



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA (CAMPUS-SOBRAL)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

EVANEIDE PEREIRA DE SÁ CARVALHO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORES DA
NARINGENINA EM MODELO DE DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR
HALOPERIDOL EM RATOS**

SOBRAL – CE

2020

EVANEIDE PEREIRA DE SÁ CARVALHO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORES DA
NARINGENINA EM MODELO DE DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR
HALOPERIDOL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Ciências da Saúde. Linha de Pesquisa: Doenças Crônicas e Câncer

Orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Coorientador: Dr. Gerardo Cristino Filho

SOBRAL – CE

2020

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)

C322a Carvalho, Evaneide Pereira de Sá.
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORES DA NARINGENINA
EM MODELO DE DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR HALOPERIDOL EM RATOS /
Evaneide Pereira de Sá Carvalho. – 2020.
54 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde, Sobral, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

Coorientação: Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho .

1. Neuroproteção. 2. Naringenina. 3. Haloperidol,. 4. Discinesia Orofacial. 5. Discinesia Tardia. I. Título.

CDD 610

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES E NEUROPROTETORES DA
NARINGENINA EM MODELO DE DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR
HALOPERIDOL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de Concentração: Ciências da Saúde. Linha de Pesquisa: Doenças Crônicas e Câncer

Orientadora: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Coorientador: Dr. Gerardo Cristino Filho

Aprovada em: ____ / ____ / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Dra. Cleane Gomes Moreira (Membro Interno)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Isabel Linhares (Membro Externo)
Centro Universitário Inta (UNINTA)

Dedico este trabalho à Deus;

Aos meus pais, Raimundo (in memoriam) e Eva, minha irmã Evanice e meu noivo Eduardo, com muito amor, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha fortaleza, que até aqui tem me sustentado. Sem Ele seria impossível sonhar e realizar. A Ele agradeço a persistência para alcançar os sonhos que Ele mesmo colocou no meu coração.

Aos meus pais, Raimundo (in memoriam) e Eva, pelos ensinamentos que me fizeram acreditar que em Deus eu poderia ir mais longe. Obrigada pelo amor dedicado a mim e por tudo que renunciaram para que eu pudesse ter uma formação. Meus protetores que não mediram esforços para que eu pudesse chegar até essa etapa da minha vida. À minha irmã, minha companheira de todas as horas e sempre amiga, Evanice, que admiro pela força inabalável, obrigada por todas as vezes que me ajudou a encontrar uma solução, as vezes invisível aos meus olhos, e me fez voltar a acreditar.

Agradeço ao meu noivo, Eduardo, que é mais uma prova do cuidado de Deus comigo. Com o qual aprendi que caminhando juntos a jornada torna-se mais leve. Obrigada pelo cuidado, paciência e toda ajuda para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida.

Agradeço a minha Orientadora Lissiana, por acreditar que seria possível e por toda paciência em mostrar o caminho que seria percorrido. Obrigada pelo exemplo de competência, dedicação e pelos inúmeros ensinamentos durante esse período. Serei sempre grata por esse presente de Deus na minha vida.

Meus agradecimentos para as equipes dos laboratórios da UFC (Laboratório de Fisiologia e Neurofarmacologia, Laboratório do Nubis, Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Microbiologia) e do Laboratório do UNINTA (Laboratório Nubem), por contribuírem para a minha formação e para o sucesso dos resultados.

Aos membros da Banca Examinadora aceitando o convite, se prontificando a participar desta fase final de dissertação. Desde já minha gratidão.

A Universidade Federal do Ceará e a agência de fomento CAPES, pelo apoio técnico.

Por fim, agradeço aqueles que aqui não foram citados, mas, que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

“Dizei do Senhor: Ele é o meu refúgio
e a minha fortaleza, o meu Deus, em quem
confio”. SL 91:2

RESUMO

A discinesia tardia (DT) é um distúrbio persistente do movimento hiperkinético, geralmente irreversível, consequência do uso de agentes bloqueadores dos receptores da dopamina, incluindo drogas antipsicóticas. Embora o recente desenvolvimento de dois medicamentos aprovados para o tratamento da DT, eles possuem efeitos adversos e ainda são considerados muito caros. Apesar dos progressos substanciais, há a necessidade de mais trabalhos com relação ao potencial de prevenção da DT. Baseado nisso, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial papel neuroprotetor do antioxidante naringenina em um modelo de discinesia orofacial (DO), induzida pelo haloperidol, em ratos Wistar machos. Os animais foram selecionados em 5 grupos: 1- controle; 2- haloperidol 1mg/kg; 3- haloperidol 1mg/kg + naringenina 10mg/kg; 4- haloperidol 1mg/kg + naringenina 25mg/kg; 5- haloperidol 1mg/kg + naringenina 50mg/kg. O tratamento foi realizado durante 21 dias e os testes comportamentais semanalmente (nos dias 7, 14 e 22). Foram avaliados os parâmetros comportamentais, incluindo número de movimentos de mastigação vazios (MMVs) (avaliação dos movimentos orofaciais), atividade locomotora (plataforma estreita e campo aberto), coordenação motora (rotarod) e teste de memória (y-maze). No 22º dia, as áreas do cérebro (hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) foram removidas para a determinação dos níveis de TBARS, nitrito, glutatona, TNF- α e IL-1 β . O tratamento com haloperidol alterou todos os parâmetros nos testes comportamentais, aumentando MMVs, reduzindo a atividade locomotora, a coordenação motora e a memória dos ratos. Além disso, aumento do estresse oxidativo, redução do antioxidante endógeno e aumento de citocinas pró-inflamatórias. A coadministração de naringenina melhorou as alterações comportamentais e reduziu os níveis de peroxidação lipídica e citocinas, mostrando um papel promissor na prevenção da DO induzida por antipsicóticos típicos.

Palavras-chave: Neuroproteção; Naringenina; Haloperidol; Discinesia Orofacial; Discinesia Tardia.

ABSTRACT

Tardive dyskinesia (TD) is a persistent hyperkinetic movement disorder, generally irreversible, consequence of the use of dopamine receptor blocking agents, including antipsychotic drugs. Although the recent development of two drugs approved for the treatment of DT, they have adverse effects and are still considered very expensive. Despite substantial progress, more work needs to be done concerning the potential for TD prevention. Based on that, the study aims to evaluate the potential neuroprotective role of the antioxidant naringenin in a model of orofacial dyskinesia (OD), induced by haloperidol, in male Wistar rats. Animals were selected into 5 groups: 1- control; 2- haloperidol 1mg/kg; 3- haloperidol 1mg/kg + naringenin 10mg/kg; 4- haloperidol 1mg/kg + naringenin 25mg/kg; 5- haloperidol 1mg/kg + naringenin 50mg/kg. The treatment was carried out for 21 days and the behavioural tests weekly (7, 14 and 22 days). Behavioural parameters were evaluated, including number of vacuous chewing movements (VCMs) (assessment of orofacial movements), locomotor activity (narrow beam and open field), motor coordination (rotarod) and memory test (y-maze). On the 22nd day, the brain areas (hippocampus, prefrontal cortex and striatum) were removed for the determination of TBARS, nitrite, glutathione, TNF- α and IL-1 β levels. Haloperidol treatment altered all parameters in behavioral tests, increasing VCMs, reducing locomotor activity, motor coordination and memory of the rats. In addition, increased oxidative stress, reduced endogenous antioxidant and increased proinflammatory cytokines. Coadministration of naringenin improved behavioural alterations and reduced lipid peroxidation and cytokines levels, showing a promising role in the prevention of OD induced by typical antipsychotics.

Keywords: Neuroprotection; Naringenin; Haloperidol; Orofacial Dyskinesia; Tardive Dyskinesia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estrutura da Naringenina.....	23
------------	-------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAT	Catalase
DT	Discinesia Tardia
DO	Discinesia Orofacial
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
eNOS	Síntese Endotelial de Oxido Nítrico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GSH	Glutathiona Reduzida
GSH-Px	Glutathiona Peroxidase
GSHt	Glutathiona Total
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IL	Interleucina
MMVs	Movimentos de Mastigação Vazios
NAR	Naringenina
NO	Óxido Nítrico
NFKB	Fator Nuclear Kappa Beta
NK	Natural Killer
ONOO	Ânion Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial de Saúde
PKA	Proteína Quinase A
SOD	Superóxido Dismutase
SNC	Sistema Nervoso Central
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico;
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TGFB	Fator de Crescimento Transformado Beta

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	13
2.0 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Esquizofrenia, antipsicóticos e discinesia tardia	15
2.2 Haloperidol	16
2.3 Fisiopatologia da discinesia tardia	17
2.3.1 Supersensibilidade do receptor de dopamina	18
2.3.2 Excitotoxicidade do glutamato e Insuficiência de ácido γ-aminobutírico (GABA)	19
2.3.3 Estresse oxidativo	20
2.3.4 Neuroinflamação	21
2.4 Substâncias neuroprotetoras	23
2.5 Naringenina	24
3.0 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4.0 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO FORMATADO	27
1.Introdução	28
2. Material e Métodos	29
2.1 <i>Animais experimentais</i>	29
2.2 <i>Medicamentos e horário de tratamento</i>	29
2.3 <i>Indução de discinesia orofacial</i>	30
2.4 Testes comportamentais	30
2.4.1 <i>Avaliação dos movimentos orofaciais</i>	30
2.4.2 <i>Teste de caminhada em plataforma estreita</i>	31
2.4.3 <i>Teste rotarod</i>	31
2.4.4 <i>Teste de campo aberto</i>	31
2.4.5 <i>Y-maze</i>	31
2.4.6 <i>Dissecção e homogeneização</i>	32
2.5 <i>Avaliação Bioquímica</i>	32
2.5.1 <i>Determinação da peroxidação lipídica</i>	32
2.5.2 <i>Determinação de nitrito e nitrato</i>	32
2.5.3 <i>Determinação da concentração reduzida de glutathiona</i>	32
2.5.4 <i>Estimativa dos níveis de TNF-α e IL-1β</i>	32
2.6 <i>Análise Estatística</i>	33

3.0 Resultados.....	33
3.1 Efeitos da naringenina nos movimentos de mastigação vazios (MMVs) em ratos tratados com haloperidol.....	33
3.2 Efeitos da naringenina na coordenação motora (rotarod) em ratos tratados com haloperidol	34
3.3 Efeito da naringenina na atividade de caminhada (teste de caminhada na plataforma estreita) em ratos tratados com haloperidol	34
3.4 Efeito da naringenina na atividade locomotora (campo aberto) em ratos tratados com haloperidol	35
3.5 Efeito da naringenina na atividade da memória (labirinto y) em ratos tratados com haloperidol	36
3.6 Efeito da naringenina no estresse oxidativo em ratos tratados com haloperidol.....	36
3.7 Efeito da naringenina nas estimativas de IL-1 β e TNF- α em ratos tratados com haloperidol	39
4.0 Discussão.....	40
5.0 Conclusão	43
6.0 Referências	43
REFERÊNCIAS	47
ANEXO A – DIRETRIZES PARA AUTORES.....	52
ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)	60
ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	61

1.0 INTRODUÇÃO

A discinesia tardia (DT) é uma complicação motora, incapacitante e potencialmente irreversível, caracterizada por movimentos hipercinéticos, involuntários, frequentes e relativamente rítmicos. As alterações são tipicamente orofaciais, com a presença de movimentos de mastigação vazios (MMVs), espasmos faciais, caretas e protrusão de língua. Em alguns casos os distúrbios hipercinéticos podem ocorrer no pescoço, membros e tronco, com sintomas axiais de movimentos rotatórios e descontínuos do quadril (CITROME, 2018; MARGOLIUS e FERNANDEZ, 2019). A presença da DT interfere na atividade voluntária, marcha e performance motora, resultando em prejuízo funcional, menores escores de qualidade de vida e estigmatização social (PATO, RODRÍGUEZ e VALVERDE, 2017).

Considerada a “Síndrome Tardia” mais comum, a DT pode ocorrer durante ou após a interrupção de um tratamento prolongado com drogas bloqueadoras do receptor de dopamina, incluindo antipsicóticos, especialmente aqueles que agem preferencialmente bloqueando os receptores D2, como os antipsicóticos de primeira geração, a exemplo do haloperidol, utilizado no tratamento da esquizofrenia (SINGH et al., 2019; HAUSER e TRUONG, 2018).

O uso de medicação antipsicótica, por tempo mínimo de 3 meses, associado ao aparecimento de movimentos atetóides ou coreóides involuntários e que persistam além de 4 a 8 semanas, preenchem os critérios para DT (D'ABREU, AKBAR e FRIEDMAN, 2018), exceto para doentes com idade superior a 60 anos, que podem ser diagnosticados com DT após 1 mês de exposição ao antipsicótico concomitante a presença de movimentos alterados que persistam pelo período mínimo de 1 mês (AQUINO e LANG, 2014).

A DT é relativamente comum e pode afetar de um quarto a um terço dos pacientes tratados cronicamente com antipsicóticos, de primeira ou segunda geração, com exceção da clozapina, que apresenta um risco consideravelmente menor de DT. Alguns estudos mostraram a incidência de DT de acordo com o tempo de uso de antipsicótico, sendo de 5% no ano 1, 27% no ano 5, 43% no ano 10 e 52% após 20 anos de exposição ao antipsicótico. Na população idosa, no entanto, a incidência anual estimada é de 26% após 1 ano e cerca de 60% após 3 anos de uso de medicação antipsicótica (D'ABREU, AKBAR e FRIEDMAN, 2018).

A idade avançada, sexo feminino e variantes genéticos (por exemplo: o metabolismo de drogas e o sistema dopaminérgico), tipo de antipsicótico, dose e duração da exposição ao antipsicótico, são importantes fatores de risco para a DT. Existem ainda evidências que sugerem que diabetes, uso de álcool e tabagismo podem representar riscos independentes para o desenvolvimento de DT (MARGOLIUS e FERNANDEZ, 2019). E apesar de vários estudos

reportarem a fisiopatologia da DT, esta permanece incerta. Porém existem algumas hipóteses: supersensibilidade ao receptor de dopamina, insuficiência de ácido γ -aminobutírico (GABA), excitotoxicidade do glutamato, geração de radicais livres, estresse oxidativo, neuroinflamação, neurodegeneração (SERVONNET e SAMAHA, 2020; HASHIMOTO et al., 2018; LISTER et al., 2017).

A DT continua sendo um desafio importante, pois é uma condição clínica, às vezes irreversível e resistente a diferentes tratamentos. Recentemente, dois medicamentos foram aprovados para o tratamento da DT, no entanto, apresentam efeitos adversos (por exemplo, sonolência, prolongamento do intervalo QT), interações medicamentosas e ainda são considerados muito caros. Portanto a busca por estratégias preventivas permanece um tópico de interesse de diversos estudos (MEYER, 2018; CITROME, 2018; MARGOLIUS e FERNANDEZ, 2019; LISTER et al., 2017).

Atualmente, os antioxidantes estão emergindo como importantes agentes neuroprotetores e existem alguns medicamentos antioxidantes aprovados para tratar inúmeras doenças causadas pelo estresse oxidativo (NEHA et al., 2019). Entre os antioxidantes naturais, um flavonóide contido em frutas cítricas, chamado naringenina (NAR), despertou muito interesse, devido às suas ações multifuncionais, considerado um poderoso composto antioxidante, anti-inflamatório, antidepressivo e neuroprotetor (RENDEIRO, RHODES e SPENCER, 2015). O antioxidante NAR pode atravessar a barreira hematoencefálica, e seus possíveis efeitos neuroprotetores foram testados em vários modelos animais (CHEN et al., 2019; LO et al., 2017; CHANDRAN et al., 2019).

O modelo de MMVs induzido pelo uso crônico de haloperidol em ratos, ocasionando a discinesia orofacial, tem sido utilizado para estudos da fisiopatologia e estratégias de tratamento e prevenção para a DT (DATTA, et al., 2016). No entanto, de acordo com nosso conhecimento, a naringenina ainda não foi testada em modelos de discinesia. Devido a todos os possíveis efeitos benéficos da naringenina, este pode ser um composto promissor para ser usado como adjuvante de drogas antipsicóticas para reduzir ou prevenir seus efeitos colaterais.

2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Esquizofrenia, antipsicóticos e discinesia tardia

Por ser uma enfermidade crônica, a esquizofrenia necessita de tratamento para aliviar os sintomas e melhorar as condições de vida. Os antipsicóticos, drogas amplamente utilizadas no tratamento de distúrbios neuropsiquiátricos em todo o mundo, foram introduzidos na década de 1950, sendo a clorpromazina o primeiro antipsicótico que efetivamente curou os sintomas positivos da esquizofrenia. Classificado como antipsicótico típico ou de 1ª geração, posteriormente mostrou efeitos colaterais no sistema extrapiramidal. E em 1957, Schonecker observou alterações nos movimentos orofaciais em três pacientes que fizeram uso do antipsicótico clorpromazina. Sendo o termo "discinesia tardia" utilizado pela primeira vez em 1964 por Faurbye, para destacar a relação entre o início do tratamento com antipsicóticos e o surgimento de movimentos anormais, que podem ter grande impacto na saúde física dos pacientes, bem como em sua qualidade de vida e no processo de adesão ao tratamento (SINGH et al., 2019; HAUSER e TRUONG, 2018; PATO RODRÍGUEZ e VALVERDE, 2017).

