

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO AQUOSO
DE *Tradescantia spathacea* SOBRE A LESÃO DA VIA
NIGROESTRIATAL EM RATOS**

LORENNNA EMÍLIA SENA LOPES

Aracaju
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO AQUOSO
DE *Tradescantia spathacea* SOBRE A LESÃO DA VIA
NIGROESTRIATAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração Saúde e Ambiente.

LORENNNA EMÍLIA SENA LOPES

Orientadora
Professora Doutora Margarete Zanardo Gomes
Co-orientador
Doutor Klebson Silva Santos

Aracaju
Fevereiro – 2019

L864e Lopes, Lorena Emília Sena
Efeito neuroprotetor do extrato aquoso de *Tradescantia spathacea*
sobre a lesão da via nigroestriatal em ratos / Lorena Emília Sena
Lopes; orientação [de] Dr^a. Margarete Zanardo Gomes e Dr. Klebson
Silva Santos. - Aracaju; UNIT, 2019.

83. f.;il

Inclui bibliografia.

(Mestrado em Saúde e Ambiente)

1. Commelinaceae. 2. Doença de Parkinson. 3. Degeneração
estriatonigral. I. Gomes, Margarete Zanardo (orient.). II. Santos,
Klebson Silva (coorient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 616.858

SIB-Sistema Integrado de Bibliotecas

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO AQUOSO DE *Tradescantia
spathacea* SOBRE A LESÃO DA VIA NIGROESTRIATAL EM RATOS**

Lorena Emília Sena Lopes

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE.

Aprovada por:

Margarete Zanardo Gomes, D.Sc.
Orientadora

Klebson Silva Santos, D.Sc.
Co-orientador

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.
Universidade Tiradentes (Examinador)

Luciana Maria de Hollanda, D.Sc.
Universidade Tiradentes (Examinador)

Maria Nogueira Marques, D.Sc.
Universidade Tiradentes (Suplente)

Patrícia Severino, D.Sc.
Universidade Tiradentes (Suplente)

Dedico a todos que acreditam na beleza de seus sonhos.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna

AGRADECIMENTOS

Sou grata à Deus pelos lindos planos na minha vida e pela oportunidade de ter chegado até aqui. À Santa Bárbara por me dar forças para lutar. Aos meus pais, por acreditarem em mim e por colocarem meus estudos como prioridade sempre. À Emerson, por sempre me apoiar e entender minhas abdicções. Às minhas estrelas-guias, que hoje encontram-se em outro plano espiritual, especialmente “meu voinho” e meu tio Marcelo.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Margarete Zanardo Gomes pela oportunidade, acolhimento, por ser uma das grandes responsáveis pelo meu processo de amadurecimento e por ser uma referência para mim. Ao meu coorientador Dr^o Klebson Silva Santos pela disponibilidade, incentivo e oportunidades que foram a mim confiadas, foi uma honra. Ao Prof^o Dr^o Cláudio Dariva pela parceria que proporcionou importantes oportunidades no desenvolvimento do projeto. Prof^o Dr^o Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior pelos ensinamentos e sábias palavras.

À Mayanna, por ser a maior incentivadora para que eu iniciasse o mestrado, obrigada minha grande amiga. Aos meus colegas de turma Peterson, Drielly, Isabella, Jeisi e Mariana, foi maravilhoso ter conhecido vocês, são presentes na minha vida. À Isabelle de Mélo, pelo auxílio nos experimentos e amizade.

À Sheilla, pelos inúmeros ensinamentos, amizade e por me dar uma tia de presente. À minha aluna de iniciação científica Joanny, Andréa (minha IC de coração), Reinaldo, Bruno e Ana Maria, pelo trabalho em grupo e comprometimento. Minha querida equipe de pesquisa e de vida, sou grata por cada momento.

Aos animais utilizados nesta pesquisa, todo meu carinho, respeito e gratidão. À Júlio, por me ensinar sobre técnicas no biotério e respeito aos animais. À Carlos e Marcos, pelo auxílio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento.

Aos colegas do LMPE e laboratórios parceiros que de alguma forma contribuíram para realização desta pesquisa, muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	ix
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 Núcleos da base.....	21
3.2 Doença de Parkinson	22
3.3 Modelos experimentais da doença de Parkinson.....	26
3.3.1 Modelos de indução.....	26
3.3.2 Avaliação comportamental	28
3.3.2.1 Teste de campo aberto.....	28
3.3.2.2 Teste do cilindro	29
3.3.2.3 Teste de campo rotatório.....	29
3.4 Tratamentos para doença de Parkinson.....	29
3.4.1 Medidas não farmacológicas	29
3.4.2 Medidas farmacológicas	30
3.5 Produtos naturais	31
3.5.1 Produtos naturais e doença de Parkinson	32
3.6. <i>Tradescantia spathacea</i>	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Local da pesquisa.....	37
4.2 Material vegetal	37
4.3 Extrações	38
4.4 Caracterização dos extratos	39
4.4.1 Rendimento global.....	39
4.4.2 Quantificação de ácidos fenólicos	39
4.4.3 Quantificação de flavonoides totais	40
4.4.4 Análise da atividade antioxidante	41
4.5 Estudo <i>in vivo</i>	41
4.5.1 Animais.....	41

4.5.2 Grupos experimentais.....	42
4.5.3 Procedimento cirúrgico	42
4.5.4 Avaliações funcionais e comportamentais	44
4.5.4.1 Teste de campo aberto.....	44
4.5.4.2 Teste de comportamento rotatório.....	45
4.5.4.3 Teste do cilindro	45
4.6 Eutanásia e preparo histológico.....	46
4.7 Avaliação histopatológica de toxicidade subaguda.....	46
4.8 Análise imunohistoquímica	47
4.9 Quantificação de células TH ⁺	48
4.10 Densidade óptica relativa para TH e GFAP	48
4.11 Análise estatística.....	48
5 RESULTADOS	49
5.1 Cinética de extração.....	49
5.2 Caracterização dos extratos	50
5.5 Teste de campo aberto.....	51
5.6 Teste do cilindro	54
5.7 Teste de comportamento rotatório.....	54
5.8 Análise histológica	55
5.9 Contagem de células TH ⁺	57
5.10 Densidade óptica relativa TH.....	58
5.11 Densidade óptica relativa GFAP.....	59
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
CRONOGRAMA.....	81
ANEXO 1 – EXSICATA DA <i>Tradescantia spathacea</i>	82
ANEXO 2 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA	83

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ANOVA	Análise de Variância
AChE	Acetilcolinesterase
AGE	Ácido gálico
AP	Anteroposterior
CEUA	Comissão de Ética para Uso de Animais
CL	Corpos de Lewy
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
CPu	Putâmen e Caudado
DA	Dopamina
DAD	Detector de arranjo de iodos
DBS	<i>Deep Brain Stimulation</i>
DP	Doença de Parkinson
DPPH	Difenil-1-picrilhidrazil
DV	Dorsoventral
EAG	Equivalente de ácido gálico
EATS	Extrato Aquoso de <i>Tradescantia spathacea</i>
ELP	Extração por líquidos pressurizados
ER	Equivalente de rutina
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (<i>Glial fibrillary acidic protein</i>)
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
Gpe	Globo pálido externo
Gpi,	Globo pálido interno
HE	Hematoxilina-eosina
IC ₅₀	Capacidade inibitória 50%
ITP	Instituto de Tecnologia e Pesquisa
L-DOPA	Levodopa
LMPE	Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental
ML	Médio-lateral
MPTP	1-metil- 4-fenil- 1,2,3,6-tetraidropiridina
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto

NB Núcleos da base
NL Neurites de Lewy
NST Núcleo subtalâmico
NUESC Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais
O₂ Ânion Superóxido
OMS Organização Mundial de Saúde
PBS Tampão fosfato (*phosphate buffered saline*)
RE Rutina
SN Substância negra
SNc Substância negra compacta
SNr Substância negra reticulada
SOD Superóxido dismutase
SUS Sistema Único de Saúde
TBS Tampão tris salino (*Tris buffered saline*)
Tc Toques contralaterais
TH Tirosina Hidroxilase
Th Toques homolaterais
TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa
UNIT Universidade Tiradentes
UPDRS *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Condições experimentais das extrações realizadas. Onde ELP = Extração por líquidos pressurizados. A proporção m/v se dá por biomassa (g) por volume de solvente (mL)..... 39

Quadro 2: Organização dos grupos experimentais. Onde Veículo 1= Solução salina contendo ácido ascórbico a 0,2%; Veículo 2= água destilada. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Pesquisas para investigação do efeito e mecanismo protetor de produtos naturais em modelos pré-clínicos para estudo da DP	33
Tabela 2: Pesquisas envolvendo os compostos fenólicos encontrados na T.spathacea	36
Tabela 3: Caracterização dos extratos	50
Tabela 4: Concentrações testadas e suas respectivas porcentagens de inibição, onde são expressos por média \pm desvio padrão (n=3).....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Corte coronal do cérebro proporcionando vista dos núcleos da base e estruturas associadas. Adaptado de Bear et al. (2002).	21
Figura 2: Modelo simplificado das vias direta e indireta dos núcleos da base, com esquema fisiológico e na doença de Parkinson. DA = Dopamina, D1 e D2 = Receptores D1 e D2, CPu = Putâmen e caudado, SNc e SNr = Substância negra compacta e reticulada; GPe e GPi = Globo pálido externo e interno, NST = núcleo subtalâmico. Adaptado de Metin e Şengör (2015).....	22
Figura 3: Sinaliza o envio de neurônios dopaminérgicos da substância negra para o núcleo estriado (núcleo caudado e putâmen) (A). Compara a transmissão de dopamina do terminal pré-sináptico para o pós-sináptico fisiologicamente e na DP (B). Adaptado de Bridi e Hirth (2018).	23
Figura 4: Detecção imunohistoquímica de neurites de Lewy (a) e corpo de Lewy (b) em neurônios dopaminérgicos da SNc. Fonte: Spillantini et al. (1997).....	23
Figura 5: Relação entre o quantitativo de neurônios dopaminérgicos e a severidade dos sintomas motores durante o envelhecimento, fase prodrômica e fase clínica. Adaptado de Heinzl et al., 2016	25
Figura 6: Publicações no Pubmed ao longo das décadas (1980 à 2017) com os diferentes modelos animais da DP. Adaptado de Trigo-Damas et al. 2018.	27
Figura 7: Estrutura química molecular da dopamina (a) e da 6-hidroxidopamina (b). Adaptado de Zeng et al. (2018).....	28
Figura 8: Fotografia da Tradescantia spathacea. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.....	34
Figura 9: Fotografias do processo de preparo da amostra: (A) folhas de Tradescantia spathacea após lavagem e secagem; (B) folhas frescas cortadas e acomodadas em recipientes para secagem; (C) folhas secas preparadas para granulometria; (D) peneirador mecânico com peneiras da série Tyler 18-32 mesh; (E) amostra com 18-32 mesh. Fonte: Arquivo próprio, 2018.....	37
Figura 10: Fluxograma ilustrativo das extrações realizadas, explicitando método de extração e proporção de biomassa por volume de solvente (m/v). Onde ELP = extração por líquidos pressurizados.	38
Figura 11: Reta de calibração para solução padrão de ácido gálico.	40
Figura 12: Reta de calibração para solução padrão de rutina	41
Figura 13: Corte sagital do encéfalo com as coordenadas referidas (em vermelho). Adaptado de Paxinos et al., (2006).....	43
Figura 14: Linha do tempo com delineamento das avaliações funcionais e comportamentais	44

Figura 15: Fotografia do equipamento de campo aberto utilizado, com animal realizando exploração vertical. Fonte: Arquivo próprio, 2018.	44
Figura 16: Fotografia do equipamento do teste de comportamento rotatório. Fonte: Arquivo próprio, 2018.	45
Figura 17: Fotografia do equipamento do teste do cilindro com animal realizando toque contralateral à lesão. Fonte: Arquivo próprio, 2018.	45
Figura 18: Protocolo da coloração por hematoxilina-eosina. Adaptado de Barbosa et al. (2015).	47
Figura 19: Aparência do extrato obtido por ELP nos diferentes tempos: (A) 15 min/15 mL; (B) 30 min/30 mL; (C) 60 min/60 mL; (D) 120 min/ 120 mL; (E) 180 min/180 mL. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.	49
Figura 20: Gráfico da cinética de rendimento da extração por ELP, com os tempos pré estabelecidos, 15, 30, 60, 120 e 180 min.	49
Figura 21: Fotografia da aparência das soluções com EATS em concentração decrescente, da esquerda para direita, na análise do potencial antioxidante. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.	51
Figura 22: Resultado do campo aberto quanto ao parâmetro de explorações horizontais (crossing). * significa diferença estatística em relação ao grupo controle (*p < 0,05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; **** p < 0.0001), # significa diferença estatística em relação ao grupo 6-OHDA (p < 0,05).	52
Figura 23: Resultado do campo aberto com o parâmetro exploração vertical (rearing). * significa diferença estatística em relação ao controle (*p < 0,05; ** p < 0.01; ***p < 0.001; **** p < 0.0001), # significa diferença estatística em relação ao 6-OHDA (p < 0,05).	53
Figura 24: Resultado do campo aberto, considerando os bolos fecais eliminados durante o teste. ** significa diferença estatística em relação ao controle (p < 0,01); # aponta diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA (# p < 0,05; ### p < 0,001). + aponta diferença significativa em relação ao EATS 10 (p < 0,05).	53
Figura 25: Resultado do teste do cilindro. Considerando p < 0,05.	54
Figura 26: Resultado do comportamento rotatório, considerando as rotações contralaterais. ** aponta diferença significativa em relação ao controle (p < 0,01); # aponta diferença significativa em relação ao 6-OHDA (p < 0,05).	55
Figura 27: Fotomicrografias de tecido de fígado (esquerda) e rins (à direita) utilizados para avaliação histopatológica (400x) dos animais estudados. Grupo controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), extrato aquoso de Tradescantia spathacea (EATS) 10 mg/kg (C), 30 mg/kg (D) e 100 mg/kg (E).	56
Figura 28: Fotomicrografias (100x) de neurônios imunorreativos para enzima TH na SNc dos animais estudados. Grupo controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B),	

extrato aquoso de Tradescantia spathacea (EATS) 10 mg/kg (C), 30 mg/kg (D) e 100 mg/kg (E).....57

Figura 29: Resultados da quantificação de neurônios imunorreativos presentes na análise do lado lesionado (direito) da substância negra compacta. * significa diferença em relação ao controle (*p < 0,05; **** p < 0,0001), #### significa diferença estatística em relação ao 6-OHDA (p < 0,0001).....58

Figura 30: Densidade óptica relativa para enzima tirosina-hidroxilase (TH+) no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. **** indica diferença significativa em relação ao controle (p < 0,0001); ### indica diferença significativa em relação ao 6-OHDA (p < 0,001).....58

Figura 31: Fotomicrografias (400x) de astrócitos imunorreativos para proteína GFAP no núcleo estriado dos animais estudados. Grupo controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), extrato aquoso de Tradescantia spathacea (EATS) 10 mg/kg (C), 30 mg/kg (D) e 100 mg/kg (E).....59

Figura 32: Densidade óptica relativa para proteína glial fibrilar ácida no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. **** indica diferença significativa em relação ao grupo controle (p < 0,0001); #### indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA (p < 0,0001).60

RESUMO

A perda neuronal dopaminérgica que ocorre na doença de Parkinson (DP) tem sido relacionada com o estresse oxidativo e a neuroinflamação na via nigroestriatal. O *Tradescantia spathacea* tem propriedades antioxidantes e pode ser uma estratégia terapêutica para a DP. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor do extrato aquoso de *T. spathacea* (EATS), administrado por via oral, sobre a lesão da via nigroestriatal em ratos. Foram realizados quatro processos de extração, dois por líquidos pressurizados (ELP 1:30 e ELP 1:90 m/v) e dois por infusão (INF 1:30 e INF 1:50 m/v). Os extratos foram analisados quanto ao rendimento global, teor de ácidos fenólicos e flavonoides totais para a seleção do EATS para aplicação *in vivo*. O extrato selecionado foi avaliado quanto à sua atividade antioxidante (capacidade de sequestro de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo – método DPPH). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Tiradentes (protocolo número 020517). Ratos *Wistar* machos (180 - 250 g) receberam microinjeção intraestriatal de solução salina contendo ácido ascórbico (0,02%) ou 6-hidroxdopamina (6-OHDA, 20 µg/3µL). Os animais foram divididos em 5 grupos (n = 8) e tratados diariamente por gavagem (0,5 mL) com veículo (água destilada) ou EATS (10; 30 ou 100 mg/kg) por 30 dias a partir do procedimento cirúrgico. Foram realizados os seguintes testes: campo aberto, para avaliar a atividade motora (explorações horizontais e verticais) e ansiedade (defecação) (24 horas e 15 dias após as microinjeções), teste do cilindro, para a avaliação de toques espontâneos contra ou homolaterais à lesão (dias 9 e 29), e teste de comportamento rotatório induzido por apomorfina (0,5 mg/kg) (30 dias), para avaliar a extensão da lesão. A eutanásia foi realizada no dia 30, e os encéfalos, fígado e rins dos ratos foram removidos, fixados em formalina e incluídos em parafina. As secções dos fígados e rins foram coradas pela técnica hematoxilina-eosina para a análise de sinais de toxicidade subaguda. Seções da substância negra *pars compacta* (SNc) foram coradas por imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH), para contagem de neurônios dopaminérgicos. Também foi medida a densidade óptica relativa de fibras positivas para TH e expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (resposta astrocitária) no estriado. Para a análise estatística foram aplicados testes ANOVA (uma ou duas vias) seguida de post-hoc de Bonferroni (dados Gaussianos), ou Kruskal-Wallis, seguido pelo post-hoc de Dunn (dados não Gaussianos). O rendimento dos extratos foi de 34,1% (PLE 1:90), 29% (PLE 1:30), 21,5% (INF 1:30) e 21,7% (INF 1:50). As obtenções de ácidos fenólicos foram de 9,5 mg/g (PLE 1:90), 21,1 mg/g (PLE 1:30), 16,8 mg/g (INF 1:50) e 31,7 mg/g (INF 1:30). Os quantitativos de flavonoides totais foram de 38,9 mg/g (ELP 1:90), 26,2 mg/g (ELP 1:30), 29,1 mg/g (INF 1:30) e 35,4 mg/g (INF 1:50). O EATS obtido por infusão 1:30 (m/v), com IC₅₀ de 16,7±1,9 µg/mL, foi selecionado para aplicação no ensaio *in vivo* e apresentou IC₅₀ de 16,7 ± 1,9 µg/mL no ensaio DPPH. Nos testes comportamentais, a lesão causada pela 6-OHDA promoveu rotações contralaterais à lesão após aplicação de apomorfina, diminuição significativa nas explorações horizontais e verticais e aumento das defecações, mas não induziu mudanças no teste do cilindro. A EATS a 30 mg/kg aumentou a atividade exploratória em campo aberto, em comparação com o grupo lesionado não tratado, enquanto o EATS 100 mg/kg reduziu significativamente as rotações e a defecação. O tratamento com EATS a 10 mg/kg não promoveu mudanças comportamentais. No entanto, o EATS em todas as doses administradas foi protetor contra alterações histológicas induzidas por 6-OHDA, quais sejam: diminuição significativa no número médio de neurônios TH na SNc e na densidade de fibras no estriado, e aumento significativo da reação astrocitária no estriado. Não foram observados sinais de toxicidade no fígado e rins. Os resultados indicam efeito neuroprotetor e ansiolítico da EATS.

Palavras-chave: Commelinaceae; Doença de Parkinson; Degeneração estriatonigral.

ABSTRACT

The dopaminergic neuronal loss that occurs in Parkinson's disease (PD) has been related to the oxidative stress and neuroinflammation in the nigrostriatal pathway. The *Tradescantia spathacea* has antioxidant properties and may be a therapeutic strategy for PD. The aim of this work was to evaluate the neuroprotective effect of the aqueous extract of *T. spathacea* (AETS), orally administered, on the nigrostriatal pathway lesion in rats. They were performed four extraction processes, two by pressurized liquid extraction (ELP 1:30 and ELP 1:90 w/v) and two by infusion (INF 1:30 and INF 1:50 w/v). The total yield, phenolic compounds and total flavonoids were assessed for the selection of the AETS for *in vivo* application. The selected AETS was evaluated regarding its antioxidant activity (scavenging of 2,2-di-phenyl-1-picrylhydrazyl - DPPH - method). The study was approved by the Ethical Committee on Animal Use of Tiradentes University (protocol number 020517). Adult male *Wistar* rats (180-250 g) received intra-estriatal microinjection of ascorbate saline (0.02%) or 6-hydroxydopamine (6-OHDA, 20 µg/3µL). The animals were divided into 5 groups (n = 8) and treated daily by gavage (0.5 mL) with vehicle (distilled water) or AETS (10; 30 or 100 mg/kg) for 30 days from the surgical procedure. The following tests were carried out: the open field, in order to evaluate the motor activity (crossing and rearing) and anxiety (defecation) (24 hours and 15 days after the microinjections), cylinder test, for the assessment of forelimb use asymmetry (days 9 and 29), and apomorphine-induced (0.5 mg/kg) rotational behavior (30 days), to evaluate the lesion extent. The euthanasia was carried out at day 30, and the rat brains, livers and kidneys were removed, formalin-fixed and paraffin-embedded. The sections of livers and kidneys were stained by hematoxylin-eosin for the analysis of signals of subacute toxicity. Sections of the substantia nigra *pars compacta* (SNc) were stained by immunohistochemistry for tyrosine-hydroxylase (TH), in order to quantify dopaminergic neurons. Also, the relative optical density of TH positive fibers (dopaminergic terminals) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression (astrocytic response) in the striatum was measured. For the statistical analysis they were performed ANOVA (one or two way) followed by Bonferroni's post-hoc (Gaussian data), or Kruskal-Wallis followed by Dunn's post-hoc (non-Gaussian data). The yield of extracts were 34.1% (PLE 1:90), 29% (PLE 1:30), 21.5% (INF 1:30) e 21.7% (INF 1:50). The phenolic compounds were found 9.5 mg/g (PLE 1:90), 21.1 mg/g (PLE 1:30), 16.8 mg/g (INF 1:50) e 31.7 mg/g (INF 1:30). The total flavonoids were 38.9 mg/g (ELP 1:90), 26.2 mg/g (ELP 1:30), 29.1 mg/g (INF 1:30) e 35.4 mg/g (INF 1:50). The AETS infusion 1:30 (w/v) was selected for the *in vivo* assay, and presented an IC₅₀ of 16.7 ± 1.9 µg/mL. In behavioral tests, the injury caused by 6-OHDA promoted a significant decrease in horizontal and vertical explorations, increased defecations and induced rotational behavior (contralateral to the lesion site), but did not induce changes in cylinder test. The AETS at 30 mg/kg increased horizontal and vertical exploratory activity in the open field, when compared to 6-OHDA untreated group, while the AETS 100 mg/kg significantly reduced rotational behavior and defecation. Treatment with AETS 10 mg/kg did not promote changes in any behavioral analysis. However, the AETS in all doses administered was protective against histological alterations induced by 6-OHDA, i.e.: significant decreases in the mean number of TH neurons in the SNc and in fiber density in the striatum, and significant increase of the astrocytic reaction in the striatum. No signs of toxicity were observed in liver and kidney. The results indicate neuroprotective and anxiolytic effects of AETS.

