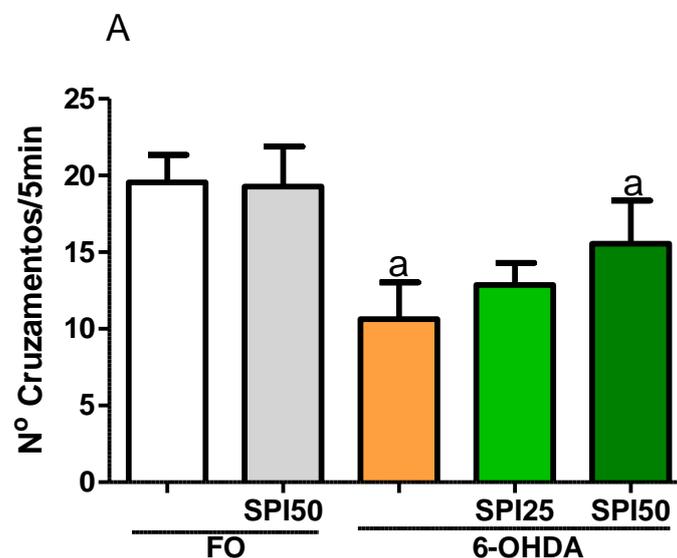
### 5.3 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre a atividade locomotora (Teste do campo aberto) em ratos parkinsonianos.

No teste do campo aberto observamos que a atividade exploratória do animal foi pouco afetada pela lesão com a 6-OHDA e que apenas o tratamento com SPI 50mg/kg apresentou uma melhora na atividade locomotora do animal lesionado pela neurotoxina, embora não houve diferença significativa no número de cruzamentos entre os grupos (FO:  $19,27 \pm 2,6$ , FO+SPI50:  $19,55 \pm 1,8$ , 6-OHDA:  $10,63 \pm 2,4$ , 6-OHDA+SPI25:  $12,86 \pm 2,4$ , 6-OHDA+SPI50  $15,56 \pm 2,8$ ) (Figura 13 A).

Com relação ao número de *rearings* que avalia a atividade exploratória vertical também não houve diferença significativa com relação ao grupo lesionado (FO:  $5,1 \pm 0,9$ , FO+SPI50:  $5,5 \pm 0,9$ , 6-OHDA:  $3,2 \pm 1$ , 6-OHDA+SPI25:  $1,4 \pm 0,5$ , 6-OHDA+SPI50  $2,2 \pm 1$ ) (Figura 13 B).

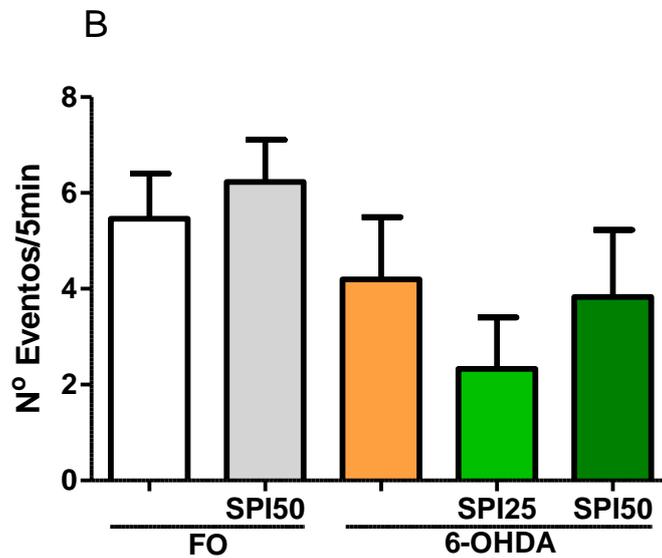
Possivelmente o tamanho da amostra utilizado (n=8), não tenha sido suficiente para detectar uma significância estatística.

Figura 13. A - Número de cruzamentos no teste o campo aberto em ratos parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA (n=8) foram tratados com a SPI (25 e 50 mg/kg) e no 15º dia, após cirurgia estereotáxica, foi feito o teste do campo aberto. Os valores estão expressos como média ± EPM.  $p < 0,05$ , <sup>a</sup> vs FO (ANOVA unidirecional e Tukey como teste post hoc).

Figura 13. B- Número de *rearings* (exploração vertical) durante o teste do campo aberto em ratos parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA (n=8) foram tratados com a SPI (25 e 50 mg/kg) e no 15º dia após cirurgia estereotáxica, foi feito o teste do campo aberto observado o número de *rearings*. Os valores estão expressos como média ± EPM,  $p > 0,05$  (ANOVA unidirecional e Tukey como teste post hoc).

#### 5.4 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre a assimetria dos membros anteriores (Teste do Cilindro) em ratos parkinsonianos

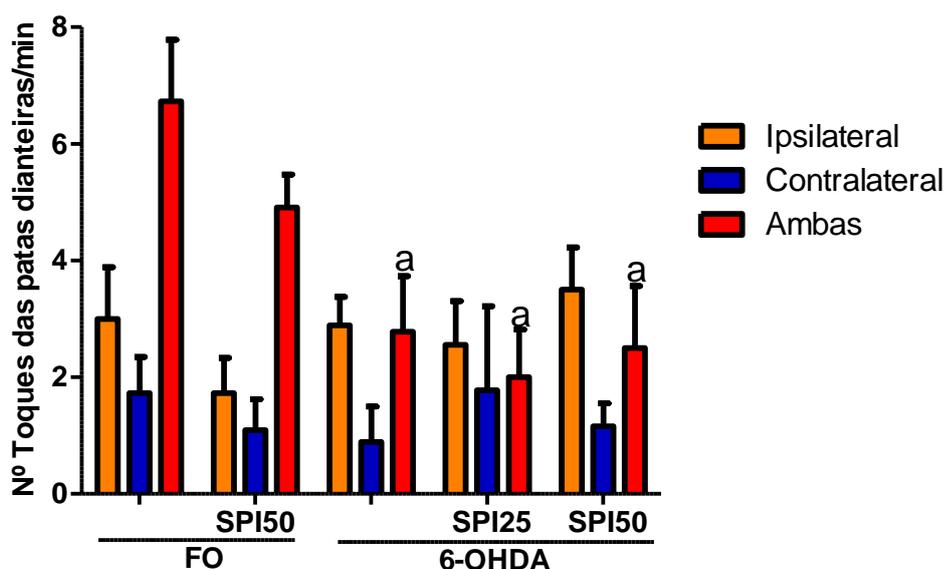
No teste do cilindro analisamos a motricidade das patas dianteiras de forma independente, ipsi e contralateral, bem como de forma combinada, ambas as patas.

Neste teste foi observada uma maior atividade com ambas as patas anteriores do grupo falso-operado e que essa atividade foi menor nos animais com a lesão por 6-OHDA, o que demonstra um comprometimento motor, após o tratamento com a SPI não foi observado essa diminuição para as patas anteriores nem ipsi e nem contralateral a lesão. Os animais lesionados tiveram uma diminuição do movimento como um todo neste teste, ou seja, a lesão levou os animais a movimentarem-se menos, portanto, realizando menos o movimento exploratório vertical (Figura 14).

Tabela 8- Números de toques com as patas dianteiras no cilindro, expressa em média  $\pm$  EPM.

Grupos	FO	FO+SPI50	6-OHDA	6-OHDA+SPI25	6-OHDA+SPI50
AMBAS	6,7 $\pm$ 1,1	4,9 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0,8	2,5 $\pm$ 1,1
IPILATERAL	3 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 1	2,6 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,7
CONTRALATERAL	1,7 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,5	0,89 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 1,4	1,2 $\pm$ 0,4

Figura 14. Número de toques das patas dianteiras (ipsilateral, contralateral e ambas), observados durante o teste do cilindro em ratos parkinsonianos.

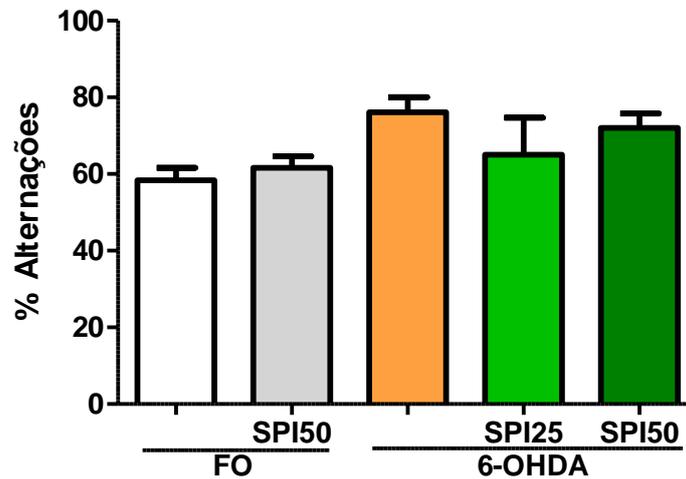


Os animais receberam a 6-OHDA através de cirurgia estereotáxica e foram tratados com SPI (25 e 50 mg/kg) e no 15º dia foi feito o teste do cilindro (n=8). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM,  $p < 0,05$ , <sup>a</sup> vs FO (ANOVA e Teste de Tukey como teste post hoc).

### 5.5 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre o aprendizado e a memória operacional em ratos parkinsonianos.

No teste do labirinto em Y foi quantificada a capacidade do animal em desempenhar a tarefa de entrar nos braços do labirinto de maneira alternada, que chamamos de memória operacional ou de trabalho. Neste teste não foi verificado déficit da memória de trabalho e nem modificação do desempenho desta tarefa em nenhum dos grupos (FO:58,4±3,2 %, FO+SPI50: 61,6±3%, 6-OHDA: 76,2±3,9%, 6-OHDA+SPI25: 65±9,7%, 6-OHDA+SPI50: 72 ± 3,8% (Figura 15).

Figura 15. Percentual de alterações espontâneas corretas observadas no teste do labirinto em Y em ratos hemi-parkinsonianos.

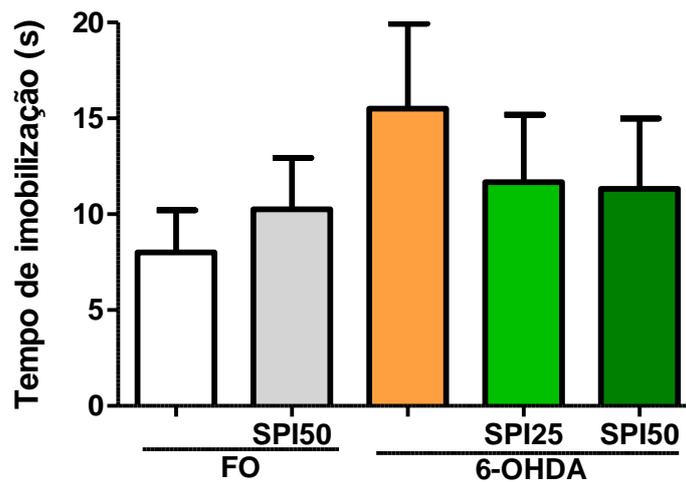


Os animais receberam a 6-OHDA intrastriatal e foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e no 17<sup>o</sup> dia foi feito o teste do labirinto em Y. (n=8). Os valores estão expressos como média ± EPM, (ANOVA unidirecional e Tukey como teste post hoc).

### 5.6 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre a atividade depressiva em ratos parkinsonianos.

O teste do nado forçado ou do desespero comportamental foi utilizado para avaliar a atividade depressiva. Os resultados mostraram que os animais lesionados do grupo 6-OHDA não tratados tiveram um maior tempo de imobilização com relação ao grupo falso-operado, porém não foi significativo e não houve melhora nos grupos lesionados tratados com a *S. platensis*, ou seja, não houve uma diminuição do tempo de imobilidade, e não houve diferença significativa entre os grupos. (FO:  $8 \pm 2,2$ , FO+SPI50:  $10,25 \pm 2,7$ , 6-OHDA:  $15,5 \pm 4,5$ , 6-OHDA+SPI25:  $11,67 \pm 3,5$ , 6-OHDA+SPI50:  $11,3 \pm 3,7$ ). (Figura 16).

Figura 16. Tempo de imobilização (s) observado durante o teste do nado forçado em ratos parkinsonianos.



Os animais receberam a 6-OHDA intraatrial e foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e no 16º dia foi feito o teste do nado forçado. (n=8). Os valores estão expressos como média ± EPM,  $p > 0,05$ , (ANOVA unidirecional e Tukey como teste post hoc).

### 5.7 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre os níveis de monoaminas (DA e DOPAC) em ratos parkinsonianos.

Os resultados demonstraram que a 6-OHDA causa uma diminuição significativa do conteúdo de dopamina (DA) no estriado ipsilateral (direito), em torno de 90%, quando comparado ao lado ipsilateral do grupo FO e ao seu próprio lado contralateral do grupo 6-OHDA. Uma diminuição menor nos níveis de DA foi apresentada pelo grupo lesionado com 6-OHDA, após tratamentos com SPI25 e SPI50 (comparativamente ao lado ipsilateral do grupo FO ou ao lado contralateral desses dois grupos) (Figura 17-A).

Resultado similar foi observado em relação aos níveis do metabólito DOPAC, o grupo lesionado 6-OHDA não tratado apresentou uma diminuição de 72%, quando relacionado ao lado direito do grupo FO, bem como ao seu próprio lado contralateral. O grupo lesionado com 6-OHDA apresentou diminuição menor após os tratamentos com a SPI comparativamente ao lado ipsilateral do grupo lesionado 6-OHDA não tratado e ao seu lado contralateral (Figura 17-B).

Tabela 9- Níveis de DA, DOPAC e HVA (ng/g de tecido) no estriado direito de ratos parkinsonianos.

GRUPOS	FO	6-OHDA	6-OHDA+SPI25	6-OHDA+SPI50
DA	3611 ±584,0	328,3±26,72	1136±110,6	990,4±171,4
DOPAC	1062±129,9	291,5±62,74	674,9±126,3	715,5±143,0
HVA	255±56,3	101,5±21,01	227±39,01	163,1±20,08

Os valores estão representados em média ± EPM.  $p < 0,05$ .