A esquizofrenia caracteriza-se por sintomas de delírios, alucinações, alterações no discurso, comportamento desorganizado ou catatônico, conhecidos como sintomas positivos, e também apresenta os ditos sintomas negativos, caracterizados pela falta de motivação, o que sugere disfunção nos circuitos de recompensa (córtex pré-frontal, núcleo accumbens e área tegumental ventral). A esquizofrenia afeta cerca de 24 milhões de pessoas em todo o mundo e é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das dez doenças mais debilitantes que afeta os seres humanos. Os quadros psicóticos em geral e a esquizofrenia em particular têm os antipsicóticos como tratamento de primeira linha, fármacos com maior potencial de induzir doenças do movimento (PINHO, PEREIRA e CHAVES, 2018).

Após a percepção que os antipsicóticos de 1ª geração utilizados no tratamento da esquizofrenia, causavam efeitos extrapiramidais, houve uma tentativa de superar esses efeitos adversos e foram então desenvolvidos entre a década de 60 e 90 os antipsicóticos "atípicos" ou de 2ª geração. Esses antipsicóticos foram chamados atípicos pois a sua propensão para causar sintomas discinéticos era considerada ausente (SINGH et al., 2019). Esperava-se que eles apresentassem menos efeitos colaterais extrapiramidais em comparação aos de 1ª geração, devido à sua menor afinidade aos receptores D2 da dopamina no estriado dorsal (CORNETT et al., 2017). Atualmente sabe-se que os antipsicóticos de 2ª geração também causam sintomas de DT, porém podem levar mais tempo para manifestar-se (SHIREEN, 2016).

Estudos sugerem que mudar de um antipsicótico de 1ª geração para um de 2ª geração, na tentativa de melhorar os sintomas de DT, pode ser benéfico. Porém os antipsicóticos de 2ª geração tendem a ter outros efeitos colaterais indesejados, incluindo ganho de peso, sedação e risco elevado de surgimento de doenças cardiovasculares. Esses fármacos podem ainda estar relacionados a uma menor eficácia em relação ao tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia. Nesse sentido os antipsicóticos de 1ª geração continuam sendo amplamente empregados no tratamento farmacológico da esquizofrenia, em especial o haloperidol, o antipsicótico mais comumente utilizado. Com ou sem intervenções psicossociais e ambientais, os antipsicóticos de 1ª geração são frequentemente a principal escolha para tratar sintomas que ocorrem na maioria dos pacientes com esquizofrenia durante o curso da doença, e o haloperidol têm sido utilizado há várias décadas, por ser eficaz no tratamento dos sintomas positivos da esquizofrenia (SHIREEN, 2016; CORNETT et al., 2017; PATO, RODRÍGUEZ e VALVERDE, 2017).

2.2 Haloperidol

Entre as drogas antipsicóticas usadas no tratamento de doenças neurológicas, o haloperidol destaca-se por ser particularmente eficaz contra os sintomas de psicoses, delírios e as alucinações, na esquizofrenia aguda e crônica. O haloperidol é um antipsicótico pertencente ao grupo das butirofenonas e exerce, também, uma ação sedativa em condições de excitação psicomotora. Ele é um bloqueador potente dos receptores dopaminérgicos centrais, classificado como um antipsicótico muito incisivo, sendo o mais indicado nos seguintes casos: para pacientes idosos com transtornos psiquiátricos (devido os fatores de risco cardiovasculares relacionados a idade); em pacientes com comprometimento cognitivo ou delirium; risco de convulsões; obesidade; arritmia cardíaca e agitação extrema (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

O haloperidol, administrado por via endovenosa, é o fármaco antipsicótico mais utilizado e estudado no tratamento de delirium. Esse fármaco atinge picos de concentração plasmática em um tempo relativamente curto (por via endovenosa: 5 a 15 minutos) e é útil por seus efeitos sedativos. A eficácia antipsicótica do haloperidol no entanto é um pouco comprometida pela tendência para causar distúrbios agudos e crônicos do movimento extrapiramidal, como parkinsonismo, acatisia, distonias e discinesia tardia (PAGE e CASARIN, 2014).

Foi estabelecido que o haloperidol se liga à receptores de dopamina do tipo D2, bloqueando sua função nas células, sendo associado a alterações desses receptores nos núcleos da base, caudado e putâmen, áreas relacionadas ao movimento, e produz ainda um incremento da atividade da proteína quinase A (PKA) que tem sido associada com a modulação de receptores de glutamato nos mesmos tipos celulares. Portanto o tratamento crônico com haloperidol é responsável por induzir discinesia tardia devido, entre outros fatores, ao bloqueio de receptores D2 nos núcleos da base e à hiperatividade dos receptores de glutamato em áreas motoras no cérebro, especialmente envolvidas em movimentos involuntários (LÓPEZ-RUIZ et al., 2015).

O haloperidol e seus metabólitos produzem movimentos anormais em animais que fazem uso crônico, denominados "movimentos de mastigação vazios" (MMVs), que caracterizam-se por aberturas repetidas da boca não direcionada a objeto físico, com ou sem protrusões da língua, que mimetizam várias características da discinesia orofacial, condição associada a alterações morfológicas e estresse oxidativo em regiões extrapiramidais do cérebro. Devido a esses efeitos o haloperidol tem sido utilizado experimentalmente na indução do modelo de discinesia orofacial em ratos, sendo uma valiosa ferramenta para estudos que buscam melhorar o conhecimento sobre a fisiopatologia e possíveis tratamentos para a discinesia tardia (DATTA, et al., 2016).

2.3 Fisiopatologia da discinesia tardia

Crane em 1968 propôs que a DT estaria relacionada a lesões na substância negra. E ao longo dos anos vários estudos foram realizados na tentativa de estabelecer a fisiopatologia da DT. Embora existam algumas teorias de etiologia e fisiopatologia, nenhuma é considerada definitiva. Entre elas, a super-sensibilidade do receptor da dopamina, a insuficiência de ácido γ -aminobutírico (GABA) e as anormalidades cerebrais estruturais estão entre as mais estudadas. Da mesma forma, as potenciais contribuições de excitotoxicidade do glutamato, geração de radicais livres, estresse oxidativo, neuroinflamação e neurodegeneração também foram reconhecidos como importantes no estabelecimento da DT (LISTER et al., 2017).

2.3.1 Supersensibilidade do receptor de dopamina

Os medicamentos antipsicóticos usados no tratamento de sintomas da esquizofrenia exercem seus efeitos terapêuticos interagindo com os receptores D2 da dopamina, diminuindo a transmissão dopaminérgica no estriado. Embora vários antipsicóticos de 2ª geração tenham sido propostos para agir através de mecanismos alternativos, não-aminérgicos, como o sistema serotoninérgico, eles também se ligam a receptores de dopamina. E a exposição a longo prazo a antipsicóticos, antagonistas de dopamina, podem evocar neuroadaptações compensatórias que levam à supersensibilidade do receptor de dopamina (SERVONNET e SAMAHA, 2020; HASHIMOTO, 2018).

A dopamina é um neurotransmissor catecolaminérgico sintetizado por neurônios cujos corpos localizam-se no tronco cerebral e projetam-se pelas vias nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e túbero-infundibular. A via nigroestriatal, localizada mais precisamente no hipotálamo, contém cerca de 80% da dopamina, com produção realizada em grande parte por meio da substância negra e encaminhada para o corpo estriado. Dentre as funções da dopamina da via nigroestriatal estão a participação no controle do movimento, regulação de humor, estresse e ansiedade. Muitas patologias são ocasionadas ao bloqueio dos receptores da dopamina nesta via, entre elas a DT (BARRETO et al., 2015).

Os antipsicóticos, ao antagonizarem a dopamina, induzem efeitos colaterais chamados “efeitos extrapiramidais” que alteram os movimentos normais. E após o tratamento prolongado com antipsicóticos, essas drogas ocasionam o surgimento de discinesia tardia. A teoria clássica da fisiopatologia da discinesia tardia está relacionada ao bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D2 na via nigroestriatal. Quando ocorre o bloqueio desses receptores há aumento e hipersensibilidade dos mesmos e hiperatividade dopaminérgica, ocasionando alterações de movimentos. Os receptores D2 da dopamina são expressos em neurônios do corpo estriado e tem função de maneira inibitória, reduzindo a velocidade e amplitude de movimentos através da ativação da via indireta dos gânglios basais, e função excitatória através da ativação da via direta, facilitando os movimentos motores. A via indireta é formada por neurônios estriatais, que expressam predominantemente receptores D2, e projetam-se para o segmento externo do globo pálido, que por sua vez inibem neurônios glutamatérgicos excitatórios presentes no núcleo subtalâmico, alterações nesses mecanismos estão entre as hipóteses da fisiopatologia da DT (MOREIRA E GUIMARÃES, 2007; MEYER, 2018).

2.3.2 Excitotoxicidade do glutamato e Insuficiência de ácido γ -aminobutírico (GABA)

A dopamina e o glutamato interagem entre si nos gânglios da base e no córtex pré-frontal, regulando intimamente a função um do outro. Anormalidades nos sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos têm sido observadas em numerosos distúrbios neuropsiquiátricos, a exemplo da esquizofrenia. O modelo clássico dos gânglios da base, prevê que a perda de dopamina estriatal diminuirá níveis extracelulares de glutamato no estriado e no córtex. Da mesma forma, prevê que níveis crescentes de dopamina no estriado deve aumentar os níveis de glutamato no estriado e córtex (CARAVAGGIO, et al., 2016).

O glutamato é o aminoácido livre mais abundante no sistema nervoso central e apresenta funções metabólicas, como biossíntese de proteínas, sendo também o principal neurotransmissor excitatório de mamíferos, e está relacionado com funções de cognição, aprendizado, memória e plasticidade neural. O glutamato participa das projeções motoras do córtex para os núcleos da base, medula espinhal e tálamo e dos núcleos da base para o tálamo. Por isso o mau funcionamento desse sistema pode prejudicar as atividades dos núcleos da base, que são relacionadas ao planejamento e execução do movimento. O glutamato exerce um importante papel nas transmissões sinápticas, sendo essencial para todos os processos neuronais, desde um simples reflexo até um complexo processamento de informações nas regiões cerebrais especializadas (VALLI e SOBRINHO, 2014).

Porém a redução de impulsos nervosos de neurônios dopaminérgicos ao estriado resulta em uma superativação do núcleo subtalâmico causando aumento na liberação de glutamato na substância negra. O aumento da liberação e dos níveis extracelulares de glutamato nos terminais corticoestriatais gera um estresse neurotóxico, com destruição dos impulsos neuronais, levando à hipersensibilidade dopaminérgica ocasionando assim o surgimento de alterações motoras e a DT. A rápida retirada de glutamato da sinapse por seus transportadores é necessária para a neurotransmissão excitatória normal e prevenção contra neurotoxicidade induzida pelo glutamato (YERNOOL et al., 2004).

As evidências indicam o envolvimento do GABA na DT. O dano aos neurônios GABAérgicos por medicamentos que afetam o funcionamento do GABA no estriado, pode explicar alguns dos sintomas característicos da DT. Além disso, as evidências sugerem uma ligação direta entre o GABA e a dopamina, na medida em que os neurônios do GABA podem inibir diretamente os neurônios da dopamina em regiões cerebrais discretas. Esses dados sugerem um delicado equilíbrio entre dopamina e GABA que, se interrompido, pode resultar em DT (CORNETT et al., 2017). O sistema GABA estriado-nigral (via dopaminérgica), fica

suprimido durante administração de antipsicóticos por longo prazo, pois há inibição da atividade dos neurônios GABA estriatais que enviam projeções para o globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico, causando hipofunção dessas estruturas e indução de movimentos anormais típicos da DT (VALLI E SOBRINHO, 2014).

A supersensibilidade dos receptores D2 dopaminérgicos que ocorre com o uso crônico de antipsicóticos está relacionada não só com o desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória e inibitória no sistema nervoso central, mas envolve também alterações no sistema do óxido nítrico e aumento do estresse oxidativo, contribuindo para o estabelecimento e manutenção em DT (SERVONNET E SAMAHA, 2020).

2.3.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é encontrado em todos os sistemas biológicos e refere-se ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os mecanismos de defesa antioxidantes. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) exerce um efeito citotóxico na membrana fosfolipídica, resultando na formação de produtos tóxicos, a exemplo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e o ânion peroxinitrito (ONOO), que em excesso estão associados a lesões celulares como a peroxidação lipídica, que é a mais extensiva investigação do processo de indução de radicais livres de lipídeos. O efeito citotóxico gerado pelas ERO ocasiona a oxidação de proteínas, a inativação enzimática, ativação excessiva de citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL), fator nuclear kappa beta (NFkB) e fator de crescimento transformado beta (TGFB)] (SILVA e FERRARI, 2011).

O processo de estresse oxidativo pode estar presente com o uso crônico de antipsicóticos, pois estes aumentam a produção de radicais livres ao bloquearem os receptores de dopamina, aumentando a síntese e o metabolismo da dopamina. A monoamina oxidase, a enzima que metaboliza a dopamina, e a própria dopamina podem causar peroxidação lipídica e alteração de enzimas antioxidantes que podem levar à morte celular. Os núcleos da base, incluindo o corpo estriado, são altamente inervados pelos neurônios da dopamina e, portanto, estão especialmente em risco de estresse oxidativo (CORNETT et al., 2017).

Evidências indicam que o estresse oxidativo persistente, causa ainda disfunção da síntese endotelial do óxido nítrico (eNOS), que passa a produzir espécies reativas do nitrogênio (ERN) a exemplo do ONOO. E para avaliar a atividade da eNOS são analisadas as concentrações plasmáticas dos principais produtos da oxidação do NO, os nitritos e nitratos.

Vários trabalhos demonstram a redução nas concentrações plasmáticas de nitrito em condições patológicas. E a quantificação do nitrito tem se mostrado interessante, uma vez que os níveis plasmáticos deste produto sofrem pouca influência de fatores exógenos. Estima-se que 70% dos níveis encontrados sistemicamente sejam derivados da atividade da eNOS, e é sugerido que este composto seja um reservatório de NO na circulação. Os nitritos derivam da reação do NO com oxigênio em solução e são biologicamente ativos. Os nitratos, que são biologicamente inativos, são produzidos através da oxidação dos nitritos pela oxihemoglobina nas hemácias e sofrem influência de muitos fatores, incluindo etnia, sexo, poluentes ambientais e medicamentos, que podem afetar os níveis plasmáticos de nitrato. Devido a esses fatores, a quantificação do nitrito tem sido utilizada preferencialmente em estudos que visam avaliar as concentrações de óxido nítrico e consequentes danos oxidativos (GOMES et al., 2013; POLUHA e GROSSMANN, 2018).

A primeira linha de defesa contra o dano oxidativo são os antioxidantes endógenos enzimáticos: superóxido dismutase (SOD), catalase e sistema das glutations [glutaciona peroxidase (GSH-Px, glutaciona total (GSht) e glutaciona reduzida (GSH)]. A determinação das concentrações de antioxidantes, a exemplo da glutaciona, é utilizada para avaliação de situações de dano oxidativo, pois quando diminuídas podem estar relacionadas a presença de estresse oxidativo (SPADA, RODRIGUES e DAMASCENO, 2008).

Além do estresse oxidativo, alterações inflamatórias também podem exercer papel no processo de neurodegeneração que ocorre na DT. A inflamação aguda inicialmente apresenta efeitos benéficos para o SNC entretanto a neuroinflamação crônica produz mediadores com efeito duradouro que permanecem após lesão inicial. (OLMÓS e LLADÓ, 2014). Vários estudos experimentais tem investigado o papel do processo inflamatório em alterações do SNC, entre elas a DT, e foi observado que a perda neuronal dopaminérgica pode ocorrer como consequência direta da ativação microglial, que é acompanhada por maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) e aumento das citocinas pro-inflamatórias (HIRSCH E HUNOT, 2009).

2.3.4 Neuroinflamação

O processo de neuroinflamação no sistema nervoso central refere-se à resposta coletiva das células do encéfalo contra insultos diversos (invasores patógenos, traumatismos, proteínas agregadas ou modificadas, doenças neurodegenerativas, entre outros), projetada para remover ou inativar agentes nocivos e para inibir e /ou reverter seus efeitos prejudiciais. Esse processo

é caracterizado pela combinação da ativação de diversos tipos celulares de forma aguda ou crônica. No processo de neurodegeneração, pode haver elevação dos níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), no corpo estriado e substância negra (OLMOS e LLADÓ, 2014).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, após traumas, procedimentos cirúrgicos ou durante infecções. Trata-se de um dos mediadores mais precoces e potentes da resposta inflamatória, tendo como principal efeito fisiológico a promoção de resposta imune e inflamatória por meio do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. Em baixas concentrações, age nas células endoteliais promovendo vasodilatação e estimulando-as a secretarem um grupo de citocinas que têm ação quimiotática em relação aos leucócitos, promovendo, desta forma, um processo inflamatório local. Portanto, na atualidade, o TNF- α é reconhecido como uma importante citocina pró-inflamatória com largo espectro de ação e os efeitos biológicos mediados por esta citocina podem ser benéficos ou deletérios para o corpo, dependendo da quantidade produzida e duração de exposição na célula (POLUHA e GROSSMANN, 2018).

A outra citocina pró-inflamatória que está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória, associada à infecção aguda, é a IL-1, produzida intensamente por macrófagos, monócitos, fibroblastos e células dendríticas, e também expressa pelos linfócitos B, células natural killer (NK) e células epiteliais. A IL-1 β é expressa em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal e produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase-2 e formação de prostaglandina no hipotálamo anterior. Também produz substância-P (SP), óxido nítrico (ativando a enzima óxido nítrico sintetase) e moléculas de adesão endotelial (SORENSEN, et al., 2014).