Keywords: Commelinaceae; Parkinson disease; Striatonigral degeneration.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa incapacitante e progressiva que atinge 5% da população acima dos 85 anos (REEVE *et al.*, 2014; KOTSAVASILOGLOU, 2017). Uma das vias dopaminérgicas atingida é a nigroestriatal, onde há perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta (SNc), redução esta que diminui a liberação de dopamina no núcleo estriado (JOHNSON, 2015).

Apesar de ter sido descrita há mais de 200 anos, a DP não possui etiologia totalmente esclarecida. A neuroinflamação e o estresse oxidativo podem estar associados à morte neuronal (NIRANJAN, 2014; KAUR *et al.*, 2018). Na neuroinflamação há produção excessiva de células da glia, que por sua vez liberam interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico, além de liberarem espécies reativas de oxigênio (ERO's), como o superóxido (SHABAB *et al.*, 2017). O estresse oxidativo contribui para a neurodegeneração devido ao desequilíbrio no potencial de oxidação-redução (redox) das células, contribuindo para oxidação de dopamina e morte de neurônios dopaminérgicos (KIM *et al.*, 2015).

A levodopa é o medicamento considerado padrão-ouro para a DP, eficaz na atenuação dos sintomas, no entanto pode gerar complicações motoras graves a longo prazo e é ineficaz na reposição dopaminérgica, foco dos tratamentos para DP (ZHANG *et al.*, 2016; TURCO *et al.*, 2018). Neste sentido, é indispensável o desenvolvimento de novas táticas terapêuticas, sendo válido destacar o avanço científico na elucidação das atividades biológicas dos produtos naturais (HOSAMANI *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016).

Diante disto, a *Tradescantia spathacea* (*T. spathacea*), pode ser uma potencial estratégia terapêutica para DP. Popularmente conhecida como abacaxi roxo, é uma herbácea ornamental pertencente à família Commelinaceae, endêmica do sudeste do México e América central. De fácil acesso e cultivo, está inserida na medicina popular para o tratamento de feridas, infecções respiratórias, processos inflamatórios, câncer, infecções bacterianas e fúngicas (AGUILAR *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-AVILA *et al.*, 2003).

Possui atividade antioxidante consistentemente alta (REYES-MUNGUÍA *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2015). A capacidade de eliminar radicais livres semelhante ao tocoferol e maior que o ácido ascórbico, em adição atividade antimutagênica e antígenotóxica (GONZÁLEZ-ÁVILA *et al.*, 2003), bacteriostática, bactericida e fungicida (GARCÍA-VARELA *et al.* 2015). Também foram demonstradas ações quimiopreventiva e antitumoral associadas à atividade antioxidante e composição fenólica (GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016).

Esta herbácea possui compostos flavonoides como a rutina, epigallocatequina, quecertina e rhoenina (TAN *et al.*, 2015) e ácidos fenólicos como o ácido vanílico, ácido p-

cumárico, ácido ferúlico e ácido gálico (GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016) associados à atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora, que atuam aumentando os níveis de antioxidantes endógenos, como a catalase, glutatona e superóxido dismutase, assim como amenizando a peroxidase lipídica, reduzindo TNF- α , acetilcolinesterase e corticosterona (MAGALINGAM *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2018).

Considerando-se que o provável mecanismo de morte neuronal na DP está relacionado a apoptose por estresse oxidativo com disfunção mitocondrial (HERNANDEZ-ROMERO *et al.*, 2012) associado ao aumento da resposta inflamatória (STOJKOVSKA *et al.*, 2015) e que o EATS possui ação antioxidante (TAN *et al.*, 2015; GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016) e seus compostos bioativos apresentam anti-inflamatória (GHOSH *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2017) e neuroprotetora (MAGALINGAM *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018), suscita-se a hipótese de que o EATS poderá contribuir para a avaliação do potencial neuroprotetor deste produto natural frente à neurodegeneração dopaminérgica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito neuroprotetor do extrato aquoso de *T. spathacea* (EATS) sobre lesão da via nigroestriatal em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o melhor método de extração em solvente aquoso para a obtenção dos compostos fenólicos, observando-se a cinética, rendimento global e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides totais;
- Avaliar a atividade antioxidante do EATS;
- Analisar alterações comportamentais (atividade motora e aspectos emocionais) e funcionais (efetividade da lesão) após a lesão em função dos tratamentos por EATS;
- Avaliar a segurança na administração do EATS, observando sinais de toxicidade nos tecidos de rins e fígados dos animais estudados;
- Analisar extensão da perda neuronal (neurodegeneração) e resposta astrocitária, por meio de análise histológica;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Núcleos da base

Os núcleos da base (NB) são estruturas interligadas com localização subcortical (figura 1), representados pelo estriado (núcleo caudado e putâmen), globo pálido externo (Gpe) e interno (GPi), núcleo subtalâmico (NST), substância negra parte compacta (SNc) e reticulada (SNr) (OBESO *et al.*, 2008). Os NB formam um complexo circuito e controlam a passagem de sinais neurais no córtex pré-frontal, trabalhando semelhante a um dinâmico portal. O núcleo estriado possui um papel importante neste circuito, pois recebe projeções de todo o córtex e prioriza o deslocamento de sinais para o córtex pré-frontal (PRAT *et al.*, 2016).

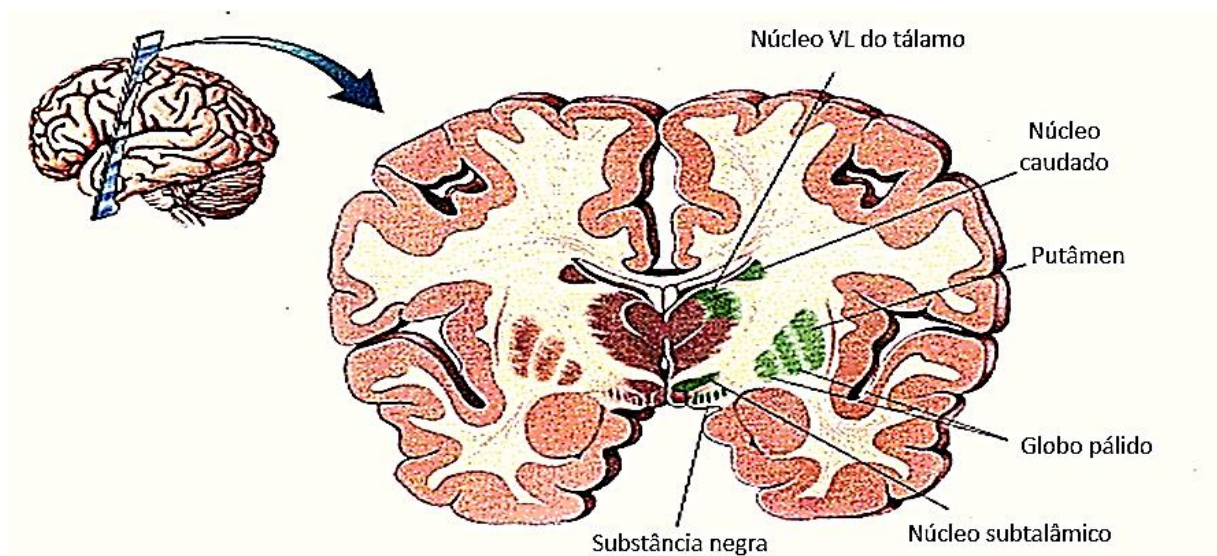


Figura 1: Corte coronal do cérebro proporcionando vista dos núcleos da base e estruturas associadas. Adaptado de Bear *et al.* (2002).

A teoria mais aceita sobre a organização dos NB é o sistema de duas vias (figura 2), a direta e a indireta, onde a dopamina tem efeito diferente a depender do fluxo em que está agindo. Ambas vias precisam trabalhar em equilíbrio funcional, onde a direta irá facilitar o movimento e a indireta, inibi-lo (JIMÉNEZ-JIMÉNEZ *et al.*, 2015).

Fisiologicamente, na via direta a SNc envia neurônios dopaminérgicos ao núcleo estriado, onde os receptores dopaminérgicos do tipo D1 nos neurônios estriatais fazem a captação de dopamina e por estímulos inibitórios GABAérgicos inibem o GPi e a SNr, estes deixam de inibir o tálamo, que por sua vez ativa o córtex cerebral por estímulos excitatórios glutamatérgicos. Na via indireta, os receptores dopaminérgicos do tipo D2 deixarão de inibir o Gpe, que por sua vez estará ativo e inibirá por estímulos inibitórios GABAérgicos o NST,

Parkinson para se referir à cognição, e “sentidos” foi interpretado como modalidades sensoriais, visto que nenhum dos pacientes foram caracterizados com alterações cognitivas e sensoriais (BERRIOS, 2016).

A DP é uma desordem neurodegenerativa e está associada ao déficit de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta, que vai ocasionar a redução de dopamina nos terminais pré e pós sinápticos do estriado dorsal, prejudicando o fluxo de dopamina na via nigroestriatal (figura 3) (QASIM *et al.*, 2016; BRIDI; HIRTH, 2018). Outra característica marcante na DP é a presença inclusões intracelulares da proteína α -sinucleína, os corpos de Lewy e neurites de Lewy (figura 4) (MARTINEZ-FERNANDEZ, 2016).

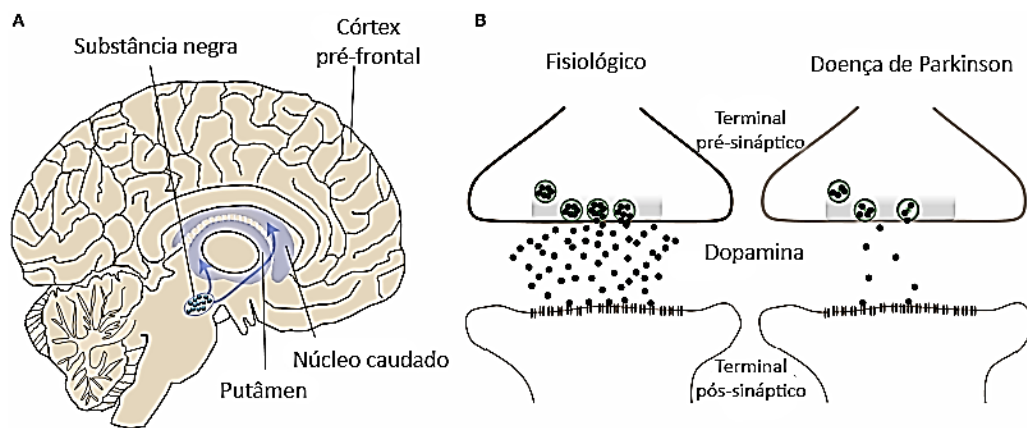


Figura 3: Sinaliza o envio de neurônios dopaminérgicos da substância negra para o núcleo estriado (núcleo caudado e putâmen) (A). Compara a transmissão de dopamina do terminal pré-sináptico para o pós-sináptico fisiologicamente e na DP (B). Adaptado de Bridi e Hirth (2018).

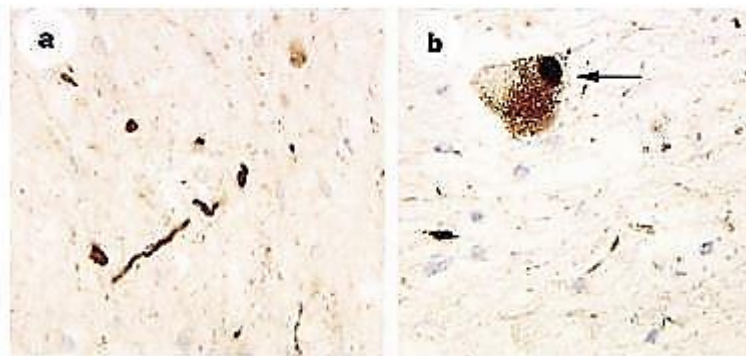


Figura 4: Detecção imunohistoquímica de neurites de Lewy (a) e corpo de Lewy (b) em neurônios dopaminérgicos da SNC. Fonte: Spillantini *et al.* (1997).

Apesar da DP não ter etiologia completamente esclarecida, estudos mostram que o envelhecimento, fatores ambientais e genéticos são as possíveis causas das doenças neurodegenerativas. O mecanismo de morte neuronal pode estar relacionado à cascatas

moleculares e eventos celulares, como o acúmulo de proteínas, neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (NIRANJAN, 2014; KAUR *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo ocorre quando há acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO's) gerado pelo aumento da produção intracelular destas espécies ou pelo déficit da capacidade antioxidante endógena. As ERO's são subprodutos altamente reativos que buscam estabilidade de elétrons na última camada, em altos níveis são nocivas e podem gerar apoptose celular devido à contribuição para o desequilíbrio do potencial redox nas células (DIXON; STOCKWELL, 2014; BHAT *et al.*, 2015).

A neuroinflamação e estresse oxidativo estão relacionados, no entanto desempenham funções distintas e independentes na DP. A exacerbação de células da glia, principalmente astrócitos e micróglia, vem sendo relatadas na patologia em estudos *post-mortem* (HERNANDEZ-ROMERO *et al.*, 2012), estas modificações desenvolvem efeito deletério nos neurônios dopaminérgicos que ainda não está totalmente elucidado. Especula-se que após injúria primária, genética ou ambiental, a reação glial mantém a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (NIRANJAN *et al.*, 2011).

Fisiologicamente, as células da glia são capazes de reduzir a formação de radicais livres, diminuir a liberação glutamatérgica em processo de excitotoxicidade, restaurar lesões na barreira hematoencefálica e estabelecer neurovascularização e neurogênese. A reação astrocitária em excesso ou desregulada interfere no suporte estrutural e metabólico dos neurônios, nas transmissões sinápticas, na produção de moléculas neurotróficas, na barreira hematoencefálica e no auxílio à micróglia na resposta imune (WANG *et al.*, 2015; DE BOOTH *et al.*, 2017).

A resposta imune glial favorece a ativação do TNF- α que libera radicais livres e aciona proteínas, como a enzima sintase de óxido nítrico induzida (iNOS) e as intercitocinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β). A iNOS pode interagir com o superóxido e formar o peroxinitrito, espécie altamente reativa (SHABAB *et al.*, 2017). A substância negra em especial é uma região vulnerável devido ao vasto conteúdo de espécies oxidáveis, como a dopamina, e teor reduzido de antioxidantes endógenos, como a glutatona. Desta forma, o estresse oxidativo desencadeia efeitos prejudiciais às células colaborando com a degeneração dopaminérgica na DP (NITA, GRZYBOWSKI, 2016).

A disfunção mitocondrial do complexo I da cadeia de transporte respiratório vem sendo identificada na DP, em especial na SNC. Ocorre por meio da inibição da mesma através de toxinas ambientais, levando a uma seletiva degeneração dopaminérgica e ao acúmulo de inclusões citoplasmáticas com ubiquitina e α -sinucleína (GANDHI; WOOD, 2005). Esta disfunção pode aumentar o quantitativo de radicais livres e superóxido, devido ao fluxo prejudicado de elétrons de nicotinamida adenina dinucleótido hidreto (NADH) para

ubiquinona, elevando o estresse oxidativo por superóxido dismutase (SOD) (NIRAJAN *et al.*, 2014).

Estima-se que ocorra aproximadamente 80% de depleção dopaminérgica da via nigroestriatal até o aparecimento dos sintomas motores cardinais, que são bradicinesia, instabilidade postural, tremor em repouso e rigidez muscular (RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2011). No entanto, os sintomas não motores costumam preceder os motores, na chamada fase prodrômica, são caracterizados por distúrbios sensoriais, psiquiátricos, autonômicos, comportamentais, da fala, da deglutição e do sono (GUEVARA; ALARCÓN, 2015). O impacto financeiro é considerável na DP devido ao gama de complicações que acometem seus portadores (BACH *et al.*, 2012).

Há uma relação inversamente proporcional entre o quantitativo de neurônios dopaminérgicos e a severidade dos sintomas motores na DP (figura 5). Inicialmente há perda fisiológica de neurônios devido ao envelhecimento e fatores de risco para a patologia, como fatores genéticos e histórico familiar. Esta perda continua na fase prodrômica e se acentua na fase clínica, onde o diagnóstico costuma ser realizado e as manifestações motoras possuem severidade elevada (HEINZEL *et al.*, 2016).

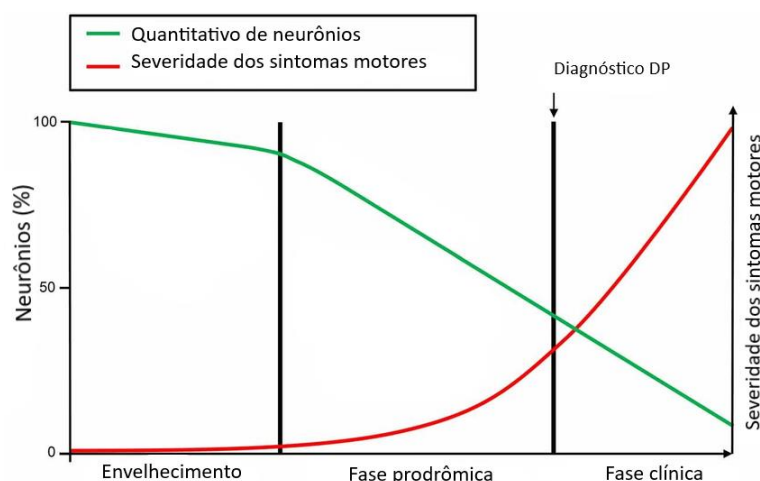


Figura 5: Relação entre o quantitativo de neurônios dopaminérgicos e a severidade dos sintomas motores durante o envelhecimento, fase prodrômica e fase clínica. Adaptado de Heinzl *et al.*, 2016

Os sintomas não motores são importantes para o estudo, pois interferem na incapacitação ao longo da doença. Dentre eles, a depressão é prevalente, acometendo 35% dos portadores e contribuindo negativamente para o risco de mortalidade (REIJNDERS *et al.*, 2008), um estudo de coorte revelou que idosos deprimidos tinham 41% no índice de mortalidade incremental, estabelecendo uma relação direta entre sintomas depressivos e óbito em idosos (SCHOEVERS, 2009).

A demência é outro sintoma que se destaca, vem se mostrando presente em até 95% dos portadores, variando de acordo com as populações estudadas, porém há discrepância

nos estudos sobre a ocorrência da demência (KATZEN; LEVIN; WEINER, 2006), alguns sugerem que a mesma ocorre nos indivíduos que tiveram rápida progressão dos sintomas motores ou em casos prolongados da doença (JANVIN *et al.*, 2006). Outras literaturas relacionam a demência aos que são acometidos predominantemente por rigidez e tremor ou naqueles pacientes com problemas motores axiais (LEVY *et al.*, 2000).

O comprometimento cognitivo atinge de 25 a 38,2% dos portadores nos estágios iniciais da doença, fato importante visto que impactará na qualidade de vida e mortalidade destas pessoas (KANDIAH *et al.*, 2014; VARALTA *et al.* 2015). O declínio cognitivo influencia na função executiva e visuoespacial, velocidade psicomotora, atenção, memória de trabalho e episódica. Alguns indivíduos estão mais expostos a disfunções cognitivas, como os que possuem idade mais avançada, baixa escolaridade, sonolência diurna excessiva, rigidez, piora dos sintomas motores, alucinações visuais, instabilidade postural, entre outros fatores (SCHNEIDER; SENDEK; YANG, 2015; LIN; WU, 2015).

A estabilidade dos movimentos é crucial para o sucesso do desempenho motor no cotidiano, pois o déficit do mesmo pode implicar desde dificuldades sutis e não observadas a olho nu à quedas e congelamento da marcha (LEWIS, 2016). Os portadores da DP passam por experiências de quedas 62% mais vezes se comparados aos acometidos por outras patologias neurológicas, pois estes sofrem mais com a instabilidade postural, além da redução do balanço dos braços, do déficit de movimentos desagregados entre braço e tronco ao longo da marcha e da diminuição do comprimento do trajeto (BARBOSA, 2016).

Avaliação do estado clínico e resposta à medicação atualmente é realizada através da avaliação clínica, por exames neurológicos e escalas, porém esta forma de parecer é subjetiva e reduz a sensibilidade do diagnóstico, desconsiderando um grande número casos (KOTSAVASILOGLOU, 2017). O teste mais utilizado para avaliar a disfunção dos gânglios basais em ambiente clínico é a Unified *Parkinson's Disease Rating Scale* - Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson (UPDRS), porém oferece pouco conhecimento sobre coordenação motora e não serve para portadores assintomáticos (LEWIS, 2016).

3.3 Modelos experimentais da doença de Parkinson

3.3.1 Modelos de indução

Grande parcela do conhecimento sobre a fisiopatologia e o tratamento da DP é proveniente de pesquisas experimentais realizadas com animais onde os modelos mamíferos são os mais utilizados, ressaltando a importância destes modelos na investigação da patologia e para o estudo de novos métodos terapêuticos (TRIGO-DAMAS *et al.*, 2018).

Dentre os modelos experimentais para indução da DP, destacam-se os genéticos, que utilizam expressões *in vitro* de mutações relacionadas à patologia, e os neurotóxicos, que podem ser por toxinas ambientais (rotenona e paraquat), que reproduzem o risco ambiental da DP, ou sintéticas (6-hidroxi-dopamina e MPTP), que continuam sendo os mais utilizados (Figura 6) (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014; ZENG *et al.*, 2018).

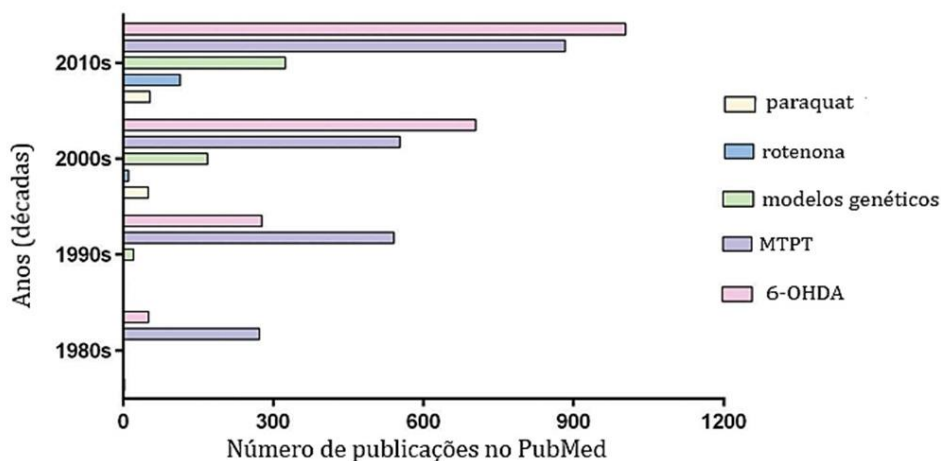


Figura 6: Publicações no Pubmed ao longo das décadas (1980 à 2017) com os diferentes modelos animais da DP. Adaptado de Trigo-Damas *et al.* 2018.

A 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) é uma toxina análoga hidroxilada da dopamina, que precisa ser administrada por via intracerebral devido a incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica. Apesar de não conseguir reproduzir no modelo animal o surgimento dos corpos de Lewy, induz a degeneração de neurônios dopaminérgicos na SNc, com consequente redução de dopamina no núcleo estriado, disfunção mitocondrial e déficits comportamentais de reprodutibilidade consistente (JIANG; DICKSON, 2018).

É um modelo versátil, podendo ser usado para desenvolver lesões completas ou parciais da via nigroestriatal, em diferentes perfis temporais, sendo utilizadas para diversas finalidades, abrangendo a investigação de mecanismos patogênicos e fisiopatológicos, assim como a investigação de medidas terapêuticas novas (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008).