Figura 17. A- Níveis de DA (ng/g de tecido) no estriado direito (ipsilateral) de animais com lesão estriatal por 6-OHDA

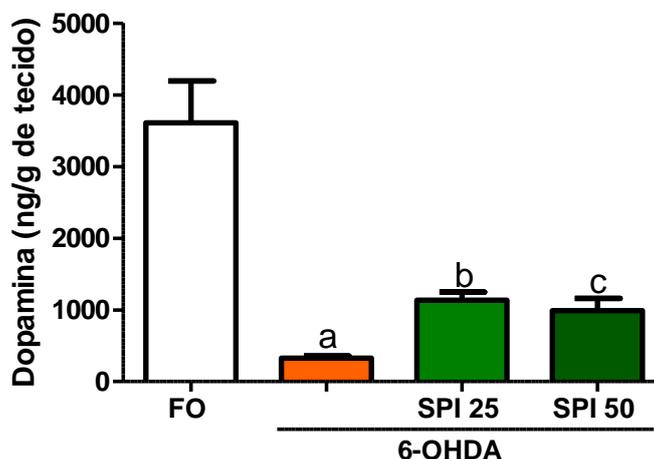


Figura 17. B- Níveis de DOPAC (ng/g de tecido) no estriado direito de animais com lesão estriatal por 6-OHDA

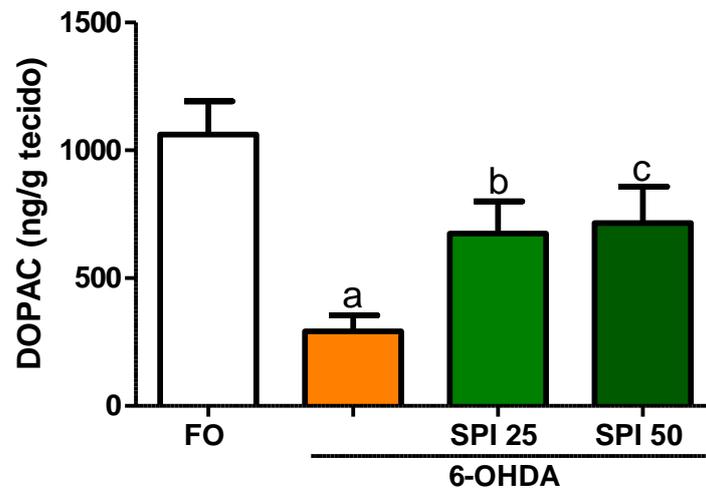


Figura 17. C- Níveis de HVA (ng/g de tecido) no estriado direito de animais com lesão estriatal por 6-OHDA

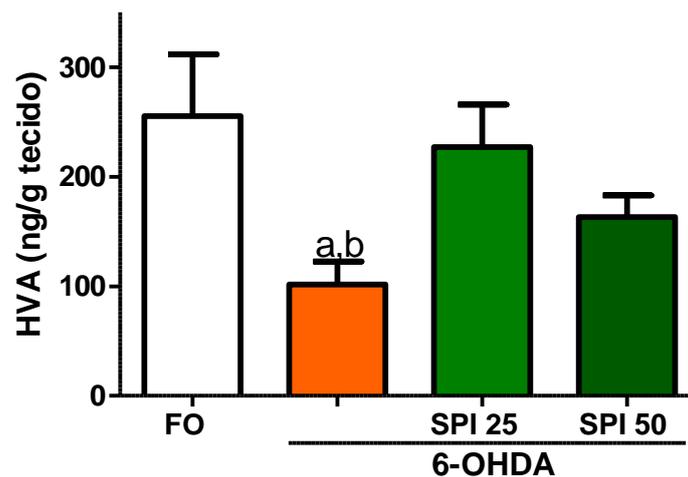


Figura 17. Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados por 18 dias após a lesão, com SPI 25 e 50 mg/kg. Após este período de tratamento, foram eutanaziados e o estriado ipsilateral foi dissecado para a dosagem do níveis de monoaminas por HPLC. (n=8). Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. (ANOVA unidirecional e Teste de Tukey como teste post hoc e teste t de Student pareado e não pareado bicaudal).

A-DA: <sup>a</sup> vs FO,  $p < 0,01$ , <sup>b</sup> vs 6-OHDA,  $p = 0,0101$ ,  $t = 7,72$ ,  $df = 9$ , <sup>c</sup> vs 6-OHDA,  $t = 3,524$ ,  $df = 11$ ,  $p = 0,0485$ .

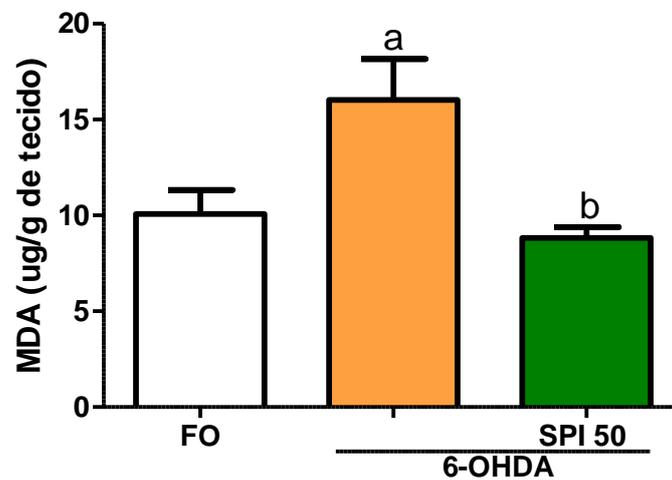
B-DOPAC: <sup>a</sup> vs FO,  $p < 0,05$ , <sup>b</sup> vs 6-OHDA,  $p = 0,0315$ ,  $t = 2,544$ ,  $df = 9$ , <sup>c</sup> vs 6-OHDA  $p = 0,0264$ ,  $t = 2,715$ ,  $df = 8$ ,  $p = 0,0264$ .

C-HVA: <sup>a</sup> vs FO, <sup>b</sup> vs 6-OHDA,  $p < 0,05$ .

### 5.8 Efeito extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre os níveis de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) em ratos hemi-parkinsonianos.

Foi observado um aumento de 2 vezes no conteúdo de MDA no estriado direito (lesionado) do grupo 6-OHDA não tratado, quando comparado ao grupo FO. O tratamento com a SPI (50 mg/kg) reverteu significativamente o aumento do conteúdo de peroxidação lipídica, expressa como conteúdo de MDA (malonildialdeído) ( $\mu\text{g/g}$  de tecido). (Figura 18).

Figura 18. Dosagem dos níveis de peroxidação lipídica no estriado direito em ratos com lesão unilateral pela 6-OHDA expressas por MDA .

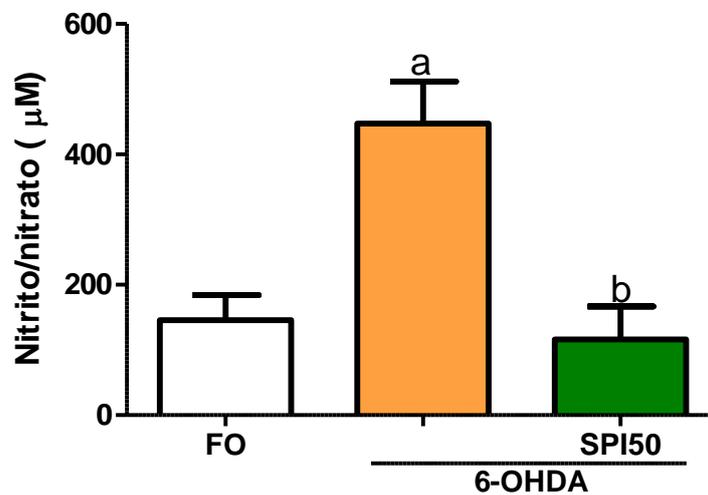


Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado e feito a dosagem da peroxidação lipídica. (n=6) Os valores estão representados em média  $\pm$  EPM.  $p < 0,001$ ,<sup>a</sup> vs FO; ,  $p < 0,001$ <sup>b</sup> vs 6-OHDA (ANOVA unidirecional e Tukey como teste post hoc).

### 5.9 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre os níveis de nitrito/nitrato em ratos hemi-parkinsonianos.

O estriado direito (lesionado) do grupo 6-OHDA não tratado apresentou um aumento de 3 vezes nos teores de nitrito, comparado ao mesmo lado do grupo FO. Por outro lado, valores ainda inferiores do conteúdo de nitrito observados pelo grupo FO foram obtidos após os tratamentos com a SPI(50 mg/kg), sugerindo um efeito antioxidante (Figura 19).

Figura 19. Níveis de nitrito/nitrato no estriado direito, em ratos com lesão unilateral pela 6-OHDA.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado e feito a dosagem dos níveis de nitrito/nitrato. (n=6). Os valores estão representados em média  $\pm$  EPM.  $p < 0,001$ ,<sup>a</sup> vs FO,;  $p < 0,001$ ,<sup>b</sup> vs 6-OHDA. (ANOVA unidirecional e Tukey como teste post hoc)

### 5.10 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre a morte neuronal avaliada através da imunorreatividade para tirosina hidroxilase (TH) no corpo estriado de ratos hemi-parkinsonianos.

Como pode ser observado na figura 20 os animais submetidos a lesão com a neurotoxina apresentaram uma redução de 99% na imunorreatividade para TH no estriado ipsilateral quando comparada aos animais FO. Por outro lado o tratamento com a SPI 50 mg/kg mostrou uma diminuição de 42% na imunocoloração para TH com relação ao grupo lesionado com 6-OHDA. Assim, a *Spirulina* diminuiu significativamente a perda do marcador dopaminérgico tirosina hidroxilase (TH) no estriado lesionado de ratos submetidos à lesão com 6-OHDA e não tratados (Figura 20).

Figura 20. A- Fotomicrografias representativas da imunomarcção para tirosina hidroxilase (TH) no estriado ipsilateral de ratos hemi-parkinsonianos.

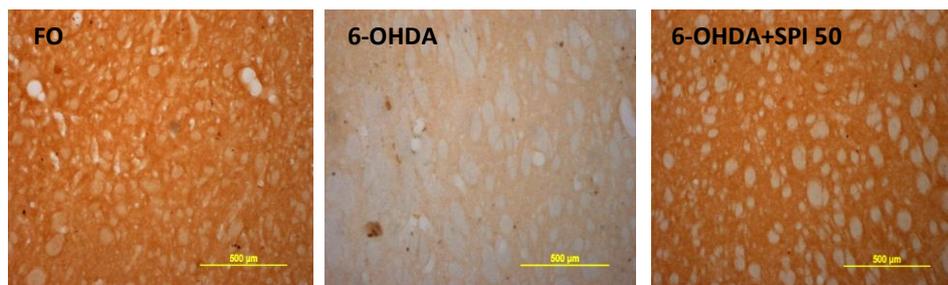
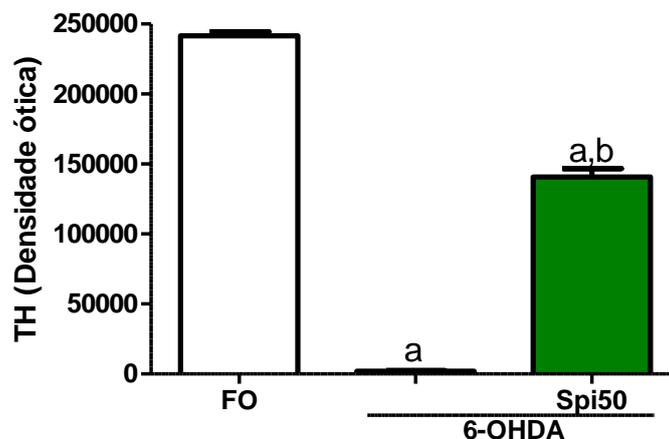


Figura 20. B- Densidade ótica da imunomarcção para tirosina hidroxilase (TH) no estriado direito em ratos hemi-parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 50 mg/kg, por 18 dias e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado. (n=4)

A- As fotomicrografias (aumento 400x; 500  $\mu$ m) foram quantificados pelo software Image J, NIH, EUA.

B- Gráfico em barras mostrando densidade ótica da imunorreatividade para TH no estriado ipsilateral.  $p < 0,001$ , <sup>a</sup> vs FO, <sup>b</sup> vs 6-OHDA. (ANOVA unidirecional seguido de Tukey como teste post hoc).

### 5.11 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre os níveis de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em ratos hemi-parkinsonianos.

No presente estudo, observou-se um aumento de 9 vezes para a imunorreatividade do iNOS no estriado do grupo lesionado 6-OHDA não tratado, isto foi reduzido significativamente a valores ainda inferiores aos do grupo FO, após o tratamento com SPI (50 mg/kg), (Figura 21).

Figura 21. A- Fotomicrografias representativas de imunomarcção para iNOS no estriado direito de ratos parkinsonianos.

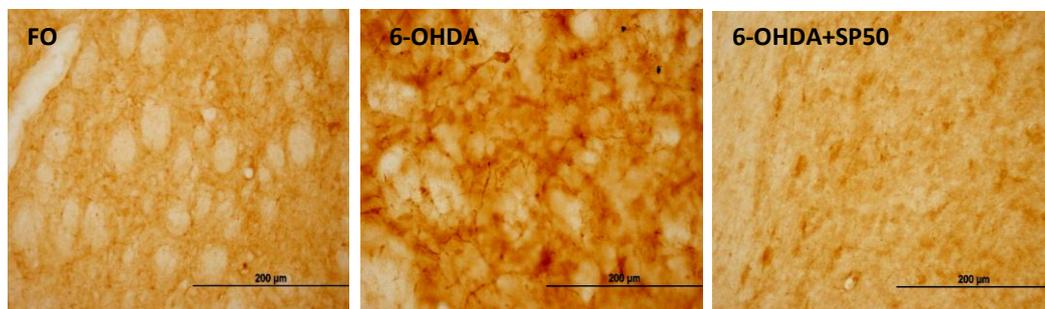
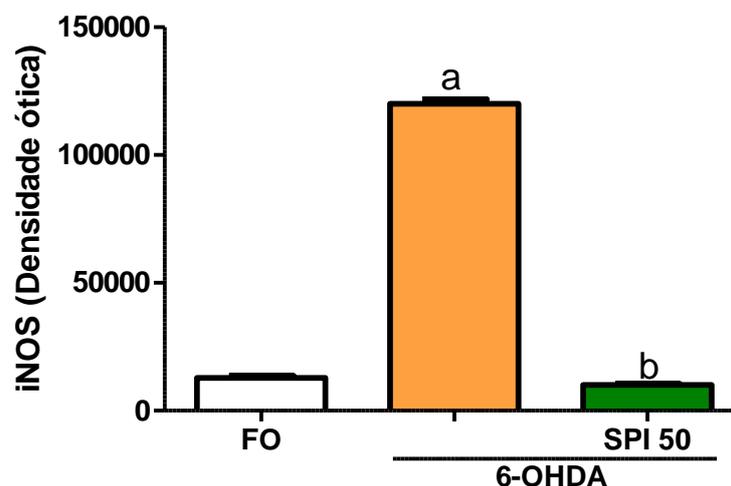


Figura 21. B- Densidade ótica da imunomarcção para iNOS no estriado direito de ratos parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado. (n=4)

A- As fotomicrografias (aumento 400x; 200µm) foram quantificadas pelo software Image J, NIH, EUA.