Muitos estudos celulares indicaram que o uso crônico de antipsicóticos a exemplo do haloperidol, está associado com aumento da expressão de marcadores inflamatórios como TNF- α e IL-1 β , e danos oxidativos que podem levar à neurotoxicidade (THAKUR, 2015). A inflamação causa ainda um aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), gerando um circuito de retroalimentação que mantém processo lesivos levando a morte celular e neurodegeneração (TEIXEIRA, et al., 2014).

2.4 Substâncias neuroprotetoras

A DT continua sendo um desafio importante devido à natureza persistente de seus sintomas e resistência a inúmeras modalidades de tratamento, incluindo a interrupção antipsicótica. Recentes descobertas sobre fatores de risco e novos conceitos em torno da fisiopatologia têm estimulado o interesse na possibilidade de tratamento direcionado para a DT. No entanto o número de estratégias de tratamento baseadas em evidências é pequeno (MEYER, 2018). Fazendo-se necessário o estudo de alternativas que possam apresentar resultado positivo quanto a prevenção do surgimento da DT.

Baseado no papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da DT, os antioxidantes destacam-se como importantes neuroprotetores. Um antioxidante é uma substância capaz de prevenir ou evitar a oxidação de uma biomolécula, seja através da interação e estabilização de espécies reativas ou transformando-as em moléculas mais estáveis, reduzindo a sua reatividade (MARCHIORO, DANI e FUNCHAL, 2016).

Atualmente, os compostos fenólicos tem despertado interesse, devido suas propriedades benéficas a saúde, sendo alvo de muitos estudos. São onipresentes nas plantas e estão entre os mais desejáveis fitoquímicos com propriedades funcionais e promotoras de saúde. Os compostos fenólicos fornecem valores adicionais e são fontes potenciais para produtos farmacêuticos e biomédicos, pois possuem alta capacidade antioxidante, propriedades anticâncer, antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória. Devido às suas funções bioativas, eles têm recebido crescente atenção nos últimos anos (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; BHUYAN e BASU, 2017).

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução; além disso, formam-se em condições de estresse, como infecções, ferimentos e radiações ultravioleta. Os compostos fenólicos possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila e suas estruturas podem variar da simples molécula fenólica à de um composto altamente polimerizado (KALA et al., 2016). A diversidade estrutural destes compostos deve-se à grande variedade de combinações que ocorre na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente dez mil compostos. Dentre estes, destacam-se os flavonóides (SARTORI, CASTRO e MORI, 2014).

Os flavonóides constituem uma classe de metabólitos secundários, de ampla distribuição no reino vegetal, com mais de 4000 tipos já descobertos e mais de 10.000 derivados identificados (PATEL, SINGH e PATEL, 2018). Pertencentes a uma classe de compostos

polifenólicos produzidos por plantas a partir da via dos fenilpropanóides, os flavonóides são considerados nutracêuticos, devido as suas distintas propriedades biológicas e farmacológicas, sendo compostos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (GEORGIEV, ANANGA e TSOLOVA, 2014).

O estudo de biomoléculas provenientes de origem vegetal faz-se necessário, pois são uma importante fonte de agentes terapêuticos. Muitos relatos na literatura demonstram o papel neuroprotetor dessas biomoléculas em vários modelos experimentais incluindo modelos de hipóxia no sistema nervoso central. Os compostos bioativos que possuem propriedades neuroprotetoras também foram propostos para serem agentes terapêuticos eficazes farmacologicamente potentes em muitas doenças, incluindo as doenças neurodegenerativas (LALL e KISHORE, 2014; SARKAR et al., 2012, TABASSUM et al., 2014).

O estudo dos antioxidantes naturais é uma nova tendência de mercado fármaco e industrial, pois, além de manter as propriedades organolépticas e químicas de alimentos, também são associados a manutenção de saúde e prevenção de doenças. E segundo a OMS a utilização extensiva de antioxidantes sintéticos e sua ingestão prolongada pode ser associado ao aparecimento de doenças. Portanto a pesquisa por antioxidantes naturais tem sido amplamente incentivada (RENDEIRO, RHODES E SPENCER, 2015).

2.5 Naringenina

A naringenina é um dos flavonóides de ocorrência natural mais importante, encontrado predominantemente em frutas cítricas, como espécies de tomates *Citrus* e figos pertencentes a *Ficus carica* do tipo smyrna. Quimicamente é denominada 2,3-di-hidro-5,7-di-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona, (C₁₅H₁₂O₅) (figura 1) (MBAVENG, ZHAO e KUETE, 2014; JADEJA e DEVKAR, 2014; ZOBEIRI, et al., 2018).

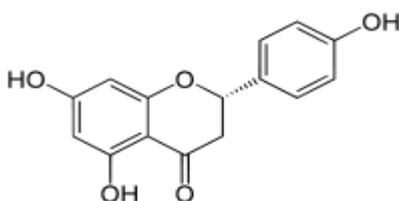


Fig 1. Estrutura química da naringenina. Fonte: Universidade de São Carlos, 2012.

Conhecida por ser um agente com diversas funções, a naringenina é considerada um poderoso composto antioxidante, antiinflamatório, antidepressivo e neuroprotetor

(RENDEIRO, RHODES E SPENCER, 2015), dotado de amplos efeitos biológicos na saúde humana, que inclui uma diminuição nos biomarcadores de peroxidação lipídica e na carbonilação de proteínas, promove o metabolismo de carboidratos, aumenta as defesas antioxidantes, elimina e modula as espécies reativas de oxigênio, modula a atividade do sistema imunológico, exercendo ação anti-inflamatória (WANG, 2015). A naringenina modula as vias de sinalização relacionadas ao metabolismo dos ácidos graxos, favorecendo a oxidação desses ácidos, diminui o acúmulo de lipídios no fígado, além de evitar eficientemente o acúmulo de lipídios e lipoproteínas no plasma. Além disso, a naringenina potencializa respostas de sinalização intracelular a baixas doses de insulina, sensibilizando hepatócitos para insulina, e é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e exercer diversos efeitos neuronais, através de interação com as vias de sinalização da proteína cinase C (ZUBEIRI et al., 2018; WANG et al., 2015).

Estudos mostraram que a naringenina apresenta a capacidade de ativar a expressão de genes de antioxidantes, tais como a SOD, CAT e GSH (YI et al., 2012). Inicialmente considerada como um poderoso composto antioxidante, capaz de neutralizar os efeitos tóxicos de radicais livres, posteriormente a naringenina apresentou-se também como um potente inibidor do NF- κ B, que interfere na produção de citocinas pró-inflamatórias. Estudos mostraram ainda seu efeito neuroprotetor em modelo de doença de Alzheimer (ZAKI et al., 2014), pois possui a capacidade de ativar a via de fatores neurotróficos, exerce efeitos neuroprotetores contra a neurotoxicidade induzida por carbaril, alivia lesão cerebral isquêmica, entre outros efeitos neuroprotetores (RENDEIRO, RHODES e SPENCER, 2015). Apresenta ainda resposta positiva na recuperação motora em modelo de doença de Parkinson (MANI et al., 2018).

Os dados mostram os efeitos benéficos da naringenina como agente multifuncional, podendo atuar como anti-inflamatório, neuroprotetor e antioxidante. Trata-se portanto de um composto promissor para ser usado como adjuvante de drogas antipsicóticas para reduzir ou prevenir seus efeitos colaterais.

3.0 OBJETIVOS

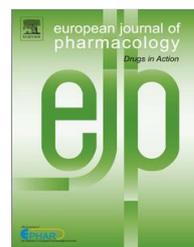
3.1 Objetivo Geral

Investigar os efeitos antioxidantes e neuroprotetores da naringenina em modelo de discinesia orofacial induzida por haloperidol em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar os efeitos da naringenina nas alterações comportamentais induzidas pelo haloperidol no modelo de discinesia orofacial;
- Verificar os efeitos da naringenina sobre os níveis de glutathione (GSH);
- Avaliar o efeito anti-inflamatório da naringenina através da quantificação de TNF- α e IL-1 β ;
- Determinar os efeitos antioxidantes da naringenina avaliando a peroxidação lipídica (TBARS) e as concentrações de nitrito/nitrato;

4.0 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO FORMATADO



2020 Elsevier B.V.

www.elsevier.com/locate/ejphar

Artigo

A NARINGENINA MEDEIA A NEUROPROTEÇÃO CONTRA A DISCINESIA INDUZIDA PELO HALOPERIDOL, IMPEDINDO O ESTRESSE OXIDATIVO E A NEUROINFLAMAÇÃO

Evaneide Pereira de Sá Carvalho^a, Cleane Gomes Moreira^a, Francisca Valéria Bezerra Sampaio Marques^a, Lucas Diogo Rosa^a, Mateus Aragão Esmeraldo^a, Francisco José Gomes^a, Paulo de Tarso Teles Dourado de Aragão^b, Rodrigo Maranguape Silva da Cunha^c, Carla Thiciane Vasconcelos de Melo^a, Gerardo Cristino Filho^a, Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar^{a,1}.

^aLaboratório de Fisiologia da Universidade Federal do Ceará, Sobral, Brasil. ^bLaboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, Sobral, Brasil. ^cLaboratório de Biologia Molecular, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, Brasil. evaneide.carvalho@hotmail.com (E.P.S.C.); cleanegmoreira@gmail.com (C.G.M.); fvbsm2013@gmail.com (F.V.B.S.M); lucasdiorosa@gmail.com (L.D.R.); mateus-esmeraldo@hotmail.com (M.A.E.); franjomes@hotmail.com (F.J.G.); paulodetarsoaragao10@gmail.com (P.T.T.D.A.); rmaranguape@gmail.com (R.M.S.C.); thiciane_melo@yahoo.com.br (C.T.V.M); gcristinofilho@gmail.com (G.C.F.); lissiana_m@yahoo.com.br (L.M.V.A.).

¹Endereço para correspondência: Avenida Comandante Maurocélido Tarciano da Rocha Pontes, 100, Sobral - CE, 62042-280.

¹E-mail para correspondência: lissiana_m@yahoo.com.br.

Resumo: A discinesia tardia (TD) é um distúrbio persistente do movimento hiperkinético, geralmente irreversível, consequência do uso de agentes bloqueadores dos receptores da dopamina, incluindo drogas antipsicóticas. Embora o recente desenvolvimento de dois medicamentos aprovados para o tratamento da DT, eles possuem efeitos adversos e ainda são considerados muito caros. Apesar dos progressos substanciais, há a necessidade de mais trabalhos com relação ao potencial de prevenção da DT. Baseado nisso, o presente estudo tem como objetivo avaliar o potencial papel neuroprotetor do antioxidante naringenina em um modelo de discinesia orofacial (DO), induzida pelo haloperidol, em ratos Wistar machos. Os animais foram selecionados em 5 grupos: 1- controle; 2- haloperidol 1mg/kg; 3- haloperidol 1mg/kg + naringenina 10mg/kg; 4- haloperidol 1mg/kg + naringenina

25mg/kg; 5- haloperidol 1mg/kg + naringenina 50mg/kg. O tratamento foi realizado durante 21 dias e os testes comportamentais semanalmente (nos dias 7, 14 e 22). Foram avaliados os parâmetros comportamentais, incluindo número de movimentos de mastigação vazios (MMVs) (avaliação dos movimentos orofaciais), atividade locomotora (plataforma estreita e campo aberto), coordenação motora (rotarod) e teste de memória (y-maze). No 22º dia, as áreas do cérebro (hipocampo, córtex pré-frontal e estriado) foram removidas para a determinação dos níveis de TBARS, nitrito, glutathiona, TNF- α e IL-1 β . O tratamento com haloperidol alterou todos os parâmetros nos testes comportamentais, aumentando MMVs, reduzindo a atividade locomotora, a coordenação motora e a memória dos ratos. Além disso, aumento do estresse oxidativo, redução do antioxidante endógeno e aumento de citocinas pró-inflamatórias. A coadministração de naringenina melhorou as alterações comportamentais e reduziu os níveis de peroxidação lipídica e citocinas, mostrando um papel promissor na prevenção da DO induzida por antipsicóticos típicos.

Palavras-chave: Neuroproteção, Naringenina, Haloperidol, Discinesia Orofacial, Discinesia Tardiva.

1.Introdução

A discinesia tardia (DT) é uma complicação motora com presença de movimentos hiperkinéticos e involuntários que normalmente ocorrem na língua, mandíbula, lábios e face, podendo também envolver outros grupos musculares e manifestar-se no tronco, pelve e membros, associados a alterações significativas e comprometimento funcional (Citrome, 2018). A DT pode ocorrer durante ou após a interrupção do tratamento prolongado com agentes bloqueadores dos receptores da dopamina, incluindo antipsicóticos (Margolius e Fernandez, 2019).

Antipsicóticos, especialmente aqueles que agem preferencialmente bloqueando os receptores D2, como os antipsicóticos de primeira geração, podem causar DT (Singh et al., 2019; Hauser e Truong, 2018). A DT é relativamente comum, afetando um quarto a um terço dos pacientes tratados cronicamente com antipsicóticos, de primeira ou segunda geração, com exceção da clozapina, que apresenta um risco consideravelmente menor de DT (D'Abreu et al., 2018). A fisiopatologia desse fenômeno ainda é incerta, mas existem algumas hipóteses: supersensibilidade do receptor de dopamina, insuficiência de ácido γ -aminobutírico (GABA), excitotoxicidade do glutamato, geração de radicais livres, estresse oxidativo e neurodegeneração (Servonnet e Samaha, 2020; Hashimoto et al., 2018; Lister et al., 2017).

A presença de DT tem sido associada a menores escores de qualidade de vida e estigmatização social (Pato et al., 2017). Recentemente, dois medicamentos foram aprovados para o tratamento da DT, no entanto, apresentam efeitos adversos (por exemplo, sonolência, prolongamento do intervalo QT), interações medicamentosas e ainda são considerados muito caros. Portanto, a DT continua sendo um desafio importante, pois é uma condição clínica às vezes irreversível e resistente a diferentes tratamentos, mantendo-se um tópico de interesse em diversos estudos, especificamente na busca de estratégias preventivas (Meyer, 2018; Citrome, 2018; Margolius e Fernandez, 2019; Lister et al., 2017). Atualmente, os antioxidantes estão

emergindo como importantes agentes neuroprotetores e existem até alguns medicamentos antioxidantes aprovados para tratar inúmeras doenças causadas pelo estresse oxidativo (Neha et al., 2019). Entre os antioxidantes naturais, um flavonóide natural contido em frutas cítricas chamado naringenina (NAR) despertou muito interesse, devido às suas ações multifuncionais, considerado um poderoso composto antioxidante, anti-inflamatório, antidepressivo e neuroprotetor (Rendeiro et al., 2015). O NAR pode atravessar a barreira hematoencefálica (BBB), e seus possíveis efeitos neuroprotetores foram testados em vários modelos animais (Chen et al., 2018; Lo et al., 2017; Chandran et al., 2019). No entanto, de acordo com nosso conhecimento, a naringenina ainda não foi testada em modelos de discinesia. Devido a todos os possíveis efeitos benéficos da naringenina, pode ser um composto promissor para ser usado como adjuvante de drogas neurolépticas para reduzir ou prevenir seus efeitos colaterais. Para testar esta hipótese, este trabalho teve como objetivo estudar o papel neuroprotetor da naringenina na discinesia orofacial induzida pelo haloperidol em ratos.

2. Material e Métodos

2.1 Animais experimentais

Ratos machos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar), pesando 250-300g, foram utilizados nesse estudo. Os animais foram mantidos em um ciclo claro / escuro de 12/12 h, com acesso a água e alimentos ad libitum, distribuídos aleatoriamente em grupos experimentais especificados. Todas as experiências foram realizadas à temperatura ambiente de 24 ± 2 ° C e foram realizadas entre 08:00 e 17:00 h. Os experimentos foram realizados de acordo com as leis vigentes do Instituto Nacional de Saúde, Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório, sob o consentimento e a vigilância do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (protocolo de aprovação número 07 / 2018). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais e reduzir o número de animais utilizados nas experiências.

2.2 Medicamentos e horário de tratamento

O haloperidol (Sigma Aldrich, EUA) foi dissolvido em água destilada e administrado numa dose de 1 mg / kg por via intraperitoneal (i.p). A naringenina (Sigma Aldrich, EUA) foi dissolvida em água destilada e administrada nas doses de 10, 25 e 50mg / kg por via oral (v.o) (Datta et al., 2016; Thakur et al., 2015; Abdel-Magied e Shedid, 2019; Mani et al., 2018).

Os animais foram divididos em 5 grupos contendo 6 animais, tratados e avaliados por 21 dias. Os comportamentos foram realizados em três momentos, aos 7, 14 e 22 dias. De acordo com o delineamento experimental da Fig. 1.

2.3 Indução de discinesia orofacial

A discinesia orofacial foi induzida por administração crônica de haloperidol (1 mg/kg, i.p., por 21 dias). Todos os parâmetros comportamentais foram avaliados semanalmente (nos dias 7 e 14), após 30 minutos da administração das doses. E a última avaliação comportamental foi realizada no 22º dia, 24h após o último tratamento (Datta et al., 2016).