A indução da DP através da via nigroestriatal pode ser produzida a partir da lesão na SNc, no feixe prosencefálico medial (FPM) ou no núcleo estriado. A administração da 6-OHDA na SNc ou no FPM produz degeneração dopaminérgica completa (> 90%) na SNc e rápida depleção dopaminérgica estriatal (SANTIAGO *et al.*, 2014). A lesão no núcleo estriado é parcial (20-85%) (BLANDINI *et al.*, 2007), provoca morte imediata de neurônios dopaminérgicos no local da lesão e progride até a 4ª semana (DA SILVA *et al.*, 2016). Por ser progressivo, o modelo de lesão estriatal é mais adequado para estudos de neuroproteção (PENTTINEN *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo ocasionado pela 6-OHDA é a maior causa da lesão neuronal deste modelo. Esta toxina penetra nos neurônios catecolaminérgicos facilmente por causa da semelhança estrutural (figura 7) com as catecolaminas endógenas e alta afinidade pelo transportador de dopamina ou noradrenalina. Após a entrada, se aloca no citosol, gerando auto oxidação e provocando formação elevada de radicais livres. A 6-OHDA pode entrar também nas mitocôndrias, provocando inibição da cadeia transportadora de elétrons e bloqueio do complexo I (SHOBER, 2004; SIMOLA *et al.*, 2007).

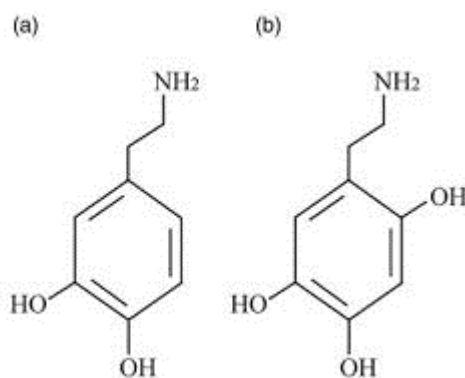


Figura 7: Estrutura química molecular da dopamina (a) e da 6-hidroxi-dopamina (b). Adaptado de Zeng *et al.* (2018).

3.3.2 Avaliação comportamental

3.3.2.1 Teste de campo aberto

Foi desenvolvido por Hall (1934) com a finalidade de avaliar locomoção e estado emocional dos animais, assim como permite analisar o efeito da lesão intracerebral e a atividade exploratória global dos animais. O comportamento do animal é determinado pelo conflito entre o impulso para a exploração e o repulso com lugares abertos, desprotegidos e iluminados (LEIKAS *et al.*, 2017).

Para isto, deve-se utilizar uma arena de madeira cercada por paredes de forma que o animal não possa fugir e subdividida em quadrantes para permitir a avaliação de quatro parâmetros: (1) *Crossings* – comportamento de exploração horizontal, quantidade de quadrantes percorridos pelo animal sobre as quatro patas; (2) *Rearing* – exploração vertical, vezes que o animal se mantém apenas com as patas posteriores; (3) Defecação – quantidade de bolos fecais expelidos ao longo do teste (WALSH; CUMMINS, 1976).

Sugere-se que a defecação é a atividade motora do animal que designa o seu estado emocional, quando alta associada a baixa locomoção indica a ansiedade e/ou estresse do animal. Bem como, a escolha do animal para se isolar em cantos do aparato ou

centralmente serve como um indicador seletivo de ansiedade ou busca por proteção no novo ambiente (ZIMCIKOVA; EVA, 2017).

3.3.2.2 Teste do cilindro

O teste do cilindro é realizado para investigar a lateralização espontânea dos membros anteriores do animal, já que a injeção unilateral da (6-hidroxidopamina) 6-OHDA pode causar comprometimento dos membros. Os animais com depleção dopaminérgica unilateral mostrarão a preferência pelo uso do membro homolateral à lesão (SAMPAIO *et al.*, 2017).

A observação da assimetria dos membros anteriores é determinada durante a exploração vertical, onde o animal entra em contato com a parede do cilindro de acrílico e é feita uma contagem de acordo com o membro que tocar: contralateral (membro afetado), homolateral (membro não afetado) ou ambos (simultaneamente) (REAL *et al.*, 2017).

3.3.2.3 Teste de campo rotatório

O teste de comportamento rotatório induzido por apomorfina irá avaliar o comprometimento do sistema dopaminérgico após administração da 6-OHDA, esta injúria desregula os receptores dopaminérgicos no lado lesionado, ocasionando em depleção de neurônios dopaminérgicos presentes da substância negra compacta (DA COSTA *et al.*, 2017).

Para a determinação do comportamento rotacional é feita a contagem e a observação do número de rotações 360° homolaterais e contralaterais que o animal dá em torno do próprio eixo. A gravidade dessa depleção é avaliada com a indução de apomorfina, onde o animal gira ao lado com menos receptores, ou seja, contralateral à lesão. Sendo um teste sensível a lesões estriatais com extensões maiores que 80% (REAL *et al.*, 2017).

3.4 Tratamentos para doença de Parkinson

3.4.1 Medidas não farmacológicas

A estimulação cerebral profunda conhecida como DBS, do inglês “*Deep Brain Stimulation*”, é um dos tratamentos recomendados para a DP, é oferecida no Brasil pelo sistema público de saúde que vem sendo considerada boa opção para os casos refratários ao tratamento farmacológico (MACHADO *et al.*, 2016). Consiste em uma técnica cirúrgica que estimula eletricamente algumas regiões subcorticais por meio da implantação de eletrodos, tem por finalidade reestabelecer equilíbrio nos circuitos neuronais que sofreram danos (SIRONI, 2011).

Esta técnica reduz as complicações causadas pelas terapias convencionais de reposição dopaminérgica e também está associada a melhora dos sintomas motores. No entanto, os estudos sobre a ação da DBS nos sintomas não motores ainda são inconsistentes e a indicação para este procedimento é minuciosa, restringindo os beneficiados à uma pequena parcela de portadores (MACHADO; REPPOLD, 2015).

A taxa de mortalidade após DBS com implantação no NST é de 0,3% (GOODMAN *et al.* 2006). Valor inferior quando comparado às técnicas ablativas, onde as palidotomias unilaterais tem um índice de mortalidade de 1,2% e morbidade permanente de 13,8%, já nas palidotomias bilaterais esta morbidade chega aos 30% (DE BIE *et al.*, 2002; GREGORY, 2002). Autores chamam atenção para os sintomas relacionados a depressão após a DBS. O posicionamento do eletrodo em áreas específicas do NST pode estar relacionado com a sintomatologia (BERNEY *et al.*, 2002). A incidência aumentada de suicídio no pós operatório destes pacientes é relatada (VOON *et al.*, 2008).

As medidas não farmacológicas também envolvem atividades que auxiliarão o portador a conduzir as limitações colocadas pela patologia, com isto adiarão a evolução da mesma, como exemplo tem-se as terapias com profissionais fonoaudiólogos, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais, entre outros (GERSZT, 2014).

Embora o tratamento farmacológico tenha importância reconhecida para controle da sintomatologia, o exercício físico é útil para garantir melhor mobilidade. Com a progressão da doença, ocorre o agravamento dos problemas motores, tornando a fisioterapia, associada aos fármacos, uma aliada para a saúde dos portadores da DP. O tratamento fisioterapêutico objetiva melhorar o desempenho, força, resistência, postura, marcha e equilíbrio, além de retardar ou amenizar sintomas parkinsonianos (MANCINI *et al.* (2008),.

Nimwegen *et al.* (2011) indica que os portadores da DP são 29% menos ativos, se comparados aos indivíduos saudáveis. Na fase inicial da DP, os portadores que possuem um nível regular de atividade física ainda podem ser comparados aos indivíduos saudáveis, no entanto quando a doença progride esta comparação tende a ser modificada.

3.4.2 Medidas farmacológicas

O tratamento farmacológico consiste na substituição dopaminérgica, os medicamentos sintéticos para a DP estão em grande diversidade e são bem aceitos no mercado. Os medicamentos representam de 20 a 65% dos custos totais da patologia, sendo que podem vir a duplicar com a progressão da mesma (BACH *et al.*, 2012). Apesar de trazerem uma melhora significativa comprovada, estes quando utilizados a longo prazo acarretam em efeitos não desejados e resistência ao tratamento (ZHANG *et al.*, 2016).

Para o tratamento farmacológico são utilizados anticolinérgicos, amantadina, inibidores da monoamina-oxidase B, agonistas dopaminérgicos, levodopa e inibidores da catecol-artometiltransferase (DE ROSSO *et al.*, 2010). Dentre estes, a levodopa ganha destaque devido à redução das manifestações clínicas da DP (FOX *et al.*, 2011).

A Levodopa ou L-DOPA foi introduzida na indústria farmacêutica nos anos 1960, levando a uma redução significativa nos tratamentos cirúrgicos, pois acreditava-se que esta medicação seria a solução para a doença, no entanto, após alguns anos os efeitos por uso prolongado da levodopa tornaram-se evidentes (SCHWALB; HAMANI, 2008; BENABID *et al.*, 2009).

A Levodopa ou L-DOPA é o principal tratamento medicamentoso, funciona com a intenção de reposição dopaminérgica (HEISTERS, 2011; YOKOYAMA *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2012). Demonstra benefícios significativos sobre os sintomas da DP, todavia, após cinco anos de uso contínuo os efeitos adversos tendem a se desenvolver. As flutuações motoras e as discinesias (movimentos anormais e involuntários estereotipados), surgem após uso prolongado desta medicação (BARSOTTINI *et al.*, 2010; YOKOYAMA *et al.*, 2011; CHO *et al.*, 2012). Além dos efeitos indesejados a longo prazo, a levodopa mostra baixa disponibilidade após administração por via oral e baixa captação cerebral (SHARMA *et al.*, 2013).

Embora a indústria farmacêutica venha apostando em alterações nas vias de administração e em diferentes formulações para veiculação da L-DOPA, além de terapias simultâneas, afim de minimizar os efeitos adversos deste tratamento (LOTIA; JANKOVIC, 2016), o desenvolvimento de novas táticas terapêuticas - especialmente com foco na proteção de neurônios dopaminérgicos e não apenas no tratamento dos sintomas - é necessário.

3.5 Produtos naturais

A ação antioxidante em plantas medicinais vem sendo alvo de estudos, o interesse por antioxidantes naturais se deve à presença de compostos fenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides, estes auxiliam na manutenção da atividade antioxidante, agindo como protetores exógenos, no combate aos radicais livres e redução do estresse oxidativo (DO *et al.*, 2014).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgam que cerca de $\frac{3}{4}$ da população mundial faz usos de alguma planta de forma terapêutica, já que a medicina tradicional constitui uma alternativa terapêutica culturalmente propagada na promoção da saúde (SAHRANAVARD *et al.*, 2014). As plantas medicinais compõem uma parcela da

variedade biológica e caracteriza uma das práticas mais antigas utilizadas na promoção, prevenção e tratamento de patologias (FIRMO *et al.*, 2011).

A fitoterapia foi implantada no Brasil pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no ano de 2006, através da publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Terapias Complementares, que estabeleceu ações que visam garantir o uso coeso de medicamentos à base de plantas medicinais conhecidas pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (CARVALHO *et al.*, 2014).

Os produtos naturais não devem ser confundidos com a medicina popular. Assim como qualquer medicamento, os fitoterápicos podem oferecer riscos em seu uso, reforçando assim a necessidade de estudos que avaliem a qualidade, reprodutibilidade, eficácia e segurança da utilização destes (VIEIRA *et al.*, 2010).

Apesar de apresentarem constituição complexa, os produtos naturais ainda são pouco explorados, sendo necessário o desenvolvimento de estudos farmacológicos para identificar características como ações biológicas e princípios ativos, assim como o incentivo à indústria farmacêutica para produção de produtos eficazes com efeitos adversos reduzidos (SCHMITT *et al.* 2011).

3.5.1 Produtos naturais e doença de Parkinson

Os produtos naturais têm sido cada vez mais investigados quanto ao seu potencial uso na DP, e algumas características são importantes para estas prospecções, como a toxicidade do produto, capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, mecanismos de ação, doses, composição química. São de interesse para as doenças neurodegenerativas os produtos naturais com toxicidade baixa, forte potencial antioxidante e anti-inflamatório, que possam ter mecanismos de ação no estresse oxidativo e na função mitocondrial (ZHANG *et al.*, 2013; SRIVASTAV *et al.*, 2017).

Na tabela 1 podem ser visualizados alguns produtos naturais com efeito neuroprotetor, assim como seus respectivos constituintes principais e mecanismos.

Tabela 1: Pesquisas para investigação do efeito e mecanismo protetor de produtos naturais em modelos pré-clínicos para estudo da DP

Produto natural	Principais constituintes	Resultados	Referências
<i>Bacopa monnieri</i>	Bacosida	Recuperação cognitiva e na função mitocondrial; Atenua agregação de α -sinucleína e apoptose	SHINOMOL <i>et al.</i> , 2012; SIDDIQUE <i>et al.</i> , 2014; HOSAMANI <i>et al.</i> , 2016
<i>Camellia sinensis</i>	Polifenóis Epicatequina Epigallocatequina	Recuperação motora, emocional e cognitiva significativa; Reparo nos níveis dopaminérgicos estriatais; Redução da peroxidação lipídica, formação de nitritos e nitratos;	KIM <i>et al.</i> , 2010; PINTO <i>et al.</i> , 2015; XU <i>et al.</i> , 2017
<i>Curcuma longa</i>	Curcumina	Reestabelece o nível de dopamina estriatal; Reduz o estresse oxidativo; Inibe a agregação de α -sinucleína; Regula o nível de acetilcolina; Melhora a atividade no complexo mitocondrial I.	VAN DER MERWE <i>et al.</i> , 2016; SONG <i>et al.</i> , 2016
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolide B	Reestabelece nível de dopamina; Melhora comportamental; Melhora de função mitocondrial e produção de ATP;	ROJAS <i>et al.</i> , 2008; EL-GHAZALY <i>et al.</i> , 2015
<i>Hypericum perforatum</i>	Quercetina Catequina Rutina	Recuperação comportamental; Elevação da expressão TH; Normalização da expressão GFAP e TNF- α ; Aumento da catalase e redução da glutatona;	KIASALARI <i>et al.</i> , 2016
<i>Mucuna pruriens</i>	Glicosídeo Ácido gálico Glutaciona Levodopa	Melhora a função locomotora e comportamental; Reduz o estresse oxidativo; Melhora a função sináptica e expressão TH	YADAV <i>et al.</i> , 2013; JANSEN <i>et al.</i> , 2014; PODDIGHE <i>et al.</i> , 2014

TH = Tirosina hidroxilase; ATP = adenosina trifosfato; GFAP = proteína ácida fibrilar glial; TNF- α = Fator de Necrose Tumoral Alfa.

3.6. *Tradescantia spathacea*

A *T. spathacea* ou *Rhoeo discolor* (figura 8), sinônimo aceito cientificamente, é popularmente denominada de abacaxi-roxo, moisés-no-berço ou espada de lansã. É uma herbácea ornamental pertencente à família Commelinaceae, endêmica do sudeste do México e América central. De fácil acesso e cultivo, está inserida na medicina popular para o tratamento de feridas, infecções de vias aéreas, processos inflamatórios, câncer, doenças sexuais, infecções bacterianas e fúngicas (AGUILAR *et al.*, 1994; GONZÁLEZ-AVILA *et al.*, 2003).



Figura 8: Fotografia da *Tradescantia spathacea*. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Na América do Sul é considerada bebida funcional, semelhante a um chá (ROSALES-REYES *et al.*, 2008), onde sua atividade antioxidante é consistentemente classificada alta em comparação com os chás de ervas, apoiando ainda mais a hipótese de que esta planta tem potencial para ser popularizada como uma bebida funcional, não só na América do Sul (REYES-MUNGUÍA *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2015).

García-Varela *et al.* (2015) realizaram ensaios *in vitro* para avaliar atividade antibacteriana de diferentes extratos da *T. spathacea* contra bactérias Gram-positivas (*Listeria innocua* e *Streptococcus mutans*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), como também para o fungo *Candida albicans*. Observou-se que os extratos mais polares, principalmente os aquosos, proporcionaram maior atividade bacteriostática e bactericida, além de fungicida.

Tan *et al.* (2015) utilizaram extratos aquosos e metanólico da *T.spathacea* para avaliar *in vitro* a atividade antioxidante e antibacteriana contra 16 cepas. Os extratos aquosos obtidos por infusão e decocção apresentaram quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante significantes, comparáveis a chás de ervas já popularizados, como a hortelã (*Mentha spicata*), e mostraram atividade antibacteriana contra 10 das 16 cepas estudadas.

As atividades antimutagênica e antigenotóxica do extrato etanólico da *T.spathacea* foram estudadas por González-Ávila *et al.* (2003) através de ensaios *in vitro*. Em adição, foi analisada a o potencial de eliminação de radicais livres pelo método DPPH, onde o extrato apresentou menor capacidade de eliminar radicais livres que a quercetina, no entanto apresentou melhor efeito que o ácido ascórbico e ação semelhante ao tocoferol.

Foi reportado na literatura o efeito dopaminérgico do extrato aquoso da *T.spathacea* associado ao bloqueio da ação antiadrenérgica do bretílio no íleo de coelhos, após rastreio farmacológico realizado por Garcia *et al.* (1971). Ensaio de citotoxicidade, especificamente para células de câncer de colo, fígado e próstata, foram realizados por Garcia-Varela *et al.* (2016). Os extratos tiveram ações quimiopreventiva e antitumoral, possivelmente devido a atividade antioxidante e composição fenólica. Mais uma vez, os extratos mais polares, principalmente os aquosos propiciaram melhores efeitos.

Através de triagem fitoquímica foram identificados terpenos, taninos, saponinas, antocianinas e alcaloides. Em análises cromatográficas foram encontrados compostos antioxidantes como flavonoides (rutina, quercetina, epigallocatequina, rhoenina e antocianina pigmento nº2) (TAN *et al.*, 2015) e ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido valílico glicosado, ácido p-cumárico) (GARCÍA-VARELA *et al.*, 2016). Grande parte destes compostos encontrados na *T.spathacea* são associados a atividade antioxidante, anti-inflamatória e/ou neuroprotetora (tabela 2).

Tabela 2: Pesquisas envolvendo os compostos fenólicos encontrados na *T.spathacea*

Composto	Classe fenólica	Ações Biológicas	Referências
Rutina	Flavonoide	Antioxidante e neuroprotetor (aumento de glutathione e redução da peroxidação lipídica)	MACHAWAL; KUMA, 2014; ALMUTAIRI <i>et al.</i> , 2017
Quercetina	Flavonoide	Antioxidante e neuroprotetor (aumento de SOD e redução da peroxidação lipídica)	MAGALINGAM <i>et al.</i> , 2016; LI <i>et al.</i> , 2018
Epigallocatequina	Flavonoide	Antioxidante, quelante de metais e neuroprotetor	SINGH <i>et al.</i> , 2016; XU <i>et al.</i> , 2017
Kaempferol	Flavonoide	Antioxidante e neuroprotetor (redução de AChE, aumento de SOD, catalase e glutathione)	HUSSEIN <i>et al.</i> , 2018
Ácido clorogênico	Ácido fenólico	Antioxidante e neuroprotetor em excitotoxicidade glutamatérgica	MIKAMI; YAMAZAWA, 2015
Ácido vanílico	Ácido fenólico	Anti-inflamatório, antioxidante e modulação de ação neuroinflamatória (redução de TNF- α , AChE, corticosterona)	SINGH <i>et al.</i> , 2014
Ácido p-cumárico	Ácido fenólico	Antioxidante, anti-apoptótico e neuroprotetor (aumento da SOD e catalase)	GUVEN <i>et al.</i> , 2015; SAKAMULA; THONG-ASA, 2018
Ácido ferúlico	Ácido fenólico	Antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor em isquemia cerebral (ação anti-apoptótica)	GHOSH <i>et al.</i> , 2017; REN <i>et al.</i> , 2017

TNF- α = Fator de Necrose Tumoral Alfa. AChE = acetilcolinesterase. SOD = superóxido desmutase

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental (LMPE) e no Núcleo de Estudos em Sistemas Coloidais (NUESC), ambos no Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), e no biotério da Universidade Tiradentes (UNIT).

4.2 Material vegetal

Foram utilizadas folhas de *Tradescantia spathacea*, coletadas no município de Aracaju no estado de Sergipe, Brasil (10°58'7.536"S, 37°3'28.469"W), no mês de setembro de 2017, no período da manhã. A identificação científica da planta estudada foi realizada de acordo com o Guia de coleta botânica proposto pelo Herbário Tiradentes - AJU, onde a exsicata depositada (Anexo 1) recebeu a numeração 0845.

Após identificada, a amostra vegetal foi preparada (figura 9), baseadas na literatura de García-Varela *et al.* (2015). As folhas inicialmente foram pesadas, encaminhadas ao LMPE, individualmente lavadas com água destilada, o excesso de umidade foi retirado com papel toalha, e cortadas em tamanho aproximado de 1 cm², acomodadas em recipientes de forma que ficassem espalhadas e colocadas em estufa a 45° C. Após a secagem, o tamanho de partícula obtida foi separado por peneiras granulométricas da série Tyler de 18-32 *mesh* e conectadas ao peneirador mecânico. As amostras foram armazenadas em recipientes de vidro protegidas da luz e em temperatura ambiente para posterior extração.



Figura 9: Fotografias do processo de preparo da amostra: (A) folhas de *Tradescantia spathacea* após lavagem e secagem; (B) folhas frescas cortadas e acomodadas em recipientes para secagem; (C) folhas secas preparadas para granulometria; (D) peneirador mecânico com peneiras da série Tyler 18-32 *mesh*; (E) amostra com 18-32 *mesh*. Fonte: Arquivo próprio, 2018.

4.3 Extrações

Com a finalidade de selecionar o extrato aquoso mais viável para aplicação *in vivo*, foram realizadas duas extrações por líquidos pressurizados (ELP) e duas por infusão, onde todos foram avaliados quanto ao rendimento global e ao quantitativo de ácidos fenólicos e flavonoides totais.

Primeiramente foi realizada cinética da ELP, visando determinar o tempo de extração mais acessível em termos de rendimento, com tempos pré-definidos de 15, 30, 60, 120 e 180 min. Concomitante, uma extração por infusão foi executada. A partir do resultado da cinética foram acrescentadas uma ELP e uma infusão, afim de padronizar os extratos quanto à proporção volume de solvente para biomassa, totalizando quatro extratos ao longo da pesquisa. Melhores detalhes do processo de obtenção dos extratos bioativos podem ser observados abaixo no fluxograma ilustrativo (figura 10).