B- Gráfico da densidade ótica:  $p < 0,001$ , <sup>a</sup> vs FO, ;  $p < 0,001$ , <sup>b</sup> vs 6-OHDA. (ANOVA unidirecional seguido de Tukey como teste post hoc)

### 5.12 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre os níveis de ciclooxygenase 2 (COX2) em ratos hemi-parkinsonianos.

Uma imunorreatividade 15 vezes maior para COX-2 foi demonstrada no estriado lesionado do grupo 6-OHDA não tratado quando comparado ao grupo FO e apresentou uma diminuição significativa dessa imunomarcção após o tratamento com SPI 50 mg/kg (Figura 22).

Figura 22. A- Fotomicrografias representativas da imunorreatividade para COX-2 no estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos.

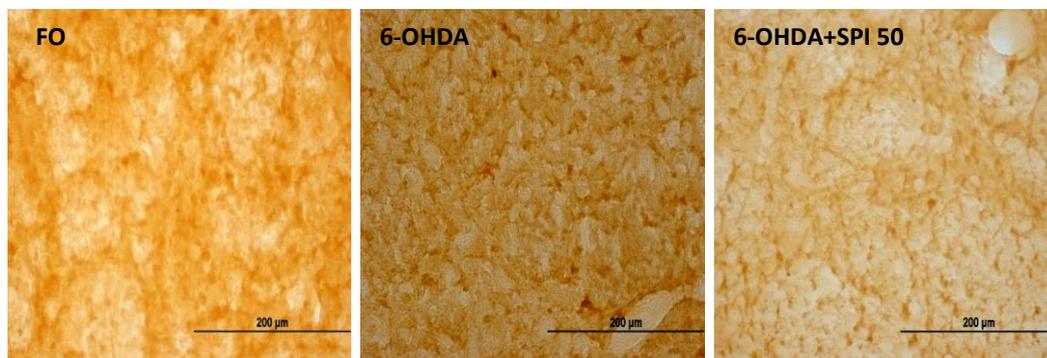
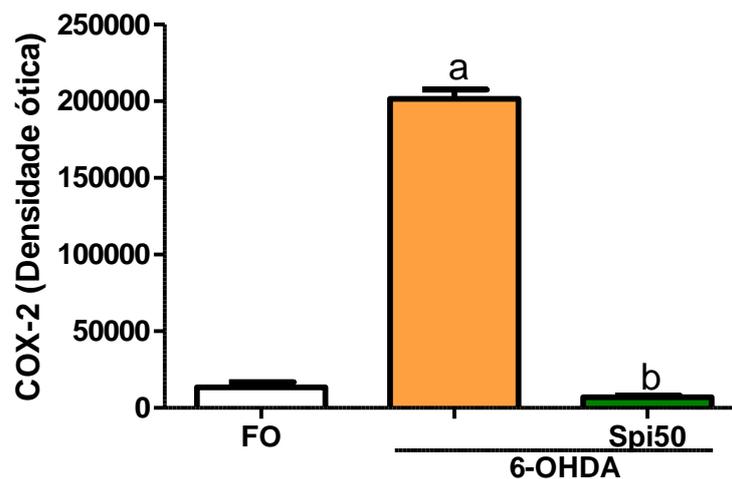


Figura 22. B- Densidade ótica de imunohistoquímica para COX-2 no estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado. (n=4)

A- As fotomicrografias (aumento 400x; 200µm) foram quantificados pelo software Image J, NIH, EUA.

B- Gráfico da densidade ótica da imunorreatividade para COX2. .  $p < 0.05$ , <sup>a</sup> vs FO, <sup>b</sup> vs 6-OHDA. (ANOVA unidirecional seguido de Tukey como teste post hoc)

### 5.13 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre os níveis do transportador de dopamina (DAT) em ratos parkinsonianos.

Da mesma forma que os achados para TH, uma diminuição significativa da imunorreatividade para o DAT (98%) foi demonstrada no estriado direito lesionado do grupo lesionado 6-OHDA não tratado. Esta redução foi revertida significativamente (55%) no grupo lesionado com 6-OHDA após tratamento com SPI 50 mg / kg. (Figura 23).

Figura 23. A-Fotomicrografias representativas de imunomarcação para DAT no estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos.

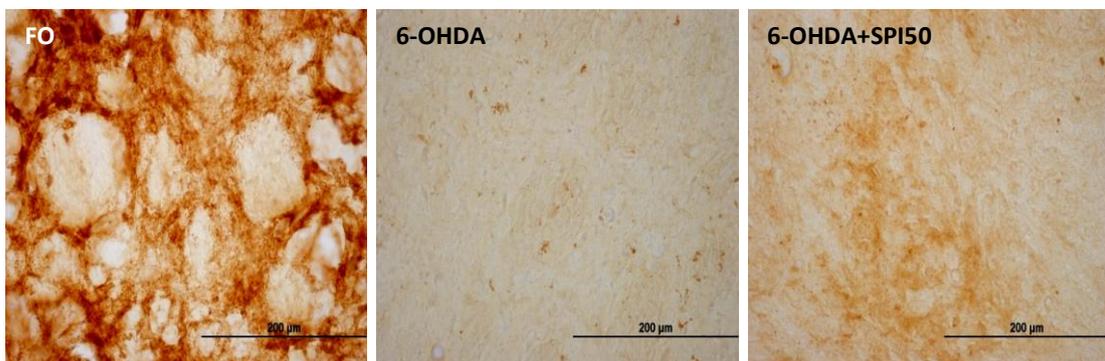
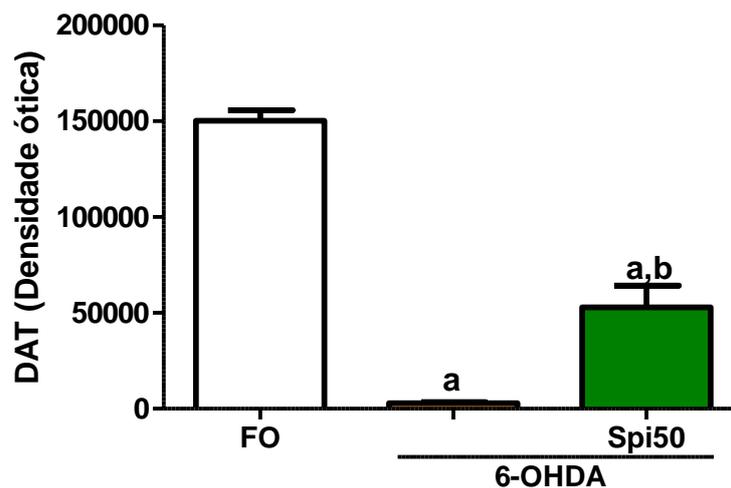


Figura 23. B- Densidade  tica de imunohistoquímica para DAT no estriado direito de ratos parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado. (n=4)

A- As fotomicrografias (aumento 400x; 200 m) foram quantificados pelo software Image J, NIH, EUA .

B- Gráfico da densidade  tica.  $p < 0,001$ , <sup>a</sup> vs FO; <sup>b</sup> vs 6-OHDA. (ANOVA unidirecional seguido de Tukey como teste post hoc)

### 5. 14 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre os níveis de Glicogênio sintase quinase $\beta$ (GSK $_3\beta$ ) em ratos parkinsonianos.

Como pode ser observado na figura 24 nos animais submetidos a lesão com a neurotoxina apresentaram uma aumento em torno de 90% na imunorreatividade para GSK $_3$  no estriado ipsilateral quando comparada a dos animais FO e o tratamento com a SPI 50 mg/kg mostrou uma diminuição significativa em torno de 42% na imunomarcção para GSK $_3\beta$  comparado ao grupo lesionado com 6-OHDA, valores semelhantes aqueles observados no grupo FO (Figura 24).

Figura 24 A-Fotomicrografias representativas de imunorreatividade para GSK $_3\beta$  no estriado direito de ratos hemi-parkinsonianos.

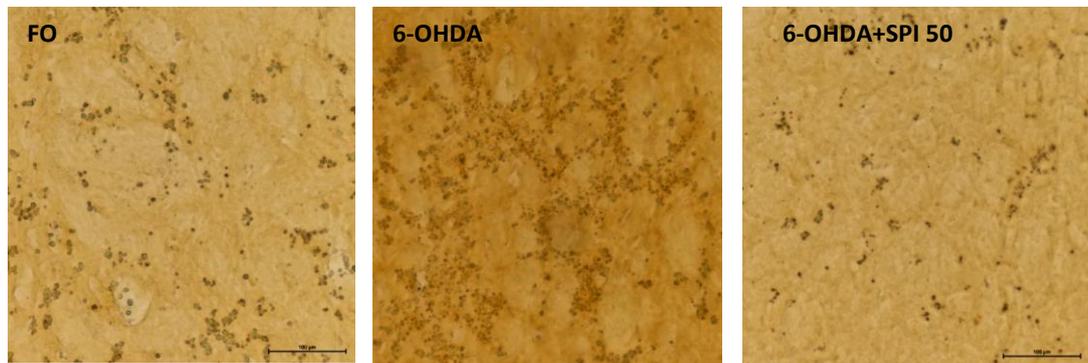
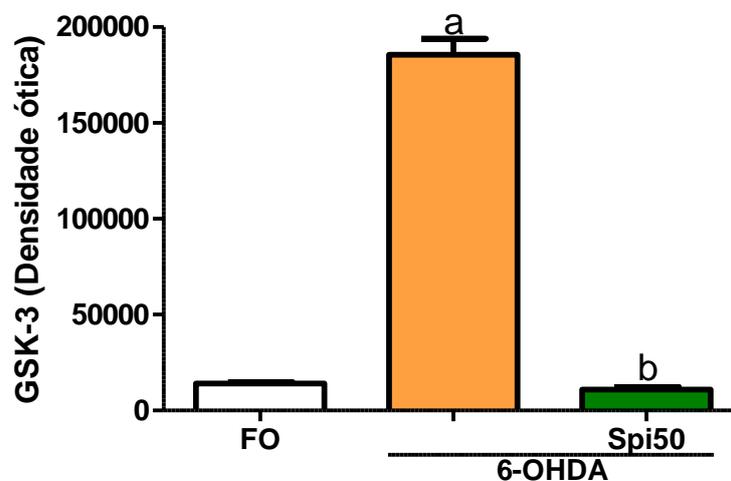


Figura 24 B- Densidade ótica de imunohistoquímica para GSK $_3\beta$  no estriado direito lesionado de ratos parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado. (n=4)

A- As fotomicrografias (aumento 400x; 100 $\mu$ m) foram quantificados pelo software Image J,

NIH, EUA.

B- Gráfico da densidade ótica :  $p < 0,001$ , <sup>a</sup> vs FO , <sup>b</sup> vs 6-OHDA (ANOVA unidirecional seguido de Tukey como teste post hoc)

### 5.15 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre a degeneração neuronal avaliado através da coloração por fluoro-jade C no estriado direito de ratos hemiparkinsonianos.

Na figura 25A abaixo podemos observar que nos animais que sofreram a lesão com a 6-OHDA apresentaram um aumento em torno de 95% na imunorreatividade para FJ-C no estriado ipsilateral e o tratamento com a SPI 50 mg/kg mostrou uma diminuição na imunofluorescência de em torno de 70% quando comparada a dos animais FO (Figura 25).

Figura 25 A- Fotomicrografia da coloração por fluoro-jade C no estriado direito lesionado de ratos hemiparkinsonianos.

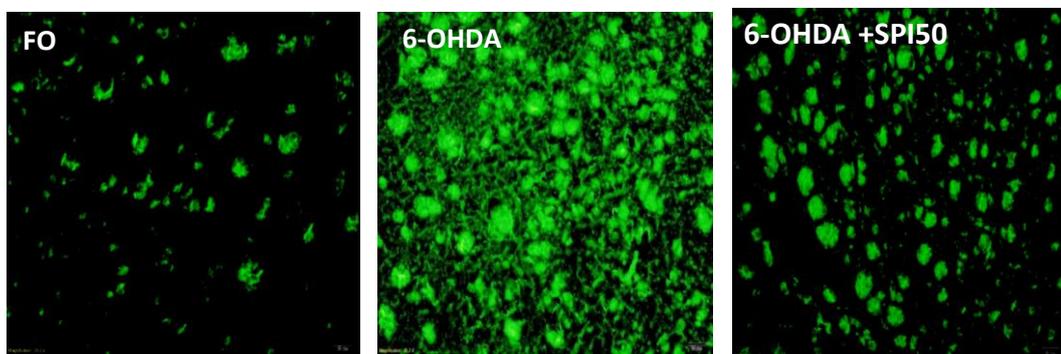
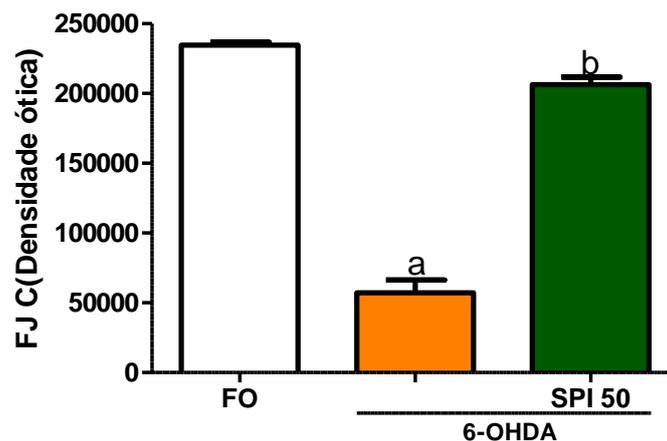


Figura 25 B- Gráfico da densidade ótica da coloração por fluoro-jade C no estriado direito lesionado de ratos hemiparkinsonianos



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado. (n=4)

A- As fotomicrografias (aumento 400x; 100  $\mu$ m) foram quantificadas pelo software Image J, NIH, EUA.

B- Gráfico da densidade ótica.  $p < 0,001$ , <sup>a</sup> vs FO, <sup>b</sup> vs 6-OHDA. (ANOVA unidirecional seguido de Tukey como teste post hoc).

### 5.16 Efeito do extrato aquoso da *Spirulina platensis* sobre o estresse oxidativo avaliado através da imunomarcção para SOD 2 no estriado direito de ratos hemiparkinsonianos.

Na figura 26 A, nos animais submetidos a lesão com a neurotoxina apresentaram uma redução de 90% na imunomarcção nas células SOD-2 positivas no estriado ipsilateral quando comparada a dos animais FO . Por outro lado o tratamento com a SPI 50 mg/kg mostrou um aumento em torno de 70% na imunomarcção para células SOD-2 positivas. (Figura 26).

Figura 26 A- Fotomicrografias da imunocoloração para SOD-2 no estriado direito lesionado de ratos hemiparkinsonianos.