Nos dias 7 e 14 a avaliação comportamental foi realizada sequencialmente na caixa espelhada, plataforma estreita e rotarod. E no 22º dia acrescentou-se o y-maze e o campo aberto aos demais comportamentos realizados nas semanas anteriores. De acordo com o delineamento experimental mostrado na Fig. 1

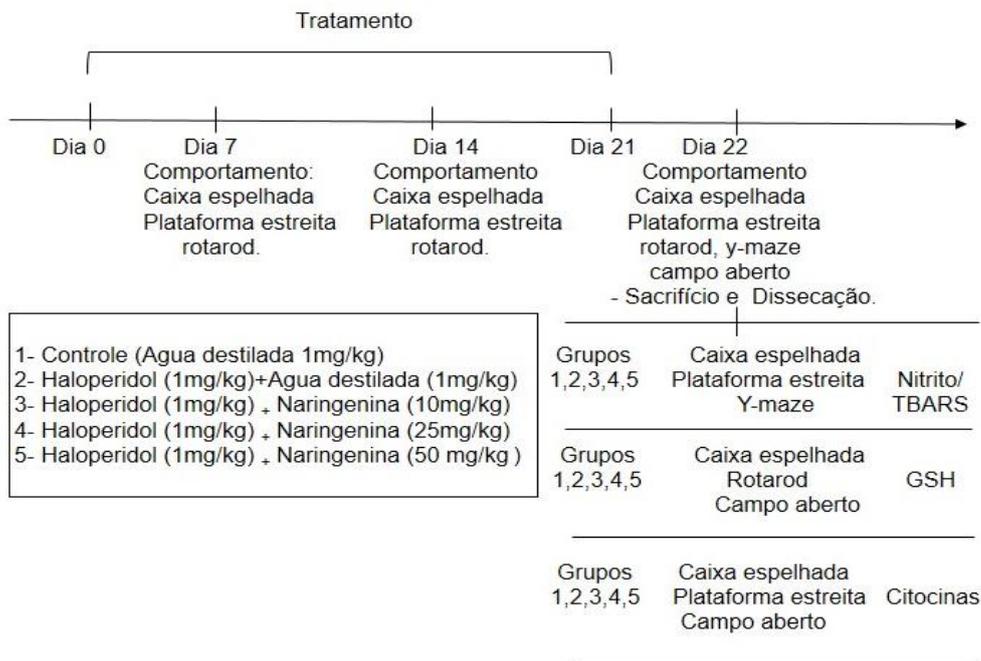


Fig. 1 Delineamento Experimental. TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; GSH: glutathiona; Citocinas: TNF- α e IL-1 β .

2.4 Testes comportamentais

2.4.1 Avaliação dos movimentos orofaciais

Os ratos foram colocados individualmente caixas em caixas espelhadas (30cm x 20cm x 30cm) para avaliação da discinesia orofacial. Os animais foram autorizados a passar 10 minutos na caixa antes do início do experimento para se acostumar com o ambiente. Os parâmetros comportamentais da discinesia oral foram medidos continuamente por um período de 10 minutos. A contagem dos movimentos, realizada com o auxílio de um cronômetro digital, foi interrompida durante os momentos de grooming (auto-limpeza). No presente estudo, os MMVs são referidos como uma única abertura da boca no plano vertical, não direcionada ao material físico (Thakur et al., 2015).

2.4.2 Teste de caminhada em plataforma estreita

A plataforma estreita foi utilizada para avaliar a coordenação motora e equilíbrio dos ratos, medindo a capacidade dos animais atravessá-la com segurança para alcançar uma caixa posicionada ao final da plataforma. O aparato foi confeccionado em metalon e consiste em uma plataforma com 1 metro de comprimento e 3 cm de largura, suportada por dois pedestais em cada extremidade, sendo de diferentes alturas (45 cm e 100cm) para permitir inclinação, impedindo que os animais se rastejem pela plataforma. Foi colocada uma caixa, medindo 20 cm x 20 cm ao final da plataforma inclinada, contendo ração para atrair os animais. O aparelho foi colocado a pelo menos 1 metro acima do solo, para facilitar a visão do observador. Foi observado se eles concluem ou não a tarefa e se ficam parados e não conseguem andar, sendo atribuído uma latência máxima de 60s pra atravessar a plataforma (Datta et al., 2016).

2.4.3 Teste rotarod

O teste rotarod é amplamente utilizado para avaliar o efeito de substâncias ou compostos na coordenação motora de ratos (Ishola, et al., 2019). Os ratos foram expostos a uma sessão de treinamento anterior para aclimatá-los ao desempenho do rotarod. Para realizar este teste, os ratos foram colocados em uma haste rotativa com um diâmetro de 7 cm (velocidade 25 rpm). O tempo de corte foi de 180s e o tempo médio da queda foi registrado. O teste foi interrompido após a queda do animal (Thakur et al., 2015).

2.4.4 Teste de campo aberto

Os ratos foram colocados em campo aberto, com área de 50 cm x 50 cm, sob pouca luz. O aparelho é dividido em 16 grades iguais, medindo 15 cm cada, claramente desenhadas na superfície. Os animais foram colocados no quadrante central para iniciar o teste, realizado por 5 minutos, em uma sala sem som. O teste foi realizado após 21 dias de tratamento e foi avaliado o movimento espontâneo dos animais (número de cruzamentos, com quatro patas) entre as divisões do campo (Archer, 1973).

2.4.5 Y-maze

Cada animal foi colocado no final de um braço do labirinto e deixado circular livremente pelo aparelho durante 6 minutos. O aparelho consistia em um labirinto em forma de Y com três braços (comprimento 45cm, largura 10cm, altura da parede 25cm) a um ângulo de 120° um do outro. Uma alternância correta foi definida como entradas nos três braços em ocasiões consecutivas. A porcentagem de alternâncias corretas foi calculada da seguinte forma: $\{(\text{número de alternâncias} / \text{número total de entradas} - 2) \times 100\}$ (Sarter et al., 1988; Ishola, et al., 2019).

2.4.6 Dissecção e homogeneização

No 22º dia, todos os animais foram sacrificados. O cérebro foi removido e as áreas do cérebro (hipocampo, estriado e córtex pré-frontal) foram dissecadas e armazenadas em um freezer a -80 ° C e usadas para avaliações bioquímicas. Determinação de TBARS, nitrito, GSH, IL-1 β e TNF- α .

2.5 Avaliação Bioquímica

2.5.1 Determinação da peroxidação lipídica

O grau de lipoperoxidação nas áreas do cérebro foi medido através da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), seguindo o método de Draper e Hadley (1990). A peroxidação lipídica foi determinada em um espectrofotômetro por absorvância de 535 nm e expressa como micromol de malondialdeído (MDA) / g de tecido.

2.5.2 Determinação de nitrito e nitrato

O acúmulo de nitrito no sobrenadante, um indicador da produção de óxido nítrico, foi determinado pelo método de Griess, descrito por Green et al (1982). Resumidamente, as áreas do cérebro foram homogeneizadas com 10% de tecido com tampão monobásico de fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4. Em seguida, 100 μ L do sobrenadante foram incubados com 100 μ L do reagente Griess, que consistia em partes iguais (1: 1: 1: 1) de sulfanilamida a 1% dissolvidas em 1% de H₃PO₄, 0,1% de N- (1-naftil) -tilenodiamina a 1% dicloridrato e água destilada à temperatura ambiente por 10 min. A absorvância foi medida a 560 nm em um leitor de microplacas. O conteúdo de nitrito foi determinado a partir de uma curva padrão usando NaNO₂ (variando de 0,75 a 100 mM) e foi expresso como micromol / g de tecido.

2.5.3 Determinação da concentração reduzida de glutatona

A concentração de glutatona reduzida (GSH) foi determinada para estimar as defesas antioxidantes endógenas. O método foi baseado na reação do ácido 5,5'-ditiobe, 2-nitrobenzóico (DTNB) com grupos tiol livres. A medição do produto da reação formado foi realizada pela leitura da absorvância a 412 nm, e a concentração de glutatona reduzida foi calculada em uma curva de glutatona padrão e expressa em micromol de GSH / g de tecido, conforme descrito por Sedlak e Lindsay (1968).

2.5.4 Estimativa dos níveis de TNF- α e IL-1 β

As áreas do cérebro foram homogeneizadas em tampão fosfato com inibidor de protease. As concentrações de TNF- α e IL-1 β foram medidas usando um kit de ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) disponível no mercado (R&D Systems Inc.,

Minneapolis, Minnesota) de acordo com as instruções do fabricante. A curva padrão demonstra uma relação direta entre a densidade óptica e as concentrações de TNF- α ou IL-1 β . Os resultados foram expressos em pg de tecido TNF- α ou IL-1 β / g.

2.6 Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada no software GraphPad Prism, versão 8.0 para Windows, expresso como média \pm SEM. Para a análise estatística dos resultados, foram utilizadas a Análise de Variância (ANOVA), *one-way* ANOVA (testes comportamentais) ou *two-way* ANOVA (análise bioquímica), seguida pelo teste de Tukey como post-hoc. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.0 Resultados

3.1 Efeitos da naringenina nos movimentos de mastigação vazios (MMVs) em ratos tratados com haloperidol

Os animais do grupo controle não apresentaram MMVs. Os grupos que receberam apenas haloperidol (1mg / kg, ip) apresentaram aumento gradual dos MMVs, como observado no comportamento dos dias 7, 14 e 22. Coadministração de haloperidol (1mg / kg, ip) e naringenina (10, 25 e 50 mg / kg, po) mostrou uma diminuição significativa nos MMVs quando comparados com o grupo haloperidol (HALO) (fig. 2).

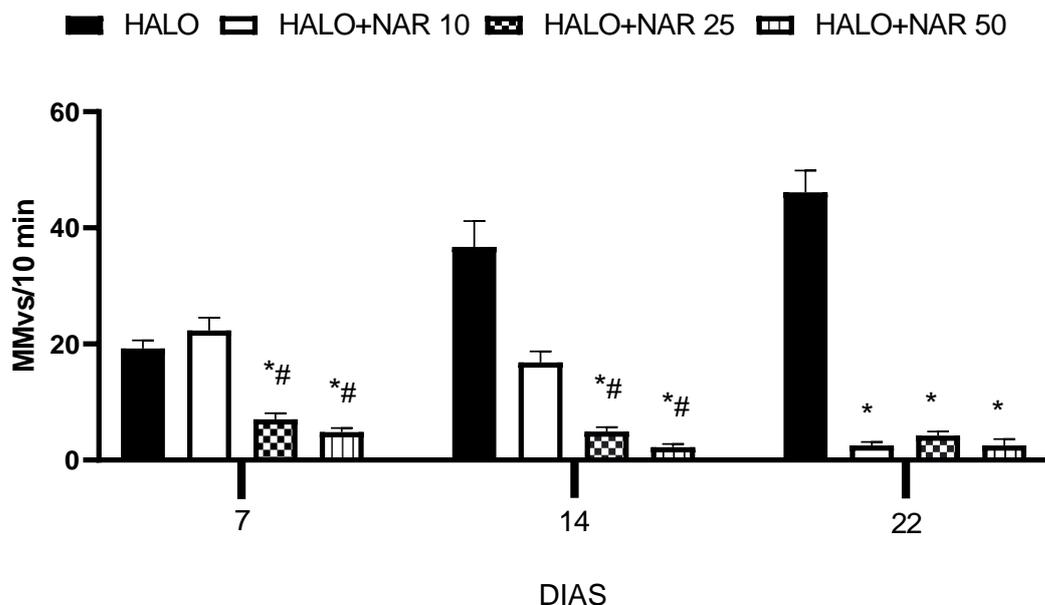


Fig. 2. Efeito da naringenina nos movimentos de mastigação vazios (MMVs) em ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=18) * $P < 0.0001$ em comparação com Grupo HALO; # $P < 0.0001$ em comparação com HALO + NAR10.

3.2 Efeitos da naringenina na coordenação motora (rotarod) em ratos tratados com haloperidol

A administração de haloperidol (1mg / kg, i.p) promoveu uma diminuição significativa na coordenação motora dos ratos, observada pelo menor tempo de latência até a primeira queda nos grupos tratados, em relação ao grupo controle. A administração concomitante de naringenina (10, 25 e 50 mg / kg p.o) não alterou o déficit motor causado pelo haloperidol (fig. 3).

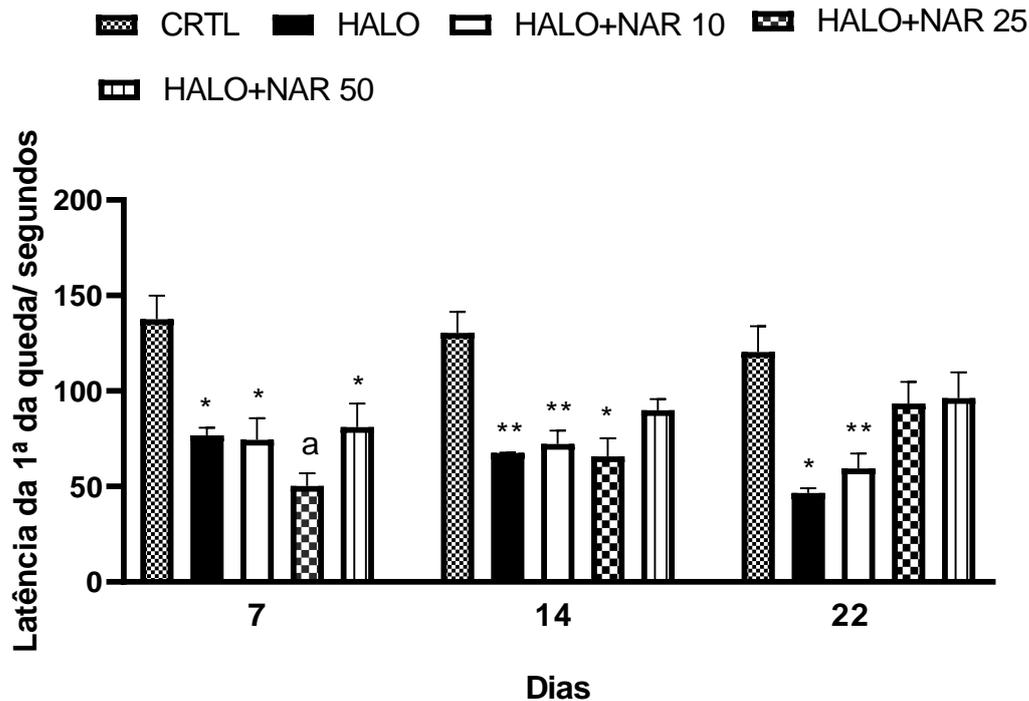


Fig. 3. Efeito da naringenina na atividade do rotarod em ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=6) *P < 0.005 em comparação ao CTRL; a P < 0.0001 em comparação ao CTRL; ** P < 0.05 em comparação com Grupo CTRL.

3.3 Efeito da naringenina na atividade de caminhada (teste de caminhada na plataforma estreita) em ratos tratados com haloperidol

O tratamento com haloperidol (1 mg / kg, i.p) reduziu a capacidade dos animais de caminhar e completar o cruzamento da plataforma estreita. O comportamento foi avaliado nos dias 7, 14 e 22. A coadministração de naringenina na dose de 25mg / kg apresentou o melhor resultado entre os grupos tratados com naringenina (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito da naringenina na atividade de caminhada (plataforma estreita), em ratos tratados com haloperidol

Grupos	D 7		D 14		D 22	
	Andou	Concluiu	Andou	Concluiu	Andou	Concluiu
1	77%	22%	72 %	27%	55%	22%
2	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3	5%	0%	5%	0%	5%	0%
4	10%	0%	22%	0%	22%	0%
5	5%	0%	16%	0%	16%	0%

Os dados são expressos em porcentagem e cada grupo tem o N=12 animais. 1- Grupo controle; 2- haloperidol (1mg/kg); 3- haloperidol + naringenina 10mg/kg; 4- haloperidol + naringenina 25mg/kg; 5- haloperidol + naringenina 50mg/kg. D- dia.

3.4 Efeito da naringenina na atividade locomotora (campo aberto) em ratos tratados com haloperidol

O tratamento com haloperidol (1mg / kg) causou uma diminuição significativa da atividade exploratória no teste de campo aberto quando comparado ao grupo controle. Os animais que receberam naringenina nas doses de 25 e 50mg / kg apresentaram recuperação motora observada com o maior número de cruzamentos em campo aberto, quando comparados ao grupo HALO (fig. 4).

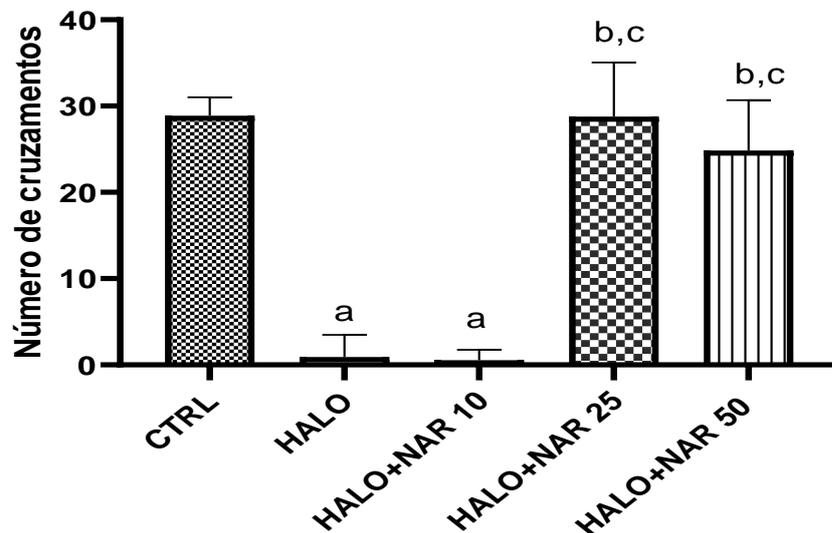


Fig. 4. Efeito da naringenina na atividade exploratória de cruzamentos no campo aberto, de ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média ± S.E.M. (n=12); a P < 0,0001 em comparação com Grupo CTRL; b P < 0,0001 em comparação com Grupo HALO; c P < 0,0001 em comparação com HALO + NAR10.

3.5 Efeito da naringenina na atividade da memória (labirinto y) em ratos tratados com haloperidol

Na avaliação do desempenho da memória de trabalho, o uso crônico de haloperidol (1mg / kg) resultou em uma diminuição na porcentagem de alternância espontânea. Por outro lado, a co-administração de naringenina (10, 25 e 50 mg / kg) reverteu significativamente as alterações causadas pela administração de haloperidol (fig. 5).

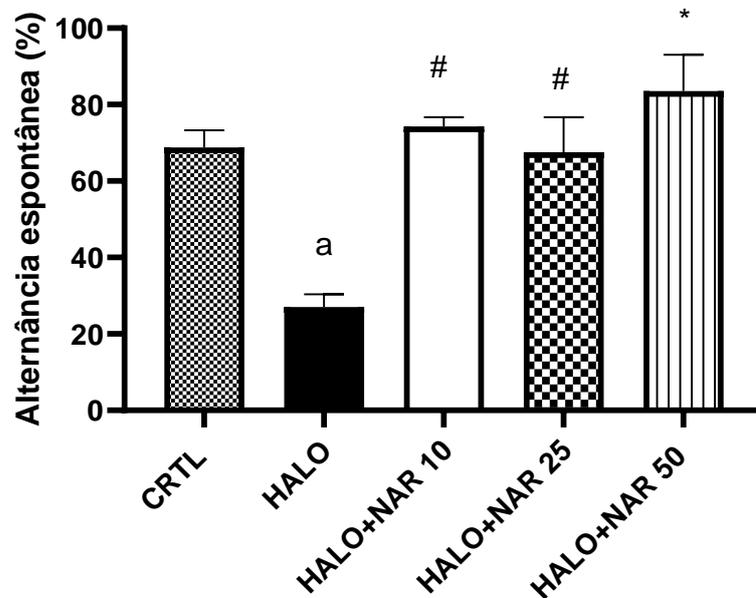


Fig. 5. Efeito da naringenina no percentual de alternância espontânea em ratos tratados com haloperidol no teste do labirinto em Y. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=6); a < 0,001 em comparação com Grupo CTRL; # P < 0,001 em comparação com Grupo HALO; * P < 0,0001 em comparação com Grupo HALO.

3.6 Efeito da naringenina no estresse oxidativo em ratos tratados com haloperidol

O uso crônico de haloperidol (1mg / kg) aumentou a peroxidação lipídica (TBARS) em todas as áreas testadas. Também aumentaram os níveis de nitrito e diminuíram a glutathione apenas no estriado e no hipocampo. A administração concomitante de naringenina (10, 25 e 50mg / kg) não reverteu as alterações nas concentrações de nitrito e glutathione (Tabelas 2 e 3), mas reduziu significativamente a peroxidação lipídica (Fig. 6, 7 e 8).

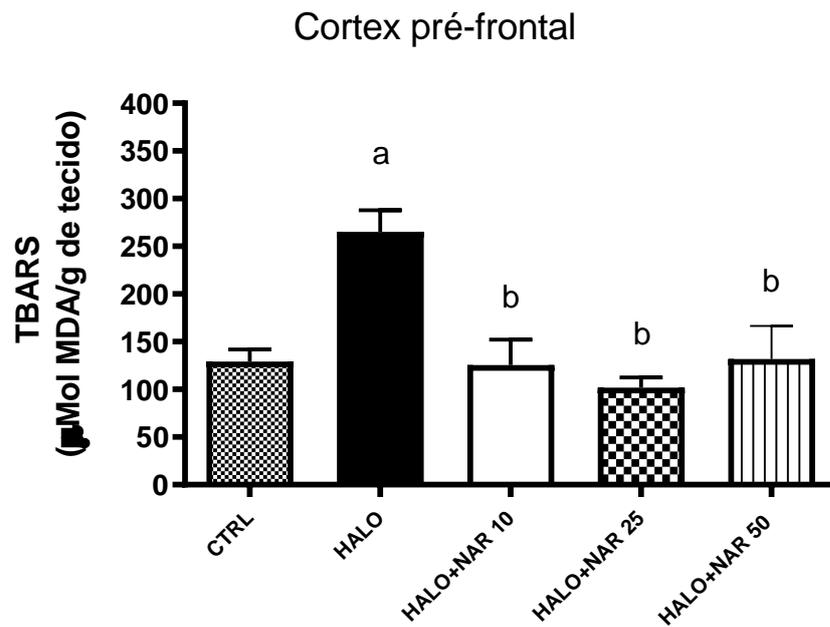


Fig. 6. Efeito da naringenina na peroxidação lipídica (TBARS) no córtex pré frontal de ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=5-6); a $P < 0,0001$ em comparação com Grupo CTRL; b $P < 0,0001$ em comparação com Grupo HALO.

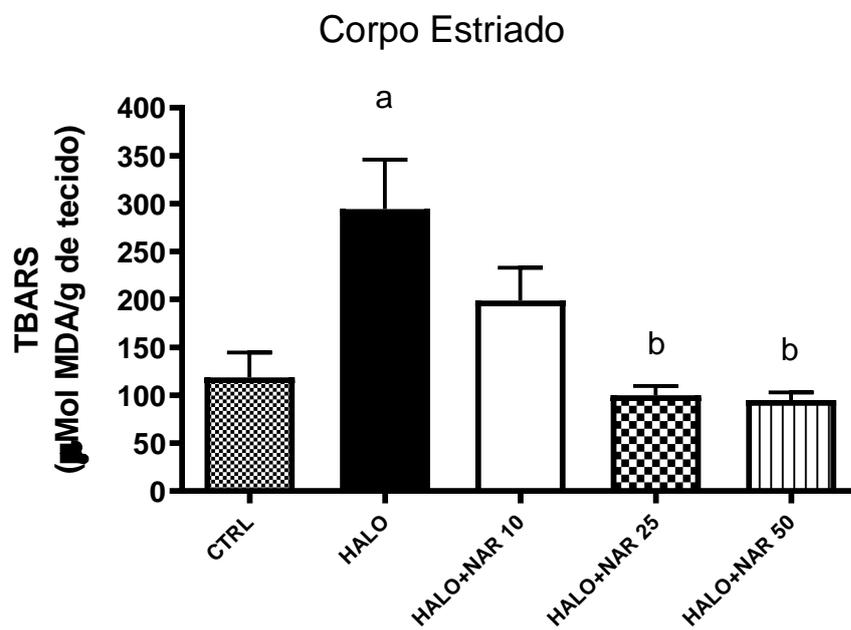


Fig. 7. Efeito da naringenina na peroxidação lipídica (TBARS), no corpo estriado de ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=5-6); a $P < 0,0001$ em comparação com Grupo CTRL; b $P < 0,0001$ em comparação com Grupo HALO.

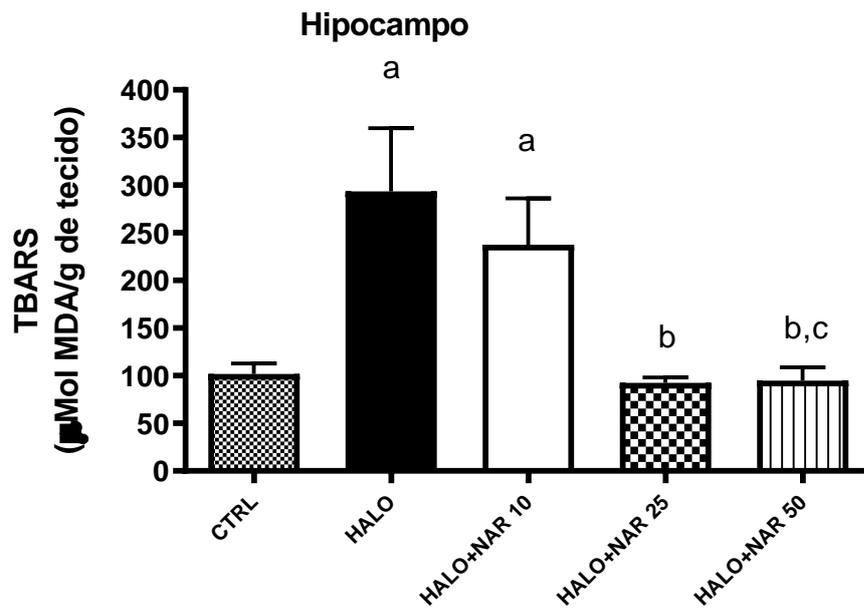


Fig. 8. Efeito da naringenina na peroxidação lipídica (TBARS) no hipocampo de ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=5-6); a $P < 0,0001$ em comparação com Grupo CTRL; b $P < 0,0001$ em comparação com Grupo HALO; c $P < 0,0001$ em comparação com HALO + NAR 10.

Tabela 2 Efeitos da naringenina nas estimativas de nitrito e nitrato ($\mu\text{mol/g}$) em ratos tratados com haloperidol

AREA	CTRL	HALO	NAR10	NAR 25	NAR 50
Cortex	0,0064 \pm 0,0002	0,0078 \pm 0,0005	0,0078 \pm 0,0001	0,0072 \pm 0,0008	0,0070 \pm 0,0007
Estriado	0,0054 \pm 0,0009	0,0096 \pm 0,0012 [#]	0,0080 \pm 0,0005	0,0072 \pm 0,0002	0,0077 \pm 0,0002
Hipocampo	0,0053 \pm 0,0003	0,0083 \pm 0,0012 [#]	0,0085 \pm 0,0006 [#]	0,0073 \pm 0,0002	0,0074 \pm 0,0002

Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=5-6); [#] $P < 0,05$ em comparação com Grupo CTRL. HALO-haloperidol; NAR-naringenina.

Tabela 3 Efeitos da naringenina nas estimativas de glutatona ($\mu\text{mol/g}$) em ratos tratados com haloperidol

AREA	CTRL	HALO	NAR10	NAR 25	NAR 50
Cortex	0,0196 \pm 0,0026	0,0127 \pm 0,0002	0,0202 \pm 0,0010	0,0178 \pm 0,0031	0,0131 \pm 0,0019
Estriado	0,0096 \pm 0,0012	0,0054 \pm 0,0009 *	0,0080 \pm 0,0005	0,0072 \pm 0,0002	0,0077 \pm 0,0002*
Hipocampo	0,0283 \pm 0,0031	0,0177 \pm 0,0007 *	0,0142 \pm 0,0014**	0,0172 \pm 0,0009**	0,014 \pm 0,0008**

Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=5-6); * $P < 0,01$ em comparação com Grupo CTRL; ** $P < 0,0001$ em comparação com Grupo CTRL.

3.7 Efeito da naringenina nas estimativas de $IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$ em ratos tratados com haloperidol

A administração de haloperidol (1mg / kg) aumentou significativamente a concentração de citocinas pró-inflamatórias ($IL-1\beta$ e $TNF-\alpha$) quando comparada ao grupo controle. Por outro lado, a co-administração de naringenina (10, 25 e 50 mg / kg) preveniu esse efeito (Fig. 9 e Fig. 10).

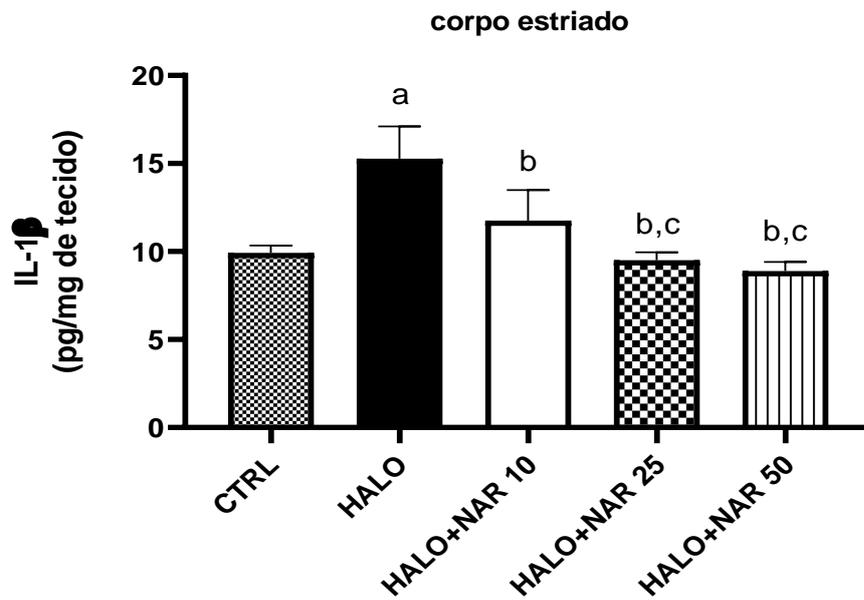


Fig. 9. Efeito da naringenina na estimativa de $IL-1\beta$ no corpo estriado de ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M (n=5-6); a $P < 0,0001$ em comparação com Grupo CTRL; b $P < 0,0001$ em comparação com Grupo HALO; c $P < 0,0001$ em comparação com HALO + NAR 10.

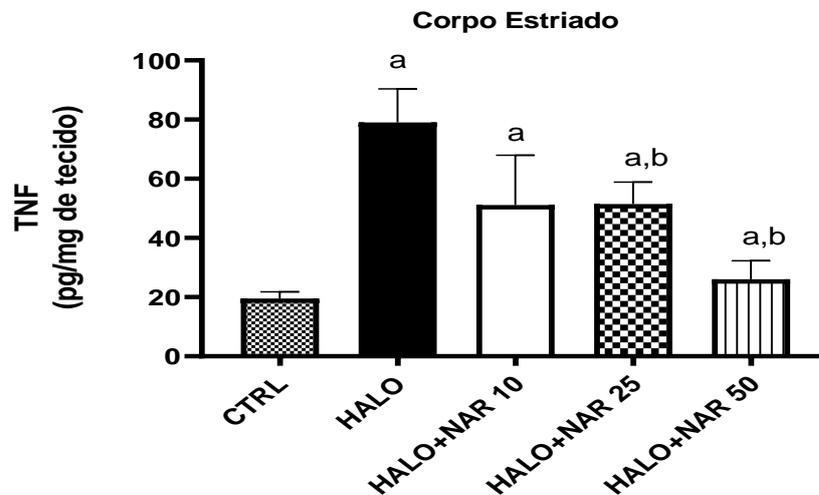


Fig.10. Efeito da naringenina na estimativa de $TNF-\alpha$ no corpo estriado de ratos tratados com haloperidol. Os dados são expressos em Média \pm S.E.M. (n=5-6); a $P < 0,0001$ em comparação com Grupo CTRL; b $P < 0,0001$ em comparação com Grupo HALO.

4.0 Discussão

Nossos resultados demonstraram que a co-administração de naringenina reduziu as manifestações de MMVs induzidas pelo haloperidol em ratos. O tratamento com haloperidol também reduziu a coordenação motora dos animais nos testes de plataforma estreita e rotarod, e a atividade locomotora no teste de campo aberto. Além disso, causou déficit de memória no teste do y-maze. Esses efeitos foram parcialmente revertidos pela naringenina, especialmente nas doses mais altas. Concomitante a alterações comportamentais, o haloperidol aumentou o estresse oxidativo, reduziu o GSH e aumentou as concentrações de citocinas pró-inflamatórias. Embora não tenham sido observadas alterações no nitrito e no GSH, a co-administração de naringenina reverteu a peroxidação lipídica e aumentou as citocinas.

A discinesia tardia causada pela administração de antipsicóticos, como o haloperidol, foi atribuída à supersensibilidade dopaminérgica devido ao bloqueio dos receptores D2 pré-sinápticos, levando a um aumento compensatório na síntese e liberação de dopamina (Ceretta et al., 2018). Em roedores, a administração crônica de haloperidol causa aumento dos movimentos orofaciais, caracterizando o modelo animal de DT (Peroza, et al., 2013). No presente estudo, a administração crônica de haloperidol por 21 dias em ratos produziu MMVs e alterações típicas da discinesia orofacial, fato que está de acordo com estudos anteriores, comprovando a indução do modelo de discinesia orofacial em animais (Datta et al., 2016; Grover et al., 2013). O tratamento com naringenina (10, 25 e 50mg / kg) causou uma diminuição progressiva dos MMVs. Em estudos anteriores, a coadministração de substâncias antioxidantes proporcionou uma diminuição dos MMVs em animais que receberam antipsicóticos cronicamente, mostrando um possível efeito protetor dessas substâncias (Lister et al., 2017; Shi et al., 2016).

Os animais do grupo haloperidol apresentaram alterações na coordenação motora e na marcha, evidenciadas por uma redução na porcentagem de animais que caminharam ou completaram o cruzamento da plataforma estreita. A administração concomitante de naringenina nas doses de 25 e 50 mg/kg impediu esse efeito. Corroborando com nossos resultados, Mani et al., 2018, observaram um efeito semelhante na recuperação motora de animais submetidos ao modelo de Parkinson induzidos por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidro piridina) e tratados com naringenina nas mesmas doses.