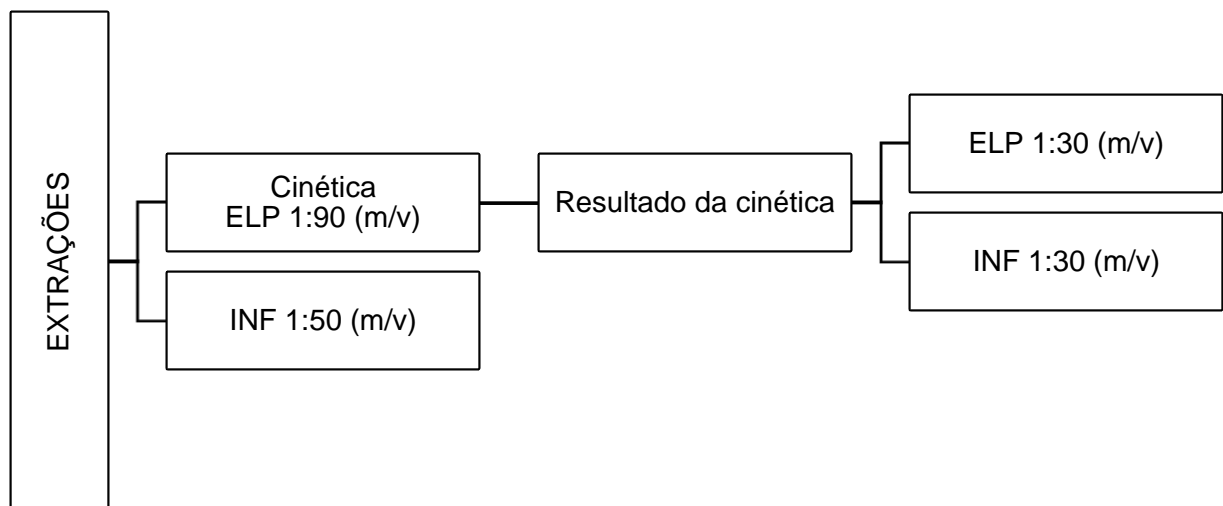


Figura 10: Fluxograma ilustrativo das extrações realizadas, explicitando método de extração e proporção de biomassa por volume de solvente (m/v). Onde ELP = extração por líquidos pressurizados.

As ELP foram obtidas através de metodologia adaptada de Jesus *et al.* (2013). Foi utilizada a unidade extratora do Núcleo de Sistemas Coloidais (NUESC), qualificada para extrair compostos bioativos pressurizados, podendo ser com líquido, gás ou ambos simultaneamente. Após a montagem da célula extratora com 2 g de biomassa e estabilização das condições experimentais (pressão isobárica de 150 bar, vazão de 1 mL/min, temperatura de 50°C) procederam-se as extrações, uma por 180 min (extração para cinética) e posteriormente uma de 60 min, adaptada ao resultado da cinética.

Foram realizadas duas infusões, a primeira foi feita com a proporção de 1:50 (m/v), seguindo a metodologia citada anteriormente (TAN *et al.*, 2015) e na segunda, foi utilizada a

proporção de 1:30 (m/v) com a finalidade de ter condições semelhantes à ELP. Foi adicionada em água destilada a 100°C à biomassa previamente pesada e com granulação conhecida, onde ficou em repouso por 15 min sem aquecimento adicional. Posteriormente foi realizada filtração com filtro microporoso, então o extrato obtido foi acomodado em placas de Petri.

Ao fim das extrações, seja por ELP ou infusão, as placas de Petri previamente identificadas e pesadas foram colocadas na estufa à 45°C para obtenção do extrato seco. Os recipientes foram pesados diariamente a fim de acompanhamento da evaporação do solvente, até obtenção de peso constante. As condições experimentais de extração dos quatro extratos obtidos podem ser melhor visualizadas no quadro abaixo (quadro 1):

MÉTODO	TEMPO	TEMPERATURA	PROPORÇÃO BIOMASSA/SOLVENTE
ELP	180 min	50°C	1:90 (m/v)
ELP	60 min	50°C	1:30 (m/v)
Infusão	15 min	100°C	1:50 (m/v)
Infusão	15 min	100°C	1:30 (m/v)

Quadro 1: Condições experimentais das extrações realizadas. Onde ELP = Extração por líquidos pressurizados. A proporção m/v se dá por biomassa (g) por volume de solvente (mL).

4.4 Caracterização dos extratos

4.4.1 Rendimento global

Os extratos obtidos foram avaliados quanto a porcentagem de rendimento global de extração, de acordo com a equação 1 (MACHADO *et al.*, 2017):

$$(1) \quad \%R = \frac{m_{es}}{m_{ag}} \times 100$$

Onde %R= porcentagem de rendimento; m_{es} = Massa de extrato seco; m_{ag} = Massa da amostra granulada.

4.4.2 Quantificação de ácidos fenólicos

A determinação do conteúdo de ácidos fenólicos nos EATS foi feita usando um procedimento modificado de Tan *et al.* (2015), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. As amostras dos extratos (250 ppm, 500 µL, em triplicata) foram misturadas com 2,25 mL do

reagente de Folin-Ciocalteu a 10%, seguido por uma adição de 1,75 ml de solução de carbonato de sódio a 7,5% (p/v) (Na_2CO_3). Os tubos de ensaio foram então deixados em repouso durante 20 min no banho a 45° C, posteriormente os valores de absorvância foram medidos a 725 nm. Foi utilizada a reta de calibração (figura 11) para solução padrão de ácido gálico (1000 ppm), que para ser obtida foi pesado de 0,1 g de ácido gálico, transferido para balão volumétrico e adicionado 100 mL de água destilada, a solução permaneceu 30 min em banho ultrassônico em temperatura ambiente e foi mantida sem contato com a luz. A curva de calibração foi preparada com ácido gálico (5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $R^2=0,9991$) O conteúdo total de ácidos fenólicos foi expresso como miligrama de ácido gálico equivalente em grama de EATS (mg AGE/g).

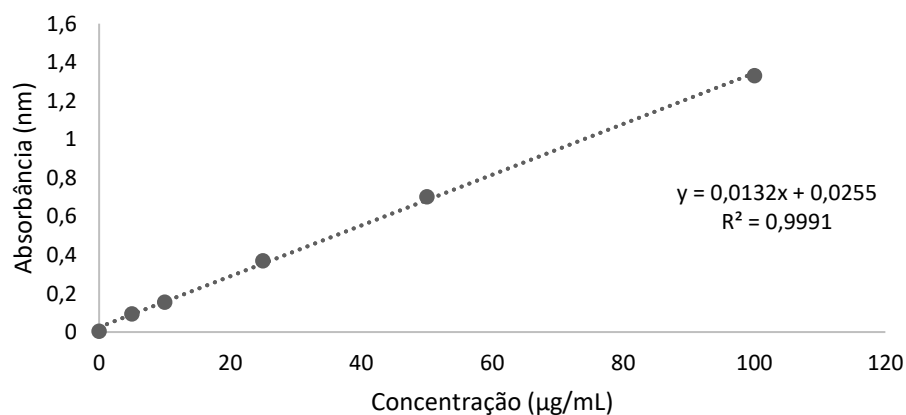


Figura 11: Reta de calibração para solução padrão de ácido gálico.

4.4.3 Quantificação de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais nos EATS foi determinado com o método colorimétrico de cloreto de alumínio como descrito em Paiva *et al.* (2018), com modificações. Foram adicionados volumes iguais de nitrato de alumínio 10% e 1,0 M de acetato de potássio (0,1 mL) a 0,5 mL de EATS, seguido de 4,3 mL de metanol. As soluções foram homogeneizadas e submetidas a banho ultrassônico durante 30 min. Após este período foi realizada a leitura da absorvância à 425 nm. Foi utilizada a reta de calibração (figura 12) para solução padrão de rutina (600 ppm) que foi preparada a partir da pesagem de 60 mg de rutina, transferido para balão volumétrico e adicionado 100 mL de metanol, a solução permaneceu 30 min em banho ultrassônico em temperatura ambiente e foi mantida sem contato com a luz. A curva de calibração foi preparada com rutina (5-140 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $R^2=0,9986$) e a concentração de flavonoides foi expressa como miligrama de rutina equivalente em grama de EATS (mg RE/g).

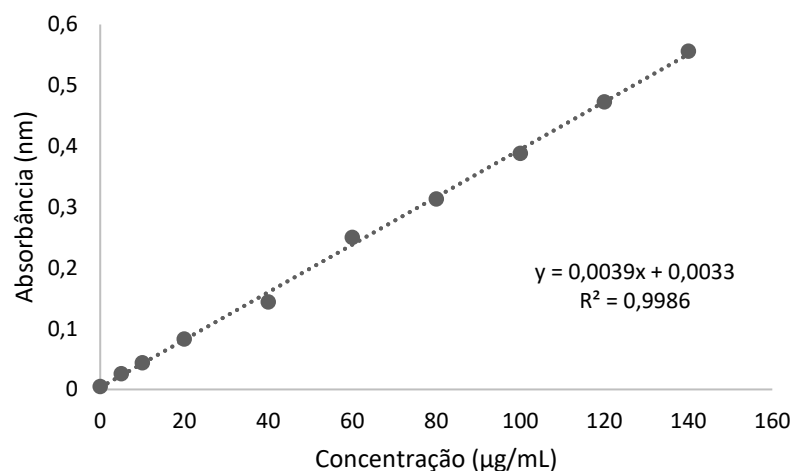


Figura 12: Reta de calibração para solução padrão de rutina.

4.4.4 Análise da atividade antioxidante

Para análise da atividade antioxidante, a metodologia de Machado *et al.* (2017) foi utilizada com adaptações. A solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi preparada em balão volumétrico (2,4 mg de DPPH em 100 mL de metanol) e armazenada sob proteção da luz. Para determinação da média de inibição do composto (IC₅₀) foram utilizadas diluições de EATS em cinco concentrações decrescentes (100, 50, 25, 12,5 e 6,15 ppm), em triplicata. As amostras foram preparadas (300 µL da diluição EATS + 2700 µL de solução de DPPH) e incubadas no escuro por 10 min, posteriormente foram lidas as absorbâncias a 517 nm no espectrofotômetro (721G Visible Spectrophotometer, Hangzhou Mindfull Technology Co., Ltd). Após o período de repouso, a leitura foi realizada utilizando a solução de DPPH sem a amostra como branco. O valor IC₅₀ é definido como a concentração da amostra de teste que conduz a uma redução de 50% da concentração de radicais livres e foi calculado através de uma curva de regressão não linear utilizando o *GraphPad Prism 7.0 software*. Foi expresso como µg do extrato/mL da solução final na solução de reação.

4.5 Estudo *in vivo*

4.5.1 Animais

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Tiradentes (UNIT) com o parecer de número 020517. O comprovante de submissão segue em anexo (Anexo 2).

Nesta pesquisa foram utilizados 40 ratos adultos, da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*, do sexo masculino, com 2-3 meses de idade, pesando entre 180 e 250 g. Estes foram acomodados em trios, em gaiolas de polipropileno padrão e com cama tipo maravalha. O ambiente foi mantido refrigerado e com controle de ciclo claro/escuro de 12 h. A fonte de alimentação foi por dieta padrão Labina® (Purina, São Paulo, Brasil), e também foi disponibilizada água, ambas sem restrições.

4.5.2 Grupos experimentais

Os 40 animais foram divididos em 5 grupos (n=8). Os grupos experimentais foram assim definidos: Grupo controle (SHAM): Veículo (Intracerebral) + veículo (por via oral); Grupo lesão: 6-OHDA + veículo; Grupos EATS: 6-OHDA + EATS 10 mg/kg; 6-OHDA + EATS 30 mg/kg; 6-OHDA + EATS 100 mg/kg. As induções intracerebrais foram realizadas por meio de microinjeção intraestriatal e o tratamento via oral por gavagem, onde a escolha das doses do EATS apoia-se na equação de Hill-Langmuir, curva dose resposta (GADAGKAR; CALL, 2015). O quadro 2 possibilita melhor visualização dos grupos experimentais e tratamento que foi recebido:

GRUPO (n=8)	INDUÇÃO VIA CEREBRAL	TRATAMENTO VIA ORAL
Controle	Veículo 1	Veículo 2
6-OHDA	6-OHDA	Veículo 2
EATS 10	6-OHDA	EATS 10 mg/kg
EATS 30	6-OHDA	EATS 30 mg/kg
EATS 100	6-OHDA	EATS 100 mg/kg

Quadro 2: Organização dos grupos experimentais. Onde Veículo 1= Solução salina contendo ácido ascórbico a 0,2%; Veículo 2= água destilada.

4.5.3 Procedimento cirúrgico

Inicialmente os animais foram pesados e então anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (100 mg/kg), volume de 0,05 mL/100 g de massa corporal do animal. Posteriormente, foram submetidos à tricotomia da região superior da cabeça, nesta localidade foi administrado cloridrato de lidocaína por via dérmica e por via subcutânea (0,1 mL). Posicionados no aparelho estereotáxico (Insight, Brasil), tiveram mandíbula e ossos temporais fixados. Para prevenção do ressecamento das córneas, foi colocado algodão embebido de água destilada nos olhos dos animais. A

assepsia do local foi realizada com uma solução de álcool iodado. Em seguida, foram submetidos à uma incisão sagital de 15 mm com auxílio de bisturi estéril. O perióstio foi raspado com cautela para exposição do crânio e visualização do Bregma.

Para realização da microinjeção no estriado direito, foi tomado como ponto zero o Bregma e alinhado às coordenadas estabelecidas por Sampaio *et al.* (2017): anteroposterior (AP): +1,0; médio-lateral (ML): +3,0; dorsoventral (DV): -5,0 (figura 13). Através de microseringa *Hamilton* (10 μ L) conectada à bomba de infusão automática (Insight, Brasil) foi administrado 6-OHDA (Sigma-Aldrich, Brasil) (20 μ g/3 μ L) diluída em solução salina 0,9% contendo 0,2% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Brasil). A microinjeção foi realizada a uma taxa de infusão de 1 μ L/min. A cânula conectada à microseringa através de tubo de polietileno (PE 10) foi mantida por 5 min para evitar refluxo.

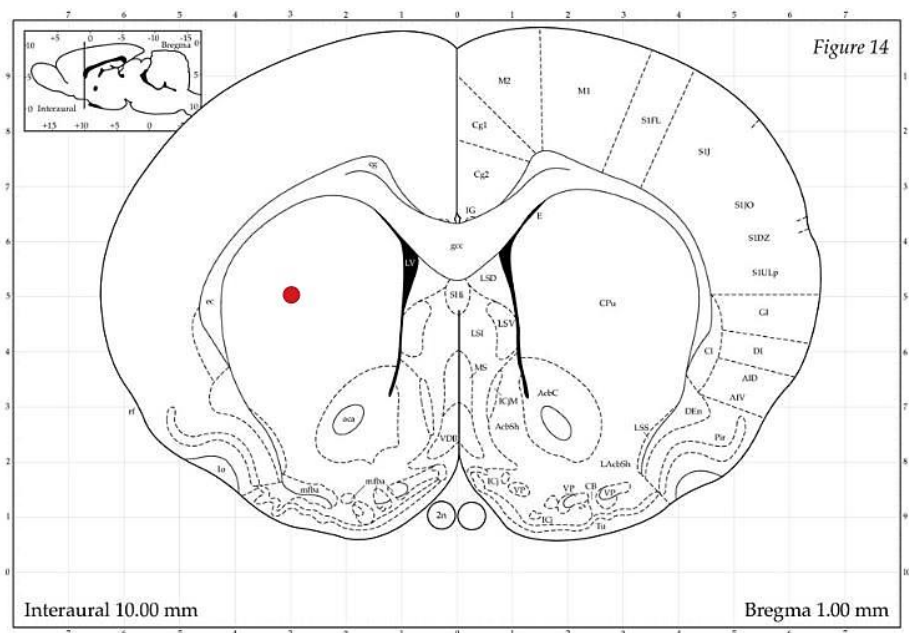


Figura 13: Corte sagital do encéfalo com as coordenadas referidas (em vermelho). Adaptado de Paxinos *et al.*, (2006)

O grupo controle também foi submetido ao procedimento supracitado, no entanto recebeu solução salina ao invés da 6-OHDA. Finalizado o procedimento cirúrgico, foi realizada sutura com fio de poliglactina 910, 5-0 (*PolySuture*®). E foi aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA, 0,2 mL/kg). Os animais foram aquecidos por uma lâmpada de 60 W até recuperação anestésica.

4.5.4 Avaliações funcionais e comportamentais

Os animais foram submetidos a três testes comportamentais diferentes, os quais foram escolhidos com embasamento científico (em relação à progressão da lesão) e foram cuidadosamente alocados para evitar coincidência no desenho experimental. O delineamento pode ser melhor visualizado na linha do tempo ilustrada abaixo (figura 14).

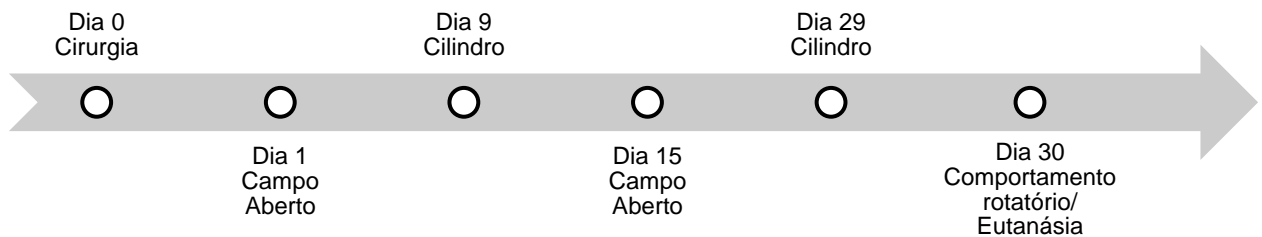


Figura 14: Linha do tempo com delineamento das avaliações funcionais e comportamentais

4.5.4.1 Teste de campo aberto

Conforme Martins *et al.* (2016), o teste foi realizado com 24 horas e 15 dias após a lesão, afim de acompanhar a progressão da mesma. A avaliação ocorreu em uma arena de madeira de 4.355 cm², cujas laterais medem 35 cm de altura e a base é subdividida em 16 quadrantes (figura 15). A mesma foi limpa com álcool a 20% entre um teste e outro para que o cheiro do animal anterior não influenciasse no posterior. O teste foi realizado com todos os animais, de forma individual e teve duração de 5 min.

Foram utilizados quatro parâmetros para avaliação: (a) *Crossings* – comportamento de exploração horizontal, quantidade de quadrantes percorridos pelo animal sobre as quatro patas; (b) *Rearing* – exploração vertical, vezes que o animal fica apenas com as patas posteriores; (c) Defecação – quantidade de bolos fecais expelidos ao longo do teste (WALSH; CUMMINS, 1976).

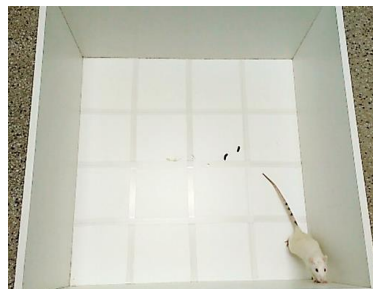


Figura 15: Fotografia do equipamento de campo aberto utilizado, com animal realizando exploração vertical. Fonte: Arquivo próprio, 2018.

4.5.4.2 Teste de comportamento rotatório

Foi realizado em uma arena circular com 31 cm de diâmetro e laterais com 13 cm de altura, com maravalha (figura 16). No 30º dia após lesão nigroestriatal (REAL *et al.*, 2013), as rotações foram induzidas com 0,5 mg/kg por via subcutânea (PADOVAN-NETO *et al.*, 2009; REAL *et al.*, 2013; SU *et al.*, 2018). Cada animal foi avaliado durante 60 min e teve seu registrado o número de giros contra e homolaterais à lesão (GOMES; DEL BEL, 2003).



Figura 16: Fotografia do equipamento do teste de comportamento rotatório. Fonte: Arquivo próprio, 2018.

4.5.4.3 Teste do cilindro

Conforme metodologia adaptada de Real *et al.*, (2017), os animais foram acomodados individualmente em um cilindro transparente medindo 30 cm de altura e 16 de diâmetro, atrás do cilindro foram posicionados dois espelhos afim de permitir uma visão 360º (figura 17), cujo foi limpo com álcool a 20% entre um teste e outro para evitar que o cheiro influenciasse. As avaliações ocorreram no 9º e 29º dia pós cirúrgico, onde cada teste durou 5 min e foi registrado em vídeo.



Figura 17: Fotografia do equipamento do teste do cilindro com animal realizando toque contralateral à lesão. Fonte: Arquivo próprio, 2018.

Conforme a metodologia de Boix *et al.* (2015), os toques na parede do cilindro foram quantificados quando realizados com o membro dianteiro contralateral ou homolateral, sendo que os toques simultâneos foram excluídos. A porcentagem dos toques contralaterais se dá pela equação 2:

$$(2) \quad \%Tc = \frac{Tc}{Th+Tc} \times 100$$

Onde: Tc = Toques contralaterais; Th = Toques homolaterais.

4.6 Eutanásia e preparo histológico

Seguindo a Resolução normativa nº 37 do CONCEA (2018), os animais foram eutanasiados com sobredosagem de anestésicos, cloridrato de cetamina (300 mg/kg) e cloridrato de xilazina (30 mg/kg), por via intraperitoneal. Os encéfalos, fígados e rins foram retirados por meio de dissecação, acomodados em formalina a 10% por 7 dias, passaram por processamento histológico automatizado no Lupetec (modelo PT09 TS) e foram incluídos em parafina. Neste processamento, o material foi desidratado em série alcoólica crescente, diafanizados em série de xilóis e impregnado por parafina, após a impregnação o material foi incluído em parafina a 55-60°C afim de formar blocos rígidos.

Os blocos foram então levados ao micrótomo MR2014 (O patologista, Brasil), para fornecer os cortes de 5 µm de espessura. Após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar no banho histológico digital (modelo BH201, Lupetec, Brasil), onde posteriormente foram colocados sobre em lâminas gelatinizadas e levados para secar em estufa à 37°C.

4.7 Avaliação histopatológica de toxicidade subaguda

Sinais de toxicidade subaguda no fígado e nos rins do animal decorrentes da lesão e da sua associação com os tratamentos foram analisadas por meio da coloração de hematoxilina-eosina (HE) seguindo a rotina das técnicas laboratoriais com metodologia de Barbosa *et al.* (2015).

As lâminas passaram por processo de desparafinização, hidratação, coloração, desidratação e diafanização, para melhor explanação, o protocolo da coloração por hematoxilina-eosina (HE) foi descrito na figura 18.

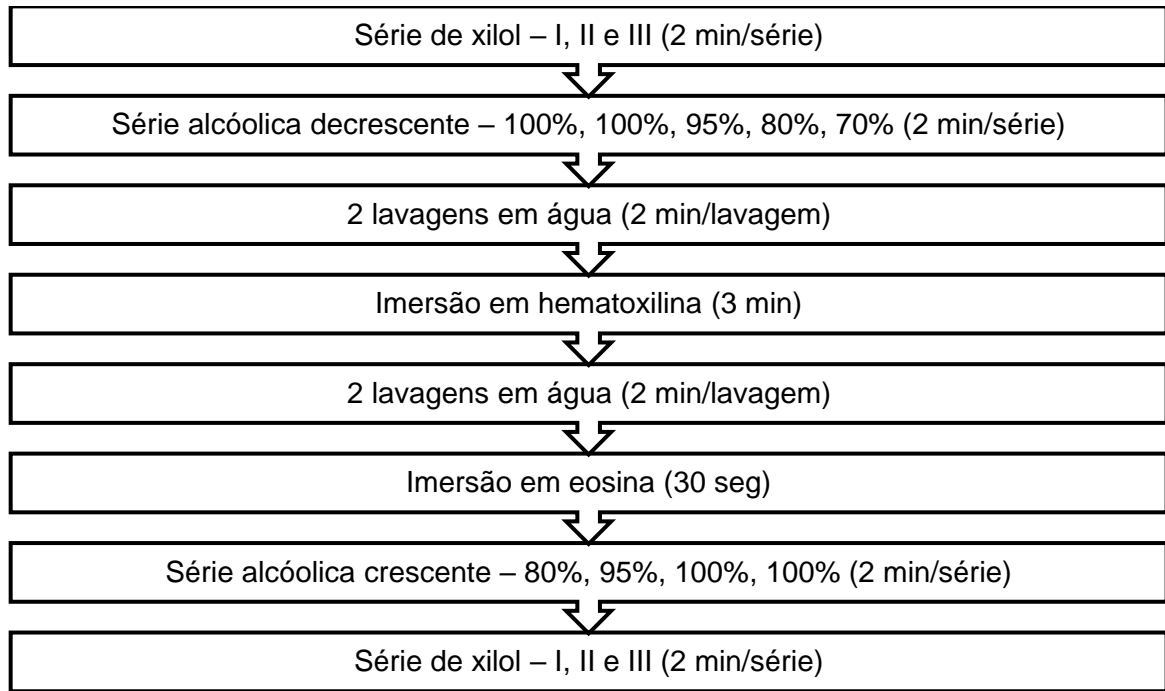


Figura 18: Protocolo da coloração por hematoxilina-eosina. Adaptado de Barbosa *et al.* (2015).