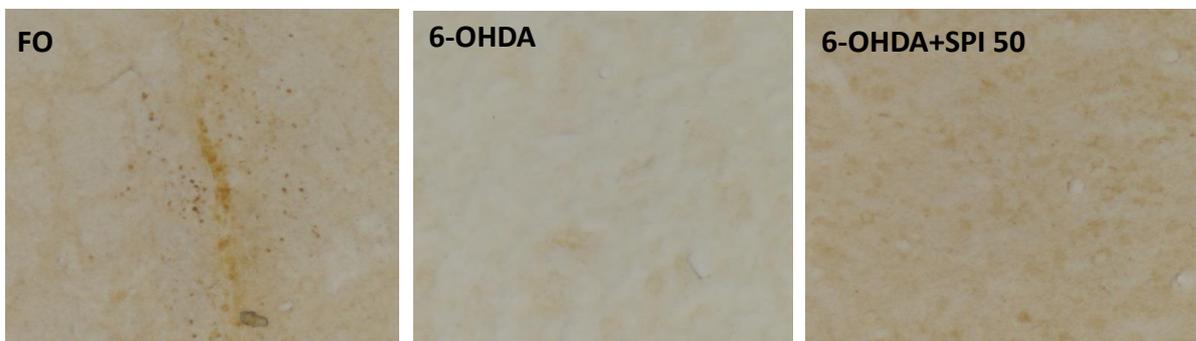
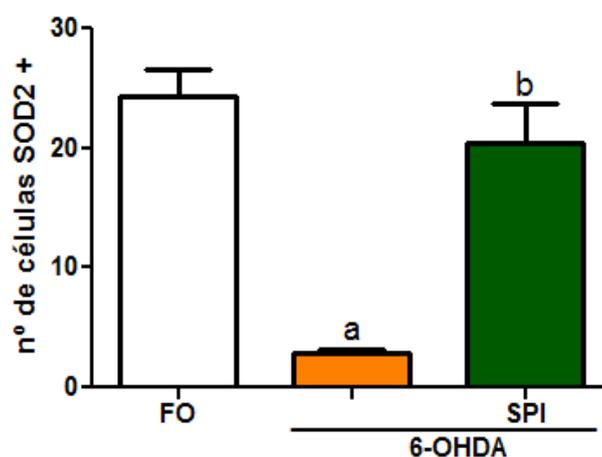


Figura 26 B- Número de células SOD-2 positivas no corpo estriado direito lesionado de ratos parkinsonianos.



Os animais com lesão unilateral pela 6-OHDA foram tratados com SPI 25 e 50 mg/kg e após o tratamento foram eutanaziados para retirada do estriado. (n=4)

A- As fotomicrografias (aumento 400x; 100 µm) foram quantificados pelo software Image J, NIH, EUA.

B- Gráfico do numero de células imunomarcadas para SOD2.  $p < 0,001$ , <sup>a</sup> vs FO, <sup>b</sup> vs 6-OHDA (ANOVA unidirecional seguido de Tukey).

## 6 DISCUSSÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que causa a morte neuronal em regiões dopaminérgicas específicas no cérebro (substância negra *pars compacta*, estriado) resultando em sintomas motores como tremor de repouso, rigidez e bradicinesia. Atualmente a Levodopa é o tratamento de primeira-linha para a DP, porém embora seja eficaz do ponto de vista sintomático o tratamento com Levodopa é incapaz de fornecer uma proteção duradoura necessária para impedir a progressão da doença. Assim em estágios mais avançados da DP os pacientes desenvolvem complicações motoras e alterações nas funções autonômicas e cognitivas (DOUNA *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas tem aumentado o interesse de inúmeros investigadores no estudo de drogas com atividades neuroprotetoras que possam ser utilizadas como novas estratégias terapêuticas no tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP. Por definição, a neuroproteção é um efeito que pode resultar em resgate, recuperação ou regeneração do sistema nervoso, suas células, estrutura e função (VAJDA, 2002).

Para elucidar a patogênese, mecanismos envolvidos com a morte neuronal e avaliar a eficácia desses novos tratamentos farmacológicos para DP foram desenvolvidos numerosos modelos animais. O sucesso na translação dos dados da pesquisa básica para a clínica apóia-se fortemente no quanto estes modelos manifestam de modo acurado a patologia os sintomas e os mecanismos patogênicos observados no paciente com DP (TIEU, 2011). Assim modelos animais com um elevado poder preditivo são pré-requisito para a pesquisa translacional e quanto de similaridade mostrar o modelo para a DP maior o valor preditivo para os ensaios clínicos (ANTONY *et al.*, 2011).

O modelo da lesão estriatal unilateral com 6-OHDA utilizado no presente trabalho como outros modelos apresenta também suas limitações. Assim embora os animais apresentem alguns dos déficits celulares e comportamentais observados em pacientes com DP, animais tratados com 6-OHDA não desenvolvem os corpos de Lewy característicos da DP (ANTONY *et al.*, 2011). Os corpos de Lewy são inclusões citoplasmáticas de agregados insolúveis de diferentes proteínas, sobretudo de alfa-sinucleína. 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 transportador de dopamina,

que carrega a toxina para dentro dos neurônios dopaminérgicos. Uma vez no neurônio, a 6-OHDA acumula-se no citosol e sofre rápida auto-oxidação, levando a altas taxas de formação de radicais livres (principalmente o peróxido de hidrogênio). 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 (BLANDINI *et al.*, 2008).

A *Spirulina platensis* é uma rica fonte de proteína, utilizada como suplemento nutricional, especialmente em países de baixa renda. No presente estudo, a padronização do extrato aquoso de *Spirulina platensis* apresentou uma composição de 16,5 mg/g de fenóis totais e 45,5% de proteína. Esta cianobactéria, além de ser uma fonte rica de proteína, é conhecida por apresentar muitas propriedades, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras, importantes para o tratamento de patologias neurodegenerativas crônicas, como a doença de Parkinson.

A presença de neuroinflamação e a disfunção mitocondrial, características comuns dessas condições neurológicas, podem levar ao aumento do estresse oxidativo por liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Essas últimas alterações irão intensificar ainda mais o dano neuronal e a inflamação subsequentes, resultando em uma retro-alimentação progressiva da neurodegeneração (FISCHER; MAIER, 2015). Diante dos fatos apresentados, avaliamos as propriedades neuroprotetoras de *S. platensis* (SPI) no modelo de hemiparkinsonismo, resultante da lesão estriatal de 6-OHDA.

As lesões estriatais induzidas pela 6-OHDA causam comportamento rotatório quando utilizamos um agonista dopaminérgico, como a apomorfina, nos animais hemi-parkinsonianos (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). Isso ocorre porque os receptores pós-sinápticos dopaminérgicos estriatais estão hipersensibilizados no lado desnervado, apresentando uma *up regulation* dos receptores D<sub>2</sub>. Esta resposta rotacional à apomorfina é utilizada como índice comportamental da supersensibilidade do receptor DA, após lesão unilateral de 6-OHDA (WADDINGTON *et al.*, 1979), bem como para avaliar a extensão da desnervação nigrostriatal unilateral (HUDSON *et al.*, 1993). Assim o teste da apomorfina tem sido usado como padrão-ouro para análises de lesões causadas pela 6-OHDA, porque é robusto, confiável e detecta as alterações na sensibilidade dos receptores de dopamina estriatais, proporcionando dessa forma, a verificação de extensas lesões nigroestriatais (MEREDITH; KANG, 2006). No presente trabalho, a potencial atividade neuroprotetora da SPI foi apoiada pela diminuição do

comportamento rotacional induzido pela apomorfina, onde o grupo lesionado 6-OHDA não tratado apresentou um aumento de quase 300 vezes o número de rotações contralaterais/h quando comparadas ao grupo FO. Este resultado está de acordo com diversos estudos (AGUIAR *et al.*, 2008; RIZELIO *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2013) que demonstraram um aumento similar, ao realizarem o teste da apomorfina duas a três semanas após a indução da lesão com 6-OHDA. Por outro lado o tratamento com a SPI nas doses de 25 e 50 mg/kg, apresentou uma diminuição significativa deste parâmetro de forma dose-dependente, este resultado por si, indica um efeito neuroprotetor desta cianobactéria.

A locomoção no campo aberto reflete a atividade exploratória do animal (KONTINEN *et al.*, 1999). No presente estudo, foi observado que a 6-OHDA induziu déficit na atividade locomotora, mas que após o tratamento com a *Spirulina* nos animais lesionados não foram observadas diferenças significativas em relação à atividade exploratória horizontal (*crossings*) nem na exploração vertical (*rearings*), no teste do campo aberto, assim como observado também em estudos anteriores (TASAIESKY *et al.*, 2008 ; TEIXEIRA *et al.*, 2013). O estudo de Iancu e colaboradores (2005) corrobora esses achados, onde os animais lesionados unilateralmente pela 6-OHDA, demonstraram comprometimento na atividade locomotora no teste do *rotarod* e no teste do cilindro, mas não no teste do campo aberto. 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 observamos alterações visíveis como a bradicinesia (SCHOBER, 2004).

No teste do labirinto em Y (Y-Maze) não foram observadas diferenças significativas em relação a memória operacional e ao aprendizado nos animais injetados com 6-OHDA. Estudos anteriores sugeriram que a tarefa espacial/relacional e detalhada, o aprendizado, é processada de forma independente por diferentes estruturas cerebrais (PACKARD *et al.*, 1989; PACKARD; McGAUGH, 1992). Assim, demonstrou-se que a aprendizagem espacial em ratos é criticamente dependente da integridade do hipocampo, mas não do estriado dorsal, enquanto que a aprendizagem das tarefas é dependente da integridade do estriado dorsal. Nos estágios iniciais da DP, quando a via nigrostriatal é danificada, os pacientes apresentam dificuldades de aprendizado de tarefas de hábito, mas mantém a capacidade de formar novas memórias episódicas (DuBOIS; PILON, 1997).

Animais parkinsonianos apresentam déficits motores semelhantes aos observados em pacientes com DP em vários aspectos. Na avaliação da assimetria dos membros anteriores,

através do teste do cilindro, observamos uma maior atividade em ambas as patas demonstradas através de um aumento do número de toques na parede do cilindro, mas não foi observado diferenças significativas do número de toques nas patas do lado ipsilateral nem do lado contralateral à lesão com 6-OHDA, assim como descrito em estudos anteriores (SCHALLERT *et al.*, 2000;SHI *et al.*, 2004).

Pacientes com DP apresentam movimentos reduzidos em amplitude (hipocinesia), assim como déficits na postura e equilíbrio, que levam à uma incoordenação motora durante a caminhada (ROZAS; GARCIA, 1997). Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o tratamento com *Spirulina platensis* não apresentou melhora na assimetria motora causada pela injeção de 6-OHDA. No entanto em um estudo de Chattopadhyaya e colaboradores, 2015, os animais tratados com *Spirulina fusiforme* apresentaram uma melhora de quase 33 % na coordenação motora dos animais, avaliada no teste do Rotarod. Neste teste assim como no teste do cilindro, a via reticuloespinal parece estar envolvida, visto que ajustes posturais são necessários para manter os animais no rotômetro (MEREDITH; KANG 2006). Animais com lesões unilaterais pela 6-OHDA apresentaram forte correlação com a assimetria das patas dianteiras no teste do cilindro, caracterizada por um aumento do uso da pata ipsilateral a lesão e uma redução da pata dianteira contralateral à lesão de forma independente.

O teste do nado forçado é um dos modelos mais tradicionais para o estudo da depressão em animais de laboratório. É um teste com boa validade preditiva e está baseado no modelo ou paradigma de “desespero comportamental” (PORSOLT *et al.*, 1977). Há relatos em outros estudos que demonstrem o efeito de drogas feitas a partir de plantas ou produtos naturais sobre a depressão em modelos animais de doença de Parkinson porém não são muito claros. Neste estudo demonstramos que o tratamento com a SPI não apresentou diferenças significativas no tempo de imobilidade do animal, portanto não foi possível confirmar um efeito antidepressivo da SPI nas doses testadas.

Mostramos que o tratamento com a SPI recuperou parcialmente as depleções DA e DOPAC observadas no estriado de animais lesionados com 6-OHDA não tratados. A característica neuropatológica mais importante da doença de Parkinson é a perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra, levando a uma depleção severa da DA estriatal (HORNYKIEWICZ; KISH, 1986). O estriado possui uma população de interneurônios dopaminérgicos que aumenta em número em modelos animais da doença de Parkinson ,

presumivelmente para compensar a depleção de dopamina (HUOT; LÉVESQUE; PARENT *et al.*, 2007). A deficiência dopaminérgica em pacientes com doença de Parkinson causa anormalidades de movimento, comportamento, aprendizagem e emoções (RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009). Assim, o SPI, por reversão parcial da depleção DA, ofereceria alguma proteção para pacientes com DP.

As teorias atuais sobre os principais mecanismos que tentam explicar a fisiopatologia do envelhecimento, como a doença neurodegenerativa relacionada à idade, frequentemente incluem o estresse oxidativo como parte de uma maior constelação de processos patológicos, em vez de se concentrar em uma única causa (JAMES *et al.*, 2012, GREENOUGH *et al.*, 2013). Em geral, as visões contemporâneas de distúrbios neurodegenerativos comuns, incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson, acidente vascular cerebral e declínio cognitivo relacionado à idade (ANDERSEN, 2004), incluem uma visão mais ampla que não depende predominantemente de um único processo bioquímico.

O tratamento com a SPI reverteu significativamente o aumento dos níveis de nitrito e a peroxidação lipídica observado no estriado direito (lesionado) do grupo 6-OHDA não tratado. É amplamente aceito que o estresse oxidativo, que leva à produção de EROS, está presente em doenças neurodegenerativas (CHEN; GUO; KONG, 2012; KIM *et al.*, 2015 ; SULTANA; PERLUIGI; BUTTERFIELD , 2013 ; UTTARA *et al.*, 2009). Outro trabalho realizado por nosso grupo de pesquisas demonstrou o aumento da peroxidação lipídica e níveis de nitrito em cérebros de pacientes com Alzheimer (DICIERO; BRUIN; VIANA, 2000) . Estes dois parâmetros são bons marcadores de estresse oxidativo e foram atenuados pela SPI, indicando o potencial antioxidante desta cianobactéria. Anteriormente (BERMEJO-BESCÓS; PINERO-ESTRADA; VILLAR DEL FRESNO, 2008), mostraram que o extrato proteico aquoso de *S. platensis* apresenta uma atividade antioxidante nas células da linhagem SH-SY5Y (neuroblastoma huano), protegendo a atividade das enzimas antioxidantes celulares (GPx total, GPx-Se e GR) e aumentando a glutatona reduzida nas células na presença do estresse oxidativo induzido pelo ferro. Um estudo recente (PÉREZ-JUÁREZ *et al.*, 2016) demonstrou que *S. platensis* reduziu a morte neuronal induzida pelo ácido kaínico em camundongos, devido as suas propriedades antioxidantes.

Para avaliar a morte neuronal dopaminérgica pela imunorreatividade de TH, o trabalho de Rodrigues; Gomide; Chadi, 2003, mostrou que a injeção estriatal de 6-OHDA

ocasionou um desaparecimento maciço de terminais imunorreativos à TH, em uma área definida dentro do estriado em torno do local da injeção. Estes autores também observaram o diminuição de corpos celulares da DA, em uma pequena região da substância negra pars compacta ipsilateral e concluíram que a injeção estriatal de 6-OHDA leva a degeneração retrógrada, bem como a ativação glial na via da dopamina nigrostriatal. TH é a enzima limitante de taxa para síntese de catecolaminas cerebrais; e a redução da expressão de TH resulta em síntese de DA diminuída, levando a DP, o que torna TH essencial na patogênese da DP (ZHU; JING, 2012). Assim, a DP pode ser considerada como uma síndrome de deficiência de TH do estriado (TABREZ *et al.*, 2012). Mostramos que o tratamento com SPI de animais lesionados com 6-OHDA produziu uma recuperação quase completa da redução significativa da imunorreatividade para TH. Considerando a grande importância da atividade de TH na DP, uma estratégia terapêutica lógica e eficiente para seu tratamento pode basear-se na correção da deficiência de TH.

Também demonstramos uma diminuição da imunorreatividade para DAT nos animais lesionados por 6-OHDA não tratados, o que foi quase que completamente recuperado após o tratamento com SPI. O transportador de dopamina (DAT) é uma proteína transmembranar, responsável pela recaptação da DA a partir da fenda sináptica e do término da transmissão dopaminérgica (VARRONE; HALLDIN, 2010). Embora geralmente seja aceito que os sintomas parkinsonianos se desenvolvam quando cerca de 70-80% dos neurônios DA são perdidos, estudos de imagem mostraram que uma perda em torno de 50% dos terminais DA é necessária para o aparecimento de sintomas em pacientes com DP (VARRONE; HALLDIN, 2010) . Há um declínio desse receptor, à medida que a doença progride em um processo exponencial, que pode ser revelado por obtenção de imagem do receptor DAT, através de tomografia computadorizada, obtidas em pacientes com DP (ANTONINI; BIUNDO, 2014). Assim, este parâmetro pode ser considerado como um marcador para a diferenciação de pacientes com DP de indivíduos saudáveis (BOR-SENG-SHU *et al.*, 2014).

A neurodegeneração resultará em morte celular e os restos neuronais desaparecerão eventualmente com a astrogliose e a reação inflamatória. Esta neurodegeneração pode ser rastreada por meio de uma técnica de coloração com o Fluoro-Jade C que é positiva a partir das 24 horas após a injeção de 6-OHDA. Esta técnica marca principalmente os neurônios no processo de degeneração (SCHUMED, ALBERTSON, SLIKKER, 1997). Nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo na marcação por Fluoro-Jade C no estriado

lesionado por 6-OHDA não tratado e que este aumento foi revertido após o tratamento com a *Spirulina*, comprovado pela diminuição da fluorescência. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Kang, 2013, que investigou o efeito de (+)-catequina na neurodegeneração usando o modelo de lesão do hipocampo de rato induzido pelo ácido kaínico. Estes resultados mostraram que a injeção *icv* de ácido kaínico induz a perda neuronal, bem como a ativação de células gliais na região CA3 do hipocampo como descrito anteriormente (MATSUOKA *et al.*, 1999), e o tratamento com (+)-catequina não só protege as células neuronais do hipocampo, mas também reduz os astrócitos positivos para o GFAP. Estes dados sugerem que a (+)-catequina, rica em polifenóis como a *Spirulina*, tem um forte efeito neuroprotetor contra a neurodegeneração do hipocampo induzida pelo ácido kaínico em ratos.

A neuroinflamação pode contribuir para uma variedade de doenças neurodegenerativas e os EROs são os principais reguladores deste processo, exercendo um efeito prejudicial direto sobre os neurônios. O óxido nítrico é um mensageiro químico altamente reativo, desempenhando um papel importante na mediação de caminhos fisiológicos e patológicos (KAVYA; DIKSHIT, 2015). A expressão do iNOS está ligada à geração de EROS que afeta vários componentes celulares e prejudica preferencialmente os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo na DP (KOPPULA *et al.*, 2012). Mostramos um aumento de nove vezes na imunorreatividade estriatal para iNOS no grupo lesionado por 6-OHDA não tratado, quando relacionado ao grupo FO. Por outro lado, após o tratamento com SPI (50mg/kg), essa imunorreatividade foi ainda menor que a observada no grupo FO. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Lee e colaboradores, 2017, onde a citotoxicidade das citocinas foi significativamente atenuada pelo extrato de *S.máxima*, outra espécie de *Spirulina*, que efetivamente impediu a produção de óxido nítrico, inibindo a óxido nítrico sintase e suprimindo a apoptose.

Uma regulação positiva de moléculas inflamatórias, como iNOS e COX-2, tem sido sugerida para desempenhar um papel importante na doença de Parkinson, levando à perda de neurônio dopaminérgico (OKUNO *et al.*, 2005). A enzima COX-2 é responsável pela primeira etapa na síntese de vários mediadores importantes que estão envolvidos tanto na iniciação como na resolução da inflamação, e a subsequente geração de prostaglandinas (PGs) após a ativação, tem mostrado participar nos processos neurodegenerativos de uma variedade de doenças (TEISMANN, 2012). Além disso, a COX-2 é rapidamente expressa em vários tipos de células, em resposta a citocinas, fatores de crescimento e moléculas pró-inflamatórias

(BARTELS; LEENDERS, 2010). No presente trabalho, demonstramos que o grande aumento na imunomarcção para COX-2, no estriado do grupo lesionado 6-OHDA não tratado, foi quase completamente revertido após tratamentos SPI (50 mg/kg). Um trabalho recente mostrou o controle do estresse oxidativo e mediadores pró-inflamatórios, modulação da expressão gênica e inibição da COX-2 como mecanismos potenciais envolvidos nos efeitos da ficocianina C e ficocianobilina (componentes bioativos da *Spirulina*), no recrutamento, diferenciação e maturação de células precursoras de oligodendrócitos em lesões que envolvem desmielinização (PENTÓN-ROL, MARÍN-PRIDA, FALCÓN-CAMA, 2018).

Nos últimos anos, Glicogênio sintase quinase-3  $\beta$  (GSK-3  $\beta$ ) tem demonstrado desempenhar papéis essenciais na modulação de uma variedade de funções celulares, o que provocou esforços para desenvolver inibidores de GSK-3  $\beta$  que possam ser utilizados na terapêutica (GOLPICH *et al.*, 2015). No presente estudo, houve um aumento da imunomarcção para o GSK-3 no grupo 6-OHDA e este aumento foi revertido pelo tratamento com a *Spirulina*. Um trabalho de Ren e colaboradores, 2016 mostrou que o Dihidromicertina (DHM), um flavonóide que possui efeitos antioxidantes, estimulou a fosforilação da GSK-3 $\beta$  em células MES23.5 provavelmente atenuando a lesão celular induzida por MPTP e a produção de EROS de uma maneira dependente do tempo e da dose, o que provavelmente contribui para proteção neuronal mediada por DHM. Além de supressão mediada por DHM da produção de EROS, este estudo fornece a primeira evidência de que o DHM modula o via Akt/GSK-3 $\beta$ , o que pode estar associado à proteção neuronal dopaminérgica, contribuindo para os efeitos neuroprotetores do DHM. Estudo de Koh *et al.*, 2017, mostrou que os níveis de glutatona do hipocampo foram examinados para determinar os efeitos de *Spirulina* sobre o estresse oxidativo nos animais injetados com beta-amilóide (A $\beta$ <sub>1-42</sub>). A *Spirulina* aumentou os níveis de glutatona no hipocampo que foram reduzidos nos ratos injetados com a  $\beta$ -amilóide. A *Spirulina* também promoveu a ativação do fator neurotrófico cerebral fosfatidilinositol-3 quinase inibindo a fosforilação da GSK-3 $\beta$ .

O estudo de Chattopadhyaya e colaboradores, 2015, mostraram as propriedades neuroprotetoras de algumas outras espécies de *Spirulina* (*S. fusiforme*) em modelo de DP semelhante ao nosso (induzido por 6-OHDA) melhorando a atividade locomotora e diminuindo o estresse oxidativo, bem como aumentando os níveis de DA, nos ratos lesionados. Outro estudo (AZIZ *et al.*, 2014) demonstrou o efeito protetor do tratamento com *Spirulina* na função locomotora e nos danos morfológicos, no modelo de lesão da medula

espinhal em ratos, mostrando que a suplementação de *S.platensis* (180 mg/kg/dia) impediu os déficits neurológicos nos animais lesionados. Garbuzova-Davis e Bickford (2010) mostraram que uma dieta suplementada com *Spirulina* manteve significativamente o peso corporal e o reflexo de extensão, e também reduziu os marcadores inflamatórios e a degeneração do neurônio motor, em um modelo de esclerose lateral amiotrófica em ratos.

O trabalho de Pabon e colaboradores (2012), usando um modelo de DP induzido por alfa-sinucleína em ratos, demonstrou que a SPI apresenta atividade neuroprotetora, pois observaram mais células TH e NeuN positivas na substância negra após o tratamento. A SPI também diminuiu o número de células microgliais ativadas. Embora esses achados corroborem com os nossos e apontem para o potencial de SPI na neurodegeneração, os autores usaram um protocolo diferente: em primeiro lugar, a administração de uma dieta contendo 0,1% de SPI, por um período de 30 dias (pré-tratamento) e, em segundo lugar, tratamento com dieta suplementada com *Spirulina* nos animais lesionados, durante 2 semanas, 1 ou 4 meses.

No presente trabalho a 6-OHDA promoveu uma diminuição significativa nas células positivas para a enzima SOD-2 (superóxido dismutase 2) no estriado lesionado e essa diminuição foi revertida após o tratamento com a *Spirulina*. Em relação à presença de SOD na substância negra de pacientes com DP, Saggi e colaboradores (1989) relataram um aumento na atividade de SOD-Mn (SOD2) e normal SOD-Cu/Zn (SOD1). Nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Bermejo-Bescós e colaboradores, 2008, onde o extrato proteico de *S. platensis* e a ficocianina exercem a atividade antioxidante protegendo a atividade das enzimas antioxidantes celulares GPx total, GPx-Se e GR e aumentando a glutatona reduzida nas células contra o estresse oxidativo induzido pelo ferro. Além disso, eles mostraram que a *S. platensis* possui propriedades quelantes de ferro que são conhecidas por catalisar muitos processos que levam ao aparecimento de radicais livres, portanto, as propriedades antioxidantes dessa cianobactéria e seus componentes bioativos, como a ficocianina, podem surgir tanto da eliminação de radicais como da quelação de metais.

Vários estudos recentes mostraram o efeito antioxidante e antiinflamatório da *Spirulina* e que este efeito pode ser útil no tratamento do diabetes tipo I. Considerando que a diabetes é uma doença de caráter inflamatório, o trabalho de Joventino e colaboradores, 2012, mostrou que a *S.platensis* diminuiu a glicemia, bem como os níveis de triglicérides e colesterol total de

ratos diabéticos. O estudo de Lee e colaboradores, 2017, corrobora este resultado, mostrando que o extrato de *Spirulina* pode ser eficaz para preservar a viabilidade e a função das células  $\beta$  pancreáticas contra condições citotóxicas. Além disso, o extrato de *Spirulina* administrado por via oral em ratos diabéticos mostrou também a diminuição dos níveis de glicose, aumento da insulina e melhora nos marcadores de enzimas hepáticas, aumentando a sobrevivência e reduzindo ou retardando a destruição das células  $\beta$  mediadas por citocinas. Outro estudo, observou que o tratamento com *Spirulina* ou insulina aliviou significativamente a disfunção renal através da redução do estresse oxidativo, enquanto os ratos recuperaram histologia renal normal. Em geral, este estudo indica que a *Spirulina* é eficiente na inibição da hiperglicemia e do estresse oxidativo induzido pela diabetes e sugere que a administração desta alga pode ser útil na prevenção de complicações diabéticas. Essa melhora foi ainda mais pronunciada do que a causada pela injeção de insulina (GARGOURI, *et al.*, 2017).

Estudos recentes tem sido mais voltados para pesquisar à ação dos componentes bioativos da *Spirulina*, como a ficocianina C e a ficocianobilina. O estudo de Kumar *et al.*, 2017, mostrou que a *Spirulina* melhora significativamente a vida útil e a atividade locomotora das moscas DJ-1 $\beta\Delta^{93}$  expostas ao paraquat. Além disso, a suplementação de *Spirulina* e ficocianina C individualmente e independentemente reduziu o estresse oxidativo. Uma diminuição significativa nas atividades de superóxido dismutase e catalase nas moscas (DJ-1 $\beta\Delta^{93}$ ) alimentadas com *Spirulina* tende a indicar o envolvimento de propriedades antioxidantes associadas à *Spirulina* na modulação da sinalização induzida pelo estresse e melhora na vida útil e atividade locomotora nas moscas drosófila (DJ-1 $\beta\Delta^{93}$ ). Estes resultados sugerem que as propriedades antioxidantes da *Spirulina* indicam um possível uso como suplemento nutricional para melhorar a qualidade de vida na doença de Parkinson.

Outro estudo (CERVANTES-LLANOS *et al.*, 2018) mostrou que, componentes bioativos da *Spirulina platensis* como a ficocianina C, a principal biliproteína dessa cianobactéria e seu grupo protéico, ficocianobilina, exercem ações de melhoria em modelos de roedores de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e restaurou a função motora dos animais. Além disso, os marcadores de estresse oxidativo foram modificados com ficocianina C medidos em homogeneizado cerebral e soro e protegeram a integridade das bainhas cerebrais de mielina, conforme demonstrado pela análise de microscopia eletrônica de transmissão. Em camundongos C57BL/6 com EAE, ficocianobilina melhorou quando administrado por via oral o estado clínico dos animais e reduziu os níveis de expressão das

citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IFN- $\gamma$  do cérebro. Esses resultados, pela primeira vez, apoiam o fato de que tanto ficocianina C quanto a ficocianobilina administrada por via oral poderiam potencialmente melhorar a neuroinflamação, proteger da desmielinização e da perda axonal, o que pode ser traduzido em uma qualidade de vida melhorada para pacientes com encefalomielite.

O teste da formalina, que é muito utilizado para medir a efetividade de agentes antinociceptivos foi realizado com o objetivo de corroborar nossos achados e ratificar que os efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes da *Spirulina platensis* são atribuídos em grande parte, possivelmente ao seu conteúdo proteico. O teste foi realizado com uma Fração Protéica da *Spirulina* (FPS) obtida do laboratório CEFAC-UFC. A vantagem deste teste sobre o teste de contorções é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor, vista em duas fases: fase inicial aguda (0 a 5 minutos) e tardia (20 a 25 minutos) após o período entre as fases, denominado intervalo de quiescência (HUNSKAAR; HOLE, 1987, MARTINS et al., 2006). A primeira fase é conhecida como dor neurogênica ou aguda, estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A $\delta$  e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase (inflamatória) está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, serotonina, e outros (HUNSKAAR; HOLE, 1987, SHIBATA et al., 1989). Os resultados mostraram que a FPS diminuiu o número de lambeduras neste ensaio, somente na fase inflamatória (dados não mostrados), fortalecendo ainda mais a hipótese de que componentes protéicos bioativos da *S. platensis* estão envolvidos na diminuição de citocinas e enzimas pró-inflamatórias. Semelhante a este resultado, o trabalho de Joventino e colaboradores, 2012, mostrou que a *Spirulina* também diminuiu de forma dependente da dose a primeira (neurogênica) e somente a segunda fase (inflamatória) do teste da formalina, evidenciando a ação anti-inflamatória dessa cianobactéria.

A *Spirulina* em um trabalho recente inibiu a inflamação induzida por LPS, através da repressão de HDAC (Histona desacetilase) em macrófagos (CHUANG *et al.*, 2009). As enzimas HDACs são conhecidas por desempenhar um papel na homeostase da acetilação de proteínas e regular as atividades celulares, como a transcrição, e sua disfunção está associada a uma grande variedade de distúrbios cerebrais (HALILI *et al.*, 2009). Assim, os inibidores de HDAC, além de exercer efeitos anti-inflamatórios, também apresentam um potencial como

drogas neuroprotetoras (GRABIEC; TAK; REEDQUIST, 2011; COPPEDÈ, 2014). Recentemente, nosso grupo demonstrou que o ácido valpróico, no modelo 6-OHDA, provavelmente exerce uma ação neuroprotetora, em parte através da inibição de HDAC (XIMENES *et al.*, 2015). O ácido valpróico aumenta a expressão de fatores neurotróficos, o que poderia contribuir para seus efeitos neuroprotetores em neurônios DA (CHEN *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007; LENG *et al.*, 2016). A inibição de HDAC foi hipotetizada como uma cooperação para a neuroproteção, através da regulação da expressão de genes em células gliais (WU *et al.*, 2013).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Spirulina* é uma cianobactéria muito rica em proteína e por este motivo, vem sendo considerada como um super-alimento. Mostramos no presente trabalho o potencial neuroprotetor da SPI relacionado a reversão parcial ou completa de várias alterações neuroquímicas observadas no corpo estriado do animal lesionado por 6-OHDA antes do tratamento com a SPI. Esta capacidade neuroprotetora foi manifestada na reversão dos níveis de DA e seus metabólitos (DOPAC e HVA) e principalmente na redução da imunoreatividade para TH, DAT, iNOS e COX-2. A SPI apresentou também uma grande atividade antioxidante ao diminuir a lipoperoxidação lipídica e os níveis de nitrito no corpo estriado dos animais lesionados por 6-OHDA.

Além disso, acreditamos que os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da *Spirulina* certamente contribuirão para suas ações neuroprotetoras, como mostrado no presente trabalho, sugerindo que este medicamento como candidato potencial seja incluído em estudos translacionais que visem a sua utilização na clínica para o tratamento de DP. Entretanto, devido à natureza multifatorial da DP, as terapêuticas disponíveis têm uma eficácia limitada, sendo necessário, portanto, a descoberta de novas drogas que atuem sobre as diferentes características da doença. Todos esses resultados dão suporte as propriedades neuroprotetoras da SPI e podem estimular estudos translacionais que promovam a inclusão da SPI como tratamento alternativo para a DP.

## 8 CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que a *Spirulina* é neuroprotetora no modelo de hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA em ratos (injeção estriatal unilateral) pois reduziu o comportamento rotacional induzido pela apomorfina, apresentou aumento nos níveis de DA, DOPAC e HVA; diminuiu a lipoperoxidação os níveis Nitrito/Nitrato; aumentou as imunomarcações para DAT e TH; diminuiu a neuroinflamação por diminuir a imunomarcação para iNOS e COX2 e também diminuiu a imunomarcação para o GSK<sub>3</sub> β; diminuiu o estresse oxidativo, demonstrado através da diminuição das imunomarcações para SOD-2; diminui a morte celular demonstrado na coloração pro fluoro-jade C..

**O que sugere que a *Spirulina*, devido aos seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante, demonstra promissor efeito neuroprotetor para a Doença de Parkinson.**

## 9 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. M.; NOBRE, H. V. J. R.; 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.
- AGUIAR, P. C.; LESSA, P. S.; GODEIRO JUNIOR, C.; BARSOTTINI, O.; FELÍCIO, A. C.; BORGES, V.; SILVA, S. M. A.; SABA, R. A.; FERRAZ, H. B.; MOREIRA FILHO, C. A.; ANDRADE, L. A. F. Genetic and Environmental Findings in Early-onset Parkinson's Disease Brazilian Patients. **Movement Disorders.** v. 23, n. 9, p. 1228–1233, 2008.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. Outdoor and indoorcultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. **Z Naturforsch C.** v.63(1-2),p.85-90, 2008.
- ANTONINI, A; BIUNDO, R. Parkinson disease: can dopamine transporter imaging define early PD? **Nat Rev Neurol**, v. 10: p. 432–433, 2014.
- ANTONY, P. M.; DIEDERICH, N. J.; BALLING, R. Parkinson's disease mouse models in translational research. **Mamm Genome**, v.22,p.401-19, 2011.
- 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.
- ASHABI, G.; RAMIN, M.; AZIZI, P.; TASLIMI, Z.; ALAMDARY, Z. S.; HAGHPARAST, A.; ANSARI, N.; MOTAMEDI, F.; KHODAGHOLI, F. ERK and p38 inhibitors attenuate memory deficits and increase CREB phosphorylation and PGC-1 levels in a-injected rats. **Behavioural. Brain Research.** v. 232, p. 165– 173. 2012.
- AZIZ, I.; RAMLI, M. D. C.; ZAIN, N. S. M.; SANUSI, J. Behavioral and histopathological study of changes in spinal cord injured rats supplemented with *Spirulina platensis*. **Evid-Bas Complem Altern Med**, v. 8, p.1-8, 2014.
- 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.
- BAIN, G.; KITCHENS, D.; YAO, M.; HUETTNER, J. E.; GOTTLIEB, D. I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. **Dev Biol.** v.168(2),p.342-57, 1995.
- BARTELS, A. L.; LEENDERS, K. L. Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. **Curr Neuropharmacol**, v. 8: p. 62–68, 2010.
- BASTIDE, M. F.; MEISSNER, W. G.; PICCONI, B.; FASANO, S.; FERNAGUT, P. O.; FEYDER, M.; FRANCARDO, V.; ALCACER, C.; DING, Y.; BRAMBILLA, R.; FISONE, G.; JON STOESSL, A.; BOURDENX, M.; ENGELN, M.; NAVAILLES, S.; DE DEURWAERDÈRE, P.; KO, W. K.; SIMOLA, N.; MORELLI, M.; GROG, L.;

RODRIGUEZ, M. C.; GUREVICH, E. V; QUIK, M.; MORARI, M.; MELLONE, M.; GARDONI, F.; TRONCI, E.; GUEHL, D.; TISON, F.; CROSSMAN, A. R.; KANG, U. J.; STEECE-COLLIER K.; FOX, S.; CARTA, M.; ANGELA, CENCI, M.; BÉZARD, E. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** v.132,p.96-168, 2015.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 325-332, 2001.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Anal. Biochem.** v. 44, p. 276-287, 1971.

BECKMAN, J. S; BECKMAN, T. W; CHEN, J; MARSHALL, P. A, FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.87,p.1620-4, 1990.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **J Appl Phycol.** v. 5. p. 235–241, 1993.

BERMEJO-BESCOS, P.; PINERO-ESTRADA, E.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Toxicol In Vitro**, v. 22: p. 1496–1502, 2008.

BIDO, S.; MARTI, M.; MORARI, M. Amantadine attenuates levodopa-induced dyskinesia in mice and rats preventing the accompanying rise in nigral GABA levels. **J Neurochem.** v.118,p.1043-55,2011.

BIEDLER, J. L.; ROFFLER-TARLOV, S.; SCHACHNER, M.; FREEDMAN, L. S. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. **Cancer Res.** v.38,p.3751-7, 1978.

BLANDINI, F. ; NAPPI G. ; TASSORELLI, C. ; MARTIGNONI, E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** v. 62, p.63-88; 2000.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. 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.; MÜLLER, 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.

BOR-SENG-SHU, E.; FELICIO, A. C.; BRAGA-NETO, P.; BATISTA, I. S.; PAIVA, W. S.; ANDRADE, D. C.; TEIXEIRA, M. J.; ANDRADE, L. A. F.; BARSOTTINI, O. G. P; SHIH, M. C.; BRESSAN, R. A.; FERRAZ, H. B. Dopamine transporter imaging using <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 SPECT in Parkinson's disease. **Med Sci Monit**, v. 20,p. 1413–1418, 2014.

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

BREDESEN, D. E. Toward a mechanistic taxonomy of cell death programs. **J Alzheimers Dis.** .v.6,p.3-6, 2004.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors.**Br J Psychol.** v. 48, 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. v. 61, n.3, p.231-265, 2000.

CERVANTES-LLANOS M, LAGUMERSINDEZ-DENIS, N.; MARÍN-PRIDA, J.; PAVÓN-FUENTES, N.; FALCON-CAMA, V.; PINIELLA-MATAMOROS, B.; CAMACHO-RODRÍGUEZ, H.; FERNÁNDEZ-MASSÓ, J. R.; VALENZUELA-SILVA, C.; RAÍCES-CRUZ, I.; PENTÓN-ARIAS, E.; TEIXEIRA, M. M.; PENTÓN-ROL, GLIFE, S. C. I. Beneficial effects of oral administration of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin in rodent models of experimental autoimmune encephalomyelitis v.1,p.130-138, 2017.

CHAPUIS, S.; OUCHCHANE, L.; METZ, O.; GERBAUD, L.; DURIF, F. Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. **Mov Disord.** v.20,p.224-30, 2005.

CHATTOPADHYAYA, I.; GUPTA, S; MOHAMMED, A.; MUSHTAG, N.; CHAUHAN, S.; GHOSH, S. Neuroprotective effect of *Spirulina fusiform* and amantadine in the 6-OHDA induced parkinsonism in rats. **BMC Complem Altern Med**, v.15,p.296, 2015.

CHEN, P-S.; PENG, G-S.; LI, G; YANG, S.; WU, X.; WANG, C-C.; WILSON, B.; LU, R-B.; GEAN, P-W.; CHUANG, D-M.; HONG, J-S. Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. **Mol Psychiatry**, v. 11: p. 1116–1125, 2006.

CHEN, C. M.; LIU, J. L.; WU, Y. R.; CHEN, Y. C.; CHENG, H. S.; CHENG, M. L.; CHIU, D. T. Increased oxidative damage in peripheral blood correlates with severity of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.** v. 33, p. 429-435, 2009.

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.

CHEN, P-S.; WANG, C-C.; BORTNER, C. D.; PENG, G-S.; WU, X.; PANG, H.; LU, R-B.; GEAN, P-W.; CHUANG, D-M.; HONG, J-S. Valproic acid and other HDAC inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. **Neurosci**, v. 149: p. 203–212, 2007.

CHEN, X.; GUO, C.; KONG, J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Neural Regen Res**, v. 7, p. 376–385, 2012.

CHIU, C-T.; WANG, Z.; HUBSBERGER, J. G.; CHUANG, D-M. Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid: beyond bipolar disorder. **Pharmacol Rev**, v. 61, p. 105–142, 2013.

CHOI, D. W. Nitric oxide: foe or friend in the injured brain? **Proc Natl Acad Sci**. p. 9741-9743, 1993.

CHU, W. L.; LIM, Y. W.; RADHAKRISHNAN, A. K.; LIM, P. E. Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. **BMC Complement Altern Med**. v.21,p.10:53, 2010.

CHUANG, D-M.; LENG, Y.; MARINOVA, Z.; KIM, H-J.; CHIU, C-T. Multiple roles of HDAC inhibition in neurodegenerative conditions. **Trends Neurosci**, v. 32: p. 591–601, 2009.

CLEETER, M. W.; COOPER, J. M.; SCHAPIRA, A. H. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. **J, Neurochem**. v.58,p.786-9, 1992.

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.

COPPEDÈ, F. The potential of epigenetic therapies in neurodegenerative diseases. **Font Gen**, v.5,p.1-8,2014.

CRAPO, J. D.; OURY, T.; RABOUILLE, C.; SLOT, J. W.; CHANG, L. Y. Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.1,p.10405-9, 1992.

DAMIANI, D. Mecanismos da Apoptose. **Manual de Patologia e Citopatologia Oncológica 2004**. [www.sistemanervoso.com](http://www.sistemanervoso.com).

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. **Exp Neurol**. v.175,p.303-17. Review, 2002.

DHALL, R.; KREITZMAN, D. L. Advances in levodopa therapy for Parkinson disease: Review of RYTARY (carbidopa and levodopa) clinical efficacy and safety. **Neurology**. v. 5,p.13-24. 2016.

DICIERO, M. M.; DE BRUIN, V. M.; VIANA, G. S. Lipid peroxidation and nitrite plus nitrate levels in brain tissues from patients with Alzheimer's disease. **Gerontology**, v. 46(4): p. 179–184, 2000.

DOBBS, R. J.; CHARLETT, A.; PURKISS, A. G.; DOBBS, S. M.; WELLER, C.; PETERSON, D. W. Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and Parkinsonism. **Acta Neurol Scand**, v.100,p.34–41, 1999.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DUBOIS, B.; PILLON, B. High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus reverses limb-use asymmetry in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. **J Neurol. Cognitive deficits in Parkinson's disease**. v.244(1)p.2-8, 1997.

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.

EDSJÖ, A.; HOLMQUIST, L.; PÅHLMAN, S. Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation. **Semin Cancer Biol**. Jun, v.17(3),p.248-56, 2007.

ELBAZ, A.; CARCAILLON, L.; KAB, S.; MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **Rev Neurol (Paris)**. v. 172(1),p.14-26, 2016.

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

ERIKSEN, J. L.; DAWSON, T. M.; DICKSON, D. W.; PETRUCCELLI, L. Minireview Caught in the Act: Synuclein Is the Culprit in Parkinson's Disease. **Neuron**. v. 40, p. 453–456, 2003.

FABBRINI, G.; BROTCHE, J. M.; GRANDAS, F.; NOMOTO, M.; GOETZ, C. G. Levodopa-induced dyskinesias. **Mov Disord**. v.30,p.1379-89, 2007.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxidat Med Cell Longev**, p 18., 2015.

GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of parkinsonism. **Clin Neurophysiol**. v.119(7),p.1459-74, 2008.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxidat Med Cell Longev**, p. 2012:11, 2012.

GARBUZOVA-DAVIS, S.; BICKFORD, P. C. Neuroprotective effect of *Spirulina* in a mouse model of ALS. **Open Tissue Eng Regen Med**, v. J 3: p.36–41, 2010.

GARGOURI, M; HAMED, H; AKROUTI, A.; DAUVERGNE, X.; MAGNÉ, C.; EL, FEKI, A. Effects of *Spirulina platensis* on lipid peroxidation, antioxidant defenses, and tissue

damage in kidney of alloxan-induced diabetic rats. **Appl Physiol Nutr Metab.** v.1,p.1-10, 2017.

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, M.; AMINI, E.; HEMMATI, F.; IBRAHIM, N. M.; RAHMANI, B.; MOHAMED, Z.; RAYMOND, A. A.; DARGAHI, L.; GHASEMI, R.; AHMADIANI, A. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) signaling: Implications for Parkinson's disease. **Pharmacol Res.** v.1,p.16-26,2015.

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

GRABIEC AM, TAK P. P.; REEDQUIST, K. A. Function of histone deacetylase inhibitors in inflammation. **Crit Rev Immunol**, v. 31: p. 233–263, 2011.

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

GREENOUGH, M. A.; CAMAKARIS, J.; BUSH, A. I. Iron dysregulation and Parkinson's disease. **Neurochem Int.** v.62(5)p.:540-55, 2013.

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

GRÜNBLATT, E.; MANDEL, S.; JACOB-HIRSCH, J.; ZELIGSON, S.; AMARIGLO, N.; REHAVI, 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** (Vienna). v. 111(12),p.1543-73, 2004.

GUTIÉRREZ-REBOLLEDO, G. A.; GALAR-MARTÍNEZ, M.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, R. V.; CHAMORRO-CEVALLOS, G. A.; HERNÁNDEZ-REYES, A. G.; MARTÍNEZ-GALERO, E. Antioxidant effect of *Spirulina* (*Arthrospira*) *maxima* on chronic inflammation induced by Freund's complete adjuvant in rats. **J Med Food**, v. 18: p. 865–871, 2015.

HALILI, M. A.; ANDREWS, M. R.; SWEET, M. J.; FAIRLIE, D. P. Histone deacetylase inhibitors in inflammatory disease. **Curr Top Med Chem**, v. 9: p. 309–319, 2009.

HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **Br J Exp Pathol.** v.70,p.737-57, 1989.

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,

HATTORI, N.; TANAKA, M.; OZAWA, T.; MIZUNO, Y. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. **Ann Neurol.** v.30,p.563-71, 1991.

HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; KOJIMA, I. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: in vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activities. **AIDS Res Hum Retroviruses.** v.10,p.1463-71, 1996.

HERRERO, M-T.; ESTRADA, C.; MAATOUK, L.; VYAS, S. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. **Front Neuroanat,** p. 9:32, 2015.

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.; BREIDERT, T.; ROUSSELET, E.; HUNOT, S; HARTMANN, A.; MICHEL, P. P. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. **Ann N Y Acad Sci.** v.991,p.214-28, 2003.

HORNYKIEWICZ, O.; KISH, S. J. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. **Adv Neurol,** v. 45,p.19-34, 1986.

HUDSON, J. L.; VAN HORNE, C. G.; STROMBERG, I.; BROCK, S.; CLAYTON, J.; MASSERANO, J.; HOFFER, B. J; GERHARDT, G. A. Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. **Brain Res,** v. 626,p.167-174, 1993.

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.

HUOT, P.; LÉVESQUE, M.; PARENT, A. The fate of striatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease and Huntington's chorea. **Brain,** v. 130(Pt 1), p. 222-232, 2007.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain,** v. 30, p. 103-114, 1987.

ISMAIL, M.; HOSSAIN, M. F.; TANU, A. R.; SHEKHAR, H. U. Effect of *Spirulina* intervention on oxidative stress, antioxidant status, and lipid profile in chronic obstructive pulmonary disease patients. **Biomed Res Int,** 2015.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESIA, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord,** v.18(Suppl 1),p.183-185, 2012.

JAMES, A. M.; COLLINS, Y.; LOGAN, A.; MURPHY, M. P. Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease. **Trends Endocrinol Metab.** v.23(9),p.429-34, 2012.

JENNER, P. Wearing off, dyskinesia, and the use of continuous drug delivery in Parkinson's disease. **Neurol Clin.** v.31(3 Suppl),p.17-35, 2013.

JOVENTINO IP, ALVES HG, NEVES LC, PINHEIRO-JOVENTINO F, LEAL LK, NEVES SA, FERREIRA FV, BRITO GA, VIANA GB. The microalga *Spirulina platensis* presents anti-inflammatory action as well as hypoglycemic and hypolipidemic properties in diabetic rats. **J Complement Integr Med.** v.10, p.9, 2012.

KAVYA, R.; DIKSHIT, M. Role of nitric oxide/nitric oxide synthase in Parkinson's disease. **Ann Neurosci (India)**, v. 12: p. 1–5, 2015.

KELM-NELSON, C. A, BRAUER ,A. F.L., BARTH, K. J., LAKE, J. M. , SINNEN, M.L.K., STEHULA, F. J., M. CAGLA, MARONGIU, R., KAPLITT, M. G., CIUCC, M. R..Characterization of early-onset motor deficits in the Pink1/ mouse model of Parkinson disease. **Brain Research**,v.1680,p.1-12, 2018.

KIM, G. H.; KIM, J. E.; RHIE, S. J.; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Exp Neurobiol**, v. 24(4): p. 325–340, 2015.

KIM, H. J.; ROWE, M.; REN, M.; HONG, J. S.; CHEN, P. S.; CHUANG, D. M. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 321: p. 892–901, 2007.

KLIVENYI, P.; VECSEI, L. Novel therapeutic strategies in Parkinson's disease. **Eur J Clin Pharmacol.** v. 66, p. 119–125, 2009.

KOH, E.J.; KIM, K.J.; SONG, J.H.; CHOI, J.; LEE, H.Y.; KANG, D.H.; HEO, H.J.; LEE, B.Y.Spirulina maxima Extract Ameliorates Learning and Memory Impairments via Inhibiting GSK-3 $\beta$  Phosphorylation Induced by Intracerebroventricular Injection of Amyloid- $\beta$  1-42 in Mice. **Int J Mol Sci.** v.13,p.18(11), 2017.

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,p.341-346, 1999.

KOPPULA, S.; KUMAR, H.; KIM, I. S.; CHOI, D-K. Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease. **Med Inflamm**, 2012.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology.** v.87, p.1344-1350, 1984.

KUMAR, A.; CHRISTIAN, P. K.; PANCHAL, K.; GURUPRASAD, B. R.; TIWARI, A. K. Supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) Improves Lifespan and Locomotor Activity in Paraquat-Sensitive DJ-1 $\beta$ 93 Flies, a Parkinson's Disease Model in *Drosophila melanogaster*. **J Diet Suppl.** v.3,p.573-588, 2017.

LEE J, PARK A, KIM MJ, LIM HJ, RHA YA, KANG HG. *Spirulina* Extract Enhanced a Protective Effect in Type 1 Diabetes by Anti-Apoptosis and Anti-ROS Production. *Nutrients*. v.15,p.9(12), 2017.

LEENTJENS, A. F. The role of dopamine agonists in the treatment of depression in patients with Parkinson's disease: a systematic review. *Drugs*. v.12,p.273-286, 2011.

LENG, Y.; WANG, J.; WANG, Z.; LIAO, H-M.; WEI, M.; LEEDS, P.; CHUANG, D-M. Valproic acid and other HDAC inhibitors upregulate FGF21 gene expression and promote process elongation in glia by inhibiting HDAC2 and 3. *Int J Neuropsychopharmacol*, v. 19(8), 2016.

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.

LEWITT, P. A.; FAHN, S. Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. *Neurology*. v.5,p.S3-12, 2016.

LIMA, A. M. A.; HIRATA, F. C. C. H.; BRUIM, G. S.; MOTA, R. M. S; BRUIM, V. M. S. The influence of playing a non-reward game on motor ability and executive function in Parkinson's disease. *Behavioural Neurology*. v. 25, p. 119–125, 2012.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, v. 443, p.787–795, 2006.

LOPES, F. M.; SCHRÖDER, R.; DA FROTA, M. L. J. R.; ZANOTTO-FILHO, A.; MÜLLER, C. B.; PIRES, A. S.; MEURER, R. T.; COLPO, G. D.; GELAIN, D. P.; KAPCZINSKI, F.; MOREIRA, J. C.; FERNANDES, M. D. A. C.; KLAMT, F. Comparison between proliferative and neuron-like sh-sy5y cells as an in vitro model for parkinson disease studies. *Brain Res*. v.14,p.85-94, 2010.

LOTIA, M.; JANKOVIC, J. New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother*. v.17,p.895-909, 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(4), p. 840–860, 2010.

LU, J.; FRERICH, J. M.; TURTZO, L. C.; LI, S.; CHIANG, J.; YANG, C.; WANG, X.; ZHANG, C.; WU, C.; SUN, Z.; NIU, G.; ZHUANG, Z.; BRADY, R. O.; CHEN, X. Histone deacetylase inhibitors are neuroprotective and preserve NGF-mediated cell survival following traumatic brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 110: p. 47–52, 2013.

LU, C.; BHARMAL, A.; KISS, Z. H.; SUCHOWERSKY, O.; HAFFENDEN, A. M. Attention and reach-to-grasp movements in Parkinson's disease. *Exp Brain Res*. v.205(1),p.69-80, 2010.

MACHT, M.; SCHARZ, R.; ELLGRING, H. Patterns of psychological problems in Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. v.111, n. 2, p. 95-101, 2005.

MALIK, M. A.; BLUSZTAJN, J. K.; GREENWOOD, C. E. Nutrients as trophic factors in neurons and the central nervous system: role of retinoic acid. **J Nutr Biochem.** v.11(1),p.2-13, 2000.

MARSHALL, J. F.; UNGERSTEDT, U. Apomorphine-induced restoration of drinking to thirst challenges in 6-hydroxydopamine-treated rats. **Physiol Behav.** v.17(5), p.817-22, 1976.

MARTINS, M.A; DE CASTRO B. L.; TONUSSI, C.R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **Journal of Pain.** v.7,n.2,p. 100 – 107, 2006.

MATSUOKA, Y.; OKAZAKI, M.; TAKATA, K.; KITAMURA, Y.; OHTA, S.; SEKINO, Y.; TANIGUCHI, T. Endogenous adenosine protects CA1 neurons from kainic acid-induced neuronal cell loss in the rat hippocampus. **Eur J Neurosci.** v.11(10),p.3617-25, 1999.

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.

MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; AKIYAMA, H.; MCGEER, E. G. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. **Ann Neurol.** v.24, p. 574-576, 1988.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G.; The alpha-synuclein burden hypothesis of Parkinson disease and its relationship to Alzheimer disease. **Exp Neurol,** v. 212,p.235–238, 2008.

MEREDITH, G. E; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. **Mov Disord.** V.21(10),p.1595-606, 2006.

METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q.; METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. Drug-induced rotation intensity in unilateral dopamine-depleted rats is not correlated with end point or qualitative measures of forelimb or hindlimb motor performance. **Neuroscience,** v. 111(2): p. 325–336, 2002.

MICHEL, A. D.; HUMPHREY, P. P. Distribution and characterisation of [3H]alpha,beta-methylene ATP binding sites in the rat. **Naunyn** v. 348, n. 6, p. 608-617, 1993.

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.

MIZUNO, Y.; OHTA, S.; TANAKA, M.; TAKAMIYA, S.; SUZUKI, K.; SATO, T.; OYA, H.; OZAWA, T.; KAGAWA, Y. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 2,p.1450-1455 , 1989.

MOGI, M.; HARADA, M.; RIEDERER, P.; NARABYASHI, H.; FUJITA, J.; NAGATSU, T. Interleukin-1 beta growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the

brain from Parkinsonian patients. **Neurosci Lett**, v. 180,p.147–150, 1994.

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.

MUGA, M. A.; CHAO JANE, C-J. Effects of fish oil and *Spirulina* on oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic hamsters. **BMC Complement Altern Med**, v. 14: p. 470, 2014.

NADLER, J. V.; PERRY, B. W.; GENTRY, C.; COTMAN, C. W. Degeneration of hippocampal CA3 pyramidal cells induced by intraventricular kainic acid. **J Comp Neurol**. v.15,p.333-359, 1980.

NAGATSUA, T.; SAWADAB, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. **Parkinsonism Relat Disord**. v.15,p.1:S3-8 , 2009.

NICHOLSON, D. W.; ALI, A.; THORNBERRY, N. A.; VAILLANCOURT, J. P.; DING C. K.. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis **Nature**, v. 376, p. 37-43, 1995.

NUSSBAUM, R. L.; ELLIS, C. E. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **N Engl J Med**. v. 3,p.348(14):1356-64,2003. Review. Erratum in: **N Engl J Med**.v.19, p.348 (25): 2588. 2003.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. **J Biol Chem**. v. 19; p.3388-3893, 2001.

OKUNO, T.; NAKATSUJI, Y.; KUMANOGOH, A.; MORIYA, M.; ICHINOSE, H.;SUMI, H.; FUJIMURA, H.; KIKUTANI, H.; SAKODA, S. Loss of dopaminergic neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD 40: relevance to Parkinson's disease. **J Neurosci Res**, v. 81(6): p. 874–882, 2005.

PABON, M. M.; JERNBERG, J. N.; MORGANTI, J.; CONTRERAS, J.; HUDSEN, C. E.; KLEIN, R. L.; BICKFORD, P. C. () A *Spirulina*-enhanced diet provides neuroprotection in an alpha-synuclein model of Parkinson's disease. **PLoS ONE**, v. 7(9):e45256, 2012.

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**. v. 106(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.

PANG, S. F.; PANG, C. S.; POON, A. M.; LEE, P. P.; LIU, Z. M.; SHIU, S. Y. Melatonin: a chemical photoperiodic signal with clinical significance in humans. **Chin Med J (Engl)**. v.111,p.197-203, 1998.

PATRO, N.; SHARMA, A.; KARIAYA, K.; PATRO, I. *Spirulina platensis* protects neurons via suppression of glial activation and peripheral sensitization leading to restoration of motor function in collagen-induced arthritic rats. **Indian J Exp Biol.** v. 49. p. 739–748, 2011.

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.

PENTÓN-ROL, G.; MARÍN-PRIDA, J; FALCÓN-CAMA, V. C-Phycocyanin and Phycocyanobilin as Remyelination Therapies for Enhancing Recovery in Multiple Sclerosis and Ischemic Stroke: A Preclinical Perspective. **Behav Sci (Basel).** v.18; p.8(1). 2018.

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.

PÉREZ-JUÁREZ, A.; CHAMORRO, G; ALVA-SÁNCHEZ, C.; PANIAQUA-CASTRO, N; PACHECO-ROSADO, J. Neuroprotective effect of arthrospira (*Spirulina*)-*platensis* against kainic acid-neuronal death. **Pharm Biol**, v. 54(8): p. 1408–1412, 2016.

PHAM, T. X.; KIM, B.; LEE, J. *Spirulina platensis* inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation through the repression of histone deacetylases in RAW 264.7 macrophages. **FASEB**, v. 27: p. 247.1, 2013.

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.

POTT GODOY, M. C.; TARELLI, R.; FERRARI, C. C.; SARCHI, M. I.; PITOSI, F. J. Central and systemic IL-1 exacerbates neurodegeneration and motor symptoms in a model of Parkinson's disease. **Brain**, v. 131: p. 1880–1894, 2008.

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

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

REALE, M.; IARLORI, C.; THOMAS, A.; GAMBI, D.; PERFETTI, B.; DI NICOLA, M.; ONOFRJ, M. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. **Brain Behav Immun**, v. 2,p.55–63, 2009.

REALE, M.; GREIG, N. H.; KAMAL, M. A. Peripheral chemo-cytokine profiles in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Mini Rev Med Chem**, v. 9,p.1229–1241, 2009.

RIZELIO, V.; SZAWKA, R. E.; XAVIER, L. L.; ACHAVAL, M.; RIGON, P.; SAUR, L.; MATHEUSSI, F.; DELATTRE, A. M.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; MENESES, M.; FERRAZ, A. C. Lesion of the subthalamic nucleus reverses motor deficits but not death of nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat 6-hydroxydopamine-lesion model of Parkinson's disease. **Braz J Med Biol Res**. v.43(1),p.85-95, 2010.

RODRIGUES, R. W. P.; GOMIDE, V. C.; CHADI, G. Striatal injection of 6-hydroxydopamine induces retrograde degeneration and glial activation in the nigrostriatal pathway. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18: p. 272–282, 2003.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, A.; BLÉ-CASTILLO, J. L.; JUÁREZ-OROPEZA, M. A.; DÍAZ-ZAGOYA, J. C. Spirulina maxima prevents fatty liver formation in CD-1 male and female mice with experimental diabetes. **Life Sci**. v.20,p.1029-1037, 2001 .

RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; JAHANSHAH, M.; KRACK, P.; LITVAN, I.; MACIAS, R.; BEZARD, E.; OBESO, J. A. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **Lancet Neurol**, v. 8: p. 1128–1139, 2009.

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.

ROSS, E.; PUAPONG, D. P.; CEPEDA, F. P.; PATTERSON, P. H. Comparison of freeze-dried and extruded Spirulina platensis as yolk pigmenting agents. **Poult Sci**. v.73,p.1282-1289, 1994.

ROZAS, G.; LABANDEIRA, GARCÍA, J. L. Mitochondrial oxidative stress and the metabolic syndrome. **Brain Res**. v.28,p.188-99,1997.

SAGGU, H.; COOKSEY, J.; DEXTER, D.; WELLS, F. R.; LEES, A.; JENNER, P.; MARSDEN, C. D. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. **J Neurochem**. v.53,p.692-7, 1989.

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.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L.; BLAND, S. T. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**. v.3,p.777-787, 2000.

- SCHAPIRA, A. H. Neuroprotection in PD- a role for dopamine agonists? **Neurology**. v. 61, n. 6, p. 34–42, 2003.
- SCHAPIRA, A. H.; COOPER, J. M.; DEXTER, D.; JENNER, P.; CLARK, J. B.; MARSDEN, C. D. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. **Lancet**. v.3,p.1269, 1989.
- 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.21,p.24-31, 2005.
- SCHMUED, L. C; ALBERTSON, C.; SLIKKER, W. J. R.; ANDERSEN, J. K. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Res**. v.14,p.37-46, 1997.
- SCHOBBER, 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.
- SEDLAK J., LINDSAY R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem**. v. 25, p. 192-195, 1968.
- SHI, L. H.; WOODWARD, D. J.; LUO, F.; ANSTROM, K.; SCHALLERT T, CHANG, J. Y. Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. **Brain Res**. v.2,p.98-106, 2004.
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASKI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.
- SHIH, M. C.; FELICIO, A. C.; DE OLIVEIRA, GODEIRO-JUNIOR. C.; DE CARVALHO, A. P.; DE ANDRADE, LA, FERRAZ. H. B; BRESSAN, R. A. Molecular imaging in hereditary forms of parkinsonism. **Eur J Neurol**. v.14,p.359-68. 2007.
- SHIH, M. C.; FRANCO, A. L. A.; AMARO, E JR.; FELICIO, A. C.; FERRAZ, H. B.; WAGNER, J.; HOEXTER, M. Q.; LIN, L F.; FU, Y. K; MARI, J. J.; TUFIK, S.; BRESSAN, R. A. Higher nigrostriatal dopamine neuron loss in early than late onset Parkinson's disease? a [99mTc]-TRODAT-1 SPECT study. **Mov Disord**. v. 30,p.863-866, 2007.
- SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 11, p.151–167, 2007.

SIMON, J.; WEBB, T. E.; BARNARD, E. A. Characterization of a P2Y purinoceptor in the brain. **Pharmacol Tox** v. 76, n. 5, p. 302-307, 1995.

SINGH, S.; AHMED, R.; SAGAR, R. K.; KRISHANA, B. Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. **Indian J Med Res.** v.124,p.419-426, 2006.

SPIVEY, A. Rotenone and paraquat linked to Parkinson's disease: human exposure study supports years of animal studies. **Environ Health Perspect.** v.119,p.259, 2011.

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

STRÅLIN, P.; KARLSSON, K.; JOHANSSON, B. O.; MARKLUND, S. L. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.15,p.2032-2036, 1995.

STURTZ, L. A.; DIEKERT, K.; JENSEN, L. T.; LILL, R.; CULOTTA, V. C. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. **J Biol Chem.** v. 12 ,p.38084-38089, 2001.

SULTANA, R.; PERLUIGI, M.; BUTTERFIELD, D. A. Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. **Free Radic Biol Med,** v. 62: p.157–169, 2013.

TABREZ, S; JABIR, N. R.; SHAKIL, S.; GREIG, N. H.; LAM, Q.; ABUZENADAH, A. M.; DAMANHOURI, G. A.; KAMAL, M. A. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets,** v. 11: p. 395–409, 2012.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI, P. A.; FIGUEIREDO, C. P.; CARGNIN-FERREIRA, E.; DA CUNHA, C. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Takahashi RNNeuroscience.** v. 28,p.830-840, 2008.

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.

TEISMANN, P. COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. **Int Un Biochem Mol Biol Inc,** v. 38: p. 395–397, 2012.

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.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. Cold Spring Harb **Perspect Med,** v.1, p.93-100, 2011.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Res.** v.18,p.485-493, 1970.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol.** v.5(1), p.107-10, 1968.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Curr Neuropharmacol**, v. 7: p. 65–74, 2009.

VAJDA, F. J. Neuroprotection and neurodegenerative disease. **J Clin Neurosci.** v.,p.9(1),p.4-8, 2002.

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.

VARRONE, A.; HALLDIN, C. Molecular imaging of the dopamine transporter. **J Nucl Med**, v. 51: p. 1331–1334, 2010.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (Arthrospira): physiology, cell biology and biotechnology. Taylor and Francis, **London**, 1997.

WADDINGTON, J. L.; CROSS, A. J.; LONGDEN, A.; OWEN, F.; POULTER, M. Apomorphine-induced rotation in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat: relationship to changes in striatal adenylate cyclase activity and 3H-spiperone binding. **Neuropharmacology**, v. 18,p.643–645, 1979.

WADDINGTON, J. L. A methodological weakness in the use of neuroleptic antagonism as a sole criterion for DAergic mediation of drug-induced behavioural effects. **Eur J Pharmacol.** v.1,p.327-329, 1979.

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

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.

WEINTRAUB, D. Dopamine and impulse control disorders in Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.64,p.93–100, 2008.

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 Med.** v. 90(1). p. 43-50, 2009.

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(1), p.43-50, 2009.

WU, X.; LI, S.; WU, Q.; PENG, Y.; YU, D.; WANG, H.; CHUI, D.; ZHAO, J. Histone deacetylase inhibition leads to neuroprotection through regulation on glial function. **Mol Neurodegen**, v. 8(Suppl 1), 2013.

XIE, H. R.; HU, L S.; LI, G Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chin Med J (Engl)**. v. 20,p.1086-1092, 2010.

XIMENES, J. C.; NEVES, K. R.; LEAL, L. K.; DO CARMO, M. R.; BRITO, G. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CAVALHEIRO, E. A.; VIANA, G. S. (). Valproic acid neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is possibly related to its anti-inflammatory and HDAC inhibitory properties. **J Neurodegener Dis**, 2015.

YANG, X.; ZHENG, R.; CAI, Y.; LIAO, M.; YUAN, W.; LIU, Z. Controlled-release levodopa methylester/benserazide-loaded nanoparticles ameliorate levodopa induced dyskinesia in rats. **Int J Nanomedicine**. v.7,p.2077-2086, 2012.

YOGIANTI, F.; KUNISADA, M.; NAKANO, E.; ONO, R.; SAKUMI, K.; OKA, S.; NAKABEPPU, Y.; NISHIGORI, C. Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. **J Investig Dermatol**, v. 134: p. 2610–2619, 2014.

ZAID, A. A. A.; HAMMAD, D. M; SHARAF, E. M. Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts. **Int J Pharmacol**, v. 11: p. 846–851, 2015.

ZHANG, Y.; MARCILLAT, O.; GIULIVI, C.; ERNSTER, L.; DAVIES, K. J. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. **Biol Chem**. v.25,p.16330-16336, 1990.

ZHU, Y.; ANZHEN, ZHANG.; JING ZENG, YANJUN. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11: p. 350–358, 2012.

## ANEXO A – Declaração de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



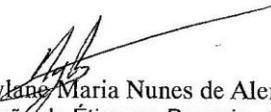
Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

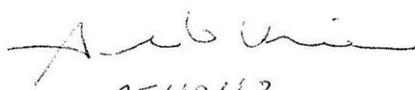
Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 27/2013, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA SPIRULINA PLATENSIS, EM RATOS COM LESÃO ESTRIATAL PRODUZIDA PELA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA), UM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON”**, de responsabilidade da Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana 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 24 de julho de 2013.

Fortaleza, 03 de setembro de 2013

  
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 CEPADFF/FAMED/UFC  
MAT. SIAPE 2166369

  
25/10/13

## ANEXO B – Artigo publicado em 2017

Neurochem Res (2017) 42:3390–3400  
DOI 10.1007/s11064-017-2379-5



ORIGINAL PAPER

## Neuroprotective Activities of *Spirulina platensis* in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Are Related to Its Anti-Inflammatory Effects

Francisco Arnaldo Viana Lima<sup>1</sup> · Ivan Pinheiro Joventino<sup>3</sup> · Francisca Pinheiro Joventino<sup>3</sup> · Aline Cordeiro de Almeida<sup>1</sup> · Kelly Rose Tavares Neves<sup>1</sup> · Marta Regina do Carmo<sup>1</sup> · Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal<sup>1</sup> · Geanne Matos de Andrade<sup>1</sup> · Glauce Socorro de Barros Viana<sup>1,2,3</sup>

Received: 19 March 2017 / Revised: 2 August 2017 / Accepted: 8 August 2017 / Published online: 31 August 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** *Spirulina platensis* (SPI) is a cyanobacterium, presenting anti-inflammatory and antioxidant actions. Considering the importance of inflammation and oxidative stress in Parkinson's disease (PD), SPI neuroprotective effects were evaluated in a model of PD. Male Wistar rats were divided into: sham-operated (SO), untreated 6-OHDA and 6-OHDA treated with SPI (25 and 50 mg/kg, p.o.). The 6-OHDA was injected into the right striata and SPI treatments started 24 h later for 2 weeks. The SO and untreated 6-OHDA-lesioned groups were administered with distilled water, for the same period. Afterwards, the animals were subjected to the apomorphine-induced rotational test and euthanized for striatal measurements of DA and DOPAC, nitrite and TBARS and immunohistochemistry assays for TH, DAT, iNOS and COX-2. SPI reduced the apomorphine-induced rotational behavior, DA and DOPAC depletions and nitrite and TBARS increases, at its high dose. Furthermore, TH and DAT immunoreactivities in the lesioned striatum of the untreated 6-OHDA-lesioned group were attenuated by SPI. Similarly, immunoreactivities for iNOS and COX-2 were also decreased after SPI treatments. In conclusion, we showed that behavioral and neurochemical alterations in hemiparkinsonian rats were partly reversed by SPI,

characterizing the neuroprotective potential of *Spirulina* and stimulating translational studies focusing on its use as an alternative treatment for PD.

**Keywords** *Spirulina platensis* · Parkinson's disease · Neuroinflammation · Oxidative stress

### Introduction

*Spirulina platensis* (Nordest.) Geitler or *Arthrospira platensis* (Nordest.) Gomont is a multicellular filamentous cyanobacterium, presenting high contents of protein, along with high amounts of essential fatty acids and amino acids, minerals, vitamins, antioxidant pigments and polysaccharides [1, 2]. Although *S. platensis* is used in many countries as a nutritional supplement, based on its potential as a source of protein and vitamins, recently more attention has been paid to its therapeutic potential. *S. platensis* shows potent anti-inflammatory and antioxidant effects in rodents, among several other biological effects [3, 4].

A neurodegenerative process, leading to a slow and progressive dysfunction and loss of neurons and axons in the central nervous system (CNS), is a primary pathological feature of chronic neurodegenerative pathologies. Parkinson's disease (PD) is a common, chronic, progressive, neurodegenerative disease with a multifactorial etiology, characterized by bradykinesia, rigidity, tremor and postural instability. The economic burden of the disease is substantial, but effective management of PD can minimize the disability and long-term health care costs [5].

Chronic inflammation is a major feature of PD and this neurodegenerative pathology not only encompasses deregulation of inflammatory pathways, resulting from genetic vulnerability, but also immune alterations associated with aging

✉ Glauce Socorro de Barros Viana  
gbviana@live.com

<sup>1</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine of the Federal University of Ceará (UFC), Rua Cel. Nunes de Melo, 1000, Fortaleza CEP 60416-000, Ceará, Brazil

<sup>2</sup> Department of Biophysiology, Faculty of Medicine Estácio of Juazeiro do Norte (Estácio/FMJ), Avenida Tenente Raimundo Rocha, 555, Juazeiro do Norte 63040-360, Ceará, Brazil

<sup>3</sup> G & F Spirulina do Brasil Ltda., Fortaleza, Brazil