Além disso, o haloperidol alterou a coordenação motora dos animais, demonstrada no teste do rotarod, corroborando com os dados da literatura (Datta et al., 2016; Thakur et al., 2015). A naringenina nas duas doses mais altas (25mg/kg e 50mg/kg) reduziu essas alterações.

Da mesma forma, estudos anteriores usando naringenina mostraram desempenho motor melhorado no rotarod em outros modelos animais (Mani et al., 2018; Bhandari et al., 2018).

Nossos dados mostram que o haloperidol reduziu a atividade locomotora de animais no teste de campo aberto. Assim como em outros testes comportamentais que avaliaram déficits motores induzidos pelo haloperidol, o uso de naringenina (25 e 50mg/kg) evitou esse efeito. Corroborando com nosso estudo, Cunha et al., 2016, utilizando um modelo de discinesia orofacial induzida por reserpina, demonstraram que os déficits motores dos animais estavam relacionados à menor distância percorrida no teste de campo aberto.

Vários fatores como a supersensibilidade ao receptor D2 dopaminérgico, a hipofunção GABAérgica, a excitotoxicidade, a neuroinflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos da discinesia tardia induzida por antipsicóticos (Shireen, 2016). Alguns estudos mostram que a administração crônica de haloperidol causa excitotoxicidade mediada por glutamato e hipofunção GABAérgica, devido à diminuição da liberação de GABA ou à perda de terminais GABAérgicos na via nigroestriatal. Isso pode contribuir para a hiperexcitabilidade estriada dopaminérgica, promovendo o aparecimento de movimentos discinéticos orofaciais e alterações motoras (Ceretta et al., 2018; Datta et al., 2016; Thakur et al., 2015).

Além das alterações motoras, nossos resultados também mostraram que o tratamento com haloperidol causou um déficit na memória de trabalho dos animais, verificado no teste y-maze. Esse efeito pode estar relacionado a alterações nos receptores dopaminérgicos mediados pelo haloperidol administrado por 21 dias (Xu et al., 2012). O tratamento com naringenina reduziu o déficit de memória dos animais. Esses resultados corroboram com outros estudos que descobriram que a naringenina é capaz de melhorar o aprendizado e a memória em vários modelos animais com comprometimento cognitivo (Khajevand-Khazaei et al., 2018; Ghofrani et al., 2015; Hua et al., 2016). Esse efeito da naringenina pode estar relacionado a uma possível ação neuroprotetora relatada em estudos anteriores (Bai et al., 2014; Chtourou et al., 2014).

Todas essas alterações comportamentais observadas em animais tratados com haloperidol são frequentemente explicadas na literatura, como resultado do aumento do metabolismo da dopamina e danos a diferentes neurônios (GABAérgicos, glutamatérgicos e dopaminérgicos) e áreas do cérebro, como estriado, hipocampo e córtex pré-frontal. O haloperidol também pode causar um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio / nitrogênio e o sistema de defesa antioxidante (ex: glutathione), levando ao excesso dessas substâncias, que podem reagir com ácidos graxos poliinsaturados, causando peroxidação lipídica (Sonego et al., 2018; Lister et al 2017; Thakur et al., 2015).

No presente estudo, observou-se que a administração crônica de haloperidol aumentou o estresse oxidativo em áreas cerebrais, demonstrado por altos níveis de peroxidação lipídica (MDA), nitrito e redução da glutathiona antioxidante. A co-administração de naringenina, principalmente nas doses mais altas, reduziu a peroxidação lipídica induzida pelo haloperidol, no entanto, não foi capaz de prevenir as alterações de nitrito e glutathiona. Em um estudo anterior, a naringenina foi capaz de inibir o estresse oxidativo, reduzindo a peroxidação lipídica e o óxido nítrico, além de aumentar os níveis de GSH (Rahigude et al., 2012).

O processo inflamatório presente na DT causa aumento da liberação de mediadores inflamatórios, como TNF- α e IL-1 β . Essas citocinas podem ser benéficas ou prejudiciais ao organismo, dependendo da quantidade e duração da exposição produzida em uma célula específica, sendo este processo relacionado à via apoptótica, conhecido como o principal mecanismo de morte celular neuronal (Poluha e Grossmann, 2018). Em um estudo realizado por Takur et al., 2015, o uso crônico de haloperidol resultou em níveis aumentados de TNF- α e IL-1 β no corpo estriado dos ratos tratados. Processo observado neste estudo, em que o uso de haloperidol também causou aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) no estriado dos animais.

Em nosso estudo, a naringenina foi capaz de impedir o aumento nas concentrações das citocinas TNF- α e IL-1 β causadas pelo haloperidol, principalmente nas doses de 25 e 50 mg / kg. Vários estudos já demonstraram esse efeito anti-inflamatório da naringenina usando outros modelos animais (Al-Roujayee, 2017; Bansal et al., 2018; Umukoro et al., 2018; Wang et al., 2019).

Mani et al. (2018), usando um modelo de Doença de Parkinson induzido por MPTP em camundongos, observaram a ação antioxidante e neuroprotetora da naringenina, nas doses de 25 e 50 mg / kg, e esses efeitos foram associados à diminuição das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . Outro resultado semelhante foi obtido por Abdel-Magied e Shedid, 2019, testando a naringenina na modulação da lesão do baço induzida por radiação ionizante (IR) em ratos. Observaram que a naringenina na dose de 50mg / kg durante 14 dias teve efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, reduzindo os níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) e peroxidação lipídica. Em nosso estudo, os melhores resultados foram obtidos com naringenina nas doses de 25 e 50mg / kg em todos os parâmetros avaliados.

5.0 Conclusão

Podemos concluir que a naringenina foi capaz de reduzir as alterações motoras e melhorar alguns déficits cognitivos causados pela administração de haloperidol. Esses efeitos parecem estar relacionados à redução do estresse oxidativo e da neuroinflamação. Nesse contexto, a naringenina pode ser uma estratégia promissora para a prevenção da DT.

Agradecimentos: Universidade Federal do Ceará (UFC), (CAPES).

Contribuição dos autores: desenho do estudo, experimentos, discussão dos resultados e preparação do manuscrito.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Referências

- Abdel-Magied, N., Shedid, S.M., 2019. The effect of naringenin on the role of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2 (Nrf2) and haem oxygenase 1 (HO-1) in reducing the risk of oxidative stress-related radiotoxicity in the spleen of rats. *Environ Toxicol.* 34 (7), 788-795.
- Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice. A review. *Anim Behav*, 21, 205-235.
- Al-Roujayee, A.S., 2017. Naringenin improves the healing process of thermally-induced skin damage in rats. *J. Int. Med. Res.*, 45, 570-582.
- Bhandari, R., Paliwal, J.K., Kuhad, A., 2018. Naringenin and its nanocarriers as potential phytotherapy for autism spectrum disorders. *Journal of Functional Foods.* 47, 361-375.
- Bai, X., Zhang, X., Chen, L., Zhang, J., Zhang, L., X., Zhao, T., Zhao, Y., 2014. Protective effect of naringenin in experimental ischemic stroke: down-regulated NOD2, RIP2, NF-kappaB, MMP-9 and up-regulated claudin-5 expression. *Neurochem.* 39, 1405-1415.
- Bansal, Y., Singh, R., Saroj, P., Sodhi, R.K., Kuhad, A., 2018. Naringenin protects against oxide-inflammatory aberrations and altered tryptophan metabolism in olfactory bulbectomized-mice model of depression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 355, 257-268.
- Citrome, L., 2018. Reprint of: Clinical management of tardive dyskinesia: Five steps to success *Journal of the Neurological Sciences.* 389, 61–66.

Cunha, A.S., Matheus, F.C., Moretti, M., Sampaio, T.B., Prediger, R.D., 2016. Agmatine attenuates reserpine-induced oral dyskinesia in mice: Role of oxidative stress, nitric oxide and glutamate NMDA receptors. *Behavioural Brain Research*. 312, 64-76.

Ceretta, A.P.C., Freitas, C.M., Schaffer, L.F., Reinheimer, J. B., Fachineto, R., 2018. Gabapentin reduces haloperidol-induced vacuous chewing movements in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 166, 21-26.

Chtourou, Y., Fetoui, H., Gdoura, R., 2014. Protective effects of naringenin on iron-overload-induced cerebral cortex neurotoxicity correlated with oxidative stress. *Biol. Trace Elem. Res.*, 158, 376-383.

Chandran, A.M.K., Christina, H., Das, S., Mumbrekar, K.D., Rao, B.S.S, 2019, Neuroprotective role of naringenin against methylmercury induced cognitive impairment and mitochondrial damage in a mouse model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 71, 103224.

Chen, F., Wei, G., Xu, J., Ma, X., Wang, Q., 2018. Naringin ameliorates the high glucose-induced rat mesangial cell inflammatory reaction by modulating the NLRP3 Inflammasome. *BMC Complement Altern Med*.18:192.

D'Abreu, A., Akbar U., Friedman, J.H., 2018. Tardive dyskinesia: *Epidemiology Journal of the Neurological Sciences*. 389, 17–20

Datta, S., Jamwal, S., Deshmukh, R., Kumar, P., 2016. Beneficial effects of lycopene against haloperidol induced orofacial dyskinesia in rats: Possible neurotransmitters and neuroinflammation modulation. *European journal of pharmacology*. 771, 229-235.

Draper, H.H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation *Original Research Article. Methods in Enzymology*. 186, 421-431.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical biochemistry*. 126(1), 131-138.

Grover, S., Kumar, P., Singh, K., Vikram, V. e Budhiraja, R.D., 2013. Possible beneficial effect of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)— α and γ agonist against a rat model of oral dyskinesia. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 111, 17-23.

Ghofrani, S., Joghataei, M.T., Mohseni, S., Baluchnejadmojarad, T., Bagheri, M., Khamse, S., Roghani, M., 2015. Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: insights into the underlying mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.*, 764, 195-201.

Hashimoto, T., Baba, S., Ikeda, H., Odab, Y., Hashimoto, K., Shimizu, I., 2018. Lack of dopamine supersensitivity in rats after chronic administration of blonanserin: Comparison with haloperidol. *European Journal of Pharmacology*. 830, 26–32.

Hua, F.Z., Ying, J., Zhang, J., Wang, X.F., Hu, Y.H., Liang, Y.P., Liu, Q., Xu, G.H., 2016. Naringenin pre-treatment inhibits neuroapoptosis and ameliorates cognitive impairment in rats exposed to isoflurane anesthesia by regulating the PI3/Akt/PTEN signalling pathway and suppressing NF-kappaB-mediated inflammation. *Int. J. Mol. Med.* 38, 1271-1280.

Hauser, R.A., Truong, D., 2018. Tardive dyskinesia: Out of the shadows. *Journal of the Neurological Sciences.* 389, 1–3.

Ishola, I.O., Akataobi, O.E., Alade, A.A., Adeyemi, O.O. 2019. Glimepiride prevents paraquat-induced Parkinsonism in mice: involvement of oxidative stress and neuroinflammation. *Fundamental e clinical pharmacology.* 33 (3), 277-285.

Khajevand-Khazaei, M., Ziaee, P., Motevalizadeh, S., Rohani, M., Roghani, M., 2018. Naringenin ameliorates learning and memory impairment following systemic lipopolysaccharide challenge in the rat. *European Journal of Pharmacology,* 826, 114-122.

Lister, J.M.S, Andrezza, A.C., Navaid, B., Wilson, V.S., Teo, C., Nesarajah, Y., Wilson, A.A., Nobrega, J.N., Fletcher, P.J., Remington, G., 2017. Lipoic acid and haloperidol-induced vacuous chewing movements: Implications for prophylactic antioxidant use in tardive dyskinesia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 72, 23–29.

Lo, Y.C., Tseng, Y.T., Hsu, H.T., Liu, C.M., Wu, S.N., 2017. Naringenin protects motor neuron against methylglyoxal-induced neurotoxicity through activating IGF-1R-related neuroprotection. *Journal of the Neurological Sciences,* 81, 616-617.

Mani, S., Sekar, S., Barathidasan, R., Manivasagam, T., Thenmozhi, A.J., Sevanan, M., Chidambaram, S.B., Essa, M.M., Guillemin, G.J., Sakharkar, M. K. 2018. Naringenin Decreases α -Synuclein Expression and Neuroinflammation in MPTP-Induced Parkinson's Disease Model in Mice. *Neurotoxicity Research.* 33, 656–670.

Margolius, A., Fernandez, H.H., 2019. Current treatment of tardive dyskinesia Parkinsonism and Related Disorders. 59, 155–160.

Meyer, J.M., 2018. Future directions in tardive dyskinesia research. *Journal of the Neurological Sciences.* 389, 76-80.

Neha, K., Haider, Md Rafi, Pathak, A., Yar, M.S., 2019. Medicinal prospects of antioxidants: A review..*European Journal of Medicinal Chemistry.*178, 687-704.

Pato, C.M.F., Rodríguez, V.M., Valverde, J.I.F., 2017. Síndrome metabólico y antipsicóticos atípicos: posibilidad de predicción y control. *Rev Psiquiatr Salud Ment, Barcelona.* 10 (1), 38-44.

Poluha, R.L., Grossmann, E., 2018. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. *Br J Pain.* 1(1), 60-5.

Peroza, L.R., Busanello, A., Leal, C.Q., Ropke, J., Boligon, A.A., Meinerz, D., Libardoni, M., Athayde, M.L., Fachineto, R., 2013. *Bauhinia Forficata* prevents vacuous chewing movements induced by haloperidol in rats and has antioxidant potential in vitro. *Neurochem. Res.,* 38 (4) 789-796.

Rendeiro C., Rhodes J.S., Spencer J.P., 2015. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. *Neurochem Int.* 89, 126-39.

Rahigude, A., Bhutada, P., Kaulaskar, S., Aswar, M., Otari, K., 2012. Participation of antioxidante and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats. *Neuroscience.* 226, 62-72.

Sarter, M., Bodewitz, G., Stephens, D.N., 1988. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist β -carbolines. *Psychopharmacology.* 94, 491-495.

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

Singh, R., Bansal, Y., Medhib, B., Kuhada, A., 2019. Antipsychotics-induced metabolic alterations: Recounting the mechanistic insights, therapeutic targets and pharmacological alternatives. *European Journal of Pharmacology.* 844, 231-240.

Servonnet, A., Samaha, A., 2020. Antipsychotic-evoked dopamine supersensitivity. *Neuropharmacology.* In press.

Shi, J., Tan, Y.L., Wang, Z.R., An, H.M., Zhang, X.Y., 2016. Ginkgo biloba and vitamin E ameliorate haloperidol-induced vacuous chewing movement and brain-derived neurotrophic factor expression in a rat tardive dyskinesia model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 148, 53-58.

Shireen, E., 2016. Experimental treatment of antipsychotic-induced movement disorders. *Journal of Experimental Pharmacology.* 8, 1–10.

Sonego, A.B., Prado, D.S., Vale, G.T., Sepulveda-Diaz, J.E., Guimarães, F.S., 2018. Cannabidiol prevents haloperidol-induced vacuos chewing movements and inflammatory changes in mice via PPAR γ receptors. *Brain, Behavior, and Immunity* 74, 241-251.

Thakur, K.S., Prakash, A., Bisht, R., Bansal, P.K., 2015. Beneficial effect of candesartan and lisinopril against haloperidol-induced tardive dyskinesia in rat. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System.* 16 (4), 917-929.

Umukoro, S., Kalejaye, H.A., Ben-Azu, B., Ajayi, A.M., 2018. Naringenin attenuates behavioral derangements induced by social defeat stress in mice via inhibition of acetylcholinesterase activity, oxidative stress and release of pro-inflammatory cytokines. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 105, 714-723.

Xu, H., Yang, H., Rose, G.M., 2012, Chronic haloperidol-induced spatial memory deficits accompany the upregulation of D1 and D2 receptors in the caudate putamen of C57BL/6 mouse. *Life Sciences,* 91, 9–10, 24, 322-328.

Wang, G., Zhang, B., He, X., Li, D., Zhang, F., 2019. Naringenin targets on astroglial Nrf2 to support dopaminergic neurons. *Pharmacological Research,* 139, 452-459.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, Camila Catherine H.; LANG, Anthony E.. Tardive dyskinesia syndromes: current concepts. **Parkinsonism & Related Disorders**, [s.l.], v. 20, p.113-117, jan. 2014. Elsevier BV.
- BARRETO, Madson Alan Maximiano et al. As consequências da diminuição de dopamina produzida na substância nigra: uma breve reflexão. **Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.83-90, 22 out. 2015. Universidade Tiradentes.
- Bhuyan, D. J., Basu, A. Phenolic compounds potential health benefits and toxicity. Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Production Waste, 27-59. 1st Edition. CRC Press. 2017.
- CITROME, Leslie. Reprint of: clinical management of tardive dyskinesia. : Clinical management of tardive dyskinesia. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 389, p. 61-66, jun. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jns.2018.02.037>.
- CORNETT, Elyse M.. Medication-Induced Tardive Dyskinesia: A Review and Update. **Ochsner Journal**, New Orleans, v. 2, n. 17, p. 162-174, jun. 2017.
- CARAVAGGIO, Fernando; NAKAJIMA, Shinichiro; PLITMAN, Eric; GERRETSEN, Philip; CHUNG, Jun Ku; IWATA, Yusuke; GRAFF-GUERRERO, Ariel. The effect of striatal dopamine depletion on striatal and cortical glutamate: a mini-review. : A mini-review. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 65, p. 49-53, fev. 2016. Elsevier BV.
- CHANDRAN, Adwaid Manu Krishna; CHRISTINA, Hannah; DAS, Shubhankar; MUMBREKAR, Kamallesh D.; RAO, B.s. Satish. Neuroprotective role of naringenin against methylmercury induced cognitive impairment and mitochondrial damage in a mouse model. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 71, p. 103224-103234, out. 2019. Elsevier BV.
- CHEN, Fenqin; WEI, Guozhu; XU, Jiao; MA, Xiaoyu; WANG, Qiuyue. Naringin ameliorates the high glucose-induced rat mesangial cell inflammatory reaction by modulating the NLRP3 Inflammasome. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 18, n. 1, p. 192-203, 22 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC.
- D'ABREU, Anelyssa; AKBAR, Umer; FRIEDMAN, Joseph H.. Tardive dyskinesia: epidemiology. : Epidemiology. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 389, p. 17-20, jun. 2018. Elsevier BV.
- DATTA, Swati; JAMWAL, Sumit; DESHMUKH, Rahul; KUMAR, Puneet. Beneficial effects of lycopene against haloperidol induced orofacial dyskinesia in rats: possible neurotransmitters and neuroinflammation modulation.: Possible neurotransmitters and neuroinflammation modulation. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 771, p. 229-235, jan. 2016. Elsevier BV.