4.8 Análise imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi realizada para marcar a expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) e para proteína glial fibrilar ácida (GFAP). As lâminas com cortes encefálicos foram submetidas a desparafinização, desidratatação, lavagem com tampão fosfato (*phosphate buffered saline* (PBS) 0,1 M, pH 7,4) e recuperação antigênica em forno de micro-ondas com tampão citrato (pH 6,0) em 2 ciclos de 5 min. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (H_2O_2 - 1% em PBS) e incubação com solução de bloqueio, Soro Albumina-Bovina 5% (Sigma-Aldrich, Sigma Chemical Co., St Louis, USA). A incubação *overnight* foi realizada com anticorpo primário monoclonal TH (produzido em camundongos, na diluição 1:500, clone TH-16, lote n° T2928, Sigma Aldrich Chemical Company, St Louis MO, USA) e com anticorpo monoclonal GFAP (produzido em camundongos, clone S206A-8, 1:100, lote SAB5201104; Sigma Aldrich Chemical Company, St Louis MO, USA). Seguida da incubação com anticorpo secundário (DAKO LSAB2 kit, DAKO Corp., Carpinteria, CA), conjugado com complexo streptavidina-peroxidase (DAKO Corp., Carpinteria, CA). Para revelação, as secções foram incubadas com o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (kit DAB, Vector Laboratories) diluído em tampão tris salino (*Tris-buffered saline*) (TBS) pH 7,4) com H_2O_2 (0,3%) e lavadas em água destilada. As lâminas foram desidratadas e diafinizadas, por fim as lamínulas foram afixadas com bálsamo do Canadá sobre as lâminas (BOIX *et al.*, 2015).

4.9 Quantificação de células TH⁺

As análises foram realizadas a partir das lâminas obtidas na imunohistoquímica para TH. As imagens foram obtidas através do microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera de vídeo Olympus. Foi utilizado o *software Image J*, do *National Institute of Health Image* [W. Rasband, domínio público *National Institute of Mental Health* (<http://rsb.info.nih.gov>)] para quantificação de corpos celulares marcados em toda a extensão da SNc. Para a quantificação de células TH⁺ foram selecionadas lâminas com 4±1 seções e SNc íntegras. Foram feitas imagens de todas as seções contidas nas lâminas, com ampliação de 100x onde foram visualizadas presença ou ausência de células imunorreativas no tecido. O resultado expressou-se pela média de neurônios correspondente às seções (PADOVANNETO *et al.*, 2015).

4.10 Densidade óptica relativa para TH e GFAP

Foram utilizadas as lâminas obtidas na imunohistoquímica para TH e para GFAP. As imagens foram obtidas através do microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera de vídeo Olympus. O *software Image J* foi utilizado para verificação da densidade óptica relativa, como parâmetro foi aplicada uma escala de cinza variando de 0 a 255, onde 0 é a cor mais escura e representa a maior intensidade. Em cada seção foram avaliados três os quadrantes do núcleo estriado: dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral. As médias das áreas foram divididas pelo córtex, que foi definido como área controle. Os resultados expressaram-se pela porcentagem da densidade óptica do lado ipsilateral em relação ao lado contralateral (MORI *et al.*, 2017).

4.11 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Por apresentarem distribuição gaussiana, a análise de rendimento global, de ácidos fenólicos, de flavonoides totais, do teste de comportamento rotatório e a densidade óptica relativa (TH e GFAP) foram realizadas por análise de variância (ANOVA) de uma via com pós teste de Bonferroni. Os testes de campo aberto e do cilindro também apresentaram distribuição gaussiana e foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós teste de Bonferroni. A contagem de células TH⁺ foi analisada por Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $p < 0,05$. Foi utilizado o *software Graph Pad Prism* versão 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 Cinética de extração

A ELP foi realizada para determinar a cinética de rendimento global de extração ao longo do tempo/volume de solvente a partir de 2 g de folhas de *T. spathacea*. Os resultados preliminares sugerem uma redução da concentração do EATS, evidenciada pela descolorização dos extratos obtidos (figura 19).

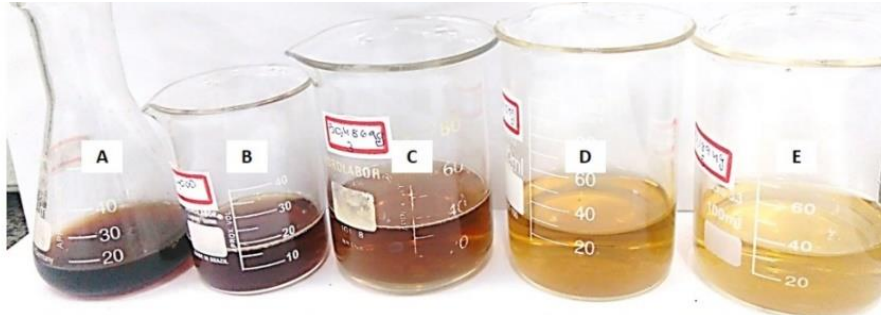


Figura 19: Aparência do extrato obtido por ELP nos diferentes tempos: (A) 15 min/15 mL; (B) 30 min/30 mL; (C) 60 min/60 mL; (D) 120 min/120 mL; (E) 180 min/180 mL. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A cinética de rendimento global de extração por ELP apresentada na figura 20, estão de acordo com os dados mostrados na figura 19. Assim as figuras 19 e 20 respectivamente indicam uma tendência à estabilização da cinética a partir de 60 min (observa-se um platô na curva), entre este e o último tempo analisado (180 min) só há alteração de aproximadamente 4%. Por este motivo, o tempo de 60 min/60 mL de solvente foi considerado o mais viável da cinética. Com isso, foi selecionado para as extrações de compostos bioativos das folhas de *T. spathacea*. Esta melhor condição experimental corresponde a proporção biomassa/solvente de 1:30 (m/v), (biomassa inicial de 2 g e vasão de 1 mL/min).

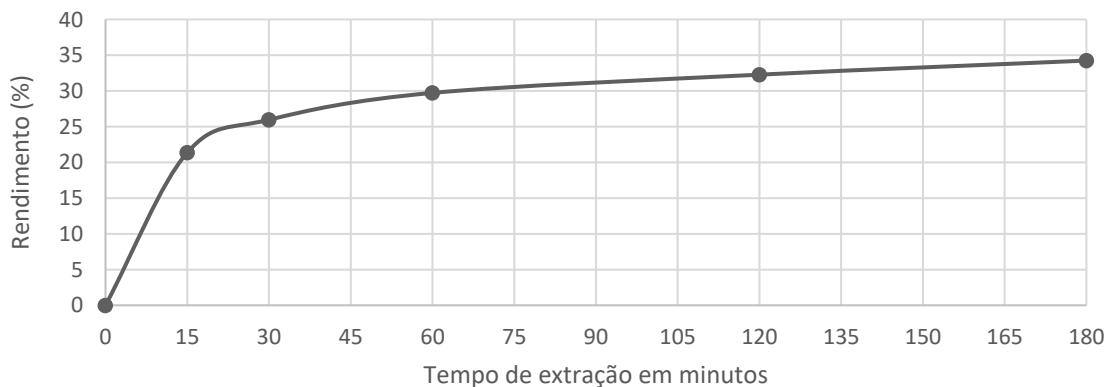


Figura 20: Gráfico da cinética de rendimento da extração por ELP, com os tempos pré estabelecidos, 15, 30, 60, 120 e 180 min.

5.2 Caracterizações dos extratos

Os extratos foram caracterizados quanto ao rendimento global, quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides totais (tabela 3). Para análise do rendimento global, foi realizada ANOVA de uma via [$F(3, 8) = 721,6$; $p < 0,0001$], com pós-teste de Bonferroni. As extrações por ELP (1:90 X 1:30) apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,0001$), onde a ELP 1:90 teve o melhor rendimento, e em relação às infusões ($p < 0,0001$). As duas extrações por infusão foram as de menor rendimento e não apresentaram diferença estatística ($p > 0,9999$) entre si.

Os dados da quantificação de ácidos fenólicos foram avaliados por ANOVA de uma via [$F(3, 8) = 324,7$; $p < 0,0001$], com pós teste de Bonferroni e todos apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,0001$). A infusão 1:30 (m/v) apresentou aumento significativo no quantitativo de ácidos fenólicos em relação a todos extratos obtidos.

Quanto à análise de flavonoides totais, os dados foram avaliados por ANOVA de uma via [$F(3, 8) = 49,43$; $p < 0,0001$], com pós teste de Bonferroni. As extrações com maior volume de solvente (ELP 1:90 e infusão 1:50) apresentaram médias sem diferença significativa entre si ($p = 0,1034$), assim como aumento significativo no quantitativo de flavonoides em relação aos extratos com menor volume de solvente (ELP 1:30 e infusão 1:30), que também apresentaram médias sem diferença estatística entre si ($p = 0,2398$).

Tabela 3: Caracterização dos extratos

Extratos	Rendimento (%)	Ácidos fenólicos	Flavonoides
ELP 1:30	29,13 ± 0,55 _a	20,12 ± 0,264 _a	26,22 ± 1,1 _a
ELP 1:90	34,07 ± 0,90 _b	9,52 ± 0,19 _b	38,92 ± 2,39 _b
INF 1:30	21,63 ± 0,25 _c	31,68 ± 1,539 _c	29,08 ± 0,54 _c
INF 1:50	21,53 ± 0,41 _c	16,82 ± 0,759 _d	34,43 ± 0,95 _d

Os valores são expressos por média ± desvio padrão (n=3). Letras diferentes indicam diferença significativa, onde $p < 0,05$.

5.4 Atividade antioxidante

Considerando a importância dos ácidos fenólicos assim como dos flavonoides para o estudo, o extrato realizado por infusão com proporção 1:30 (m/v) foi selecionado para aplicação *in vivo* por apresentar quantidades significativas em ambas quantificações. Sendo assim, a análise do potencial antioxidante foi avaliada somente neste extrato, que a partir de então será chamado de EATS, em cinco concentrações (figura 21).



Figura 21: Fotografia da aparência das soluções com EATS em concentração decrescente, da esquerda para direita, na análise do potencial antioxidante. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

A capacidade inibitória de 50% (IC_{50}) do EATS foi de $16,7 \pm 1,9 \mu\text{g/mL}$. Na concentração máxima testada (100 ppm), o EATS foi capaz de inibir 81,3% dos radicais livres. As porcentagens de inibição de acordo com a concentração utilizada no DPPH podem ser melhor visualizadas na tabela 4.

Tabela 4: Concentrações testadas e suas respectivas porcentagens de inibição, onde são expressos por média \pm desvio padrão ($n=3$).

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%)
100	$81,3 \pm 0,6$
50	$71,9 \pm 5,4$
25	$52,4 \pm 4,2$
12,5	$45,1 \pm 9,2$
6,125	$33,6 \pm 2,9$

5.3 Teste de campo aberto

Para análise dos resultados do teste de campo aberto foi realizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós teste de Bonferroni. Na avaliação das explorações horizontais (figura 22), houve interação significativa entre os tempos analisados e os tratamentos [$F(4, 35) = 3,052$; $p = 0,0294$], no entanto, sem diferenças significativas entre os tempos [$F(1, 35) = 0,5456$; $p = 0,3724$]. Houveram diferenças significativas entre os tratamentos [$F(4, 35) = 9,271$; $p < 0,0001$].

No 1º dia após a lesão, foi observada diminuição significativa nas explorações horizontais nos grupos 6-OHDA, EATS 10, EATS 30 e EATS 100 quando comparados com o controle (não lesionado). Contudo, os grupos lesionados com 6-OHDA mostraram médias estatisticamente iguais entre si. No 15º dia, os animais que receberam a toxina por

microinjeção intracerebral ainda apresentaram médias significativamente menores que as do grupo controle, exceto o grupo EATS 30 que apresentou elevação significativa nas explorações horizontais. O grupo EATS 100 foi diferente estatisticamente do EATS 30.

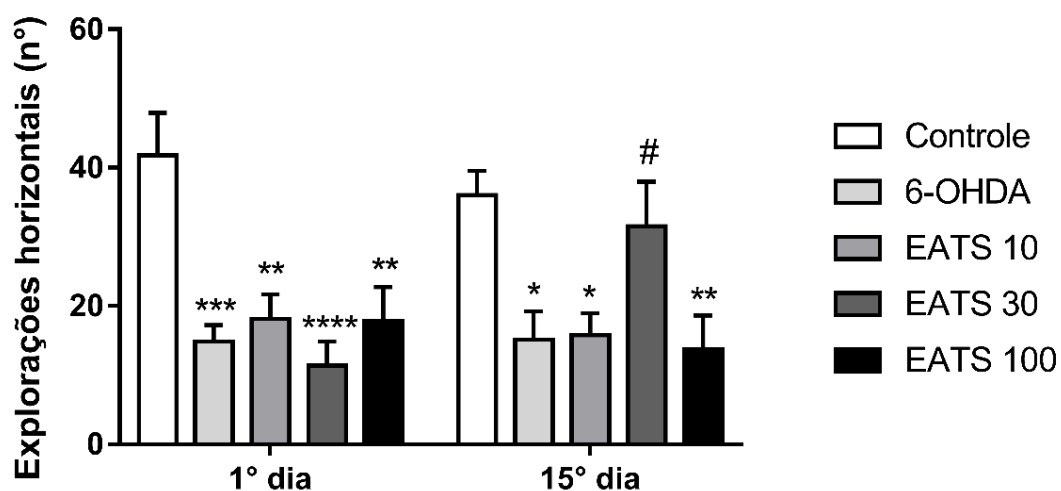


Figura 22: Resultado do campo aberto quanto ao parâmetro de explorações horizontais (*crossing*). * significa diferença estatística em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$), # significa diferença estatística em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,05$).

Quanto às explorações verticais (figura 23), a análise estatística evidenciou interação entre os tempos analisados e tratamentos [$F(4, 35) = 4,11$; $p = 0,0096$], mas não ocorreu o mesmo nas comparações entre os tempos [$F(1, 35) = 0,8547$; $p = 0,3860$]. Houveram diferenças significativas entre os tratamentos [$F(4, 35) = 4,191$; $p = 0,0088$].

No 1º dia, os grupos 6-OHDA, EATS 10, EATS 30 e EATS 100 mostraram diminuição significativa das médias de explorações verticais quando comparados ao grupo controle. No 15º dia após a lesão, os grupos que foram tratados com o EATS 10, EATS 30 e EATS 100 mostraram aumento nas explorações verticais, sendo semelhantes ao grupo controle. Os animais do 6-OHDA encontraram dificuldade na recuperação dos *rearings*, apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle, e o grupo EATS 30 apresentou aumento significativo comparado ao 6-OHDA.

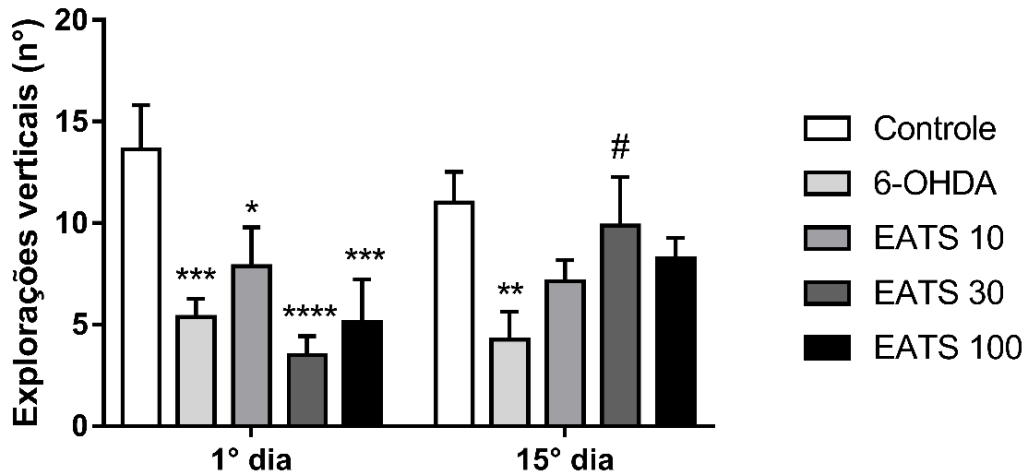


Figura 23: Resultado do campo aberto com o parâmetro exploração vertical (*rearing*). * significa diferença estatística em relação ao controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$), # significa diferença estatística em relação ao 6-OHDA ($p < 0,05$).

Ao analisar as comparações entre as médias de bolos fecais (figura 24) durante o teste de campo aberto, observou-se que não houve nem interação entre os tempos e tratamentos [F (4, 35) = 1,897; $p = 0,1328$] nem diferença significativa entre os tempos [F (1, 35) = 1,51; $p = 0,2273$], porém houve diferença significativa entre os tratamentos [F (4, 35) = 6,479; $p = 0,0005$]. Na primeira avaliação, nenhum grupo expressou diferença significativa em relação ao controle, mas o mesmo não ocorreu o grupo EATS 100 apresentou perfil diferente do grupo 6-OHDA e EATS 10, eliminando menos bolos fecais. Na segunda avaliação, o grupo 6-OHDA apresentaram aumento significativo em relação ao grupo controle. Os animais do grupo EATS 100 permaneceram apresentando diferença significativa do grupo 6-OHDA.

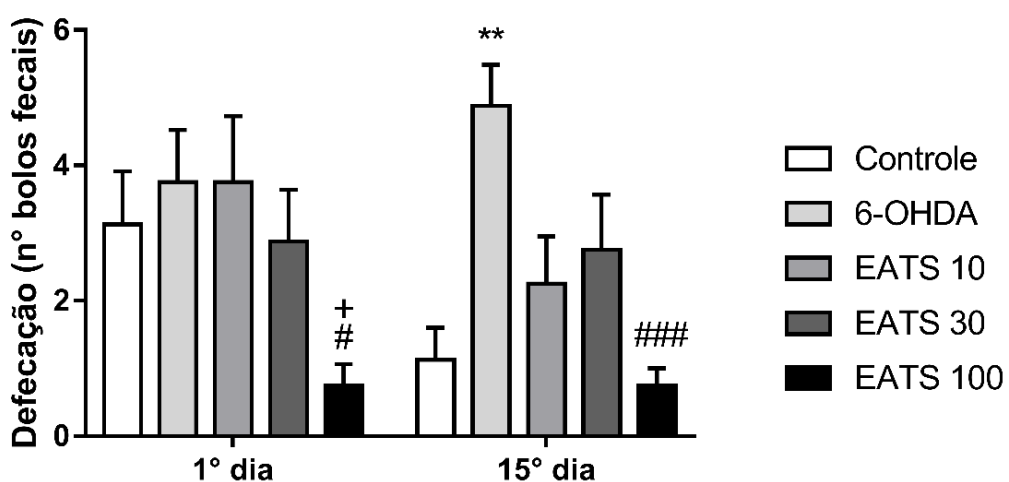


Figura 24: Resultado do campo aberto, considerando os bolos fecais eliminados durante o teste. ** significa diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,01$); # aponta diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA (# $p < 0,05$; ### $p < 0,001$). + aponta diferença significativa em relação ao EATS 10 ($p < 0,05$).

5.4 Teste do cilindro

Foi realizada ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós teste de Bonferroni (figura 25), onde não houve interação entre os tempos (dias de tratamento) e tratamentos [$F(4, 35) = 0,286$; $p = 0,8851$], no entanto houve para os tratamentos [$F(4, 35) = 4,443$; $p = 0,0052$]. Não houve diferença significativa nos tempos [$F(1, 35) = 1,112$; $p = 0,2990$]. Não foi evidenciada diferença estatística entre os grupos nem no 9º nem no 29º dia, embora os animais controle e os que receberam EATS apresentaram um percentual de toques contralaterais mais elevado do que os animais lesionados e tratados somente com veículo.

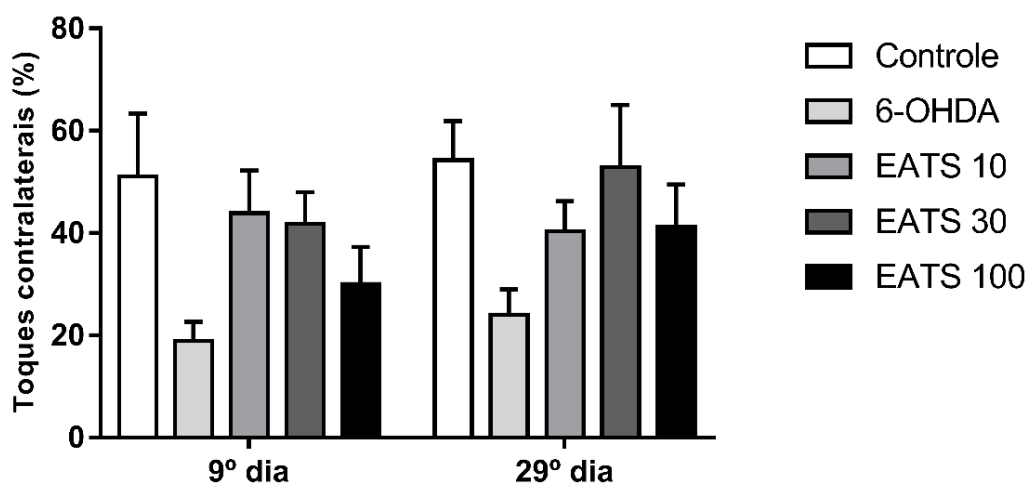


Figura 25: Resultado do teste do cilindro. Considerando $p < 0,05$.

5.5 Teste de comportamento rotatório

Foi realizada ANOVA de uma via com pós teste de Bonferroni (figura 26), onde $F(4, 35) = 4,93$ e $p = 0,0029$. Os animais do EATS 10, EATS 30 e EATS 100 apresentaram comportamento semelhante ao grupo controle, efetuando menos rotações contralaterais, sendo iguais estatisticamente ao mesmo, logo, somente o grupo 6-OHDA apresentou diferença significativa comparado ao controle. Quando os grupos lesionados são comparados, constata-se que os tratados com EATS 100 mostram diminuição significativa em relação ao tratado com veículo (6-OHDA). Os extratos, quando comparados entre si, permaneceram iguais estatisticamente.

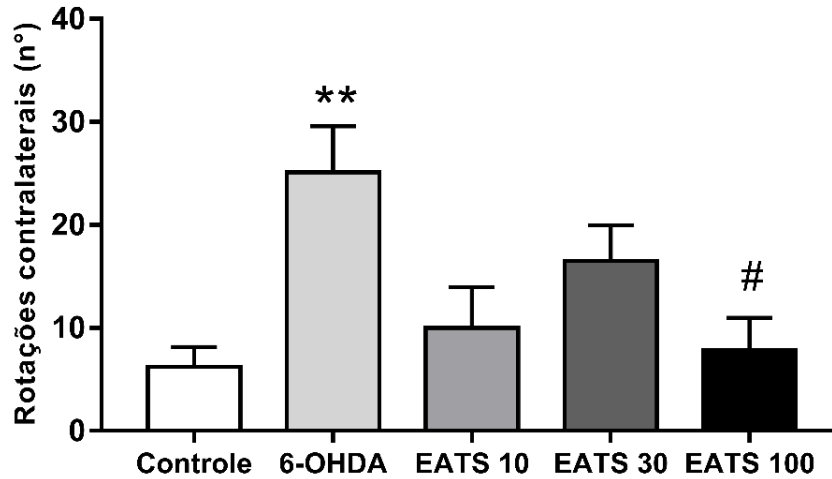


Figura 26: Resultado do comportamento rotatório, considerando as rotações contralaterais. ** aponta diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,01$); # aponta diferença significativa em relação ao 6-OHDA ($p < 0,05$).

5.6 Análise histológica

Ao analisar histologicamente as amostras dos fígados e rins dos animais, não foram encontradas alterações que pudessem indicar toxicidade subaguda em nenhum dos grupos experimentais (figura 27). Os fígados estavam com homogeneidade de aspecto e hepatócitos com núcleos íntegros. Os rins também apresentaram-se homogêneos, com corpúsculos renais, cápsulas de Bowman e túbulos contorcidos íntegros.

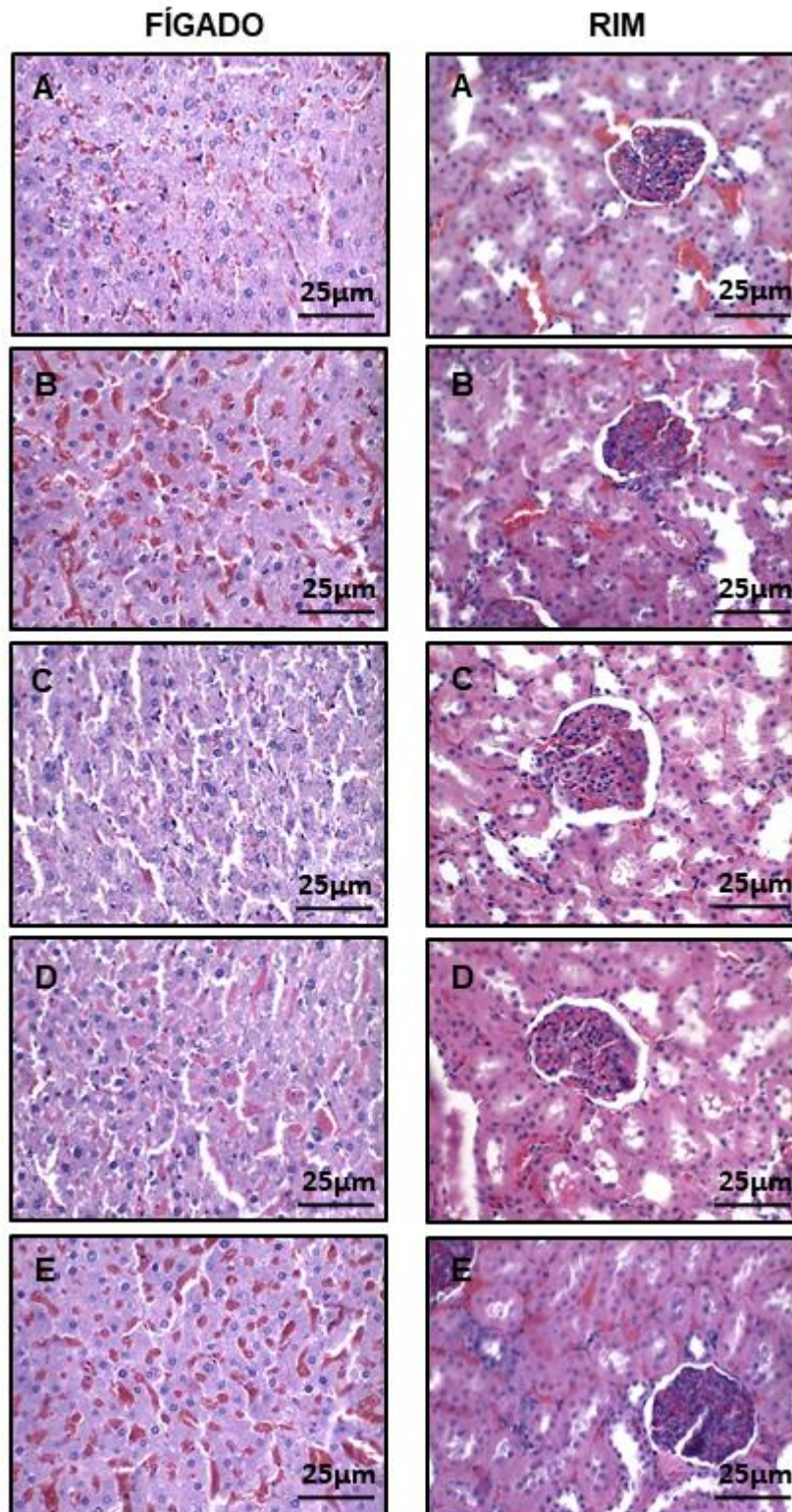


Figura 27: Fotomicrografias de tecido de fígado (esquerda) e rins (à direita) utilizados para avaliação histopatológica (400x) dos animais estudados. Grupo controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* (EATS) 10 mg/kg (C), 30 mg/kg (D) e 100 mg/kg (E).

5.7 Contagem de células TH⁺

. Na figura 28 podem-se visualizar fotomicrografias (100x) da SNc dos respectivos grupos estudados, onde as médias da contagem de neurônios TH⁺ nos grupos foram analisadas por Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (figura 29), onde $p < 0,0001$. Os grupos 6-OHDA e EATS 10 apresentaram redução significativa nos neurônios imunorreativos em comparação ao grupo controle. Os animais tratados com EATS 100 apresentaram elevação significativa em relação ao grupo 6-OHDA

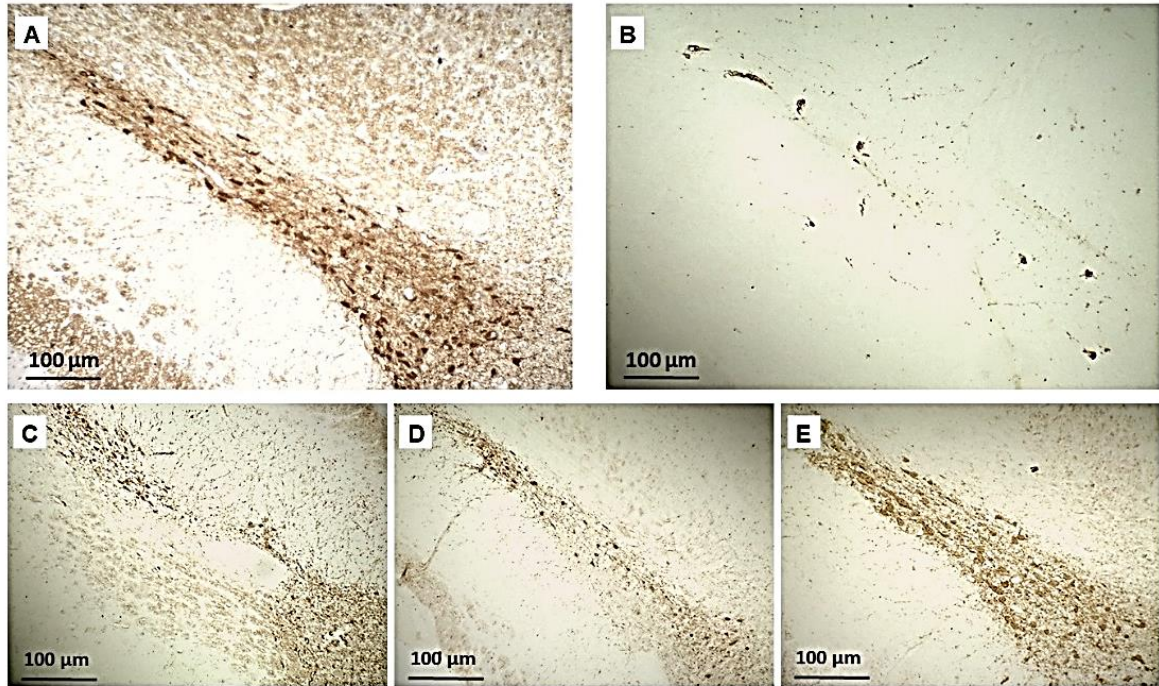


Figura 28: Fotomicrografias (100x) de neurônios imunorreativos para enzima TH na SNc dos animais estudados. Grupo controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* (EATS) 10 mg/kg (C), 30 mg/kg (D) e 100 mg/kg (E).



Figura 29: Resultados da quantificação de neurônios imunorreativos presentes na análise do lado lesionado (direito) da substância negra compacta. * significa diferença em relação ao controle (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$), #### significa diferença estatística em relação ao 6-OHDA ($p < 0,0001$).

5.8 Densidade óptica relativa TH

Foi realizada ANOVA com pós teste de Bonferroni [$F(4, 25) = 13,95$, $p < 0,0001$]. A densidade óptica relativa para TH (figura 30) do núcleo estriado evidenciou redução significativa na porcentagem das fibras positivas TH+ no grupo 6-OHDA ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. Nos animais tratados com EATS 10 ($p = 0,0007$), EATS 30 ($p = 0,0007$) e EATS 100 ($p = 0,0004$) houve aumento significativo em comparação ao grupo 6-OHDA. Os grupos de EATS não apresentaram diferença estatística em relação ao controle, nem entre si.



Figura 28: Densidade óptica relativa para enzima tirosina-hidroxilase (TH+) no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. **** indica diferença significativa em relação ao controle ($p < 0,0001$); ### indica diferença significativa em relação ao 6-OHDA ($p < 0,001$).

5.9 Densidade óptica relativa GFAP

Na figura 31 podem-se visualizar fotomicrografias (400x) do núcleo estriado dos respectivos grupos estudados, onde foram realizadas ANOVA por pós teste de Bonferroni. Na densidade óptica para GFAP (figura 32) foi observado um aumento significativo de expressão astrocitária no grupo 6-OHDA ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle. Diferente do grupo 6-OHDA, os animais tratados com EATS 10 ($p < 0,0001$), EATS 30 ($p < 0,0001$) e EATS 100 ($p < 0,0001$) apresentaram redução na expressão astrocitária, assemelhando-se ao grupo controle.

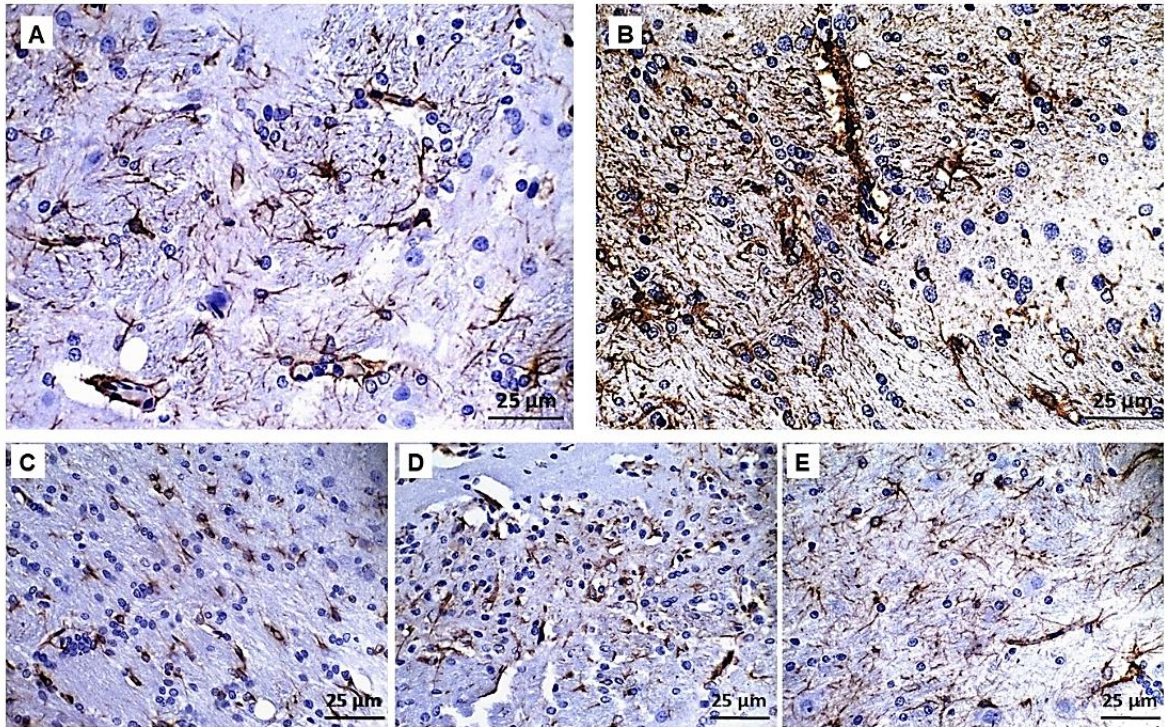


Figura 31: Fotomicrografias (400x) de astrócitos imunorreativos para proteína GFAP no núcleo estriado dos animais estudados. Grupo controle (A), 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (B), extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* (EATS) 10 mg/kg (C), 30 mg/kg (D) e 100 mg/kg (E).

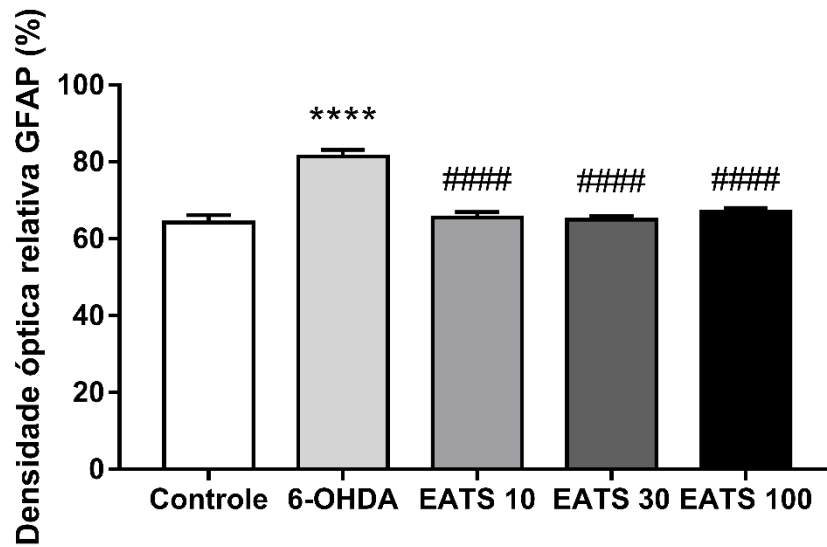


Figura 32: Densidade óptica relativa para proteína glial fibrilar ácida no núcleo estriado, em relação ao lado contralateral à lesão. As colunas representam as médias e as barras o erro padrão da média. **** indica diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,0001$); #### indica diferença significativa em relação ao grupo 6-OHDA ($p < 0,0001$).

6 DISCUSSÃO

A infusão foi um dos métodos selecionados para obtenção dos extratos nesta pesquisa, e está associada ao aumento na extração de compostos fenólicos e atividade antioxidante (CITTAN *et al.*, 2018). A ELP foi o outro método de extração utilizado, associada ao aumento no rendimento comparado às extrações convencionais (BENAYAD *et al.*, 2014; MONTE *et al.*, 2014), corroborando com a literatura, as ELP obtiveram os melhores rendimentos neste estudo comparadas às infusões. Comparando com outros métodos de extração para a mesma espécie vegetal, todos extratos obtidos neste estudo foram superiores aos encontrados na literatura, onde foram relatados rendimentos de 2,8 a 8,37% utilizando-se a técnica de decocção (LUCIANO-MONTALVO *et al.*, 2013; ROSALES-REYES *et al.*, 2008), 3,4% por rotaevaporação (SRIWANTHANA *et al.*, 2007) e 17,9% por *Soxhlet* (MENA-REJON *et al.*, 2009).

O maior quantitativo de flavonoides foi obtido na ELP 1:90 (m/v), no entanto este extrato apresentou o menor valor de compostos fenólicos. Em contrapartida, o maior quantitativo de compostos fenólicos foi obtido através da infusão 1:30 (m/v), corroborando com CITTAN *et al.* (2018), esta técnica também proporcionou um valor significativo de flavonoides totais, fortalecendo a escolha deste extrato para aplicação no ensaio *in vivo*.

Quando comparados com a literatura, tanto as infusões quanto as ELP proporcionaram melhor obtenção de compostos fenólicos que o extrato metanoico obtido no estudo de Sánchez-Roque *et al.* (2017) e a infusão utilizada na pesquisa de García-Varela *et al.* (2015), que obtiveram valores de 2,3 mg/g e 8,5 mg/g respectivamente. O extrato metanoico obtido no estudo de Tan *et al.* (2014) apresentou 20,4 mg/g, valor maior que o obtido na ELP 1:90 (m/v) e na infusão 1:50 (m/v), semelhante à ELP 1:30 (m/v) e menor que o obtido por infusão 1:30 (m/v). Suscitando que o processo de cinética permitiu otimizar a extração de compostos fenólicos, tendo em vista que que a de 1 g de biomassa/30 mL de solvente proporcionou melhores resultados.

A infusão com menor volume de solvente por biomassa (1:30 m/v) obteve mais fenóis quando comparada a *Rhoeo bermudensis* (29,6 mg/g), *Tradescantia pallida* (15,3 mg/g), *Callisia fragrans* (26,9 mg/g), ambas pertencentes a família Commelinaceae. Esta infusão também apresentou mais compostos fenólicos que 33 das 35 ervas e plantas medicinais analisadas por Kahkonen *et al.* (1999), possuindo menos que a *Calluna vulgaris* (36 mg/g) e a *Lythrum salicaria* (42,1 mg/g). García-Varela *et al.* (2015) encontrou mais compostos fenólicos nas extrações de *T.spathacea* com água, seja em ebulição (16,9 mg/g) ou não (8,5 mg/g) do que nas que utilizou metanol (1,5 mg/g), etanol (1,6 mg/g), acetato de etila (9,4

mg/g), acetona (5,5 mg/g), éter de petróleo (1,4 mg/g), clorofórmio (1,7 mg/g) e hexano (0,7 mg/g), corroborando que o uso da água como solvente nesta pesquisa foi uma boa escolha.

Os métodos de extração utilizados (infusão e ELP) proporcionaram maior obtenção de flavonoides que os extratos de Sánchez-Roque *et al.* (2017) e Tan *et al.* (2014), com 0,7 mg/g e 10,8 mg/g respectivamente. A última literatura citada também mostra que a *T.spathacea* possui mais flavonoides totais quando comparada com outras plantas da família Commelinaceae, como a *Rhoeo bermudensis* (18,4 mg/g), *Tradescantia pallida* (10,6 mg/g), *Callisia fragrans* (2,5 mg/g) e a *Tradescantia zebrina* (17,1 mg/g).

O alto teor de compostos fenólicos encontrado no EATS pode estar relacionado às ações neuroprotetoras (diminuição de déficits comportamentais e aumento do número de neurônios dopaminérgicos após lesão) observadas no presente trabalho. Em trabalhos anteriores, foram identificados por análise cromatográfica a presença de flavonoides como a rutina, epigallocatequina, quecertina e rhoenina (TAN *et al.*, 2015), além de ácidos fenólicos como o ácido vanílico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido gálico (GARCIA-VARELA *et al.*, 2016) na *T.spathacea*. Estes compostos estão associados à atividade antioxidante e neuroprotetora, aumentando a SOD, catalase e glutathione, amenizando a peroxidação lipídica, reduzindo TNF- α , AChE e corticosterona (MAGALINGAM *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2018).

Com relação à atividade antioxidante, houveram limitações para encontrar resultados de IC₅₀ da *T.spathacea* na literatura devido à escassez de estudos publicados referentes ao conteúdo. Em estudo com a *Commelina benghalensis*, também da família Commelinaceae, Sahu *et al.* (2013) estudaram a atividade antioxidante, onde a capacidade inibitória de 50% foi 32,92 μ g/mL (metanol), 32,31 μ g/mL (etanol) e 35,62 μ g/mL (hexano). A atividade antioxidante em produtos naturais tem sido relacionada ao efeito neuroprotetor de extratos (KIASALARI *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2016), fato que está associado à fisiopatologia da doença, em que o estresse oxidativo tem papel majoritário (BHAT *et al.*, 2015; KAUR *et al.*, 2018).

No ensaio *in vivo* foram realizados testes com os animais para avaliação funcional, o teste de campo aberto foi utilizado com a finalidade de avaliar atividade locomotora e comportamental associada à ansiedade (SU *et al.*, 2018). Conforme esperado, em ambos um e quinze dias após a lesão, os animais que receberam 6-OHDA apresentaram uma redução significativa na locomoção espontânea (CARVALHO *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2016; ANTIPOVA *et al.*, 2017), indicando que os déficits motores do modelo animal induzido por esta toxina, amplamente utilizado (BLANDINI, 2008), foram reproduzidos no presente estudo. Com 15 dias, os animais que receberam EATS 30 mg/kg expressaram um aumento significativa nas explorações horizontais e verticais. Tal resultado (diminuição de déficits

motores) é sugestivo de ação neuroprotetora. No entanto, os resultados do teste de comportamento rotatório e a avaliação da imunohistoquímica para TH mostraram que a dose de 100 mg/kg de EATS também foi eficaz em atenuar a perda de neurônios e fibras dopaminérgicas, além de diminuir a resposta astrocitária. A não observação de um efeito do EATS 100 mg/kg nos testes espontâneos poderia ser explicada pelo efeito ansiolítico do EATS a 100 mg/kg, evidenciado pela diminuição de defecações observado no teste de campo aberto desde tanto em 24h (administração aguda) quanto em 15 dias (administração subaguda), pois a análise de defecação durante o campo aberto visa avaliar os níveis de ansiedade nos animais submetidos ao teste (HALL, 1934). Vale destacar que a *T. spathacea* está listada como uma das plantas medicinais utilizadas para tratamento de ansiedade e depressão no México (GUTIERREZ *et al.*, 2014). Novamente, o aumento do número médio de bolos fecais expelido em animais lesionados pela 6-OHDA, indicando aumento de níveis de ansiedade em função da lesão (WALSH; CUMMINS, 1976).

Ainda na avaliação comportamental, no teste do cilindro os toques contralaterais são contabilizados com a finalidade de avaliar o uso espontâneo da pata dianteiras do animal avaliado. A preferência será pelo lado contralateral à lesão cerebral, visto que o membro afetado será o contralateral. Um animal é considerado saudável com TC iguais ou acima de 50% (BOIX *et al.*, 2015). O déficit motor manifestado no toque contralateral relaciona-se a depleção dopaminérgica no núcleo estriado e ação da via indireta dos núcleos da base, onde os estímulos GABAérgicos para o Gpe são elevados, desinibindo o NST e mantendo o córtex motor inibido, em consequência há redução na iniciação dos movimentos contralaterais (OBESO *et al.*, 2014). Neste experimento, a lesão foi estabelecida ao lado direito do núcleo estriado, então quanto mais lesionado o animal estiver ele optará pelo uso da pata dianteira direita e apresentará menor %TC, assim como quanto mais os efeitos da lesão estiverem reduzidos a pata esquerda começará a ser mais utilizada espontaneamente e o %TC se elevará. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre os grupos, o grupo tratado com EATS 30 mg/kg apresentou %TC acima de 50% (de maneira similar ao grupo controle), podendo ser considerado saudável. Estes resultados condizem com outros achados da literatura, em que a atividade neuroprotetora foi investigada com diferentes compostos, onde a pata contralateral foi utilizada cerca de 50% (RAUCH *et al.*, 2010; ANTIPOVA *et al.*, 2017).