GEORGIEV, Vasil; ANANGA, Anthony; TSOLOVA, Violeta. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. **Nutrients**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 391-415, 21 jan. 2014. MDPI AG.

GOMES, H.F., PALEI, A.C.T, MACHADO, J.S.R., SILVA, L.M., MONTENEGRO, M.F., JORDÃO, A.A., DUARTE, G., TANUS-SANTOS, J.E., CAVALLI, R.C. , SANDRIM, V.C. Avaliação de marcadores de status oxidativo e biodisponibilidade de NO em distúrbios hipertensivos da gravidez. **Journal of Human Hypertension**. **27**, 345 – 34, 2013.

HAUSER, Robert A.; TRUONG, Daniel. Tardive dyskinesia: out of the shadows. : Out of the shadows. **Journal Of The Neurological Sciences**, [s.l.], v. 389, p. 1-3, jun. 2018. Elsevier BV.

HASHIMOTO, Takashi; BABA, Satoko; IKEDA, Hiroko; ODA, Yasunori; HASHIMOTO, Kenji; SHIMIZU, Isao. Lack of dopamine supersensitivity in rats after chronic administration of blonanserin: comparison with haloperidol. : Comparison with haloperidol. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 830, p. 26-32, jul. 2018. Elsevier BV.

HIRS

CH, Etienne C; HUNOT, Stéphane. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. : a target for neuroprotection?. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 8, n. 4, p. 382-397, abr. 2009. Elsevier BV.

Jadeja ,R.N., Devkar, R.V. **Polyphenols and Flavonoids in Controlling Non-Alcoholic Steatohepatitis**, 1st Edition, 615-623, 2014.

KALA, Harneet Kaur; MEHTA, Rajendra; SEN, Kamal Kumar; TANDEY, Roshni; MANDAL, Vivekananda. Critical analysis of research trends and issues in microwave assisted extraction of phenolics: have we really done enough. : Have we really done enough. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 85, p. 140-152, dez. 2016. Elsevier BV.

LISTER, Joshua; ANDREAZZA, Ana C.; NAVAJD, Bushra; WILSON, Virginia S.; TEO, Celine; NESARAJAH, Yasika; WILSON, Alan A.; NOBREGA, José N.; FLETCHER, Paul J.; REMINGTON, Gary. Lipoic acid and haloperidol-induced vacuous chewing movements: implications for prophylactic antioxidant use in tardive dyskinesia. : Implications for prophylactic antioxidant use in tardive dyskinesia. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 72, p. 23-29, jan. 2017. Elsevier BV.

RUIZ, M Amparo Lopez. Neuroleptic-Induced Oral-Facial Tardive Dyskinesia in a Prepuberal Boy with an Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. **Pediatrics & Therapeutics**, [s.l.], v. 05, n. 03, p. 1000248-1000249, 2015. OMICS Publishing Group.

LALL, Namrita; KISHORE, Navneet. Are plants used for skin care in South Africa fully explored? **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 153, n. 1, p. 61-84, abr. 2014. Elsevier BV.

LO, Y.C., TSENG, Y.T., HSU, H.T., LIU, C.M., WU, S.N. Naringenin protects motor neuron against methylglyoxal-induced neurotoxicity through activating IGF-1R-related neuroprotection. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 81, p. 616-617, 2017.

MARGOLIUS, Adam; FERNANDEZ, Hubert H.. Current treatment of tardive dyskinesia. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 59, p. 155-160, fev. 2019. Elsevier BV.

MEYER, Jonathan M. Future directions in tardive dyskinesia research. **Journal Of The Neurological Sciences**, v. 389, p. 76-80, jun. 2018.

KUETE, Victor, MBAVENG A.T., ZHAO Q.. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**. Harmful and protective effects of phenolic compounds from African medicinal plants. **1st Edition**, 2014.

MARCHIORO, M.; DANI, C.; FUNCHAL, C.. Efeito dos Antioxidantes Exógenos em Modelos Experimentais da Doença de Parkinson. **Ciência em Movimento**, [S.L.], v. 18, n. 36, p. 93-107, 30 jun. 2016.

MOREIRA, Fabrício A.; GUIMARÃES, Francisco S. Mecanismos de ação dos antipsicóticos: hipóteses dopaminérgicas. **Medicina, Ribeirão Preto**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 63-71, 30 mar. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Consultoria Jurídica/Advocacia Geral da União. Princípio Ativo: haloperidol. Nota Técnica N° 303/2013, atualizada em 23/11/2015.

MANI, Sugumar; SEKAR, Sathiya; BARATHIDASAN, Rajamani; MANIVASAGAM, Thamilarasan; THENMOZHI, Arokiasamy Justin; SEVANAN, Murugan; CHIDAMBARAM, Saravana Babu; ESSA, Musthafa Mohamed; GUILLEMIN, Gilles J.; SAKHARKAR, Meena Kishore. Naringenin Decreases α -Synuclein Expression and Neuroinflammation in MPTP-Induced Parkinson's Disease Model in Mice. **Neurotoxicity Research**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 656-670, 9 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

NEHA, Kumari; HAIDER, Md Rafi; PATHAK, Ankita; YAR, M. Shahr. Medicinal prospects of antioxidants: a review. : A review. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 178, p. 687-704, set. 2019. Elsevier BV.

OLMOS, Gabriel; LLADÓ, Jerònia. Tumor Necrosis Factor Alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2014, p. 1-12, 2014. Hindawi Limited.

POLUHA, Rodrigo Lorenzi; GROSSMANN, Eduardo. Inflammatory mediators related to arthrogenic temporomandibular dysfunctions. **Brazilian Journal Of Pain**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 60-65, 2018.

PATO, Clara M. Franch; RODRÍGUEZ, Vicente Molina; VALVERDE, Juan I. Franch. Síndrome metabólico y antipsicóticos atípicos. Posibilidad de predicción y control. **Revista de Psiquiatría y Salud Mental**, Espanha, v. 10, n. 1, p. 38-44, jan. 2017.

PINHO, Lara Manuela Guedes de; PEREIRA, Anabela Maria de Sousa; CHAVES, Cláudia Margarida Correia Balula. Quality of life in schizophrenic patients: the influence of sociodemographic and clinical characteristics and satisfaction with social support: the influence of sociodemographic and clinical characteristics and satisfaction with social support. **Trends In Psychiatry And Psychotherapy**, [s.l.], v. 40, n. 3, p. 202-209, 8 mar. 2018. FapUNIFESP.

PAGE, Valerie J.; CASARIN, Annalisa. Use of antipsychotics for the treatment of intensive care unit delirium. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 26, n. 2, p. 86-88, 2014. GN1 Genesis Network.

PATEL, Kanika; SINGH, Gireesh Kumar; PATEL, Dinesh Kumar. A Review on Pharmacological and Analytical Aspects of Naringenin. **Chinese Journal Of Integrative Medicine**, [s.l.], v. 24, n. 7, p. 551-560, 10 dez. 2014. Springer Science and Business Media LLC

RENDEIRO, Catarina; RHODES, Justin S.; SPENCER, Jeremy P.e..The mechanisms of action of flavonoids in the brain: direct versus indirect effects: Direct versus indirect effects. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 89, p. 126-139, out. 2015.

SARKAR, Aditi; ANGELINE, M. Sonia; ANAND, Kushi; AMBASTA, Rashmi K; KUMAR, Pravir. Naringenin and quercetin reverse the effect of hypobaric hypoxia and elicit neuroprotective response in the murine model. **Brain Research**, [s.l.], v. 1481, p. 59-70, out. 2012.

SINGH, Raghunath; BANSAL, Yashika; MEDHI, Bikash; KUHAD, Anurag. Antipsychotics-induced metabolic alterations: recounting the mechanistic insights, therapeutic targets and pharmacological alternatives. : Recounting the mechanistic insights, therapeutic targets and pharmacological alternatives. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 844, p. 231-240, fev. 2019.

SERVONNET, Alice; SAMAHA, Anne-noël. Antipsychotic-evoked dopamine supersensitivity. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 163, p. 107630-107643, fev. 2020.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects ∴ a review. : Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal Of Functional Foods**, [s.l.], v. 18, p. 820-897, out. 2015.

SHIREEN, Erum. Experimental treatment of antipsychotic-induced movement disorders. **Journal Of Experimental Pharmacology**, [s.l.], v. 8, p. 1-10, ago. 2016.

SILVA, Wallison Junio Martins da; FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, [s.l.], v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011. FapUNIFESP.

SARTORI, Caroline Junqueira; CASTRO, Ana Hortência Fonsêca; MORI, Fabio Akira. Teores de fenóis totais e taninos nas cascas de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*). **Floresta e Ambiente**, [s.l.], v. 21, n. 3, p. 394-400, 1 ago. 2014. FapUNIFESP.

SORENSEN, Mathew D.; CHI, Thomas; SHARA, Nawar M.; WANG, Hong; HSI, Ryan S.; ORCHARD, Tonya; KAHN, Arnold J.; JACKSON, Rebecca D.; MILLER, Joe; REINER, Alex P.. Activity, Energy Intake, Obesity, and the Risk of Incident Kidney Stones in Postmenopausal Women: a report from the women ∴s health initiative. : A Report from the Women's Health

Initiative. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, [s.l.], v. 25, n. 2, p. 362-369, 12 dez. 2013. American Society of Nephrology (ASN).

SPADA, Ana Paula Machado, RODRIGUES, T.; DAMASCENO, D.C. Avaliação de metodologias para análise de estresse oxidativo em tecidos de ratos diabéticos. **Revista Mn Metabólica**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 47-52, 2008.

TABASSUM, Nahida; HAMDANI, Mariya. Plants used to treat skin diseases. **Pharmacognosy Reviews**, [s.l.], v. 8, n. 15, p. 52-60, 2014. Medknow.

TEIXEIRA, Bruno Costa; LOPES, André Luiz; MACEDO, Rodrigo Cauduro Oliveira; CORREA, Cleiton Silva; RAMIS, Thiago Rozales; RIBEIRO, Jerri Luiz; REISCHAK-OLIVEIRA, Alvaro. Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **Jornal Vascular Brasileiro**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 108-115, abr. 2014. FapUNIFESP.

THAKUR, Kuldeep Singh; PRAKASH, Atish; BISHT, Rohit; BANSAL, Puneet Kumar. Beneficial effect of candesartan and lisinopril against haloperidol-induced tardive dyskinesia in rat. **Journal Of The Renin-angiotensin-aldosterone System**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 917-929, 24 jan. 2014.

VALLI, Laura Gomes; SOBRINHO, Jony de Andrade. Mecanismo de ação do glutamato no sistema nervoso central e a relação com doenças neurodegenerativas. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, Brasil, v. 18, n. 1, p. 58-67, 2014.

WANG, Q., YANG J., ZHANG X.-M., ZHOU L., LIAO X.-L., YANG B.,; Practical synthesis of naringenin. **J. Chem. Res.**, v. 39, n. 1, p. 455-457, 2015.

YI, Li-tao; LI, Jing; LI, Huo-chen; SU, Dong-xue; QUAN, Xia-bo; HE, Xiao-cheng; WANG, Xiao-hong. Antidepressant-like behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects of naringenin in the mouse repeated tail suspension test. **Progress In Neuro-psychopharmacology And Biological Psychiatry**, [s.l.], v. 39, n. 1, p. 175-181, out. 2012.

YERNOOL, Dinesh; BOUDKER, Olga; JIN, Yan; GOUAUX, Eric. Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. **Nature**, [s.l.], v. 431, n. 7010, p. 811-818, out. 2004. Springer Science and Business Media LLC.

ZAKI, Hala F.; ABD-EL-FATTAH, May A.; ATTIA, Amina S.. Naringenin protects against scopolamine-induced dementia in rats. **Bulletin Of Faculty Of Pharmacy, Cairo University**, [s.l.], v. 52, n. 1, p. 15-25, jun. 2014. Egypts Presidential Specialized Council for Education and Scientific Research.

ZOBEIRI, Mehdi; BELWAL, Tarun; PARVIZI, Fatemeh; NASERI, Rozita; FARZAEI, Mohammad H.; NABAVI, Seyed F.; SUREDA, Antoni; NABAVI, Seyed M.. Naringenin and its Nano-formulations for Fatty Liver: cellular modes of action and clinical perspective. : Cellular Modes of Action and Clinical Perspective. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, [s.l.], v. 19, n. 3, p. 196-205, 10 jul. 2018.

ANEXO A – DIRETRIZES PARA AUTORES

Estrutura do artigo

Seções numeradas por subdivisão

Divida seu artigo em seções numeradas e claramente definidas. As subseções devem ser numeradas como 1.1 (depois 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (o resumo não está incluído na numeração da seção). Use esta numeração também para referência cruzada interna: não se refira apenas ao 'texto'. Qualquer subseção pode receber um breve cabeçalho. Cada cabeçalho deve aparecer em sua própria linha separada.

Introdução

Indique os objetivos do trabalho e forneça um histórico adequado, evitando um levantamento detalhado da literatura ou um resumo dos resultados. Certifique-se de limitar o comprimento deste parágrafo ao máximo. 500 palavras.

Material e métodos

Forneça detalhes suficientes para permitir que o trabalho seja reproduzido por um pesquisador independente. Os métodos já publicados devem ser resumidos e indicados por uma referência. Se estiver citando diretamente de um método publicado anteriormente, use aspas e também cite a fonte. Quaisquer modificações nos métodos existentes também devem ser descritas.

Os Resultados

Resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Isso deve explorar a importância dos resultados do trabalho, não repeti-los. Evite citações extensas e discussão da literatura publicada. Certifique-se de limitar o comprimento deste parágrafo ao máximo. 1500 palavras.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma curta seção de Conclusões, que pode ser autônoma ou formar uma subseção de uma seção de Discussão.

Informações essenciais da página de rosto

- ***Título.*** Conciso e informativo. Os títulos são frequentemente usados em sistemas de recuperação de informações. Evite abreviações e fórmulas sempre que possível.
- ***Nomes e afiliações de autores.*** Indique claramente os nomes e sobrenomes de cada autor e verifique se todos os nomes estão escritos com precisão. Você pode adicionar seu nome entre parênteses em seu próprio script por trás da transliteração em inglês. Apresente os endereços de afiliação dos autores (onde o trabalho real foi realizado) abaixo dos nomes. Indique todas as afiliações com uma letra sobrescrita em minúscula imediatamente após o nome do autor e na frente do endereço apropriado. Forneça o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se disponível, o endereço de e-mail de cada autor.
- ***Correspondência.*** Indique claramente quem irá lidar com a correspondência em todas as

etapas da arbitragem e publicação, também após a publicação. Essa responsabilidade inclui responder a quaisquer perguntas futuras sobre Metodologia e Materiais.

Verifique se o endereço de email é fornecido e se os detalhes de contato são mantidos atualizados pelo autor correspondente.

• **Endereço atual / permanente.** Se um autor se mudou desde que o trabalho descrito no artigo foi concluído ou estava visitando na época, um 'Endereço atual' (ou 'Endereço permanente') pode ser indicado como uma nota de rodapé para o nome desse autor. O endereço em que o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como o principal endereço de afiliação. Números arábicos sobrescritos são usados para essas notas de rodapé.

Os Destaques

Destaques são opcionais, mas altamente incentivados para esta revista, pois aumentam a capacidade de descoberta do seu artigo através dos mecanismos de pesquisa. Eles consistem em uma pequena coleção de tópicos que capturam os novos resultados de sua pesquisa, bem como novos métodos usados durante o estudo (se houver). Veja os exemplos aqui: [exemplo Destaques](#).

Os destaques devem ser enviados em um arquivo editável separado no sistema de envio on-line. Use 'Destaques' no nome do arquivo e inclua 3 a 5 pontos de marcador (máximo de 85 caracteres, incluindo espaços, por ponto de marcador).

Resumo

É necessário um resumo conciso e factual. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. Um resumo é frequentemente apresentado separadamente do artigo, portanto, ele deve poder ser autônomo. Por esse motivo, as referências devem ser evitadas, mas se essencial, cite o (s) autor (es) e ano (s). Além disso, abreviações não padronizadas ou incomuns devem ser evitadas, mas, se essenciais, devem ser definidas na primeira menção no próprio resumo.

Resumo gráfico

Um **resumo** gráfico é opcional para este periódico. Ele deve resumir o conteúdo do artigo de forma concisa e pictórica, projetada para capturar a atenção de um grande número de leitores on-line. Os autores devem fornecer imagens que representem claramente o trabalho descrito no artigo. Os resumos gráficos devem ser enviados como um arquivo separado no sistema de envio on-line. Tamanho da imagem: forneça uma imagem com um mínimo de 531 × 1328 pixels (h × w) ou proporcionalmente mais, mas deve ser legível na tela com um tamanho de 200 × 500 pixels (a 96 dpi corresponde a 5 × 13 cm). Lembre-se da legibilidade após a redução, especialmente se estiver usando uma das figuras do próprio artigo. Tipos de arquivos preferidos: arquivos TIFF, EPS, PDF ou MS Office. Consulte <https://www.elsevier.com/graphicalabstracts> por exemplo.

Declaração de ética para experimentação animal

Autores devem incluir uma declaração de aprovação ética para experimentação animal que será reconhecida em todo o mundo. Indique a natureza das permissões de revisão ética e diretrizes nacionais ou institucionais para o cuidado e uso de animais que cobrem a pesquisa. A declaração deve incluir o (s) número (s) de aprovação do aplicativo e o nome da organização aprovadora.

Palavras-chave

Imediatamente após o resumo, forneça no máximo 6 palavras-chave, usando ortografia e nomenclatura americanas e evitando termos gerais e plurais e vários conceitos (evite, por exemplo, "e", "de"). Seja poupador de abreviações: somente as abreviações firmemente estabelecidas no campo podem ser elegíveis. Essas palavras-chave serão usadas para fins de indexação.

Abreviações

Abreviações são um obstáculo para o leitor. Use o menor número possível de abreviações e escreva os nomes dos compostos, receptores, etc., na íntegra em todo o texto do manuscrito, com as exceções fornecidas AQUI.

Abreviações desnecessárias. Abreviações desnecessárias, como AP, TEP, TFT, CER, nAc e LTFSE (para potencial pós-potencial, transepitelial, teste de Tail-flick, ratos expostos ao frio, núcleo accumbens e campo tegmental lateral simpático-excitatório) **não** são aceitáveis.

Abreviações de receptor. Abreviações de receptor como & *bgr*; AR, mAChR, BZR para o & *bgr*; receptor adrenérgico, receptor muscarínico e receptor benzodiazepínico, respectivamente, **não** devem ser utilizados. Para receptores, evite a abreviatura "R". Nos subtipos de receptor, mencione o nome completo do receptor em todo o manuscrito, por exemplo, receptor de adenosina A₁, receptor de dopamina D₂, melanocortina MC₃receptor, endotelina ET_A receptor.

Abreviações que vieram substituir o termo completo. Abreviações que vieram substituir o termo completo (por exemplo, GABA, DOPA, EDRF, 5HT, para & *ggr*; -aminobutyric acid, 3,4-dihidroxifenilalanina, fator relaxante derivado do endotélio, 5-hidroxitriptamina) podem ser usadas, desde que o termo está escrito no resumo e no corpo do manuscrito na primeira vez em que a abreviação é usada.

Nomes químicos difíceis de manejar. Nomes químicos pesados podem ser abreviados. Por exemplo, 8-OH-DPAT, DOI, DTG, BAPTA, para 8-hidroxi-2- (di- *n*- propilamino) tetralina, 1- (2,5-dimetoxi-4-iodofenil) -aminopropano, 1,3 -di (2-tolil) -guanidina, 1,2-bis (*o* -aminofenoxi) etano- *N*, *N*, *N*' , *N*'ácido tetraacético, são aceitáveis; no entanto, o nome químico completo deve ser dado uma vez no resumo e no corpo do manuscrito, seguido nos dois casos pela abreviação.

Nomes de código. Os nomes de código podem ser usados, mas o nome químico completo deve ser fornecido no resumo e no texto.

Os autores que não atenderem a essas demandas terão seus manuscritos devolvidos para correção, com atraso na publicação como resultado.

Agradecimentos

Recolha os agradecimentos em uma seção separada no final do artigo antes das referências e, portanto, não os inclua na página de título, como uma nota de rodapé do título ou de outra forma. Liste aqui as pessoas que forneceram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, fornecendo ajuda ao idioma, assistência por escrito ou prova de leitura do artigo, etc.).

Formatação de fontes de financiamento

Liste as **fontes de** financiamento dessa maneira padrão para facilitar a conformidade com os requisitos do financiador:

Financiamento: Este trabalho foi financiado pelos Institutos Nacionais de Saúde [números de concessão xxxx, aaaa]; a Fundação Bill & Melinda Gates, Seattle, WA [número de concessão zzzz]; e os Institutos de Paz dos Estados Unidos [número da concessão aaaa].

Não é necessário incluir descrições detalhadas sobre o programa ou tipo de subsídios e prêmios. Quando o financiamento for proveniente de uma concessão em bloco ou de outros recursos disponíveis para uma universidade, faculdade ou outra instituição de pesquisa, envie o nome do instituto ou organização que forneceu o financiamento.

Se nenhum financiamento foi fornecido para a pesquisa, inclua a seguinte frase:

Esta pesquisa não recebeu nenhum subsídio específico de agências de fomento nos setores público, comercial ou sem fins lucrativos.

Nomenclatura e unidades

Somente nomes genéricos e químicos de medicamentos devem ser utilizados, embora um equivalente proprietário possa ser indicado uma vez entre parênteses. A nomenclatura de substâncias químicas deve ser consistente, clara e inequívoca e deve estar de acordo com o uso da American Chemical Society e com a convenção recomendada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, <http://www.iupac.org/general/FAQs/ns.html>) Em caso de dúvida, os escritores devem consultar os índices do Chemical Abstracts; os vários relatórios e panfletos do Comitê de Nomenclatura, Ortografia e Pronúncia da Sociedade Americana de Química; as recomendações do IUBMB (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>) Quando são utilizados medicamentos que são misturas de estereoisômeros, deve-se esclarecer o fato de serem de natureza composta e implicar isso na interpretação dos dados e na obtenção de conclusões. O uso do prefixo apropriado é essencial. O uso do nome genérico sozinho, sem prefixo, seria usado para se referir a agentes sem estereoisômeros. A nomenclatura de receptores e seus subtipos e canais de íons deve estar de acordo com NCIUPHAR (<http://www.iuphar.org/nciuphar.html>). O nome trivial das enzimas pode ser usado no texto, mas o nome sistemático e o número de classificação de acordo com a nomenclatura enzimática do NC-IUBMB (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>), rev. edn. (Academic Press, Nova York, NY, 1984) deve ser citada na primeira vez que uma enzima é mencionada.

Fórmulas matemáticas

Envie as equações matemáticas como texto editável e não como imagens. Apresente fórmulas simples alinhadas com o texto normal sempre que possível e use o solidus (/) em vez de uma linha horizontal para pequenos termos fracionários, por exemplo, X / Y. Em princípio, as variáveis devem ser apresentadas em itálico. Os poderes de e são frequentemente mais convenientemente indicados por exp. Numere consecutivamente quaisquer equações que precisam ser exibidas separadamente do texto (se referidas explicitamente no texto).

Notas de rodapé

As **notas de** rodapé devem ser usadas com moderação. Numere-os consecutivamente ao longo do artigo. Muitos processadores de texto podem criar notas de rodapé no texto, e esse recurso pode ser usado. Caso contrário, indique a posição das notas de rodapé no texto e liste as notas de rodapé separadamente no final do artigo. Não inclua notas de rodapé na lista Referência.

Obra de arte

Arte eletrônica

Pontos gerais

- Certifique-se de usar letras e tamanhos uniformes da arte original.
- Incorpore as fontes usadas se o aplicativo fornecer essa opção.
- Procure usar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol ou use fontes parecidas.
- Numere as ilustrações de acordo com a sequência no texto.
- Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de ilustrações.
- Forneça legendas para ilustrações separadamente.
- Dimensione as ilustrações próximas às dimensões desejadas da versão publicada.
- Envie cada ilustração como um arquivo separado.
- Certifique-se de que as imagens coloridas sejam acessíveis a todos, inclusive àqueles com visão de cores prejudicada.

Um guia detalhado sobre arte eletrônica está disponível.

Formatos

Se a arte eletrônica for criada em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), forneça 'como está' no formato de documento nativo. Independentemente do aplicativo usado que não seja o Microsoft Office, quando a arte final eletrônica for finalizada, 'Salvar como' ou converta as imagens em um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos de linhas, meios-tons e combinações de linhas / meios-tons indicados abaixo):

EPS (ou PDF): desenhos vetoriais, incorpore todas as fontes usadas.
 TIFF (ou JPEG): fotografias coloridas ou em escala de cinza (meios-tons), mantenha no mínimo 300dpi.

TIFF (ou JPEG): os desenhos de linha de bitmap (pixels em preto e branco puro) mantêm um mínimo de 1000 dpi.

TIFF (ou JPEG): combinações de linha / meio-tons de bitmap (cores ou escala de cinza), mantenha um mínimo de 500 dpi.

Por favor, não:

- Forneça arquivos otimizados para uso na tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG); estes geralmente têm um número baixo de pixels e um conjunto limitado de cores;
- Forneça arquivos com resolução muito baixa;
- Envie gráficos desproporcionalmente grandes para o conteúdo.

Trabalho artístico colorido

Verifique se os arquivos de trabalho artístico estão em um formato aceitável (TIFF (ou JPEG), EPS (ou PDF) ou arquivos do MS Office) e com a resolução correta. Se, juntamente com o artigo aceito, você enviar figuras em cores utilizáveis, a Elsevier garantirá, sem custo adicional, que essas figuras apareçam coloridas online (por exemplo, ScienceDirect e outros sites), além

da reprodução das cores impressas. Mais informações sobre a preparação de obras de arte eletrônicas .

O uso de cores para gráficos ou tabelas é fortemente desencorajado (exceções são feitas para críticas de convidados).

Legendas das figuras

Verifique se cada ilustração possui uma legenda. Forneça legendas separadamente, não anexadas à figura. Uma legenda deve incluir um título breve (**não** na figura) e uma descrição da ilustração. Mantenha o texto nas ilustrações em si, no mínimo, mas explique todos os símbolos e abreviações usadas.

Tabelas

Envie tabelas como texto editável e não como imagens. As tabelas podem ser colocadas ao lado do texto relevante no artigo ou em páginas separadas no final. Numere as tabelas consecutivamente de acordo com sua aparência no texto e coloque as notas da tabela abaixo do corpo da tabela. Seja poupador no uso de tabelas e verifique se os dados apresentados nelas não duplicam os resultados descritos em outras partes do artigo. Evite usar regras verticais e sombreamento nas células da tabela.

Referências

Citação no texto

Certifique-se de que todas as referências citadas no texto também estejam presentes na lista de referências (e vice-versa). Todas as referências citadas no resumo devem ser fornecidas na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referências, mas podem ser mencionados no texto. Se essas referências forem incluídas na lista de referências, elas devem seguir o estilo de referência padrão da revista e incluir uma substituição da data de publicação por 'Resultados não publicados' ou 'Comunicação pessoal'. A citação de uma referência como 'no prelo' implica que o item foi aceito para publicação.

Links de referência

O aumento da descoberta de pesquisas e a revisão por pares de alta qualidade são garantidos por links on-line das fontes citadas. Para permitir a criação de links para serviços de abstração e indexação, como Scopus, CrossRef e PubMed, verifique se os dados fornecidos nas referências estão corretos. Observe que sobrenomes, títulos de periódicos / livros incorretos, ano de publicação e paginação podem impedir a criação de links. Ao copiar referências, tenha cuidado, pois elas já podem conter erros. O uso do DOI é altamente incentivado.

É garantido que o DOI nunca muda, para que você possa usá-lo como um link permanente para qualquer artigo eletrônico. Um exemplo de citação usando DOI para um artigo ainda não publicado é: VanDecar JC, Russo RM, James DE, Ambeh WB, Franke M. (2003). Continuação assísmica da laje das Pequenas Antilhas sob o nordeste da Venezuela. *Jornal de Pesquisa Geofísica*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Observe que o formato dessas citações deve estar no mesmo estilo de todas as outras referências no artigo.

Referências na Web

No mínimo, o URL completo deve ser fornecido e a data em que a referência foi acessada pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecida (DOI, nomes de autores, datas, referência a uma publicação de origem, etc.), também deve ser fornecida. As referências da Web podem ser listadas separadamente (por exemplo, após a lista de referências) em um cabeçalho diferente, se desejado, ou podem ser incluídas na lista de referências.

Referências de dados

Este periódico incentiva você a citar conjuntos de dados subjacentes ou relevantes em seu manuscrito, citando-os em seu texto e incluindo uma referência de dados em sua Lista de Referência. As referências de dados devem incluir os seguintes elementos: nome (s) do autor, título do conjunto de dados, repositório de dados, versão (quando disponível), ano e identificador persistente global. Adicione [conjunto de dados] imediatamente antes da referência para que possamos identificá-lo adequadamente como uma referência de dados. O identificador [conjunto de dados] não aparecerá no seu artigo publicado.

Referências em uma edição especial

Certifique-se de que as palavras 'esta edição' sejam adicionadas a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) a outros artigos na mesma Edição Especial.

Software de gerenciamento de referência

A maioria dos periódicos da Elsevier tem seu modelo de referência disponível em muitos dos mais populares produtos de software de gerenciamento de referência. Isso inclui todos os produtos que suportam estilos de linguagem de estilo de citação, como Mendeley. Usando plug-ins de citação desses produtos, os autores precisam apenas selecionar o modelo de periódico apropriado ao preparar seu artigo, após o qual as citações e bibliografias serão automaticamente formatadas no estilo da revista. Se ainda não houver um modelo disponível para este periódico, siga o formato das referências e citações de amostra, conforme mostrado neste Guia. Se você usar o software de gerenciamento de referência, remova todos os códigos de campo antes de enviar o manuscrito eletrônico. Mais informações sobre como remover códigos de campo de diferentes softwares de gerenciamento de referência.

Os usuários do Mendeley Desktop podem instalar facilmente o estilo de referência desta revista clicando no seguinte link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/european-journal-of-pharmacology>

Ao preparar seu manuscrito, você irá poder selecionar esse estilo usando os plug-ins Mendeley para Microsoft Word ou LibreOffice.

Formatação de referência

Não há requisitos estritos sobre a formatação de referência no envio. As referências podem estar em qualquer estilo ou formato, desde que o estilo seja consistente. Onde aplicável, o (s) nome (s) do (s) autor (es), título da revista / título do livro, título do capítulo / título do artigo, ano de publicação, número do volume / capítulo do livro e o número do artigo ou paginação devem estar presentes. O uso do DOI é altamente incentivado. O estilo de referência usado pela revista será aplicado ao artigo aceito pela Elsevier na fase de prova. Observe que os dados ausentes serão destacados no estágio de prova para o autor corrigir. Se você deseja formatar as referências, elas devem ser organizadas de acordo com os seguintes exemplos

Estilo da referência:

Texto: Todas as citações no texto devem se referir a:

1. *Autor único:* nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambiguidade) e o ano de publicação;

2. *Dois autores:* nome dos autores e ano de publicação;

3. *Três ou mais autores:* nome do primeiro autor seguido por 'et al.' e o ano de publicação.

Citações podem ser feitas diretamente (ou entre parênteses). Grupos de referências podem ser listados primeiro em ordem alfabética, depois cronologicamente ou vice-versa.

Exemplos: 'como demonstrado (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan e Jones, 1999).... Ou, como demonstrado (Jones, 1999; Allan, 2000) ... Kramer et al. (2010) mostraram recentemente ... '

Lista: As referências devem ser organizadas primeiro em ordem alfabética e depois ordenadas cronologicamente, se necessário. Mais de uma referência do (s) mesmo (s) autor (es) no mesmo ano deve ser identificada pelas letras 'a', 'b', 'c' etc., inseridas após o ano da publicação.

ANEXO B – PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Avaliação dos efeitos antioxidantes e neuroprotetores da naringenina em modelo de discenesia orofacial induzida por haloperidol em ratos**, registrada com o nº 07/18, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 06/09/2018.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/09/2018 até 06/09/2020
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos <i>Wistar</i>
Nº de animais	162
Peso/Idade	250-300g/2-3meses
Sexo	Ratos: 150 ♂ e 12 ♀
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 13 de setembro de 2018.

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva

Vice-coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

ANEXO C- COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

The European Journal of Pharmacology <eesserver@eesmail.elsevier.com>

27/01/2020 20:24



Para: evaneide.carvalho@hotmail.com

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Evaneide Pereira de Sá Carvalho,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: European Journal of Pharmacology

Title: Naringenin mediates neuroprotection against haloperidol-induced dyskinesia by preventing oxidative stress and neuroinflammation

Corresponding Author: Lissiana Magna Aguiar

Co-Authors: Evaneide Pereira de Sá Carvalho; Cleane Gomes Moreira; Francisca Valéria Bezerra Sampaio Marques; Lucas Diogo Rosa; Mateus Aragão Esmeraldo; Francisco José Gomes; Paulo de Tarso Teles Dourado de Aragão; Rodrigo Maranguape Silva da Cunha; Carla Thiciane Vasoncelos de Melo; Gerardo Cristino Filho;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/ejp/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Evaneide&lname=Pereira de Sá Carvalho&email=evaneide.carvalho@hotmail.com>Or log in: <https://ees.elsevier.com/ejp/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=evaneide.carvalho@hotmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at lissiana_m@yahoo.com.br;lissianamva@gmail.com.

Thank you,

European Journal of Pharmacology