As rotações contralaterais induzidas por apomorfina são avaliadas afim de verificar o prejuízo do sistema dopaminérgico após lesão por 6-OHDA, onde o quantitativo de rotações relaciona-se com a depleção de dopamina (LIMA *et al.*, 2017). O teste é realizado com 30 dias, visto que a lesão da via nigroestriatal em ratos é progressiva e evolui aproximadamente até a 4ª semana (DA SILVA *et al.*, 2016), onde as rotações contralaterais

são diretamente proporcionais à extensão da lesão (REAL *et al.*, 2017). As rotações são justificadas pela ligação da apomorfina (agonista dopaminérgico direto) aos receptores dopaminérgicos do tipo D2 no estriado, que aumentam em número e afinidade nos neurônios pós-sinápticos, privados de dopamina do núcleo estriado (KONIECZNY *et al.*, 2017). O grupo lesão apresentou um aumento significativo de rotações em comparação aos animais controles e aos tratados com EATS 100 mg/kg, indicando que o EATS em dose mais alta proporcionou neuroproteção frente à lesão com 6-OHDA.

Com a progressão da lesão na via nigroestriatal induzida por 6-OHDA a depleção de neurônios dopaminérgicos pode chegar até 85% e esta depleção se relaciona ao percentual de neurônios mortos na SNc (BLANDINI *et al.*, 2007). Neste estudo, foi observada uma perda significativa de neurônios e fibras dopaminérgicos no grupo 6-OHDA relevada pela redução da imunoreatividade para TH, corroborando que o modelo experimental escolhido foi efetivo (BATASSINI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). Concomitante a este achado, o grupo 6-OHDA apresentou aumento na expressão astrocitária. Esta resposta astrocitária reflete um processo inflamatório causado pela toxina e que pode ser observada mesmo após 3-4 semanas (MORI *et al.*, 2017). Os astrócitos são capazes de diminuir a formação de radicais livres, fornecer suporte estrutural e metabólico dos neurônios, assim como o auxílio na resposta imune (DE BOOTH *et al.*, 2017). Kuter *et al.* (2018) sugere que a disfunção astrocitária resulte em déficit no suporte metabólico dos neurônios dopaminérgicos, que fisiologicamente seriam capazes de sobreviver por um tempo, capacidade essa reduzida com a lesão por 6-OHDA.

Os tratamentos com EATS nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg proporcionaram recuperação significativa de neurônios na SNc e de fibras positivas TH+ no núcleo estriado, assim como redução da expressão astrocitária nos após a lesão induzida por 6-OHDA. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação do EATS frente à 6-OHDA envolve, ao menos em parte, ação anti-neuroinflamatória. Este efeito poderia ser atribuído, inclusive, aos compostos fenólicos encontrados em sua composição química. Estes compostos, principalmente os ácidos fenólicos e flavonoides, agem como antioxidantes exógenos e participam da modulação neuroinflamatória (ALMUTAIRI *et al.*, 2017; GHOSH *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2017).

Por fim, não foram observados sinais de toxicidade no fígado e rins dos animais estudados, este achado pode ser atribuído à toxicidade aguda da *T.spathacea* ser acima de 5000 mg/kg (TAN *et al.*, 2014), sendo assim classificado como categoria 5 pelo *Globally Harmonised System* (GHS), que engloba produtos que devem ser utilizados com cautela (OECD, 2001). No entanto, não pode-se afirmar que foi realizado ensaio de toxicidade

subaguda no EATS devido a não realização de etapas preconizadas pela Resolução n.90 da ANVISA, sendo uma limitação do presente estudo.

7 CONCLUSÃO

O EATS (INF 1:30), selecionado para aplicação *in vivo*, apresentou quantitativo satisfatório de ácidos fenólicos e flavonoides totais comparado à literatura, assim como atividade antioxidante (IC₅₀). Observou-se melhora na atividade motora após tratamento com EATS, sendo que a dose de 100 mg/kg mostrou efeito ansiolítico e reduziu os movimentos rotatórios contralaterais à lesão. Não foram observados sinais de toxicidade nos tecidos de rins e fígados dos animais estudados. O EATS nas três doses diminuiu a extensão da perda neuronal e diminuiu da resposta astrocitária. O tratamento com EATS, portanto, teve efeito neuroprotetor em modelo experimental para estudo da DP.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, A.; CAMACHO, R.; CHINO, S. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. *Instituto Mexicano del Seguro Social* 1994; 1: 30-35.
- ALMUTAIRI, M.M.; ALANAZI, W.; ALSHAMMARI, M.U.A.; ALOTAIBI, M.R.; ALHOSHANI, A.R., AL-REJAIE.; S.S. et.al Neuro-protective effect of rutin against Cisplatin-induced neurotoxic rat model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2017; 17:472
- ANTIPOVA, V.A.; HOLZMANN, C.; SCHMITT, O.; WREE, A.; HAWLITSCHKA, A. Botulinum Neurotoxin A Injected Ipsilaterally or Contralaterally into the Striatum in the Rat 6-OHDA Model of Unilateral Parkinson's Disease Differently Affects Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2017; 11(119): 1-17.
- AZMIR, J.; ZAIDUL, I. S. M; RAHMAN, M. M.; SHARIF, K. M.; MOHAMED, A.; SAHENA, F. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. *Journal of Food Engineering* 2013; 117(4): 426-436.
- BACH, J.P.; RIEDEL, O.; KLOTSCH, J.; SPOTTKE, A.; DODEL, R.; WITTCHE, H.U. Impact of complications and comorbidities on treatment costs and health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Journal of the Neurological Sciences* 2012; 314: 41-47.
- BARBOSA, A.F.; CHEN, J.; FREITAG, F.; VALENTE, D.; SOUZA, C.O.; VOOS, M.C. et al. Gait, posture and cognition in Parkinson's disease. *Dement. neuropsychol.* 2016; 10(4):280-286.
- BARBOSA, R.A.; NUNES, T.L.G.M.; PAIXÃO, A.O.; BELO-NETO, R., MOURA, S.; ALBUQUERQUE JR, R.L.C. et al. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. *Pharmaceutical Biology* 2015; 54: 993-1004.
- BARSOTTINI, O.G.P.; NICARETTA, D.H.; MAIA, D.P.; SALLEM, F.A.S. Tratamento da fase avançada da doença de Parkinson com estratégias terapêuticas para flutuações motoras e discinesias. In: Tosta, E.D.; Rieder, C.R.M.; Borges, V.; e colaboradores. *Doença de Parkinson: Recomendações*. 1ed. Academia Brasileira de Neurologia. 2010, p.43-58.
- BATASSINI, C.; BROETTO, N.; TORTORELLI, L.S.; BORSOI, M.; ZANOTTO, C.; GALLAND, F. et al. Striatal Injury with 6-OHDA Transiently Increases Cerebrospinal GFAP and S100B. *Neural Plasticity*, 2015; 2015: 1-9.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. *Neurociências – Desvendando o Sistema Nervoso*. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.
- BENABID, A.L.; CHABARDES, S.; MITROFANIS, J.; POLLAK, P. Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2009; 8(1):67-81.
- BENAYAD, Z.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; FRIAS, J.; GOMEZ-CORDOVES, C.; SAFI, N. Phenolic composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of extracts from Moroccan *Opuntia ficus-indica* flowers obtained by different extraction methods. *Industrial Crops and Products* 2014; 62: 412-420.

BENÍTEZ-BURRACO, A.; HERRERA, E.; CUETOS, F. ¿Un déficit nuclear en la enfermedad de Parkinson? *Neurología* 2015; 1-8.

BERNEY, A.; VINGERHOETS, F.; PERRIN, A.; GUEX, P.; VILLEMURE, J.G.; BURKHARD, P.R. *et al.* Effect on mood of subthalamic DBS for Parkinson's disease: a consecutive series of 24 patients. *Neurology* 2002; 59(9):1427-1429.

BERRIOS, G.E. Introdução à "Paralisia agitante", de James Parkinson. *Revista Latinoamericana de Psicopatologia Fundamental* 2016; 19(1): 114-121.

BHAT, A.H., DAR, K. B., ANEES, S., ZARGAR, M. A., MASOOD, A., SOFI, M. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2015; 74, 101–110.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism and Related Disorders* 2008; 14:124-129.

BLANDINI, F.; LEVANDIS, G.; BAZZINI, E.; NAPPI, G.; ARMENTERO, M.T. Time course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes, and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *European Journal of Neuroscience*, 2007; 25: 397-405.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy* 2014; 8 (155): 1–12.

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

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

BRIDI, J.C.; HIRTH, F. Mechanisms of α -Synuclein Induced Synaptopathy in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience* 2018; 12(80):1-18.

CARVALHO, A.C.B.; SANTOS, L.A.; SILVEIRA, D. Systematic organization of medicinal plant information: a monograph template proposal. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2014; 24: 80-88.

CARVALHO, M. M.; CAMPOS, F. L.; COIMBRA, B.; PÊGO, J. M.; RODRIGUES, C.; LIMA, R. *et al.* Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. *Molecular Neurodegeneration* 2013; 8:14.

CHO, S.Y.; SHIM, S.R.; RHEE, H.Y.; PARK, H.J.; JUNG, W.S.; MOON, SK. *et al.* Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders* 2012; 18(8): 948-952.

CHOI, B-K.; CHOI, M-G.; KIM, J-Y.; YANG, Y.; YING, L.; KWEON, D-H. Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Neuroscience* 2013; 110(10): 4087–4092

CITTAN, M.; ALTUNTAŞ, E.; CELIK, A. Evaluation of antioxidant capacities and phenolic profiles in *Tilia cordata* fruit extracts: A comparative study to determine the efficiency of traditional hot water infusion method. *Industrial Crops and Products*, 2018; 122: 553-558.

Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Resolução Normativa CONCEA nº 37. 2018.

DA COSTA, R.O.; GADELHA-FILHO, C.V.J.; DA COSTA, A.E.M.; FEITOSA, M.L.; DE ARAÚJO, D.P.; DE LUCENA, J.D. *et al.* The treadmill exercise protects against dopaminergic neuron loss and brain oxidative stress in parkinsonian rats. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017; 1-10.

DA SILVA, T.P.; POLI, A.; HARA, D.B.; TAKAHASHI, R.N. Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Neuroscience Letters* 2016 622: 83-87.

DANZER, K.M.; HAASEN, D.; KAROW, A.I.R.; MOUSSAUD, S.; HABECK, M.; GIESE, A. *et al.* Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and sowing. *The Journal of Neuroscience* 2007; 27 (34): 9220-32.

DE BIE, R.M.; DE HAAN, R.J.; SCHUURMAN, P.R.; ESSELINK, R.A.; BOSCH, D.A.; SPEELMAN, J.D. Morbidity and mortality following pallidotomy in Parkinson's disease: a systematic review. *Neurology* 2002; 58(7):1008-1012.

DE BOOTH, H.; D.HIRST, W.; WADE-MARTINS, R. The Role of Astrocyte Dysfunction in Parkinson's Disease Pathogenesis. *Trends in Neurosciences*, 2017; 40(6): 358-370.

DE ROSSO, A.L.Z.; PINTO, R.A.S.R.; MACHADO, A.A.C.; LIMA, C.F.L.S. Recomendações para o tratamento da fase inicial da doença de Parkinson. In: Tosta, E.D.; Rieder, C.R.M.; Borges, V.; e colaboradores. *Doença de Parkinson: Recomendações*. Academia Brasileira de Neurologia, 2010; 1: 19-42

DIXON, S.J.; STOCKWELL, B.R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology* 2014; 10(1), 9–17.

DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P.L.; HUYNH, L. H.; SOETAREDDJO, F. E.; ISMADJI, S. *et al.* Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 2014; 22(3), 296–302.

EL-GHAZALY, M.A.; SADIK, N.A.H.; RASHED, E.R.; ABD-EL-FATTAH, A.A. Neuroprotective effect of EGb7611 and low-dose whole-body g-irradiation in a rat model of Parkinson's disease. *Toxicology and Industrial Health* 2015; 31(12):1128-1143.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVES, L.P.L.; DIAS, I.C.L. *et al.* Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cadernos de Pesquisa* 2011; 18(1): 90-95.

FOX, S.H., KATZENSCHLAGER, R., LIM, S.Y., RAVINA, B., SEPPI, K., COELHO, M. *et al.* The movement disorder society 7045 evidence-based medicine review update: treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 2011; 26(3):2–41

- GADAGKAR, SR.; GERALD B. CALL, G.B. Computational tools for fitting the Hill equation to dose–response curves. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2015; 71: 68-76.
- GANDHI, S.; WOOD, N. W. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics* 2005; 14(18): 2749-2755.
- GARCIA, M.; MIYARES, C.; MENENDEZ, E.; SAINZ, F. Blockade of the Antiadrenergic Action of Bretylium by an Aqueous Extract of the Leaves of *Rhoeo spathacea*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 1971; 49(12): 1106-1110.
- GARCÍA-VARELA, R.; FAJARDO RAMÍREZ, O. R.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; ALTAMIRANO, J.; CARDINEAU, G. A. Cancer cell specific cytotoxic effect of *Rhoeo discolor* extracts and solvent fractions. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 190:46–58.
- GARCÍA-VARELA, R.; GARCÍA-GARCÍA, R.M.; BARBA-DÁVILA, B.A.; FAJARDO-RAMÍREZ, O.R.; SERNA-SALDIVAR, S.O.; CARDINEAU, G.A. Antimicrobial Activity of *Rhoeo discolor* Phenolic Rich Extracts Determined by Flow Cytometry. *Molecules* 2015; 20(10): 18685-18703.
- GERSZT, P.P.; BALTAR, C.R.; SANTOS, A.E.; ODA, A.L. Interference of the early and late drug therapy in Parkinson disease in the management of dysphagia. *Rev. CEFAC* 2014; 16(2):604-619.
- GHOSH, S.; BASAK, P.; DUTTA, S.; CHOWDHURY, S.; SIL, P.C. New insights into the ameliorative effects of ferulic acid in pathophysiological conditions. *Food and Chemical Toxicology*, 2017; 103: 41-55.
- GOMES, M.Z.; DEL BEL, E.A. Effects of electrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. *Brain Research Bulletin* 2003; 62: 107-11.
- GONZÁLEZ-AVILA, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; DE LA GARZA, M.; HERNÁNDEZPRETELÍN, M.D.C.; DOMÍNGUEZ-ORTÍZ, M.A.; FATTEL-FAZENDA, S. *et al.* Antigenotoxic, antimutagenic and ROS scavenging activities of a *Rhoeo discolor* ethanolic crude extract. *Toxicol In Vitro*. 2003; 17(1): 77-83.
- GOODMAN, R.R.; KIM, B.; Mc CLELLAND, S. III; SENATUS, P.B.; WINFIELD, L.M.; PULLMAN, S.L. *et al.* Operative techniques and morbidity with subthalamic nucleus deep brain stimulation in 100 consecutive patients with advanced Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(1):12-17.
- GREGORY R. Surgery for movement disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 72:132-135.
- GUEVARA, E.; ALARCÓN, V. La evaluación neuropsicológica de la Enfermedad de Parkinson en Chile: una tarea pendiente. *Revista Chilena Neuropsicología* 2015; 10(1):5-7.
- GUO, S.; YAN, J.; YANG, T.; YANG, X.; BEZARD, E.; ZHAO, B. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. *Biological Psychiatry* 2007; 62(12):1353-1362.

GUTIÉRREZ, S.L.G.; CHILPA, R.R.; JAIME, H.B. Medicinal plants for the treatment of “nervios”, anxiety, and depression in Mexican Traditional Medicine. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2014; 24(2014): 591-608.

GUVEN, M.; ARAS, A.B.; AKMAN, T.; SEN, H.M.; OZKAN, A. SALIS, O. et al. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in rat model of embolic cerebral ischemia. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2015; 18(4): 356-363.

HALL, C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 1934; 18(3): 385-403.

HEINZEL, S.; ROEBEN, B.; BEN-SHLOMO, Y.; LERCHE,S.; ALVES, G.; BARONE, P. Prodromal Markers in Parkinson’s Disease: Limitations in Longitudinal Studies and Lessons Learned. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2016; 8 (147):1-10.

HEISTERS, D. Parkinson's: symptoms, treatments and research. *British Journal of Nursing* 2011; 20(9): 548-554.

HERNÁNDEZ-ROMERO M.C.; DELGADO-CORTÉS M.J.; SARMIENTO, M.; DE PABLOS R.M.; ESPINOSA-OLIVA, M.A.; ARGÜELLES, S. Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *NeuroToxicology* 2012; 33(3): 347-360.

HOSAMANI, R.; KRISHNA, G; MURALIDHARA. Standardized Bacopa monnieri extract ameliorates acute paraquat-induced oxidative stress, and neurotoxicity in prepubertal mice brain. *Nutritional Neuroscience* 2016; 19(10): 434-446.

HUSSEIN, R.M.; MOHAMED, W.R.; OMAR H.A. A neuroprotective role of kaempferol against chlorpyrifos-induced oxidative stress and memory deficits in rats via GSK3β-Nrf2 signaling pathway. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018;152:29-37.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Projeção da população 2018: número de habitantes do país deve parar de crescer em 2047. Estatísticas sociais, 2018.

JANSEN, R.L.; BROGAN, B.; WHITWORTH, A.J.; OKELLO, E.J. Effects of five ayurvedic herbs on locomotor behaviour in a drosophila melanogaster parkinson's disease model. *Phytotherapy Research* 2014; 28(12): 1789-95.

JANVIN, C.C.; LARSEN, J.P.; AARSLAND, D.; HUGDAHL, K. Subtypes of mild cognitive impairment in Parkinson's disease: progression to dementia. *Mov Disord* 2006; 9: 1343-1349.

JESUS, A. A.; ALMEIDA, L. C.; SILVA, E. A.; FILHO, L. C.; EGUES, S. M. S.; FRANCESCHI, E. et al. Extraction of palm oil using propane, ethanol and its mixtures as compressed solvent. *Journal of Supercritical Fluids* 2013; 81: 245-253.

JIANG, P.; DICKSON, D.W. Parkinson’s disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica* 2018; 135:13–32

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F.J.; ALONSO-NAVARRO, H.; PIUDO, M.R.L.; HERNÁNDEZ, B.J.A. Trastornos del movimiento (I): conceptos generales, clasificación de los síndromes parkinsonianos y enfermedad de Parkinson. *Medicine* 2015; 11(74):4415-4426.

JOHNSON, T.J. Terapia celular en la enfermedad de Parkinson y los factores que influyen em su éxito. *Horiz Med.* 2015; 15(4): 44-51.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.L.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999; 47(10): 3954-62.

KANDIAH, N.; ZHANG, A.; CENINA, A.R.; AU, W.L.; NADKARNI, N.; TAN, L.C. Montreal Cognitive Assessment for the screening and prediction of cognitive decline in early Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014; 20(11):1145-1148.

KARPINAR, D.P.; BALIJA, M.B.; KÜGLER, S.; OPAZO, F.; REZAEI-GHALEH, N.; WENDER, N. et al. Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with compromised beta structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models. *The EMBO Journal* 2009; 28(20): 3256-68.

KATZEN, H.L.; LEVIN, B.E.; WEINER, W. Lado e tipo de sintoma motor influenciam a cognição na doença de Parkinson. *Mov Disord* 2006; 21: 1947-1953.

KAUR, H.; AHUJA J.S.; LICHTEN M. Methods for Controlled Protein Depletion to Study Protein Function during Meiosis. *Methods in Enzymology*, 2018; 601: 331-357.

KAUR, R.; MEHAN, S., SINGH, S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. *Neurological Sciences*, 2018; 40: 13-23.

KHAN, R.A.; KHAN, M.R.; SAHREEN, S. Protective effects of rutin against potassium bromate induced nephrotoxicity in rats. *BMC Complement Altern Med* 2012; 12:204–208.

KIASALARI Z1, BALUCHNEJADMOJARAD T, ROGHANI M. CELL. *Hypericum perforatum* hydroalcoholic extract mitigates motor dysfunction and is neuroprotective in intrastriatal 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2015; 36 (4): 521-530

KIM, GH; KIM, JE; RHIE, SJ; YOON, S. The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Experimental neurobiology* 2015; 24:325–340.

KIM, J.S.; KIM, J.M.; JEONG-JA, O.; JEON, B.S. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression and cell death by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a green tea catechin, in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Journal of Clinical Neuroscience* 2010; 17(9): 1165-1168.

KONIECZNY, J.; CZARNECKA, A.; LENDA, T.; KAMINSKA, K.; MICHALUK, L. A.K. The significance of rotational behavior and sensitivity of striatal dopamine receptors in hemiparkinsonian rats: a comparative study of lactacystin and 6-OHDA. *Neuroscience* 2017; 340: 308–318

KOTSAVASILOGLOU, C. Machine learning-based classification of simple drawing movements in Parkinson's disease. *Biomedical Signal Processing and Control* 2017; 31: 174-180.

KUTER, K.; OLECH, Ł.; GŁOWACKA, U. Prolonged dysfunction of astrocytes and activation of microglia accelerate degeneration of dopaminergic neurons in the rat substantia nigra and block compensation of early motor dysfunction induced by 6-OHDA. *Molecular neurobiology* 2018; 55: 3049-3066.

LANCIEGO, J.L.; LUQUIN, N.; OBESO, J.A. Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2012; 2:1-21.

LASHUEL, H.A.; OVERK, C.R; OUESLATI, A.; MASLIAH, E. The many faces of alpha-synuclein: structure and toxicity to the therapeutic target. *Nature Reviews Neuroscience*, 2013; 14 (1): 38-48.

LEIKAS, J.V.; KAARIAINEN, M.T.; JALKANEN, J.A.; LEHTONEN, M.; RANTAMAKI, T.; FORSBERG, M.M. Combined Ipsilateral Limb Use Score as an Index of Motor Deficits and Neurorestoration in Parkinsonian Rats. *Journal of Neuroscience Research* 2017; 95: 1858-1870.

LESZEK, J.; BARRETO, G.E.; GSIOROWSKI, K.; KOUTSOURAKI, E. ÁVILA-RODRIGUES, M.; ALIEV, G. Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. *Neurological Disorders - Drug Targets* 2016; 15(3):329-336.

LEVITES, Y.; WEINREB, O.; MAOR, G.; YODIM, M.B.H.; MANDEL, S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry* 2001; 78(5): 1073-1082.

LEVY, G. Insuficiência motora na DP: relação com demência e idade. *Neurology* 2000; 55: 201-206.

LEWIS, M.M. Synergy as a new and sensitive marker of basal ganglia dysfunction: A study of asymptomatic welders. *Neuro Toxicology* 2016; 56: 76-85.

LI, X.; WANG, H.; WEN, G.; LI, L.; GAO, Y.; ZHUANG, Z. *et al.* Neuroprotection by quercetin via mitochondrial function adaptation in traumatic brain injury: PGC-1 α pathway as a potential mechanism. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018; 22(2): 883-891.

LIMA, F.A.V.; JOVENTINO, I.P.; JOVENTINO, F.P.; DE ALMEIDA, A.C.; NEVES, K.R.T.; DO CARMO, M.R. *et al.* Neuroprotective activities of *Spirulina platensis* in the 6-OHDA model of Parkinson's disease are related to its antiinflammatory effects. *Neurochemical research* 2017; 42(12):3390-3400

LIN, C.H.; WU, R.M. Biomarkers of cognitive decline in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related disorders*, 2015; 21:431-433

LOTIA, M.; JANKOVIC, J. New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. *J. Expert Opinion on Pharmacotherapy* 2016; 17(7):895-909

LUCIANO-MONTALVO, C.; BOULOGNE, I.; GAVILLÁN-SUÁREZ, J. A screening for antimicrobial activities of Cribbean herbal remedies. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2013; 13(126): 1-9.

MACHADO, A.P.F.; PEREIRA, A.L.D.; BARBERO, G.F.; MARTÍNEZ, J. Recovery of anthocyanins from residues of *Rubus fruticosus*, *Vaccinium myrtillus* and *Eugenia brasiliensis* by ultrasound assisted extraction, pressurized liquid extraction and their combination. *Food Chemistry* 2017; 231: 1-10.

MACHADO, F. A. *et al.* Neuropsychological profile of Parkinson's disease patients selected for deep brain stimulation surgery. *Dement. neuropsychol.* 2016; 10(4):296-302.

MACHADO, F.A.; REPPOLD, C.T. O efeito da estimulação cerebral profunda nos sintomas motor e cognitivo da doença de Parkinson: uma revisão da literatura. *Dement. Neuropsychol.* 2015; 9 (1): 24-31.

MACHAWAL, L.; KUMAR, A. Possible involvement of nitric oxide mechanism in the neuroprotective effect of rutin against immobilization stress induced anxiety like behaviour, oxidative damage in mice. *Pharmacological Reports* 2014; 66: 15–22.

MAGALINGAM, K.B.; AMMU RADHAKRISHNAN, A.; HALEAGRAHARA, N. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercitrin against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 2016; 29(1): 30–39.

MANCINI, M.; ROCCHI, L.; HORAK, F.B.; CHIARI, L. *et al.* Effects of Parkinson's disease and levodopa on functional limits of stability. *Clin Biomech.* 2008; 23(4):450–458.

MARTINEZ-FERNANDEZ, R.; GASCA-SALAS, C.; SÁNCHEZ-FERRO, Á.; OBESO, J.A. Actualización en la enfermedad de Parkinson, Parkinson's disease: a review. *Revista Médica Clínica Las Condes* 2016; 27(3): 363-379.

MARTINS, W.B.; RODRIGUES, S.A.; DANTAS, C.G.; DE LUCCA JÚNIOR, W.; XAVIER FILHO, L.; CARDOSO, J.C. *et al.* Neuroprotective effect of *Portulaca oleracea* extracts against 6-hydroxydopamine-induced lesion of dopaminergic neurons. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 2016; 88(3): 1439-1450.

MENA-REJON, G.; CAAMAL-FUENTES, E.; CANTILLO-CIAU, Z.; CEDILLO-RIVERA, R.; FLORES-GUIDO, J.; MOO-PUC, R. In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2009; 121: 462-465.

METIN, S.; ŞENGÖR, N.S. Ventral Striatal Pathway Determines the Behavior: A Computational Model. *ResearchGate* 2015; 1-20.

MIKAMI, Y.; YAMAZAWA T. Chlorogenic acid, a polyphenol in coffee, protects neurons against glutamate neurotoxicity. *Life Sciences*, 2015; 139: 69-74.

MILLER, R. L.; JAMES-KRACKE, M.; SUN, G. Y.; SUN, Y. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochemical Research* 2009; 34(1): 55-65.

MONTE, C. D.; CARRADORI, S.; GRANESE, A.; DI PIERRO, G. B.; LEONARDO, C.; NUNZIO, C. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. *BMC Urology*, 2014; 14: 1 -11.

MORI, M. A., DELATTRE, A. M., CARABELLI, B., PUDELL, C., BORTOLANZA, M., STAZIAKI, P. *et al.* Neuroprotective effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is mediated by a reduction of inducible nitric oxide synthase. *Nutritional Neuroscience* 2017; 21(5), 341–351.

NIMWEGEN, M.; SPEELMAN, A.D.; HOFMAN-VAN ROSSUM, E.J.M.; OVEREEM, S.; DEEG, D.J.H.; BORM, G.F. *et al.* Physical inactivity in Parkinson's disease. *J Neurol.* 2011; 258(12):2214-21.

NIRANJAN, R. The Role of Inflammatory and Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Focus on Astrocytes. *Molecular Neurobiology* 2014; 49(1):28-38.

NIRANJAN, R.; NATH, C.; SHUKLA, R. Guggulipid and nimesulide differentially regulated RNA expressions from inflammatory genes via inhibition of NF- κ B and CHOP activation in LPS, C6-stimulated mouse astrocytoma cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2011; 31: 755-764.

NITA, M.; GRZYBOWSKI, A. The role of the reactive oxygen species and oxidative stress in the pathomechanism of the age-related ocular diseases and other pathologies of the anterior and posterior eye segments in adults. *Oxid. Med. Cell Longev* 2016; 2016: 1–23

NUNZIO, C. Modern extraction techniques and their impact on the pharmacological profile of *Serenoa repens* extracts for the treatment of lower urinary tract symptoms. *BMC Urology* 2014; 14: 63.

OBESO, J. A.; RODRÍGUEZ-OROZ, M. C.; BENITEZ-TEMINO, B.; BLESÁ, F. J.; GURIDI, J.; MARIN, C. *et al.* Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement Disorders* 2008; 23(3): S548–S559.

OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; GOETZ, C.G.; MARIN, C.; KORDOWER, J.H.; RODRIGUEZ, M. *et al.* Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature Medicine* 2010; 16:653–661.

OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; STAMELOU, M.; BHATIA, K.P.; BURN, D.J. The expanding universe of disorders of the basal ganglia. *The Lancet*, 2014; 384(9942): 523-31.

OLCHIK, M.R.; AYRES, A.; GHISI, M.; SCHUH, A.F.S.; RIEDER, C.R.M. The impact of cognitive performance on quality of life in individuals with Parkinson's disease. *Dement. Neuropsychol* 2016; 10(4): 303-309.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001.

PADOVAN-NETO, F.E.; CAVALCANTI-KIWIATKOVISKI, R.; CAROLINO, R.O.G.; ANSELMO-FRANCI, J.; BEL, E.D. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression do L-DOPA induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology* 2015; 89:87-99.

PADOVAN-NETO, F.E.; ECHEVERRY, M.B.; TUMAS, V.; DEL-BEL, E.A. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-INDUCED dyskinesias in a rodent modelo f Parkinson's disease. *Neuroscience* 2009; 159: 927-935.

PAIVA, L.; LIMA, E.; NETO, A. I., BAPTISTA, J. Seasonal Variability of the Biochemical Composition and Antioxidant Properties of *Fucus spiralis* at Two Azorean Islands. *Marine drugs* 2018; 16(8):1-21.

PAXINOS, G.; WATSON, G. *O cérebro de rato em coordenadas estereotáxicas*. Elsevier, 2006.

- PEDROLLO, C.T.; KINUPP, V.F.; SHEPARD JUNIOR, G. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. *Journal of Ethnopharmacology* 2016; 186: 111-124.
- PENTTINEN, A.-M.; SULEYMANOVA, I.; ALBERT, K.; ANTTILA, J.; VOUTILAINEN, M.H.; AIRAVAARA, M. Characterization of a new low-dose 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease in rat. *Journal of Neuroscience Research*, 2016; 94(4): 318-328.
- PINTO, N.B.; DA SILVA, A.; NEVES, K.R.; SILVA, A.H.; LEAL, L.K.; VIANA, G.S. Neuroprotective Properties of the Standardized Extract from *Camellia sinensis* (Green Tea) and Its Main Bioactive Components, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015:1-12.
- PODDIGHE, S.; DE ROSE, F.; MAROTTA, R.; RUFFILLI, R.; FANTI, M.; SECCI, P.P. *et al.* *Mucuna pruriens* (Velvet bean) rescues motor, olfactory, mitochondrial and synaptic impairment in PINK1 B9 Drosophila melanogaster genetic model of Parkinson's disease. *PLOS One* 2014; 9(10):1-11.
- PRAT, C.S. Basal ganglia impairments in autism spectrum disorder are related to abnormal signal gating to prefrontal cortex. *Neuropsychologia* 2016; 91:268-281.
- QASIM, S.E.; HEMPTINNE, C.; SWANN, N.C.; MIOCINOVIC, S.; OSTREM, J.L.; STARR, P.A. Electrocorticography reveals beta desynchronization in the basal ganglia-cortical loop during rest tremor in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 2016; 86: 177–186.
- RAUCH, F.; SCHWABE, K.; KRAUSS, J.K. Effect of deep brain stimulation in the pedunculopontine nucleus on motor function in the rat 6-hydroxydopamine Parkinson model. *Behav. Brain Res.* 2010; 210:46–53
- REAL, C.C.; DOORDUIN, J.; FELTES, P.K.; GARCIA, D.V.; FARIA, D.P.; BRITTO, L.R.; *et al.* Evaluation of exercise-induced modulation of glial activation and dopaminergic damage in a rat model of Parkinson's disease using [11C]PBR28 and [18F]FDOPA PET. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2017; 1-16.
- REAL, C.C.; FERREIRA, A.F.B.; CHAVES-KIRSTEN, G.P.; TORRÃO, A.S.; PIRES, R.S.; BRITTO, L.R.G. BDNF receptor blockade hinders the beneficial effects of exercise in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 2013; 237(1): 118-129.
- REEVE, A.; SIMCOX, E.; TURNBULL, D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing research reviews* 2014; 14:19–30.
- REIJNDERS, J.S.; EHRT, U.; WEBER, W.E.; AARSLAND, D.; LEENTJENS, A.F. A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Movement Disorders Journal*, 2008; 23:183-189.
- REN, Z.; ZHANG, R.; LI, Y.; LI, Y.; YANG, Z.; YANG, H. Ferulic acid exerts neuroprotective effects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury via antioxidant and anti-apoptotic mechanisms in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017; 40(5): 1444-1456.
- REYES-MUNGUÍA, A.; AZÚARA-NIETO, E.; BERISTAIN, C.I.; CRUZ-SOSA, F.; VERNON-CARTER, E.J. Propiedades antioxidantes del maguey morado (*Rhoeo discolor*); Purple maguey (*Rhoeo discolor*) antioxidant properties CyTA - *Journal of Food* 2009; 7(3): 209–216.

ROCHA, E.M.; DE MIRANDA, B.; SANDERS, L.H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease* 2018; 108: 249-257

RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; LOPEZ-AZCARATE, J.; GARCIA-GARCIA, D.; ALEGRE, M.; TOLEDO, J.; VALENCIA, M. *et al.* Involvement of the sub-thalamic nucleus in impulse control disorders associated with Parkinson's disease. *Brain* 2011; 134:36–49.

ROJAS, P.; SERRANO-GARCIA, N.; MARES-SAMANO, J.J.; MEDINA-CAMPOS, O.N.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; OGREN, S.O. EGb761 protects against nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice: role of oxidative stress. *European Journal of Neuroscience* 2008; 28(1): 41-50.

ROSALES-REYES, T.; DE LA GARZA, M.; ARIAS-CASTRO, C.; RODRÍGUEZ-MENDIOLA, M.; FATTEL-FAZENDA, S.; ARCE-POPOCA, E. *et al.* Aqueous crude extract of *Rhoeo discolor*, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2008; 115(3): 381-386.

SAHRANAVARD, S.; GHAFARI, S.; MOSADDEGH, M. Medicinal plants used in Iranian traditional medicine to treat epilepsy. *Seizure* 2014; 23(5): 328-332.

SAHU, R.K.; KAR, M.; ROUTRAY, R. DPPH Free Radical Scavenging Activity of Some Leafy Vegetables used by Tribals of Odisha, India. *Journal of Medicinal Plants Studies* 2013; 1(4): 21-27.

SAKAMULA, R.; THONG-ASA, W. Neuroprotective effect of p-coumaric acid in mice with cerebral ischemia reperfusion injuries. *Metabolic Brain Disease*, 2018; 33(3): 765-773.

SAMPAIO, T.B.; PINTON, S.; DA ROCHA, J.T.; GAI, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Involvement of BDNF/TrkB signaling in the effect of diphenyl diselenide on motor function in a Parkinson's disease rat model. *European Journal of Pharmacology* 2017; 795: 28-35.

SÁNCHEZ-ROQUE, Y.; AYORA-TALAVERA, G.; RINCÓN-ROSALES, R.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.A.; MEZA-GORDILLO, R.; WINKLER, R. *et al.* The flavonoid fraction from *Rhoeo discolor* leaves acting as antiviral against influenza A virus. *Records of Natural Products* 2017; 11(6):532-546.

SANTIAGO R.M.; BARBIERO, J.; GRADOWSKI, R.W.; BOCHEN, S.; LIMA, M.M.; DA CUNHA, C. *et al.* Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behavioural Brain Research*, 2014; 259: 70-77.

SCHMITT, E.K.; MOORE, C.M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. *Current Opinion in Chemical Biology* 2011; 15:497-504.

SCHNEIDER, J.S.; SENDEK, S.; YANG, C. Relationship between Motor Symptoms, Cognition, and Demographic Characteristics in Treated Mild/Moderate Parkinson's disease. *PLoS One* 2015; 10 (4):1-11.

SCHOEVERS, R.A.; GEERLINGS, M.I.; DEEG, D.J.; HOLWERDA, T.J.; JONKER, C.; BEEKMAN, A.T. Depression and excess mortality: evidence for a dose response relation in community living elderly. *International J Geriatr Psychiatry*. 2009; 24:169-76.

- SCHWALB, J.M.; HAMANI, C. The history and future of deep brain stimulation. *Neurotherapeutics* 2008; 5 (1):3-13.
- SHABAB, T.; KHANABDALI, R.; MOGHADAMTOUSI, S.Z.; KADIR, H.A.; MOHAN, G. Neuroinflammation pathways: a general review. *International Journal of Neuroscience* 2017; 127:624-633.
- SHARMA, S.; LOHAN, S.; MURTHY, R.S. Formulation and characterization of intranasal mucoadhesive nanoparticulates and thermoreversible gel of levodopa for brain delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 2014; 40: 869-878
- SHINOMOL, G.K.; MYTHRI, R.B.; BHARATH, M.M.S. *Bacopa monnieri* extract offsets rotenone-induced cytotoxicity in dopaminergic cells and oxidative impairments in mice brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2012; 32(3): 455-465.
- SHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell and Tissue Research* 2004; 318(1):215–224.
- SIDDIQUE, Y.H.; MUJTABA, S.F; FAISAL, M.; JYOTI, S.; NAZ, F. The effect of *Bacopa monnieri* leaf extract on dietary supplementation in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *European Journal of Integrative Medicine* 2014; 6(5): 571-580.
- SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A.R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research* 2007; 11(3-4):151-167.
- SINGH, N.A.; MANDAL, A.K.A.; KHAN, Z. A. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Nutrition Journal*, 2016; 15:60
- SIRONI, V.A. Origin and evolution of deep brain stimulation. *Front Integr Neurosci.* 2011; 5:1-5.
- SONG, S.; NIE, Q.; LI, Z.; DU, G. Curcumin improves neurofunctions of 6-OHDA induced parkinsonian rats. *Pathology, Research and Practice* 2016; 212(4): 247-251.
- SPILLANTINI, M.G.; SCHMIDT, M.L.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q.; JAKES, R.; GOEDERT, M. Alfa-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997; 388(6645): 839-840.
- SRIVASTAV, S.; FATIMA, M.; MONDAL, A.C. Important medicinal herbs in Parkinson's disease pharmacotherapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 92: 856–863
- SRIWANTHANA, B.; TREESANGSRI, W.; BORIBOONTRAKUL, B.; NIUMSAKUL, S.; CHAVALITTUMRONG, P. In vitro effects of Thai medicinal plants on human lymphocyte activity. *Journal of Science Technology* 2007; 29(1): 17-28
- STOJKOVSKA, I.; WAGNER, B.M.; MORRISON, B.E. Parkinson's disease and enhanced inflammatory response. *Experimental Biology and Medicine* 2015; 240(11): 1387-1395
- SU, R-J.; ZHEN, J-L.; WANG, W.; ZHANG, J-L.; ZHENG, Y.; WANG, X.M. Time-course behavioral features are correlated with Parkinson's disease-associated pathology in a 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rat model. *Molecular medicine reports* 2018; 17: 3356-3363.
- SUBRAMANIAM, S.R.; CHESSELET, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 2013; 106, 17-32.

- TAN, J.B.L.; LIM, Y.Y.; LEE, S.M. Antioxidant and antibacterial activity of *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn leaves. *Journal of Food Science and Technology* 2015; 52(4): 2394-2400.
- TAN, J.B.L.; LIM, Y.Y.; LEE, S.M. *Rhoeo spathacea* (Swartz) Stearn leaves, a potential natural food colorant. *Journal of Functional Foods*, 2014; 7(1): 443-451.
- TRIGO-DAMAS, I.; DEL REY, N.L-G.; BLESÁ, J. Novel models for Parkinson's disease and their impact on future drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2018; 13(3): 229-239.
- TURCO, F.; CANESSA, A.; OLIVIERI, C.; POZZI, N.G.; PALMISANO, C.; ARNULFO, G. *et al.* Cortical response to levodopa in Parkinson's disease patients with dyskinesias. *The European Journal of Neuroscience* 2018; 48(6): 2362-2373.
- UNGERSTEDT, U. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiologica Scandinavica* 1971; 367: 69-93.
- VAN DER MERWE, C.; VAN DYK, H.C.; ENGELBRECHT, L.; VAN DER WESTHUIZEN, F.H.; KINNEAR, C.; LOOS, B. *et al.* Curcumin rescues a PINK1 knock down SH-SY5Y cellular model of Parkinson's disease from mitochondrial dysfunction and cell death. *Molecular Neurobiology* 2016; 54(4): 2752-2762.
- VAN ROOIJEN, B.D.; CLAESSENS, M.M.; SUBRAMANIAM, V. Membrane binding of oligomeric alpha-synuclein depends on bilayer charge and packing. *FEBS Letters* 2008; 582(27): 3788-3792.
- VARALTA, V.; PICELLI, A.; FONTE, C.; AMATO, S.; MELOTTI, C.; ZATEZALO, V. *et al.* Relationship between Cognitive Performance and Motor Dysfunction in Patients with Parkinson's Disease: A Pilot Cross-Sectional Study. *BioMed Research International*, 2015; 2015:1-6.
- VIEIRA, S.C.H.; SOLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZARATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2010; 20(1): 28-34.
- VOLPICELLI-DALEY, L.A.; GAMBLE, K.L.; SCHULTHEISS, C.E.; RIDDLE, D.M.; WEST, A.B.; LEE, V.M. Formation of alpha-synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. *Mol Biol Cell* 2014; 25(25):4010-4023
- VOON, V.; KRACK, P.; LANG, A.E.; LOZANO, A.M.; DUJARDIN, K.; SCHUPBACH, M. *et al.* A multicentre study on suicide outcomes following subthalamic stimulation for Parkinson's disease. *Brain* 2008; 131(10):2720-2728.
- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. Mechanisms mediating the production of environmentally induced brain changes. *Psychological Bulletin* 1975; 82(6): 986-1000.
- WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: A critical review. *Psychological Bulletin*, 1976. 83(3): 482-504.
- WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Transl Neurodegener.* 2015; 12:4-19

WANG, Y.L.; JU, B.; ZHANG, Y.Z.; YIN, H.L.; LIU, Y.J.; WANG, S.S.; et al. Protective Effect of Curcumin Against Oxidative Stress-Induced Injury in Rats with Parkinson's Disease Through the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017; 43:2226-2241

WINNER, B.; JAPPELLI, R.; MAJI, S.K.; DESPLATS, P.A.; BOYER, L; AIGNER, S. *et al.* In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108(10): 4194-9

XU, Q.; LANGLEY, M; KANTHASAMY, A; REDDY, M. Neurorescue effect of EGCG in an animal model of Parkinson's disease. *The FASEB Journal*, 2016; 30(1): 1174.

XU, Q.; LANGLEY, M.; KANTHASAMY, A.G.; REDDY, M.B. Epigallocatechin Gallate Has a Neurorescue Effect in a Mouse Model of Parkinson Disease. *The Journal of nutrition*, 2017; 147(10): 1926-1931.

YADAV, S.K.; PRAKASH, J; CHOUHAN, S; SINGH, S.P. *Mucuna pruriens* seed extract reduces oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in paraquat-induced Parkinsonian mouse model. *Neurochemistry International* 2013; 62(8): 1039-47.

YOKOYAMA, H.; KUROIWA, H.; KASAHARA, J.; ARAKI, T. Neuropharmacological approach against MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine)-induced mouse model of Parkinson's disease. *Acta Neurobiologia e Experimentalis* 2011; 71(2): 269-280.

YUAN, H.; ZHENG, J.C.; LIU, P.; ZHANG, S.F.; XU, J.Y.; BAI, L.M. Pathogenesis of Parkinson's disease: oxidative stress, environmental impact factors and inflammatory processes. *Neuroscience Bulletin* 2007; 23: 125-130.

ZENG, X-S.; GENG, W-S.; JIA, J-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro* 2018; 10: 1-15.

ZHANG, A; SUN, H; WANG, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 63: 570-577.

ZHANG, T-M.; YU, S-Y.; GUO, P.; DU, YA., HU, YANG., PIAO, YING-SHAN., ZUO, LI-JUN., LIAN, TENG-HONG., WANG, RUI-DAN., YU, QIU-JIN., JIN, ZHAO., ZHANG, WEI. Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study. *Medicine (Baltimore)*, 2016; 95(50): 5400.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1147: 93-104.

ZIMCIKOVA, E.; SIMKO, J.; KARESOVA, I.; KREMLACEK, J.; MALAKOVA, J. *Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open field test?*. *Seizure - European Journal of Epilepsy*, 2017; 52: 35-40.

CRONOGRAMA

ATIVIDADES	SEMESTRES			
	1°	2°	3°	4°
Elaboração da dissertação	X	X	X	X
Fundamentação teórica	X	X	X	X
Encaminhamento do projeto ao CEUA da UNIT	X			
Seminário de acompanhamento discente	X			
Obtenção das amostras de <i>Tradescantia spathacea</i>	X			
Realização dos experimentos de incorporação e caracterização dos extratos		X		
Procedimento de cirúrgico com tratamento imediato e realização de testes comportamentais			X	
Análises histopatológica				X
Análise imunohistoquímica			X	X
Análise e tabulação de dados			X	X
Submissão e apresentação de trabalhos para eventos, artigos científicos				X
Qualificação				X
Confecção de artigo e patente				X
Defesa				X

Onde: X = Atividades desenvolvidas;

ANEXO 1 – EXSICATA DA *Tradescantia spathacea*



ANEXO 2 - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato aquoso de *Tradescantia spathacea* sobre a lesão da via nigroestriatal em ratos", registrada com o nº 020517, sob a responsabilidade de Margarete Zanardo Gomes, 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 31/05/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	31/07/2017 a 31/07/2018
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de Animais	50
Peso/idade	180g-250g / 2 – 3 meses
Sexo	Macho
Origem	Bióterio da UNIT

Aracaju, 31 de maio de 2017

Carine Santana Ferreira Marques
Coordenadora Substitua da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT