UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

CLEONICE CREUSA DOS SANTOS

ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR E IMUNOMODULADOR DE FLAVONOIDES EM MODELOS *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON

Salvador, BA
2015

CLEONICE CREUSA DOS SANTOS

ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR E IMUNOMODULADOR DE FLAVONOIDES EM MODELOS *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra Silvia Lima Costa

Salvador, BA
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

"Estudo do efeito neuroprotetor e imunomodulador de flavonoides em modelos in vitro da Doença de Parkinson"

Mestranda Cleonice Creusa dos Santos
Orientador - Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

BANCA EXAMINADORA

Professor Doutor Victor Diogenes Amaral da Silva
PPGIm/ICS-UFBA

Professora Doutora Camila Alexandrina Viana Figueiredo
PPGIm/ICS-UFBA

Prof. Doutor Juan Segura Aguilar
Universidade do Chile

Salvador, 26 de março de 2015

Profa.Silvia Lima Costa
Coordenadora - PPGIm-ICS-UFBA

Av. Reitor Miguel Calmon S/N – Vale do Canela – CEP 40.110-100 – Salvador – Bahia – Brasil
Tel. 055 71-3247 6269 3283-8921 e-mail: ppgimicsufba@gmail.com/www.ppgim.ufba.br

Ficha Catalográfica elaborada pela BUS – Biblioteca Universitária de Saúde da UFBA

S237 Santos, Cleonice Creusa dos

Estudo do efeito neuroprotetor e imunomodulador de flavonoides em modelos *in vitro* da doença de Parkinson / Cleonice Creusa dos Santos. - Salvador, 2015.

74 f.

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Silvia Lima Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2015

1. Doença de Parkinson. 2. Rutina. 3. Neuroproteção. 4. Neurotoxina. 5. Aminocromo. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. II. Silva, Victor Diogenes Amaral da. III. Costa, Silvia Lima. IV. Título.

CDU 616.858

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter estado comigo e ter me dado forças para cumprir mais esta meta.

A minha família, aos meus pais João e Creusa pelo apoio que me deu e tem me dedicado mesmo não entendendo meus horários inflexíveis e os finais de semana no laboratório. Aos meus irmãos, Hailton, Maria, Ednalva, Solange e Darlã por terem me ajudado nos momentos de estudo, na escrita deste trabalho e por me buscar no laboratório tarde da noite. A Maria Cecilia minha querida sobrinha que no momento de stress em que eu estava estudando ou escrevendo vinha me interromper com seu lindo sorriso para que eu parasse e colocasse o vídeo da galinha pintadinha.

A Joana por ter me incentivado à entrar no laboratório de Neuroquímica e ter me apresentado a Profª. Silvia Lima Costa.

A professora Silvia, que não tenho palavras para agradecer pela sua orientação e conhecimento, pela pessoa que é tão dedicada que não me sinto simplesmente como uma orientanda, mas como uma filha, pois a considero como uma mãezona.

A Victor (Victinho), meu querido e eterno orientador, que não mediu esforços na minha orientação, sempre solicito às minha inquietações e desespero nos momentos em que os experimentos não davam certo, tinha uma palavra amiga para me animar, estimular e incentivar.

A Érica, pela ajuda nos experimentos e também pelo bom ouvido, por me escutar e aconselhar nos momentos em que sentia dificuldades no decorrer do trabalho.

A Maria Socorro (Help), se a Bahia tem um anjo bom na pessoa de Irmã Dulce, o LabNq tem seu anjo bom na sua pessoa. Muito obrigado, por ter me acompanhar no laboratório final de semana, final de ano e carnaval.

Aos ICs, Tácio e Vanessa pela ajuda nos experimentos. E ao grupo LabNq.

Também agradeço a Prof.ª Maria de Fátima e Profº. Ramon, Alex e a Rosa.

Agradeço também a Profª Graça e Claudia pela ajuda no biotério, pois a conclusão deste Mestrado também se deve à ajuda de vocês. Pró Graça, obrigada pela pessoa de tamanha sensibilidade, que compreendia o meu desespero quando as ratas não estavam gestantes e você saia da sua casa independendo do dia se fosse carnaval ou no sábado se disponibilizando ir no biotério para pegar outro animal.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento”.

Albert Einstein

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo. No entanto, mecanismos molecular responsável pelo processo degenerativo no sistema dopaminérgico nigroestriatal durante a doença de Parkinson permanecem desconhecidos. Atualmente, concorda-se que disfunção mitocondrial, agregação de α-sinucleína, estresse oxidativo, neuroinflamação e degradação protéica são causas envolvidas. Estudos farmacológicos têm focado no uso de metabolitos secundários de plantas e, entre estes, os flavonoides têm mostrado atividade biológica com efeitos neuroprotetores, antiinflamatórios e antioxidantes. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos neuroprotetores e imunomodulatórios de flavonoides bioativos usando modelos *in vitro* de DP. Foram usados diferentes modelos de culturas neuronais, avaliadas pelo testes de MTT e análises morfológicas para avaliar os efeitos citotóxicos ou neuroprotetores da rutina e quercetina. Em seguida, foram usados diferentes modelos de cultura primária de células gliais e neuronais e testes de MTT, exclusão ao azul de tripan, Fluoro-Jade B, Western Blot ou imunocitoquímica para β-III-Tubulina, Western Blot para tirosina hidroxilase ou para GFAP para investigar o efeito citotóxico induzido por aminocromo e/ou o efeito neuroprotetor induzido por rutina. Também investigamos a resposta imunoinflamatória ou imunomodulatória dosando citocinas (IL6, IL10, TNF-alpha) usando o método de ELISA. Nossos resultados demonstraram que rutina e quercetina (10-50µM) não induziram decréscimo no metabolismo mitocondrial em linhagens celulares SHSY-5Y ou co-cultura primária de neurônios/células gliais, contudo estes aumentaram o metabolismo mitocondrial nas concentrações de 50 e 100 µM em células da linhagem PC12. Além disso, rutina (10µM) induziu alterações morfológicas em células PC12. Também foi visto que aminocromo (250-500µM) induziu uma redução na viabilidade celular em co-cultura de mesencéfalo e em cultura de microglia, cultura de células gliais e cultura de neurônios corticais. Ainda, a exposição ao aminocromo reduziu a expressão de β-III-tubulina, tirosina hidroxilase e GFAP em co-culturas de mesencéfalo e cultura de células gliais. Nossos resultados demonstram que a rutina protege células neurais frente a dano induzido por aminocromo, aumenta a expressão de β-III-tubulina e protege a rede de neuritos. Além do mais, aminocromo induziu redução de níveis de citocinas IL-6, IL-10 e TNF-alfa que foram reguladas a níveis basais quando a co-cultura de mesencéfalo foi tratada com rutina. Concluímos então que a rutina protege células PC12 contra danos celulares induzidos por MPTP, co-culturas de mesencéfalo e células gliais contra danos induzidos por aminocromo. Podemos sugerir que a redução no nível de citocinas é conseqüência da perda de células gliais induzidas por aminocromo e que o retorno a níveis basais podem ser resultado de glioproteção e neuroproteção induzida pela rutina.

Palavras-chave: Rutina, Doença de Parkinson, Neuroproteção, Neurotoxina, Aminocromo.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by the loss of dopaminergic neurons in the midbrain. The molecular mechanism responsible for degenerative process in the nigrostriatal dopaminergic system in PD remains unknown. Currently, there is a general agreement that mitochondrial dysfunction, α-synuclein aggregation, oxidative stress, neuroinflammation and impaired protein degradation are involved. Pharmacological studies have been focusing in using plant secondary metabolites and, among these, flavonoids have shown biological activity such neuroprotective, anti-inflammatory and antioxidant. In this sense, the objective of this work was to study the neuroprotective and immunomodulatory effects of a bioactive flavonoid using *in vitro* models of PD. We used different models of neuronal culture and MTT test and morphological analysis to make a screening of cytotoxic and/or neuroprotection by rutin and quercetin. After we used different models of primary culture of neuronal and glial cells and MTT test, Tripan Blue, Fluoro-Jade B, western blot or immunocytochemistry of β-III-Tubulin, tyrosine hydroxylase or GFAP in order to investigate the cytotoxic effect induced by aminochrome and/or neuroprotection induced by rutin. We also investigated immunoinflamatory response or immunomodulation by measuring cytokines (IL6, IL10, TNF-alpha) using ELISA. Our results demonstrated that rutin and quercetin (10-50µM) did not induce decrease in mitochondrial metabolism on SHSY-5Y cells line, or primary co-culture of neuron/glial cells, however it increased the mitochondrial metabolism at concentrations 50 and 100µM on PC12 cells line. Moreover rutin (10µM) induce alterations on PC12 cells morphology. We also saw that aminocrhome (250-500µM) induced a decrease on cell viability at midbrain co-culture and microglia culture, glial cells culture, cortical neurons culture. In addition, the exposure to aminocrhome decreased expression of β-III-tubulin, tyrosine hydroxylase and GFAP on midbrain co-cultures and glial cells culture. Our results demonstrate that rutin protects neural cells from damage induced by aminocrhome, increases β-III-tubulin expression and protects neurite network. Furthermore, aminocrhome induced reduction of cytokines IL-6, IL-10 and TNF-alpha levels that were regulated to basal levels when the midbrain co-culture was treated with rutin. We concluded that rutin protects against PC12 cells cell against death induced by MPTP and neuronal and glial cells against death induced by aminocrhome. We can suggest that the reduction in cytokine levels are consequence of the loss of glial cells induced by aminocrhome and that the return to baseline levels may result from glioprotection and neuroprotection induced by rutin.

Keywords: Rutin, Parkinson's disease, Neuroprotection, Neurotoxin, Aminocrhome.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Os flavonoides rutina e quercetina não interferem na viabilidade das células SHSY-5Y, PC-12 e em Co-culturas primárias de neurônio/células gliais corticais. A toxicidade foi avaliada pelo teste de MTT 44

FIGURA 2 – Efeito dos flavonoides quercetina e rutina em células PC12. Avaliação de morfologia celular por microscopia de contraste de fase. 45

FIGURA 3 – O flavonoide rutina protege as células PC12 expostas ao dano por MPTP. A avaliação neuroprotetora através do método de exclusão ao azul de tripan 45

FIGURA 4 – Testes de viabilidade celular em culturas de células neurais após exposição ao Aminocromo e MPTP..... 46

FIGURA 5 – Efeito do aminocromo na expressão de proteína marcadora de neurônios (β-III-Tubulina) e marcadora de neurônios dopaminérgicos (Tirosina Hidroxilase) em co-culturas mesencefálicas através de Western Blot e imunodetecção..... 47

FIGURA 6 – Efeito do aminocromo e rutina na expressão de proteína marcadora de neurônios (β-III-Tubulina) e marcadora de neurônios dopaminérgicos (Tirosina Hidroxilase) em co-culturas mesencefálicas através de Western Blot e imunodetecção. 48

FIGURA 7 – Análise da expressão da proteína neuronal β -III-tubulina por imunocitoquímica em co-cultura de mesencéfalo.....49

FIGURA 8- (A) Análise da citotoxicidade do aminocromo e atividade protetora da rutina em cultura de células de microglia, através do teste de exclusão ao azul de tripan. (B) Análise da citotoxicidade do aminocromo em cultura de células gliais, através do teste de MTT.....50

FIGURA 9 – Efeito do aminocromo e rutina na expressão de proteína marcadora de astrócitos (GFAP) em culturas de células gliais e co-culturas mesencefálicas através de Western Blot e imunodetecção..... 51

FIGURA 10 – Análise dos níveis de citocinas TNF-alfa (A), IL- 6 (B) e IL-10 (C), pelo método de ELISA, após 48h de exposição ao aminocromo (10µM) e/ou tratamento com rutina (10µM) em sobrenadante de co-cultura de mesencéfalo..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aβ25-35	Fragmento 25-35 da proteína beta – amilóide
Aβ42	Fragmento 42 da proteína beta – amilóide
BSA	Albumina sérica bovina
DA	Dopamina
DAPI	4,6diamidino-2-phenilindol
DAT	Transportador de Dopamina
DMF	Dimetilformamida
DNAmt	Ácido desoxirribonucleico – mitocondrial
DP	Doença de Parkinson
EGCG	Epigalocatequina-3-galato
GFAP	Proteina acídica fibrila glial
$HO^{\bullet -}$	Radical Hidroxil
IFN-γ	Interferon gamma
LB	Corpúsculos de Lewy
MAO-B	Monoamina oxidase B
MMP-3	Metaloproteinase de matriz
MPP^{+}	1-methyl-4phenylpyridinium
MPTP	1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenytetrazolium bromide
NADH	Dinucleótidio de adenina nicotinamida reduzida
NADPH	De fosfato de dinucleótidio de adenina nicotinamida β reduzida
NC	Crista neural
NO	Oxido Nitrico
ON	Over night
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância nigra pós-compacta
SOD	Superóxido dismutase
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
6-OHDA	6-hidroxidopamina
VMAT	Transportador vesícula de monoamina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. REVISÃO DE LITERATURA 17
2.1 DOENÇA DE PARKINSON 17
2.1.1 *FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON* *17*
2.1.2 RESPOSTA IMUNE NO SNC *20*
2.1.3. PRINCIPAIS MODELOS DE ESTUDO IN VITRO E IN VIVO DE DOENÇA DE PARKINSON 22
2.1.4 PRINCIPAIS TRATAMENTOS ATUALMENTE APLICADOS PARA PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON *25*
2.2 BIOCOMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS 26
2.2.1 FLAVONOIDES *26*
2.2.1.1 Efeitos biológicos da rutina e quercetina *28*

3. HIPÓTESE 30
4. OBJETIVOS 30
4.1. OBJETIVO GERAL 30
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30

5. MATERIAIS E MÉTODOS 31
5.1 CULTURAS DE CÉLULAS *31*
5.1.1CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC-12 NÃO DIFERENCIADAS *31*
5.1.2 CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM SHSY-5Y DIFERENCIADAS *31*
5.1.3 CULTURAS PRIMÁRIAS DE CÉLULAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL *32*
5.1.3.1 Cultura de células gliais corticais *32*
5.1.3.2 Cultura de neurônios corticais *33*
5.1.3.3 Co-cultura de neurônios/ células gliais corticais *33*
5.1.3.4 Co-cultura de neurônios/ células da glia mesencefálicas *34*
5.1.3.5 Cultura de células microgliais corticais 34
5.2 EXPOSIÇÕES ÀS DROGAS 35
5.2.1 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM FLAVONOIDES RUTINA E QUERCETINA *35*
5.2.2 INDUÇÃO DE DANOS CELULARES COM MPTP *35*
5.2.3 INDUÇÃO DE DANOS CELULARES COM AMINOCROMO 35

5.3. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR 36
5.3.1. TESTE DO MTT 36
5.3.2. ANÁLISE DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR *36*
5.3.3 ANÁLISE DA MORTE DE NEURÔNIOS POR FLUORO JADE B 37
5.3.4 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA GLIAL E NEURONAL 37
5.3.5 *MENSURAÇÃO DE CITOCINAS* 39
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA 39

6. RESULTADOS 40
6.1 SCREENING DE CITOTOXICIDADE DOS FLAVONOIDES EM DIFERENTES MODELOS NEURAIS *IN VITRO* 40
6.2 EFEITO NEUROPROTETOR DOS FLAVONOIDES EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 SOB AÇÃO DA TOXINA MPTP 40
6.3 ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DO AMINOCROMO EM CULTURA DE NEURÔNIOS CORTICAIS E CO-CULTURA MESENCEFÁLICA 40
6.4 EFEITO NEUROPROTETOR DOS FLAVONOIDES EM DIFERENTES MODELOS NEURAIS *IN VITRO* 41
6.5 EFEITO GLIOPROTETOR E IMUNOMODULADOR DO FLAVONOIDE RUTINA EM CO-CULTURA DE MESENCÉFALO 42

7. DISCUSSÃO 53

8. CONCLUSÃO 60

REFERÊNCIAS 61

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma das doenças neurodegenerativas mais prevalentes, embora sua causa permaneça desconhecida, muitos pesquisadores acreditam que a doença surge a partir de uma interação entre fatores genéticos e ambientais que leva à degeneração progressiva dos neurônios em regiões sensíveis do cérebro (PRINGSHEIM et al., 2014).

Segundo Dorsey et al. (2007), a estimativa, em 2005, do número de indivíduos com idade acima de 50 anos apresentando a doença de Parkinson foi de 4,1 e 4,6 milhões e espera-se que esse número dobre entre 8,7 e 9,3 milhões, em 2030, e que a maioria dos casos seja fora do mundo ocidental. Estes pesquisadores sugerem que esse aumento da população com DP está associado ao aumento da expectativa de vida e que o número de pessoas com esta enfermidade vai crescer substancialmente a menos que uma medida preventiva seja identificada (DORSEY et al., 2008).

Esta enfermidade apresenta-se por sinais clínicos característicos como: tremor em repouso, bradicinesia e rigidez, que são resultantes da degeneração progressiva e seletiva de neurônios dopaminérgicos (SCHAWKAT et al., 2015).

Diversas hipóteses têm sido levantadas sobre a causa da patogenia da DP, dentre elas a oxidação da dopamina (DA) citosólica (e seus metabólitos) conduzindo à produção de radicais livres citotóxicos (Para revisão ver SEGURA-AGUILAR; PARIS et al., 2014).

Segundo Bratic e Larsson (2013), espécies reativas de oxigênio (ROS) são considerados indesejáveis subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbico que induzem danos oxidativos para várias macromoléculas celulares devido à sua elevada reatividade química, sendo que a cadeia respiratória está localizada na membrana mitocondrial interna, onde este é o principal local de abundante produção de superóxido de oxigênio na célula, formada em nível dos complexos I e III durante o transporte de elétrons. Contudo, esse superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD) para um radical hidroxil altamente reativo, sendo que este é considerado como sendo a forma mais prejudicial de ROS, provocando danos oxidativos para praticamente todos os tipos de molécula na célula, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (BRATIC; LARSSON, 2013).

Estudos também têm mostrado que a redução de um elétron do aminocromo leva a formação de radical leucoaminocromo-o-semiquinona, gerando a formação de peróxido de hidrogênio, radicais hidroxil, depleção de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida

(NADH), de oxigênio e de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH) reduzida, necessários para a redução da glutationa oxidada catalisada pela glutationa-peroxidase gerando dano mitocondrial e morte neural (PARIS et al., 2011)

As células microgliais e astrogliais estão implicadas em processos de neuroinflamação e morte celular dopaminérgica (GAO et al., 2003; BARCIA et al., 2012). A ativação microglial promove aumento de fatores inflamatórios, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (MOGI et al., 1994b) e interferon gama (IFN-γ) (MOUNT et al., 2007), que estão elevados no soro de pacientes com doença de Parkinson. Análises *post-mortem* de cérebros de pacientes com DP demonstraram aumento de citocinas no sistema nigroestriatal (MOGI et al., 1994a; MOGI et al., 1994b). Esta reação inflamatória generalizada observada poderia estar sendo causada, potencialmente, pela ativação glial que ocorre depois da morte dopaminérgica (HIRSCH et al., 1998; NAGATSU E SAWADA, 2007). Análises *post-mortem* da SNpc (Substância nigra pars-compacta) tem mostrado evidente degeneração dopaminérgica, que se correlaciona com aumento de células microgliais ativadas (McGEER et al., 1988) e astrócitos reativos (FORNO et al., 1992).

As atuais terapias aplicadas em pacientes com doença de Parkinson apresentam ação sintomática e não diminuem ou param a degeneração de neuronal, por isso pesquisas com produtos naturais que apresentem propriedades farmacológicas, tais como agentes antioxidantes que apresentem potencial em varrer radicais livres, podem proteger contra degeneração neuronal e potencialmente retardar, prevenir e tratar a DP (SCHAPIRA et al 2005; SMITH et al 2011; ANTONINI et al 2009; CHEN et al., 2006).

Um exemplo de compostos naturais farmacologicamente ativos é o dos flavonoides, que são compostos polifenólicos amplamente encontrados em alimentos de origem vegetal, que apresentam uma diversidade de atividades biológicas que inclui: neuroprotetora (DAJAS et al., 2003; KANG et al., 2005; MERCER et al., 2005), antitumoral (LAMBERT et al., 2007; CABRERA et al., 2007), antioxidante (CHEN et al., 2006) e anti-inflamatória (GUARDIA et al., 2001). Incluindo inibição da produção de citocinas pro-inflamatórias e modulação da enzima formadora de NO (iNOS) (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; SILVÁN et al., 1996).

Além dessas propriedades, os flavonoides também ativam a via de MAPK (ERK-2, JNK1, e p38), a expressão de genes de sobrevivência (c-Fos, c-Jun) e estimulam a defesa contra insultos tóxicos (enzimas desintoxicantes de fase II; glutationa S -transferase, a quinona redutase), ativação de astrócitos e microglia, liberação de fator de necrose tumoral-α

(TNF-α), aumentam a capacidade de eliminar radicais livres e de resgatar disfunção astrocitária (WILLIAMS et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Com base nos relatos da literatura sobre efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos flavonoides, e o envolvimento da resposta neuroinflamatória e estresse oxidativo na patogênese da doença de Parkinson, nossa hipótese é que os flavonoides protegem contra a neurodegeneração que ocorre nesta enfermidade.

Assim, o presente projeto tem como objetivo analisar o potencial neuroprotetor de flavonoides em modelos *in vitro* da doença de Parkinson.

Nesta dissertação de mestrado, no primeiro momento serão descritos os principais aspectos da enfermidade de Parkinson, sua patogenia, alterações do sistema imune em pacientes e os modelos padronizados para o estudo da sua etiologia e descoberta de novos fármacos. Em seguida, serão abordadas prospecções de fármacos, e estudos sobre as propriedades biológicas dos flavonoides no Sistema Nervoso (SN). E por fim, serão apresentados nossos estudos sobre a neuroproteção de flavonoides em modelos *in vitro* da doença de Parkinson.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, é uma doença neurodegenerativa crônica, progressiva caracterizada por sintomas motores característicos que incluem bradicinesia (lentidão dos movimentos), ataxia, rigidez e tremor em repouso (HORNYKIEWICZ, 1966; RIEDERER e WUKETICH, 1976). Mas que também é acompanhada por uma série de manifestações não motoras, incluindo ansiedade, depressão, demência e distúrbios autonômicos (DAWSON; DAWSON, 2003; GIRÁLDEZ-PÉREZ et al., 2014).

Além desses sintomas outras alterações generalizadas são observadas envolvendo alterações em diferentes áreas do cérebro causado pela inclusão de corpos de Lewy (tálamo, hipotálamo, bulbo olfatório ou do tronco cerebral) ou alterações no sistema nervoso autônomo, indicando que essa enfermidade não é apenas uma alteração motora, mais sim, um distúrbio sensorial, cognitivo, psiquiátrico e autônomo (GIRÁLDEZ-PÉREZ et al., 2014). Segundo Shulman et al. (2010), os sintomas não motores podem preceder o desenvolvimento de sintomas motores por muitos anos na DP e é patologicamente definida pela neurodegeneração de células dopaminérgicas SNpc em associação com patologia da α-sinucleína.

Atualmente a DP é a segunda enfermidade neurodegenerativa mais comum nos países desenvolvidos. E sua incidência aumentou exponencialmente a partir dos anos 60, sendo que ainda há previsões que aumente drasticamente com o aumento da expectativa de vida (DORSEY et al., 2007).

Embora a causa da doença de Parkinson ainda seja desconhecida, várias teorias têm sido estudadas como neuroinflamação, excitotoxicidade, aumentos de ferro na substância nigra pars compacta, e/ou depleção de antioxidantes endógenos, agregação de α-sinucleína, disfunção mitocondrial e disfunção na degradação de proteínas que estão envolvidos na neurodegeneração (BARZILAI e MELAMED, 2003; SEGURA-AGUILAR et al., 2014).

2.1.1 FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON

Várias hipóteses têm sido estudadas para a patogenia da DP dentre elas: mutações em vários genes relacionados ao tráfico de organela parecem predispor indivíduos para o

desenvolvimento de DP, pois transporte axonal através de microtúbulos é necessário para remover mitocôndrias danificadas, para o transporte de vesículas e vacúolos autofágicos, esse tráfico adequado sobre os microtúbulos requer a produção de ATP mitocondrial para as proteínas motoras dineina, cinesina e miosina e para função de actina (SULZER, 2007).

Sabe-se que uma combinação de fatores genéticos e ambientais ocasiona a agregação da proteína α-sinucleína anormal nos corpos de neurônios levando a disfunção celular e, em seguida, a morte neuronal (DAVIE, 2008). Entretanto o conhecimento sobre a etiopatogenia da DP não está bem esclarecido. A maior parte das hipóteses deriva de tecidos *post-mortem* ou modelos animais. Os mecanismos responsáveis pela perda neuronal têm sido discutidos durante anos.

Uma das teorias mais sustentadas sugere que a oxidação da dopamina (DA) citosólica (e seus metabolitos) conduz à produção de radicais livres citotóxicos (GREENAMYRE; HASTINGS, 2004). Embora Fahn (2005a) considere que a DA não seja por si mesma uma fonte significativa de espécies reativas de oxigênio (ROS), já que o tratamento com L-DOPA (que eleva os níveis de DA em pacientes com Parkinson) não acelera o progresso da enfermidade nem gera maior vulnerabilidade de neurônios em diferentes regiões. Por outro lado, em pH fisiológico, a dopamina é oxidada a dopamina-o-quinona, que cicliza em vários passos à aminocromo, um precursor da neuromelanina, que normalmente se acumula no decorrer da idade na substância *nigra* (ZECCA et al., 2002; ZECCA et al., 2008). Em contrapartida, em indivíduos com a doença de Parkinson há perda de neurônios dopaminérgicos por alguns mecanismos induzidos pelo aminocromo, tais como: formação de adutos com α-sinucleína inibindo a fibrilização desta, com isto gerando e estabilizando protofibrilas neurotóxicas (CONWAY et al., 2001; NORRIS et al., 2005); redução de um elétron por flavoenzimas formando radical leucoaminocromo-o-semiquinona, que é extremamente reativo com oxigênio, e pode reduzi-lo a radicais superóxido e gerar citotoxidade (ARRIAGADA et al., 2004; FUENTES et al., 2007; PARIS et al., 2001; PARIS et al., 2005a,b).

Além disso, vários autores coincidem a informação de que a disfunção mitocondrial tem um papel importante na DP (HENCHCLIFFE e BEAL, 2008; SCHAPIRA, 2008b; VILA et al., 2008). Esta hipótese nasceu acidentalmente em 1983, quando se observou que o inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), causava sintomas similares aos da enfermidade (LANGSTON et al., 1983). O que estava altamente vinculado à morte de neurônios catecolaminérgicos, principalmente da região mesencefálica (BURNS et al., 1983).

Hoje, já é bem compreendido o mecanismo com que um agente inibidor de atividade mitocondrial pode promover a morte celular via o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, falha bioenergética e liberação de citocromo c, que pode ativar vias apoptóticas e causar doenças degenerativas, dentre elas a doença de Parkinson (LIU et al.,2009; PERIER e VILA, 2012).

Atualmente, numerosas evidencias sustentam esta teoria: (1) compostos tóxicos cujo alvo é a mitocôndria, como por exemplo, a rotenona, induzem a degeneração dopaminérgica por mecanismos similares aos do MPTP (PRZEDBORSKI et al., 2004); (2) vários dos genes implicados nas formas idiopática e familiar da DP codificam proteínas relacionadas às mitocôndrias (MOORE et al., 2005; ABOU-SLEIMAN et al., 2006; SCHAPIRA, 2008a) e (3) em amostras *post morten* da SNpc coletadas de pacientes com DP há uma diminuição significante da atividade do complexo I mitocondrial e déficit na cadeia transportadora de elétrons (CTe) (MANN et al., 1994; KEENEY et al., 2006). Ainda, tem sido observado danos oxidativos a outros componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA (ZHANG et al., 1999), cuja fonte de estresse oxidativo parece ser o anion radical superóxido (O_2^-) e outras ROS, geradas por ineficiências na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (NICHOLLS, 2002).

Segundo Soong e Cols (1992), a produção elevada de O_2^- poderia ser responsável também por altos níveis de mutações somáticas do DNA em neurônios DA da SNpc e também do DNA mitocondrial (DNAmt), que aparenta ser mais vulnerável devido à proximidade física do sitio de geração de radical. De fato, os neurônios da substancia nigra destes pacientes mostram acúmulo de deleções do DNAmt (BENDER et al., 2006). Em vista que, o genoma mitocondrial codifica treze proteínas envolvidas na cadeia respiratória, sete dos quais estão implicados na formação do complexo I (SCHAPIRA, 2008a), e que ao perderem sua função irão influenciar negativamente na produção de ATP, podendo contribuir para um dano bioenergético dos neurônios DA da SNpc e finalmente a morte celular (BENDER et al., 2006; SURMEIER et al., 2011).

Outras evidências relacionadas com a fisiopatologia da DP apontam um forte componente oxidativo. Os elementos expostos anteriormente mostram que embora a DP seja uma enfermidade multifatorial, cuja complexa etiologia permanece em estudo, são inequívocas as evidencias que demonstram o papel do estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial na perda de neurônios DA da SNpc. Os níveis de glutationa reduzida se encontram diminuídos na SNpc, e a depleção desta tem sido associada à perda de neurônios nessa zona (EBADI et al., 1996). A diminuição da capacidade da glutationa reduzida de

detoxicar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) aumenta o risco da formação de radicais livres e da peroxidação lipídica, consequentemente, tem-se observado níveis aumentados de malonildialdehido e hidroperóxidos nesta região. Outro fator importante relacionado com o aumento de estresse oxidativo nos pacientes com Parkinson, é o acumulo de ferro na SNpc, por ser esta uma das zonas de maior acúmulo deste metal KIENZL et al., 1995. Existem muitos relatos que associam a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) com a liberação de ferro da ferritina, desta maneira, o ferro fica disponível para catalisar a reação de Fenton-Haber-Weiss, neste caso para formar o radical hidroxil ($HO^{\bullet -}$.) e desencadear o estresse oxidativo. Por tudo isto, muitos autores sugerem que a terapia com antioxidantes e quelantes de ferro poderia ser uma alternativa eficaz para o tratamento da DP (KIENZL et al., 1999).

Por outro lado, ainda há outra hipótese sobre as causas da DP, que tem como foco de estudo as α- sinucleínas, que são proteínas de aproximadamente 19-20 kDa existentes como um monômero nativamente desdobrado no citosol neuronal e nos terminais pré-sinápticos contendo 120-140 resíduos de aminoácidos. Entretanto, quando estas se encontram na presença de membranas lipídicas sofrem uma alteração conformacional de uma estrutura secundária helicoidal α-hélice, para uma estrutura secundária em forma de folhas β-pregueadas, que são propensas à formação de dímeros e oligômeros neurotóxicos (CLAYTON e GEORGE, 1998; JAKES et al., 1994; KIM et al., 2014; SURGUCHOV et al., 1999). Além disso, a α-sinucleína torna-se propensa a agregação quando sofre fosforilação, ubiquitinação, nitração e truncagem (BEYER e ARIZA, 2012; DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; LI e BEAL, 2005).

2.1.2 RESPOSTA IMUNE NO SNC

Ainda, é reconhecido que ocorrem alterações no sistema imune de pacientes acometidos pela enfermidade de Parkinson, dentre elas, mudanças na população de linfócitos do fluido cerebroespinhal e do sangue, síntese de imunoglobulinas, citocinas e proteínas de fase aguda (CZŁONKOWSKA et al., 2002). E as células da microglia entram como um importante agente neuroinflamatório nesta enfermidade (McMEER, 1988), uma vez que estas podem ser ativadas por fatores liberados na morte de neurônios dopaminérgicos como metaloproteinase de matriz 3 (MMP-3), neuromelanina e α-sinucleína.

A ativação microglial é característica patológica comum de doenças neurodegenerativas (WANG et al., 2014). Nas regiões lesionadas no sistema nervoso central (SNC) há evidencias de inflamação, caracterizada por reação glial, especialmente de

microglia, bem como aumento na expressão de receptores de antígenos do tipo HLA, citocinas e componentes do sistema complemento (McGEER et al., 1988; HIRSCH et al., 1998; KURKOWSKA-JSTRZEBSKA et al.,1999). Segundo Moehle et al. (2012) a ativação microglial induz o aumento da expressão de LRRK2, que pode mediar alguns aspectos da sinalização ou a diferenciação em células da resposta imune inata. Por outro lado, a inibição da expressão de LRRK2 atenua a resposta inflamatória microglial.

Ressaltando que, a resposta microglial inflamatória iniciada pelo dano neuronal primário em células dopaminérgicas da substância nigra é marcada por produção de citocinas inflamatórias (TNFα, IL-6, IL-1β) e indução de estresse oxidativo, podendo desse modo, agravar o curso da doença. Durante o dano cerebral crônico, astrócitos também induzem a libertação de citocinas como TNF-α, IL-1β, IL-6, que por sua vez são importantes na ativação da microglia e consequente morte neuronal. Neste caso, a morte de neurônios dopaminérgicos, provavelmente ocorre através da ativação de apoptose por citocinas como TNF-α, IL-1β, IL-6 (CABEZAS et al., 2014).

Também pode ser evidenciada na literatura referência sobre a resposta imune adaptativa na DP. Um exemplo visto em estudos de Kannarkat et al. (2013), que caracterizaram que as células da microglia expressam moléculas de MHC-II e seu reconhecimento pela célula T $CD4^+$ através do seu receptor único ativa a célula T, que por sua vez ativa células T $CD8^+$ citotóxicas levando a degeneração neuronal na doença de Parkinson. Sabe-se que o aumento da susceptibilidade para DP está relacionado a moléculas MHC II que podem influenciar no aumento da neuroinflamação e que as micrioglias ativadas secretam citocinas e quimiocinas que perturbam a barreira hemato-encefálica e atraem linfócitos para o local da lesão (HIRSCH et al., 2009; MOSLEY et al., 2012).

É importante salientar que, as células da microglia estão presentes no desenvolvimento cerebral e que no cérebro maduro podem ser encontradas por todo sistema nervoso central. Elas são de origem mesodérmica, assumem uma forma amebóide quando ocorre algum insulto no ambiente cerebral, mas quando isso não acontece se mantêm em repouso numa morfologia ramificada (DEL RIO-HORTEGA, 1932).

Segundo Kettenmann et al. (2011) a microglia é um conjunto de macrófagos residentes no sistema nervoso central, que podem se comunicar com neurônios através de sinalização e expressam receptores de citocinas, regulam o desenvolvimento, estruturação e funcionamento de redes neuronais e são considerados os sensores de patologias cerebral, que em caso de qualquer detecção de sinais de lesões cerebrais ou disfunção do sistema nervoso passam por um processo de ativação de vários estágios complexos que os converte às células

microgliais ativadas. Os astrócitos similarmente aos neurônios são células de origem ectodérmica e apresentam diversas funções que contribuem para a limpeza de ROS e toxinas do ambiente extracelular, estabilização de comunicação célula a célula, manutenção do meio ambiente neuronal, manutenção do metabolismo neuronal e síntese de neurotransmissores e possuem receptores e sítios de recaptação de neurotransmissores (JANSEN et al., 2014; CHARRON et al., 2014; MARAGAKIS e ROTHSTEIN, 2006).

Segundo Halliday e Stevens (2011), os fatores celulares envolvidos na iniciação da destruição do tecido subjacente PD não se limitam aos neurônios. Há evidências de que as alterações precoces na glia são mais substanciais do que se pensava anteriormente, e os astrócitos e microglia parecem estar envolvidas na acumulação de α-sinucleína considerados importantes para o início da degeneração. Lee *et al*. (2011), relataram que as proteínas α-sinucleínas segregadas a partir de células neuronais são prontamente endocitadas pelos astrócitos.

Em suma, a disfunção dos astrócitos ou o processo de astrogliose reativa está como uma fonte importante de potenciais mecanismos que possam contribuir para uma série de distúrbios do SNC (CHARRON et al., 2014). Já se sabe que a astrogliose é um processo continuo de alterações moleculares, celulares e funcionais que vão desde as alterações na expressão do gene para a formação de cicatriz, que podem exercer efeitos benéficos ou nocivos (HAMBY; SOFRONIEW, 2010).

Todas essas evidencias sugerem que a neuroinflamação caracterizada por microgliose e astrogliose gerando a produção de citocinas pró-inflamatórias tem participação na patogênese da Doença de Parkinson, pois esta resposta glial excessiva leva a morte neuronal (FU et al., 2015; LI et al., 2005). Estas evidências sugerem que o uso de agentes anti-inflamatórios, que modulem a resposta neuro-imune, pode inibir a progressão da enfermidade de Parkinson (PETERSON; FLOOD, 2012).

2.1.3 PRINCIPAIS MODELOS DE ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE DOENÇA DE PARKINSON

Uma grande variedade de modelos biológicos associados às toxinas MPTP, 6-OHDA e aminocromo, se encontram disponíveis para a investigação de compostos com possível atividade antiparkisoniana. Neste sentido, o emprego de linhagens celulares de origem dopaminérgicas como SHSY-5Y (derivada de neuroblastoma humano), PC12 (derivada de tumor neuroendócrino de glândula adrenal de ratos) e RCSN-3 (derivada da substância nigra

de ratos) expostas à 6-OHDA (6-hidroxidopamina), MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) ou aminocromo constituem modelos *in vitro* atualmente adotados para estudos relacionados à enfermidade de Parkinson (ALBRECHT e BUERGER, 2009; PARIS et al., 2011).

Existem alguns modelos *in vitro* clássicos usados para ensaios farmacológicos que buscam compostos com possível atividade antiparkinsoniana. São exemplos: emprego de culturas postnatais de SNpc lesionadas com MPP^+, que age como um inibidor do complexo I mitocondrial (TIEU, 2011). Embora tenha sido demonstrado que o acúmulo de MPP^+ nos neurônios dopaminérgicos é um fator crítico para a neurotoxicidade, muitas vezes é usada em estudos *in vivo* ou *in vitro* a pré-toxina MPTP, que pode atravessar a barreira hemato-encefálica e sofrer bioativação à MPP^+, para então gerar a morte neuronal (WONG et al., 1999).

Após atravessar a barreira hemato-encefálica, o MPTP por mecanismos desconhecidos é convertido para MPDP pela MAO-B no interior das células astrocíticas e em seguida à MPP^+ que é liberado para o espaço extracelular e transportado pelo transportador de dopamina (DAT) para os neurônios dopaminérgicos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Uma vez dentro do neurônio o MPP^+ entra na mitocôndria e inibi o complexo I da cadeia respiratória (LIU et al., 1982), e depois, pode translocar-se por transportador vesícular de monoamina (VMAT) ou permanecer no citosol (LIN; KANG, 2005). Em cultura de astrócito foi verificado o acumulo intracelular de MPTP e que o mesmo encontra-se dentro de lisossomos (MARINI et al., 1992), e que os astrócitos são capazes de converter MPTP no seu metabólito neurotóxico MPP^+ (RANSOM et al., 1987).

O MPTP tem sido utilizado em macacos e roedores como um modelo experimental padrão para a DP (YAMASHITA; MATSUMOTO, 2007) e nos modelos que utilizam primatas, produz sintomas característico da doença de Parkinson em humanos, incluindo tremor, rigidez, lentidão de movimentos e instabilidade postural (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Além do MPTP como indutor de modelo de estudo *in vivo* para a doença de Parkinson, a neurotoxina 6-OHDA (2,4,5 trihidroxi fenil etilamina) também tem sido amplamente utilizada (Ungerstedt, 1968, BLUM, 2001). Esta é um análogo hidroxilado da dopamina aplicado para gerar lesão direta no sistema dopaminérgico *nigro-estriatal* (TIEU, 2011). Segundo Masoud et al. (2014), o transportador de dopamina é responsáveis por regular a homeostase da dopamina e cuja função é transportar a dopamina a partir do espaço

extracelular para o neurônio pré-sináptico, e o acúmulo de dopamina no citosol pode desencadear o estresse oxidativo e neurotoxicidade.

A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica (BHE) e quando é administrada por via sistêmica destrói os neurônios adrenérgicos dos gânglios simpáticos, mas não apresentam ação tóxica no sistema nervoso central. Contudo, a injeção intracerebral de 6-OHDA produz uma destruição seletiva de neurônios catecolaminérgicos. Esta especificidade é devida a sua alta afinidade pelo sistema de transporte de catecolaminas. Ungersted (1968), descreveu pela primeira vez que a injeção estereotáxica de 6-OHDA no feixe *nigro estriado* induzia uma lesão seletiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc.

Sabe-se que a 6-OHDA possui uma potente ação inibidora da cadeia respiratória mitocondrial. E que morte neuronal dopaminérgica induzida por 6-OHDA está ligada fundamentalmente à formação de H_2O_2, radicais livres tipo hidroxilo ($HO^{\bullet -}$.) e quinonas que se produzem em sua metabolização (EMBORG, 2004; HENZE et al., 2005). Estudos desenvolvidos com esta neurotoxina em linhagem celular PC12 mostraram que essas células sofreram estresse oxidativo, alterações na função mitocondrial e ativação da caspase-3 (JIANG et al., 2014).

O metabolismo da dopamina pela MAO-B gera espécies reativas de oxigênio (RAPPOLD; TIEU, 2010). Teorias recentes sugerem que mecanismos semelhantes àqueles que induzem oxidação da dopamina são responsáveis pela toxicidade gerada pela 6-OHDA, uma vez que a redução de um elétron da sua quinona foi essencial para a neurotoxicidade em células derivadas da substância nigra de ratos da linhagem RCSN silenciadas para a enzima DT-diaforase (VILLA et al., 2013).

Apesar do uso freqüente de neurotoxinas exógenas como o MPTP ou análogas de endógenas como a 6-OHDA, que induzem modelos tóxicos agudos, estas não podem modelar com precisão a patogênese da DP, uma vez que se trata de uma enfermidade neurodegenerativa de curso lento e progressivo. Ainda, a patologia causada por MPTP é limitada para o sistema nigro-estriatal, enquanto que na patologia da doença de Parkinson é mais generalizada (BLESA e PRZEDBORSKI, 2014; JENNER e MARSDEN, 1986).

Alguns estudos vêm mostrando a participação do aminocromo em processos neurotóxicos dos neurônios dopaminérgicos, sugerindo este como modelo de estudo *in vitro* ou *in vivo* da enfermidade de Parkinson. O aminocromo é produzido pela oxidação da dopamina e é o precursor da neuromelanina (PARIS et al., 2007). Já foi demonstrado que este induz disfunção mitocondrial em linhagem celular de neuroblastoma humano (SHSY-5Y) e em mitocôndria isolada cérebro de rato (VAN LAAR et al., 2009). E em estudo utilizando

mitocôndria isolada de cérebro de rato o aminocromo alterou a permeabilidade e respiração mitocondrial (BERMAN; HASTINGS, 1999), e células da linhagem RCSN-3 expostas ao aminocromo apresentaram alteração em organização do citoesqueleto, morte celular, disfunção mitocondrial, liberação de citocromo C, ativação de caspase-3, e formação de vacúolos autofágicos, quando sofreram inibição da enzima DT-Diaforase por tratamento com dicumarol, indicando a importância desta enzima para a proteção contra o dano celular induzido pelo aminocromo (PARIS et al., 2010; PARIS et al., 2011). Também, já foi visualizado que o aminocromo inibe a fibrilização de α- sinucleína (NORRIS et al., 2005), e com isso ocorre um aumento na formação de protofibrila que são neurotóxicas (CONWAY et al., 2001).

Quando a enzima DT-Diaforase não se encontra ativa, a redução de um elétron do aminocromo leva a formação do radical leucoaminocromo-o-semiquinona, gerando um ciclo redox entre a formação deste e do aminocromo com concomitante formação de peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, depleção de NADH e O_2 necessário para a produção de energia. Ainda, depleção de NADPH, necessários para a redução da glutationa oxidada catalisada pela glutationa-peroxidase (PARIS et al., 2011).

2.1.4 *PRINCIPAIS TRATAMENTOS ATUALMENTE APLICADOS PARA PACIENTES COM DOENÇA DE PARKINSON*

Há mais de três décadas, o tratamento da doença de Parkinson tem sido a utilização de L-Dopa, um precursor da dopamina, agonistas do receptor de dopamina e o uso de inibidores da monoamina oxidase [MAO-B] que reduzem o metabolismo da dopamina. Estes são aprovados pelo *Federal Drug Administration* (FDA) para uso em PD precoce e avançado, enquanto que inibidores da Catecol-O-metiltransferase (COMT) que têm a função de bloquear a metilação de L-DOPA na periferia, aumentando assim os níveis disponíveis no cérebro, são aprovados apenas para pacientes com sintomas flutuantes da DP. Ainda que, a L-Dopa produza efeitos colaterais importantes, que geralmente aparecem após vários anos de uso crônico como: desenvolvimento de flutuações motoras, discinesia e psicose (SCHAPIRA et al 2005; SMITH et al 2011).

Os agonistas da dopamina para tratar a doença de Parkinson eram classificados como opções de primeira linha para a monoterapia no início da doença em muitas diretrizes nacionais e internacionais, entretanto devido ao conhecimento de que o tratamento em longo prazo gera o risco de desenvolver transtornos do controle dos impulsos, edema periférico,

sonolência diurna e fibrose valvular cardíaca, fez-se com que em muitos países o seu uso passasse a ser restrito para opções de segunda linha com monitoramento de segurança (ANTONINI et al., 2009). Estas terapias têm ação sintomática e não diminuem ou param a degeneração neuronal, por isso pesquisas com produtos naturais que apresentem propriedades neuroprotetoras representam uma importante fonte de novos compostos bioativos contra esta enfermidade.

2.2 BIOCOMPOSTOS DERIVADOS DE PLANTAS

A utilização medicinal de produtos naturais, em especial os provindos de plantas, é paralela a própria história da humanidade. Segundo Franco (2005), o uso popular de plantas medicinais é uma arte que acompanha o ser humano desde os primórdios da civilização, sendo fundamentada no acúmulo de informações repassadas oralmente. Assim, diferentes sociedades humanas formaram seu conhecimento empírico próprio no uso medicinal ou tóxico das plantas. Neste aspecto, a indústria farmacêutica tem pesquisado e prospectado, também a partir dos chamados metabólitos secundários vegetais, moléculas que apresentem reconhecida ou possível correlação de atividade biológica sobre alguma patologia, seja como agente de ação direta contra microrganismos ou ação indireta, como ação moduladora do sistema imune ou ação anti-inflamatória. Diversas espécies de plantas de interesse na medicina humana e/ou veterinária (bem como seus princípios ativos) têm como alvo as células provenientes do SNC, concedendo a elas importância farmacológica e/ou toxicológica. Nos últimos anos, uma variedade de estudos tem sido conduzida objetivando-se avaliar possíveis atividades farmacológicas de moléculas ou extratos obtidos de plantas em patologias que acometem o SNC, como por exemplo, potencial anti-inflamatório e imunomodulatório em microglias ativadas (PARK et al., 2009; CHEN et al., 2011; SILVA et al., 2008).

2.2.1 Flavonoides

Entre os metabólitos secundários, de origem vegetal amplamente investigados na atualidade, estão os flavonoides, que representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Estes são encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos derivados, tais como os chás e vinhos. Os flavonoides possuem uma ampla diversidade estrutural que é atribuída ao

nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização. Para Simões (2004), diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, tais como atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória. Segundo Sak (2014), à atividade antioxidante e a capacidade de sequestrar as espécies reativas de oxigénio (ROS) representam a maior parte dos efeitos biológicos dos compostos fenólicos. Estudos mostram que em condições de inflamação e estresse oxidativo, os flavonóides podem impedir as cascatas de sinalização inflamatórios via inibição da NFkB e, assim, dininuir a produção de iNOS, por outro lado, eles também evitam a sobre-expressão de enzimas geradoras de ROS reduzindo os níveis de superóxido e de peroxinitrito (DUARTE et al., 2014). Segundo Yoon (2005), dentre os quarenta fármacos anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994, doze foram derivados ou baseados em polifenóis de origem natural.

Assim, polifenóis específicos são capazes de modular vias como: potencial de membrana mitocondrial, cadeia de transporte de elétron mitocondrial, síntese de ATP e remover ou inibir a formação de enzimas formadoras de ROS (SANDOVAL-ACUÑA et al., 2014. Alguns polifenóis podem exercer ação por suprimir a neuroinflamação e promover a memória, aprendizagem, e a função cognitiva (VAUZOUR, 2012). Segundo Spencer (2008) ao invés de atuar como um antioxidante clássico alguns flavonoides têm a capacidade de interagir com a proteínas quinases na cascata de sinalização para estimular a sobrevivência neuronal e/ou melhorar a plasticidade sináptica. A atividade anti-inflamatória dos flavonoides, segundo López-Posadas (2008), esta relacionada à modulação de células envolvidas na inflamação, como, por exemplo, inibindo: a proliferação dos linfócitos T, bem como, a produção de TNF, IL-1 e IL-17 (citocinas pró-inflamatórias) ou mesmo modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico.

Estudos sugerem um possível papel dos flavonoides na redução da morte neuronal associada com doenças neurodegenerativas em que o estresse oxidativo, ativação de caspase e apoptose neuronal estão envolvidos (SCHROETER et al., 2000). Vauzour *et al*. (2007), demonstraram que a epicatequina não só protege os neurônios contra insultos oxidativos, mas também tem o potencial de modular a função sináptica e aumento da regulação da expressão gênica através da sobre-regulação de genes envolvidos na plasticidade sináptica (SCHROETE et al., 2007). Por outro lado, o flavonoide casticina, isolado da planta *Croton betulaster*, demonstrou ser capaz de exercer um efeito neuroprotetor contra o apoptose basal de culturas primárias progenitoras, aumentando a população neuronal (SPORN, 2010).

Outros estudos mostraram que o flavonóide epigalocatequina-3 galato (EGCG), exerce ações neuroprotetoras em cultura de células da linhagem SH-SY5Y que foram submetidas a um dano com 6-OHDA (LEVITES et al., 2003), e que este flavonoide tem ação de atenuar a translocação nuclear de NF-kB e a sua atividade em células SH-SY5Y expostas a 6-OHDA (LEVITES et al., 2002). Ainda, polifenóis encontrados no chá verde (*Camellia sinensis*) têm a capacidade de inibir o transportador de dopamina (DAT) e com isso inibir a captação de MPP^+ protegendo as células mesencefálica contra o dano induzido por esta neurotoxina (PAN et al., 2003).

Neste contexto, por apresentarem ações neuroprotetoras, anti-inflamatórias, imunomoduladoras e antioxidantes, visualizamos os flavonoides como potenciais agentes terapêuticos contra processos oxidativos e inflamatórios do sistema nervoso central, em especial os envolvidos na doença de Parkinson.

2.2.1.1 Efeitos Biológicos da rutina e quercetina

Um exemplo de moléculas de origem vegetal cuja ação sobre as células do sistema nervoso tem sido estudada para fins farmacológicos, é o flavonoide rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo). Trata-se de um flavonoide glicosilado, pois apresenta um dissacarídeo (raminose + glicose) ligado a posição 3 do anel piranono (Para revisão, ver Becho et al., 2009). Este é amplamente encontrado na planta *Dimorphandra mollis Bent* do Semiárido da Bahia, entretanto é um flavonoide dietético comum, consumido em frutos, vegetais e bebidas de origem vegetal (TANG et al., 2011). E tem várias funções biológicas, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória, e efeitos anticancerígenos já descritos (WU et al., 2011).

As propriedades farmacológicas da rutina têm sido alvo de investigação como agente inibidor do estresse oxidativo, inidor da acumulação de colágeno de tipo IV e laminina, inibidor da liberação de TGF-β1 e demonstra ser eficaz na redução da neurotoxicidade via atividade antioxidante contra dano induzido por acrilamida (TANG et al., 2011; MOTAMEDSHARIATY et al., 2014). Estudos vêm mostrando que a rutina apresenta uma atividade seqüestradora de radicais livres e de inibição eficaz da peroxidação lipídica (YANG et al., 2008). Outros estudos desenvolvidos com linhagem celular PC12 submetido a dano com 6-OHDA mostraram que a rutina modula vários genes de proteção para evitar a morte de células neuronais, particularmente a supressão da Park2, Park5, Park7, Casp3 e Casp7 (MAGALINGAM et al., 2015). A rutina também apresenta propriedades de inibir

neurotoxicidade induzida por 6-OHDA em células PC-12, aumentando os níveis de enzimas antioxidantes e inibindo a peroxidação lipídica (MAGALINGAM et al., 2013).

Estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa revelaram que o flavonoide rutina inibiu o crescimento e modificou o fenótipo de células astrocíticas da linhagem GL-15, assim como foi capaz de induzir aumento na expressão de GFAP em culturas primárias de astrócitos (SANTOS et al., 2011; SILVA et al, 2008). Nones *et al*. (2012) verificaram que os astrócitos tratados com rutina não apresentaram alteração de morfologia e proliferação celular, entretanto revelaram que este flavonoide tem a capacidade de aumentar a população de células no sistema nervoso por inibir a morte celular por apoptose, que pode influenciar no perfil fenotípico dos progenitores neurais e ainda alterar a morfologia de astrócitos que adquirem aspecto fibrilar (Nones et al., 2012).

A quercetina é um bioflavonoide que não possui cadeia de carboidrato em seu anel aromático, sua estrutura é semelhante à da rutina, de forma que é considerado como a forma aglicona desta. A atividade antioxidante e o potencial neuroprotetor da quercetina têm sido relacionados à sua característica estrutural, devido à quantidade de hidroxilas presentes nos seus anéis fenólicos (ECHEVERRY et al., 2010).

A quercetina é um dos flavonoides presentes em alimentos de origem vegetal e embora seja considerado protetor contra lesão oxidativa, atenue na toxicidade induzida por peroxido de hidrogênio em culturas de células gliais obtidas de cérebro de ratos (KABADERE et al., 2011). Ainda, estudos relatam a quercetina com um potencial antioxidante, por bloquear a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), e proteger contra peroxidação lipídica, com isso inibidora da neurotoxicidade induzida por oxaliplatina (AZEVEDO et al., 2013). Segundo Fiorani et al., 2010, a quercetina apresenta função de prevenir dano mitocondrial e é progressivamente consumida por ativação de oxidorredutases. Por outro lado, o flavonoide quercetina apresenta a capacidade de estimular a mitocôndria regulando a atividade do complexo-I em neurônios dopaminérgicos danificados e de eliminar o radical OH gerado em modelo de ratos submetidos ao dano com rotenona (KARUPPAGOUNDER et al.,2013).

3. HIPÓTESE

Com base nos relatos da literatura sobre efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios dos flavonoides, e o envolvimento da resposta neuroinflamatória e estresse oxidativo na patogênese da doença de Parkinson, nossa hipótese é que os flavonoides protegem contra a neurodegeneração que ocorre nesta enfermidade.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar o potencial neuroprotetor de flavonoides em modelos *in vitro* da doença de Parkinson.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade neuroprotetora de flavonoides contra morte neuronal induzida por MPTP e aminocromo;
- caracterizar danos celulares induzidos por aminocromo em culturas primárias de sistema nervoso central de ratos;
- investigar a resposta neuroinflamatória induzida por aminocromo e o efeito anti-inflamatório da rutina contra esta resposta neuroinflamatória

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq) alocado no Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

5.1 CULTURAS DE CÉLULAS

5.1.1 Cultura de células da linhagem PC-12 não diferenciadas

As células PC12 são células derivadas de uma linhagem clonal de feocromocitoma de ratos que exibem características de neurônios, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Cultilab, SP, Brasil) suplementado com 1% de Penicilina/Estreptomicina, 1% de L-glutamina, 10% de soro equino e 5% de soro fetal bovino a 37°C com 5% de CO2. Quando as culturas atingiram a confluência foram descoladas das placas de cultura por uma solução contendo 0,05% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS. Culturas de células confluentes, cultivadas em placas de 100 mm Ø foram dissociadas utilizando-se uma solução de tripsina 0,05% e EDTA 0,02% diluídos em PBS, e replaqueadas em placas poliestireno de 4 cm de diâmetro ou de 96 poços (TPP), a uma densidade inicial de 2 x 105 células/cm^2 em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de Penicilina/Estreptomicina, 1% de L-glutamina, 10% de soro equino e 5% de soro fetal, e incubadas a 370°C em atmosfera úmida e controlada, contendo 5% de CO_2. Vinte e quatro horas após a redistribuição das células nas placas específicas para cada método de análise, as células foram tratadas com o flavonoide (1-100µM) e ou MPTP (1-400µM) diluídos diretamente no meio de cultura, por um período de até 48 horas. Todos os experimentos foram realizados até a décima passagem das células.

5.1.2 Cultura de células da linhagem SHSY-5Y diferenciadas

As células SH-SY5Y são originadas de neuroblastoma humano e quando diferenciadas com ácido retinóico (AR) apresentam fenótipo neuronal. Foram cultivadas em placas de cultura de poliestireno a uma densidade de $1x10^4$ células/cm^2, em meio Dulbecco modificado meio DMEM HAMF12 (Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 0,5 mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5µg/ml de fungizona, 2 mM L-glutamina, 3,6g/L de HEPES, 12 mL/L de glicose 50% e 10%soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil). Após 24h as células

foram induzidas à diferenciação com ácido retinóico, de forma a se obter células neurais com propriedades semelhantes aos neurônios, incluindo o crescimento de neuritos (CAVANAUGH et al., 2006; FERNANDEZ-GOMEZ et al., 2006). Este processo seguiu o protocolo descrito por Pahlman *et al*. (1984), tratando as células com 10 µM de AR diluído em meio de cultura por um período de 7 dias. Após diferenciação, a linhagem passou a ser designada como SH-SY5Y(RA) e foi submetida ao tratamento com os flavonoides rutina e quercetina nas concentrações de 10 e 50µM, por 24h.

5.1.3 Culturas primárias de células do sistema nervoso central

Para alcançarmos diferentes objetivos, culturas primárias foram realizadas a partir de regiões específicas do sistema nervoso central de fetos ou neonatos de ratos Wistar obtidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia e sofreram procedimentos segundo protocolo já bem estabelecidos no LabNq e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS, Protocolo nº 0272012).

5.1.3.1 Culturas de células gliais corticais

Culturas primárias de células gliais foram preparadas de acordo com método de Cookson et al (1994) modificado. Foram utilizados ratos Wistar neonatos (0-2 dia), que foram decapitados e seus hemisférios cerebrais expostos e removidos assepticamente. As células dissociadas foram suspensas em meio Dulbecco modificado meio DMEM HAMF12 (Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 0,5 mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/ml de fungizona, 2 mM L-glutamina, 3,6g/L de HEPES, 12 mL/L de glicose 50% e 10%soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil). As células gliais foram semeadas em garrafas de cultura de poliestireno (Cultilab, SP, Brasil) de 270 mm previamente sensibilizados com Poli-D-Lysina (Sigma P7280) cultivadas em câmara úmida com 5% CO2 a 37°C. A cada 48 h o meio de cultura foi trocado. Apos 15 dias, quando se esperava que a glia tivesse atingido maturidade, as células foram tripsinizadas e replaqueadas, de acordo com o teste a ser adotado, para placas de poliestireno.

5.1.3.2 Culturas de neurônios corticais.

Culturas primárias de neurônio foram preparadas de acordo com o método de Tetsuya et al. (1999) modificado. Foram utilizados fetos de ratos Wistar (15 - 18 dias). Após serem anestesiadas com câmara de CO2, as fêmeas gestantes foram sacrificadas por deslocamento da articulação atlanto-occipital e sofreram cirurgia cesariana para retirada do útero gravídico. Os fetos foram retirados do útero e foram decapitados. Seus hemisférios cerebrais foram expostos e removidos assepticamente. As meninges e os vasos sanguíneos foram retirados dos córtices cirurgicamente e, em seguida, após dissociação mecânica, forçados a passar por uma membrana de Nitex estéril com malha de 75µm. As células dissociadas foram suspensas em meio Dulbecco (DMEM/HAM F12, Cultilab, SP, Brasil) suplementado com 6,25 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3,6 g/L de Hepes, glicose a 0,6 % e 10 % de soro fetal bovino (Cultilab, SP, Brasil).

5.1.3.3 Co-cultura de neurônios/células gliais corticais

Culturas primárias das células da glia foram preparadas de acordo com método descrito por Cookson et al (1994). Resumidamente, os hemisférios cerebrais de crias de ratos Wistar de um dia de idade pós-natal foram isolados assepticamente e as meninges foram removidas com auxilio de lupa para posterior dissecção do tecido cortical. Em seguidas, as células foram suspensas em meio DMEM/HAM-F12 (Cultilab, SP, Brasil), suplementado com 100 UI/mL de penicilina G, estreptomicina 100 µg/mL, 2 mM de L-glutamina, 0,011 g/L de piruvato, 10% de SFB, 3,6 mg/L Hepes e 33 mM de glicose (Cultilab, SP, Brasil) e cultivadas em placas de 100 milímetros Ø em uma atmosfera úmida com 5% de CO2 a 37° C. O meio de cultura foi mudado a cada dois dias, e as células foram cultivadas durante 15 dias, para serem então tripsinizadas (tripsina-EDTA) e plaqueadas a uma densidade de 670 células/mm2 e mantidos por 48 h em uma atmosfera úmida com 5% de CO2 a 37° C para estabilização da cultura. Neste momento, neurônios de hemisférios cerebrais de embriões de ratos Wistar com 15-18 dias de idade gestacional, foram obtidos através do mesmo método descrito acima para a cultura da glia. As células neuronais em suspensão no meio DMEM/HAM-F12 suplementado foram semeadas sobre a monocamada astroglial numa proporção de 1:2 células gliais (335 células/mm2). As células gliais e neuronais juntas foram incubadas em atmosfera úmida com 5% de CO2 a 37° C durante 8 dias, quando os tratamentos foram realizados.

5.1.3.4 Co-cultura de neurônios/células gliais mesencefálicas

Culturas primárias de neurônios/células gliais mesencefálicas foram preparadas de acordo com o método de (ZHANG et al., 2013) modificado. Foram utilizados fetos de ratos Wistar (15 - 18 dias), após serem anestesiadas em câmara de CO2, as fêmeas gestantes foram sacrificadas por deslocamento da articulação atlanto-occipital e sofreram cirurgia cesariana para retirada do útero gravídico. Os fetos foram retirados do útero e foram decapitados e o mesencéfalo foi removidos assepticamente. As meninges e os vasos sanguíneos foram retirados cirurgicamente e, em seguida, após dissociação mecânica, forçados a passar por uma membrana de Nitex estéril com malha de 75µm. As células dissociadas foram suspensas em meio Dulbecco (DMEM, Cultilab, SP, Brasil) suplementado com 6,25 µg/mL de penicilina/estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 3,6 g/L de Hepes, glicose a 0,6 % e 10 % de soro fetal bovino e soro equino (Cultilab, SP, Brasil). As celulas foram semeadas em placas de poliestireno de acordo com teste a ser adotado previamente sensibilizados com Poli-D-Lysina (Sigma P7280) por 4h e com Laminina **** over night e cultivadas em câmara úmida com 5% CO_2 a 37°C. No dia 03 foi retirada 50% do meio com acréscimo da mesma quantidade que foi retirado demeio novo e no dia 07 as células foram utilizadas para testes.

5.1.3.5 Cultura de células microgliais corticais

Células da microglia foram obtidas a partir do córtex de ratos neonatos (0-2 dias). Após dissociação mecânica, as células foram dispostas em frascos de cultura de 75 cm², previamente tratados com 50µg/ml de poli-D-lisina, acrescentado 33 mM de glicose, 2mM de glutamina, 3mM de bicarbonato de sódio, 0,5 mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/ml de fungizona em meio DMEM suplementado com 6,25 µg/ml gentamicina, 10% de soro equino (Gibco, Grand Island, NY), e 10% SFB (Cultilab,SP, Brasil). As células foram mantidas em cultura mista glial por até 7 dias. As células microgliais foram removidas a partir da cultura mista glial através de agitação a 1000 rpm durante 3 horas. Após o término da agitação o meio foi recolhido, centrifugado a 1000rpm, e as células, após contagem numa câmara de Neubauer, foram utilizadas nas diferentes abordagens experimentais.

5.2 EXPOSIÇÕES ÀS DROGAS

5.2.1 Tratamento das células com flavonoides rutina e quercetina

Os flavonoides rutina e quercetina foram obtidos da Sigma-Aldrich (98% de pureza). Estes foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 100mM formando soluções de estoque, mantidas no escuro e à temperatura de -4°C. As diluições finais de cada um dos flavonoides foram obtidas no momento do tratamento através de diluições seriadas até concentrações de 1-100µM, que foram adotadas inicialmente para realização de *screening* de citotoxicidade, em que as células foram analisadas após o período de 24h ou 48h. Os controles foram tratados com DMSO diluído no meio de cultura em volume equivalente ao utilizado nos grupos tratados com os flavonoides, não ultrapassando a concentração final de 0,1%; que não mostrou nenhum efeito significativo nos parâmetros analisados em comparação com as células que não receberam diluentes.

5.2.2 Indução de danos celulares com MPTP

MPTP adquirido do fabricante (Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), foi pesado e dissolvido em água ultra-pura a uma concentração de 20mM formando uma solução mãe. No momento do experimento e a partir da mesma foram realizadas diluições para as concentrações de 50-5000µM. As células foram analisadas após o período de 24h ou 48h, a depender do procedimento experimental.

5.2.3 Indução de danos celulares com aminocromo

O aminocromo foi preparado e purificado de acordo com protocolo descrito por Paris et al. (2010). A síntese de aminocromo foi realizada a partir da oxidação de dopamina em solução à 5mM (Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), catalizada com solução de tirosinase 1mg/ml (Sigma Chemical Co. (St Louis, MO) em tampão MES 25 mM a pH 6,0 durante 10 minutos à temperatura ambiente. A coluna com uma pipeta de 10 ou 25ml foi preparada preparada com a resina CM-sephadex (Sigma Chemical Co. (St Louis, MO) previamente hidratada com MES 25 mM pH: 6,0 (por 24 horas); Aminocromo foi recolhido a partir da dopamina que não reagiu com a tirosinase na coluna CM- Sephadex e feito alíquotas de 1mL e estocado a -70. No dia da modulação o aminocromo foi então analisado usando

espectrofotometria de absorção na faixa de 478 nm de comprimento de onda e a sua concentração foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 3058 M^{-1} cm^{-1}. As células foram tratadas com aminocromo em contrações de 0,005µM – 10µM e analisadas após o período de 48 h.

5.3 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

5.3.1 Teste do MTT

Um dos métodos utilizados para avaliar a viabilidade celular foi o teste do MTT (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Este teste baseia-se no principio da conversão do substrato de cor amarelo (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas, em cristais de formazan, de cor violácea (HANSEN et al., 1989).

Após o término do tempo de exposição das culturas aos flavonóides (rutina ou quercetina) e/ou aos agentes indutores de danos celulares (6-OHDA, MPTP ou aminocromo), foi adicionado a solução de MTT (100 µL/poço) a uma concentração final de 1 µg/mL, diluído em meio de cultura. Para completa dissolução dos cristais de formazan, após as duas horas de contato com o MTT, foi acrescido um volume de 100 µL/poço de um tampão contendo 20% de duodecil sulfato de sódio (SDS), 50% de dimetilformamida (DMF) em pH 4,7, à temperatura ambiente. No dia seguinte, a absorbância óptica no comprimento de onda de 595 nm de cada amostra foi mensurada usando um espectrofotômetro (Varioscan Thermo, Finlândia). Os experimentos foram realizados em octuplicatas em três experimentos independentes e os resultados apresentados como a porcentagem da viabilidade (media e desvio padrão) em relação ao controle.

5.3.2 Análise da integridade da membrana celular

O possível dano à integridade da membrana celular foi analisado através do teste de exclusão do azul de tripan, 24 e 48 horas após a modulação das culturas celulares com os flavonoides e/ou as neurotoxinas. As células aderidas, soltas por tripsinização, e não aderidas foram centrifugadas a 1000 RPM por 5 minutos e ressuspensas em uma solução de meio de cultura contendo o corante azul de tripan à 0,1%. Após dez minutos de descanso, e outra ressuspensão, uma alíquota de 10µL da suspensão celular foi retirada e usada para contagem

do número de células em câmara de Neubauer através de microscopia óptica. As células viáveis foram determinadas através da capacidade destas de excluir o corante, formando um halo azulado ao seu redor, enquanto as células inviáveis tornam-se completamente coradas. Foi quantificado o percentual de células viáveis em relação ao número total de células no quadrante avaliado.

5.3.3. Análise da morte de neurônios por Fluoro Jade B

O reagente fluorescente Fluoro Jade B, é um marcador específico de neurônios em processo de degeneração (Milipore, AG310). As células das co-culturas mesencefálicas e PC12 foram cultivadas em placas de 96 poços pretas, numa densidade de $8,6X10^4$ células/poço, tratadas com o aminocromo nas concentrações de 0,01; 0,025; 0,05 e 0,1μM, por 48h e MPTP nas concentrações de 50, 100, 200 e 400μM, por 48h. Após o período de tratamento, foi retirado o sobrenadante dos poços de cultura e as células foram fixadas com etanol (4°C), por 10 minutos. As culturas foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 a 0,3% em PBS,por 10 minutos. Decorrido o período, as culturas foram lavadas por três vezes com água destilada e incubadas com a solução de Fluoro Jade B (0,001%), por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação e protegidas da luz. A seguir, as culturas foram lavadas por mais três vezes com PBS e incubadas com um agente fluorescente intercalante de DNA 4´,6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR), por 5 minutos e lavadas novamente com PBS. Então, foram realizadas duas leituras em fluorímetro (especificação do aparelho): a primeira no filtro 480/530 nm para quantificação do Fluoro Jade B e a segunda no filtro 350/470nm, para a quantificação do DAPI. O resultado da quantificação da morte celular foi avaliada mediante a relação entre a intensidade de fluorescência do Fluoro Jade B / intensidade de fluorescência do DAPI.

5.3.4 Avaliação da resposta glial e neuronal

Após exposição ao agente citotóxico aminocromo na concentração de 0,01 μM e co-tratamento com o flavonoide rutina a 10 μM, as culturas de células foram lavadas por três vezes com PBS em pH 7,4 e fixadas com paraformaldeído a 4% durante 20 minutos a –20 °C. O excesso de paraformaldeído foi desprezado e as placas ficaram em repouso até completa evaporação e secagem do paraformoldeído. As células foram reidratadas com PBS,

permeabilizadas com solução de Triton X-100 (0,2%) em PBS e bloqueadas com solução de Albumina Sérica Bovina BSA (5%) em PBS, por 1 hora. A seguir as culturas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: monoclonal de camundongo β-III-Tubulina (1:200, Santa Cruz Biotechnology - SC 69966), marcador de citoesqueleto de neurônios jovens, o anticorpo de coelho GFAP (1:300, Sigma – G9269) e anticorpo policlonal de coelho anti-tirosina hidroxilase (1:200,Millipore – AB 152) marcador, de neurônios dopaminérgicos, ambos anticorpos foram diluídos em PBS/BSA (1%) e mantidos em câmera úmida a 4ºC *over night* (ON) . Decorrido o tempo de incubação no anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com o anticorpos secundários: IgG anti-coelho Alexa Fluor 546 (1:200 Sigma) ou IgG anti-camundongo alexa fluor 488 (1:100, sigma) diluído em PBS, sob agitação lenta, por 2 h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram contra corados com o agente fluorescente intercalante de DNA 4´,6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) na concentração de 5 μg/mL durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas três vezes com PBS, analisadas por microscopia de fluorescência e fotografadas com filme Kodak Cromo ISO100 em câmera Olympus AX-70. Para todas as reações, os controles negativos foram realizados seguindo os mesmos procedimentos, com exceção da incubação no anticorpo primário.

Complementarmente, alterações nos níveis de expressão de proteínas foram investigadas através de westernblot e imunodetecção. Para tanto, após tratamento das células as proteínas foram extraídas com tampão de extração (4M uréia, 2% SDS, 2mM EGTA, 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2mM EDTA, 0,5% Triton X-100) contendo 1 μl/mL de um coquetel de inibidor de proteases, e a concentração de proteínas determinada usando-se o Kit BCA. As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose. As proteínas foram detectadas com anticorpos primários monoclonal de camundongo β-III-Tubulina (1:2000, Santa Cruz Biotechnology - SC 69966) marcador de neuritos de neurônios jovens, o anticorpo de coelho GFAP (1:1000, Sigma – G9269), anticorpo policlonal de coelho anti-tirosina hidroxilase (1:1000,Millipore – AB 152) marcadore de neurônios dopaminérgicos todos diluídos em PBS/BSA (1%) e mantidos em câmera úmida a 4ºC *over night* (ON) e reveladas com anticorpos secundários Anti mouse 1:1000 e Anti rabbit 1:1000 conjugados com peroxidase de rábano e seu substrato através de quimioluminescência. Após revelação os filmes de raio X foram escaneados para análise densitométrica das bandas imunorreativas, que é realizada utilizando o software ImageJ (WAYNE RASBAND; NATIONAL INSTITUTES

OF HEALTH, USA). Os resultados foram expressos em percentual de Unidades Densitométricas Arbitrárias em relação ao controle não tratado. Como controles, do depósito de proteínas, foram realizadas eletroforeses idênticas cujos géis foram corados com azul de Comasie.). Esta análise foi realizada em três experimentos independentes.

5.3.5 Mensuração de citocinas

As citocinas IL-6, IL 10 e TNF-α foram mensuradas no meio de cultura de células por ELISA sanduíche. As células foram cultivadas em placas de 15 mm de diâmetro (5 x 10^5 células/poço) e submetidas ao dano com aminocromo na concentração de 0,01µM e/ou tratadas com o flavonoide rutina (10µM). O meio de cultura de três experimentos independentes foi colhido 48 h após o tratamento. Os níveis das citocinas IL-6 (R & D systems) e TNF (R & D systems) foram medidas de acordo com as instruções do fabricante.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.10 (California, EUA) e registrados como média ± desvio padrão dos diferentes parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística entre os grupos foi realizada uma análise de variância seguida pelo teste One Way ANOVA com pós-teste de Student-Newmann-Keuls. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significantes. Os resultados de citotoxicidade com o teste do MTT foram apresentados como a percentagem da viabilidade (média e desvio padrão) em relação ao controle, considerado como 100 %.

6. **RESULTADOS**

6.1 SCREENING DE CITOTOXICIDADE DOS FLAVONOIDES EM DIFERENTES MODELOS NEURAIS *IN VITRO*

O efeito dos flavonoides rutina e quercetina, nas concentrações de 1 à 100 µM, sobre a viabilidade celular em diferentes modelos de culturas (linhagem SHSY-5Y, co-cultura primária de neurônio/células gliais corticais; linhagem PC-12) foi investigado através do teste do MTT, 24 h ou 48 h após o tratamento. Não se observou redução do metabolismo mitocondrial em nenhuma das concentrações testadas demonstrando que nestas condições os flavonoides não induziram efeitos citotóxicos (Figura 1: A, B, C e D). Por outro lado, observou-se que o flavonoide quercetina induziu aumento da atividade mitocondrial em culturas de linhagem de células PC12 a partir da concentração de 5µM e apresentou neste caso, resposta dose dependente a partir da concentração de 10µM, 48 h após os tratamentos (Figura 1C). Já o flavonoide rutina induziu aumento de atividade mitocondrial em cultura da linhagem PC12, a partir de concentrações de 50µM que também apresentou resposta dose-dependente, 48 h após os tratamentos (Figura 1D).

A análise de microscopia óptica 24 h após tratamento das culturas de células da linhagem PC12 tratadas com os flavonoides quercetina e rutina, ambos na concentração de 10 µM, mostrou que as células expostas ao flavonoide quercetina apresentam morfologia poligonal assim como as células em condições controle (Figura 2, Querc 10µM). Entretanto as células de culturas tratadas com rutina apresentaram alterações morfológicas caracterizadas por contração do corpo celular, emissão de finos prolongamentos e algumas células com morfologia esferoidal (Figura 2, Rut 10µM). Este teste foi determinante para selecionar a rutina como flavonoide de ação biológica mais intensa, portanto o utilizado para os demais experimentos

6.2 EFEITO NEUROPROTETOR DOS FLAVONOIDES EM CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 SOB AÇÃO DA TOXINA MPTP

Para melhor caracterizar a alteração fenotípica e definir a eleição da rutina, como flavonoide de estudo de efeito neuroprotetor, realizou-se teste de citotoxicidade através do método de exclusão ao azul de tripan em culturas de células PC12 expostas ao MPTP em concentração de 400µM e/ou rutina (10µM) e também em condições controle (DMSO 0,1%). Verificou-se que o flavonoide rutina induziu redução de 13% na quantidade de células da

linhagem PC12 viáveis, no entanto esta redução não foi estatisticamente significante, enquanto que exposição das células PC12 à pré-toxina MPTP induziu uma redução de 28% da viabilidade e foi estatisticamente significante. De forma interessante, em culturas tratadas de modo concomitante com MPTP e rutina, não foi visualizado redução na quantidade de células viáveis (Figura 3).

6.3 ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DO AMINOCROMO EM CULTURA DE NEURÔNIOS CORTICAIS E CO-CULTURA MESENCEFÁLICA

Ao avaliar a neurotoxicidade do aminocromo através do teste do MTT em cultura de neurônios corticais e Fluoro Jade-B em co-cultura mesencefálica expostas por 48h. Observou-se uma diminuição viabilidade neuronal em ambos os modelos de. Na cultura de neurônio cortical, foi visualizada redução da atividade mitocondrial nas concentrações de 0,025-0,1 µM com uma redução de 12,7 a 19,9% na conversão do MTT em relação à culturas em condições controle (Figura 4A). Por outro lado, as células neuronais tratadas com MPTP (50-400 µM) não sofreram alteração na atividade mitocondrial revalidado a importância das células gliais no metabolismo desta pré-toxina à MPP^+ para indução de citotoxicidade (Figura 4B). Ainda, a avaliação da viabilidade de neurônios em co-cultura de mesencéfalo, através do teste de coloração com Fluoro-Jade B, demonstrou indução de morte neuronal por aminocromo em concentrações de 0,025 e 0,05 µM, mas não na concentração de 0,1 µM (Figura 4C).

Ainda, visando caracterizar o dano neuronal induzido por aminocromo, co-culturas de mesencéfalo foram tratadas com a toxina à 10 µM e, 48 h após o tratamento, os níveis da expressão das proteínas β-III-Tubulina e Tirosina Hidroxilase foram avaliadas por Western blot e imunodetecção. Estas análises revelaram que o aminocromo induziu diminuição na expressão de ambas as proteínas, marcadores estrutural de neurônios e metabólico de neurônios dopaminérgicos, com redução de 55,4 e 52,5 unidades densitométricas arbitrárias, respectivamente (Figura 5: A, B, C e D).

6.4 EFEITO NEUROPROTETOR DOS FLAVONOIDES EM DIFERENTES MODELOS NEURAIS *IN VITRO*

Após caracterização do dano induzido por aminocromo em co-cultura mesencefálica, foi investigada a ação neuroprotetora da rutina (10µM) após 48 h de tratamento de culturas submetidas ao dano com 10µM da toxina. Para tanto, foram investigados os níveis de

expressão das proteínas β-III-Tubulina e Tirosina Hidroxilase por western blot e imunodetecção. Os resultados mostraram que as células submetidas ao dano com aminocromo tiveram uma diminuição da expressão desta proteína estrutural e da enzima de neurônios dopaminérgicos, o que é demonstrativo de neurodegeneração. Quando essas células foram submetidas ao tratamento somente com o flavonoide rutina ou concomitante com o aminocromo, verificou-se um aumento de 32,96 unidades densitométricas arbitrárias da expressão da β-III-Tubulina mostrando que o flavonoide protegeu os neurônios da degeneração (Figura 6: A e B). Entretanto não foi possível observar a mesma inibição da redução da expressão da Tirosina Hidroxilase em células tratadas concomitantemente com rutina, ainda que a rutina isoladamente, foi capaz de induzir aumento de 4,4 unidades densitométricas arbitrárias da expressão de Tirosina Hidroxilase em células que não foram expostas ao aminocromo (Figura 6: C e D).

Para melhor avaliar o aumento da expressão de β-III-Tubulina em co-cultura mesencefálica tratadas com rutina a 10µM, realizamos imunocitoquímica em culturas expostas ao aminocromo e/ou rutina e também em condições controle (DMSO 0,1%). Foi observado que em condições controle as culturas apresentaram uma densa rede de células β-III-Tubulina positivas (Figura 7A). Esta rede neuronal se apresentou desestruturada em culturas expostas por 48 h ao aminocromo (10µM). Estas culturas também se caracterizaram pela presença de neurônios com neuritos tortuosos (Figura 7B). No entanto, culturas expostas ao aminocromo em concentração tratadas com o flavonoide rutina tiveram a rede de células β-III-Tubulina positivas parcialmente mantida (Figura 7C). Ainda, apresentaram células neuronais com corpo celular e neuritos mais desenvolvidos, que o observado em condições controle e mais íntegros que aqueles expostas somente ao aminocromo (Figura 7C e D).

6.5 EFEITO GLIOPROTETOR E IMUNOMODULADOR DO FLAVONOIDE RUTINA EM CULTURA PRIMARIA DE CÉLULAS GLIAIS.

Visando melhor compreender o papel da resposta de células gliais ao dano induzido pelo amicromo e a ação do flavonoide rutina, foram realizados experimentos com culturas primárias de células gliais em condições similares àquelas realizadas em co-culturas de mesencéfalo. Em culturas de células gliais expostas ao aminocromo nas concentrações de 50-0,05 µM foi visualizada uma redução de 6,9 a 18% da atividade mitocondrial, através do teste de MTT, efeito não observado em culturas expostas à concentração de 0,1 µM da toxina (Figura 8B). Em cultura de microglias isoladas foi observada uma redução de 70% na

quantidade de células viáveis expostas a 0,01µM de aminocromo, e de 60% nas culturas expostas ao aminocromo na mais alta concentração testada (0,1 µM) (Figura 8A). Por outro lado, nas culturas que sofreram tratamento concomitantemente com rutina (10µM) e aminocromo, a redução na viabilidade de células microgliais foi reduzida à 50% (Figura 8A).

A avaliação glioprotetora da rutina (10µM) em cultura primária de glia e co-cultura de mesencéfalo expostas ao aminocromo (0,01µM) foi realizada através do western blot para avaliar os níveis de expressão da proteína GFAP. Ambos os modelos de culturas que foram expostos ao aminocromo na presença ou ausência da rutina apresentaram redução na expressão de GFAP (Figura 9: A, B, C e D). A rutina isoladamente aumentou a expressão desta proteína em co-culturas de mesencéfalo (Figura 9 C e D).

A investigação da resposta imunomodulatória em co-culturas mesencefálicas tratadas com aminocromo (0,01 µM) e/ou Rutina (10 µM) foi investigada através da quantificação dos níveis das citocinas IL-6, IL-10 e TNF-alfa secretadas no meio de cultura pelo teste de ELISA. Em condições controle foram observados níveis de IL-6 e IL-10 na ordem de 232,91 e 2.170,92pg/mL, respectivamente, e por outro lado baixos níveis de TNF-alfa (53,71 pg/mL), sugerindo um ambiente regulatório (Figura 10: A, B e C).

Em células tradadas com rutina (10µM) foi detectado um aumento dos níveis de citocina IL-6 (Figura 10B). Por outro lado, foi observado que houve uma redução dos níveis das citocinas IL-6, IL10 e TNF-alfa nas culturas tratadas com aminocromo (0,01 µM) em comparação com o controle negativo (0.1% DMSO) ou células tratadas com rutina, de forma que os níveis de citocinas IL-6 e IL-10 reduziram a valores não detectáveis pela técnica aplicada, enquanto que os níveis de TNF-alfa reduziram em 57,38% em relação ao controle. Também se observou que as células tratadas com aminocromo e rutina tiveram os níveis de IL10 e TNF-alfa semelhantes aos das células tratadas com rutina e ao controle negativo, e os níveis de IL-6 semelhante aos níveis detectados em células tratadas apenas com rutina (Figura 10: A, B e C).

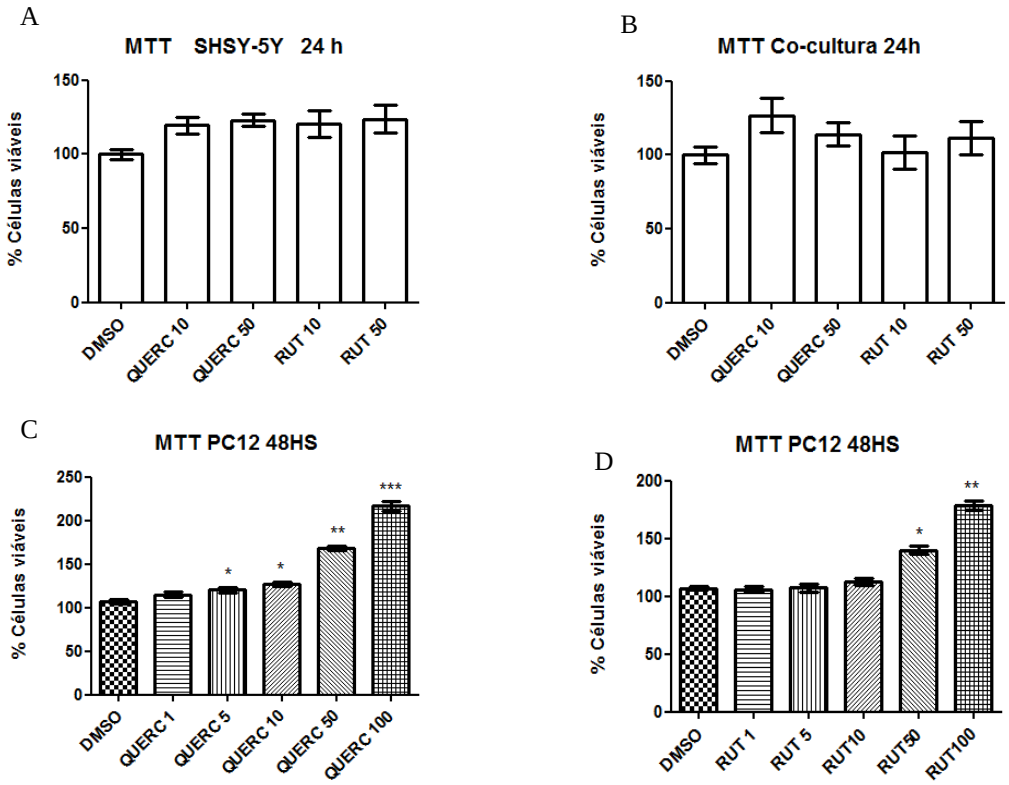

Figura 1. Os flavonoides rutina e quercetina não interferem na viabilidade das células SHSY-5Y, PC-12 e em Co-culturas primarias de neurônio/células gliais corticais. A toxicidade foi avaliada pelo teste de MTT. (A) Células SH-SY5Y e (B) Co-cultura de neurônio/células gliais cortical expostas a quercetina e rutina nas concentrações (5 e 10 µM), por um período de 24h. (C) Células PC12 exposta à quercetina em concentrações (1 e 100 µM), por um período de 48h. (D) Células PC12 exposta à rutina em concentrações (1 e 100 µM), por um período de 48h. Foi utilizado como controle negativo o veículo de diluição das substâncias (DMSO 0,1%). A significância estatística dos resultados foi assegurada pelo teste *One-way ANOVA* (* $p < 0,05$ em relação ao controle; ** $p<0,01$ em relação ao controle ; ***$p<0,1$ em relação ao controle). Resultados são representativos de três experimentos independentes.

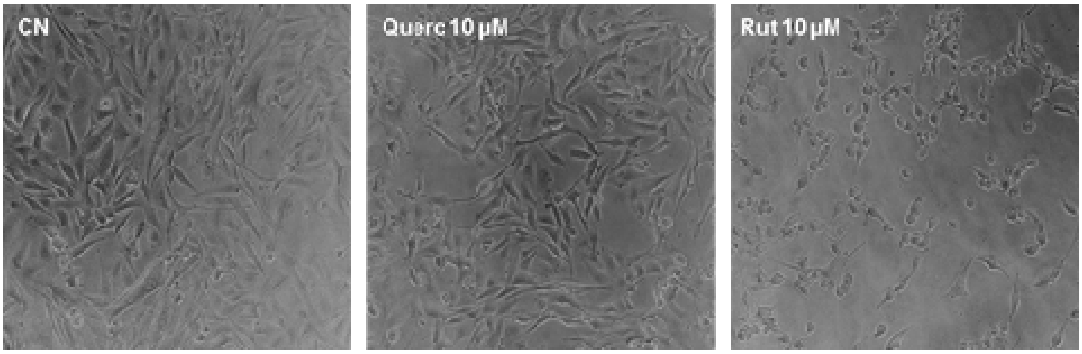

Figura 2 - Efeito dos flavonoides quercetina e rutina em células PC12. Avaliação de morfologia celular por microscopia de contraste de fase. CN: Células PC12 expostas ao veículo de diluição dos flavonoides, por 24h como controle (DMSO 0,1%). Células PC12 expostas aos flavonoides quercetina (Querc) e rutina (Rut) na concentração de 10µM, por 24h. obj 20x.

.

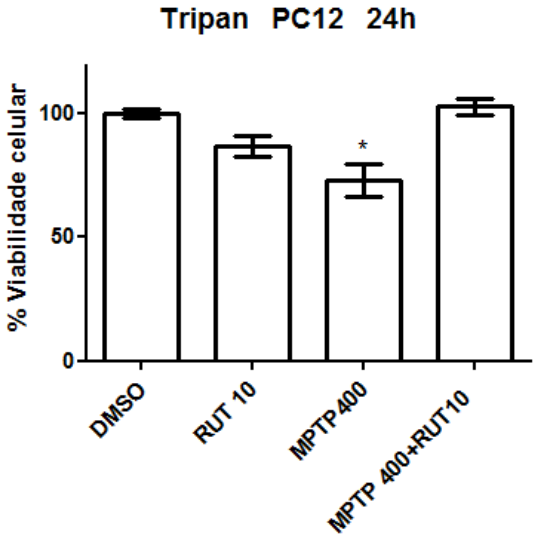

Figura 3 - O flavonoide rutina protege as células PC12 expostas ao dano por MPTP. A avaliação neuroprotetora através do método de exclusão ao azul de tripan. As células foram expostas a pré-toxina MPTP na concentração de 400µM e/ou a rutina (10µM) e em condição controle (DMSO 0,01%), por 24h. O resultado foi expresso em percentual de células impermeáveis ao Azul de Tripan, em relação ao número total de células/campo. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA (* $p < 0,05$ em relação ao controle).

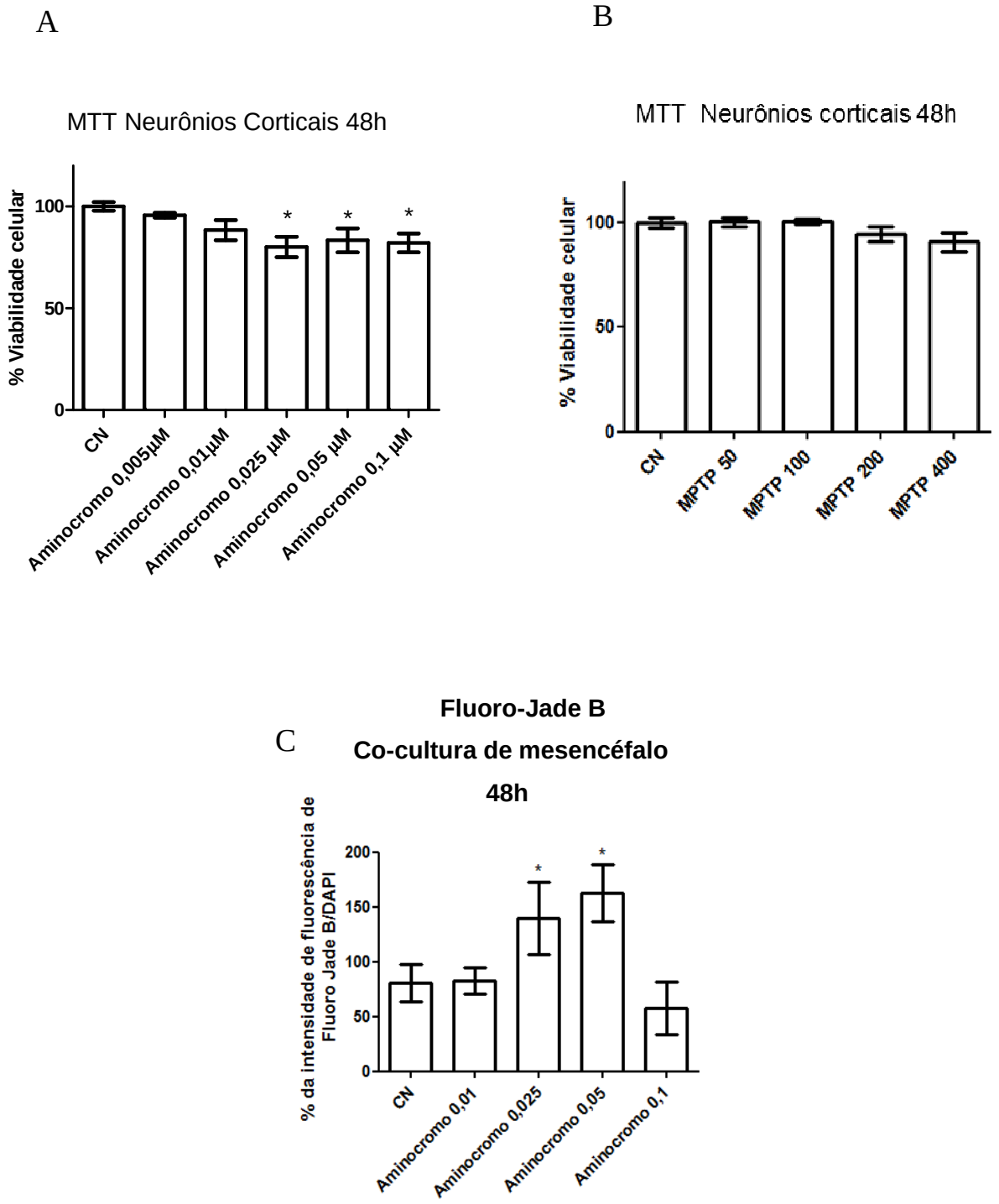

Figura 4 – Testes de viabilidade celular em culturas de células neurais após exposição ao Aminocromo e MPTP. (A) Cultura de neurônios expostas a diferentes concentrações de aminocromo (0,005 - 0,01 µM) e avaliação da viabilidade pelo teste do MTT após o período de 48h. (B) Cultura de neurônios corticais expostas a diferentes concentrações de MPTP (50-400µM) e avaliação da viabilidade pelo teste do MTT após o período de 48h. (C) Co-cultura de neurônios/células gliais mesencefálicos exposto a diferentes concentrações de aminocromo (0,01-0,1 µM) e avaliação da viabilidade pelo teste de fluoro-jade B, após o período de 48h. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. (* $P < 0,05$ em relação ao controle)

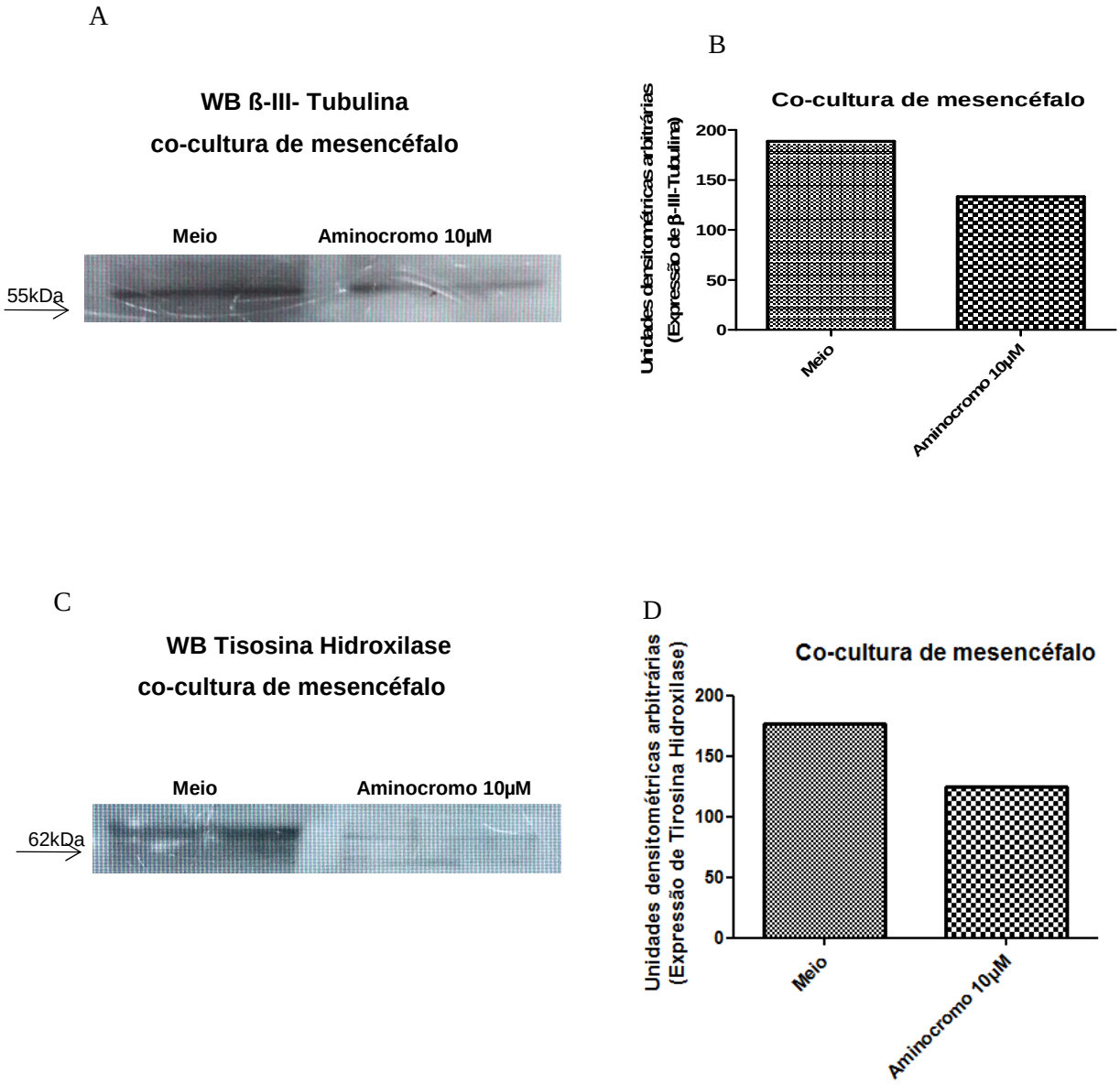

Figura 5 - Efeito do aminocromo na expressão de proteína marcadora de neurônios (β-III-Tubulina) e marcadora de neurônios dopaminérgicos (Tirosina Hidroxilase) em co-culturas mesencefálicas através de Western Blot e imunodetecção. As células foram mantidas na presença do aminocromo 10 µM. Western blot e imunodetecção para expressão das proteínas β-III-Tubulina (A) e Tirosina Hidroxilase (C) foi realizado após 48h. A análise densitométrica das bandas de proteínas β-III-Tubulina (B) e tirosina hidroxilase (D) está representada graficamente em unidades arbitrárias, o grupo controle foi considerado como 100%.

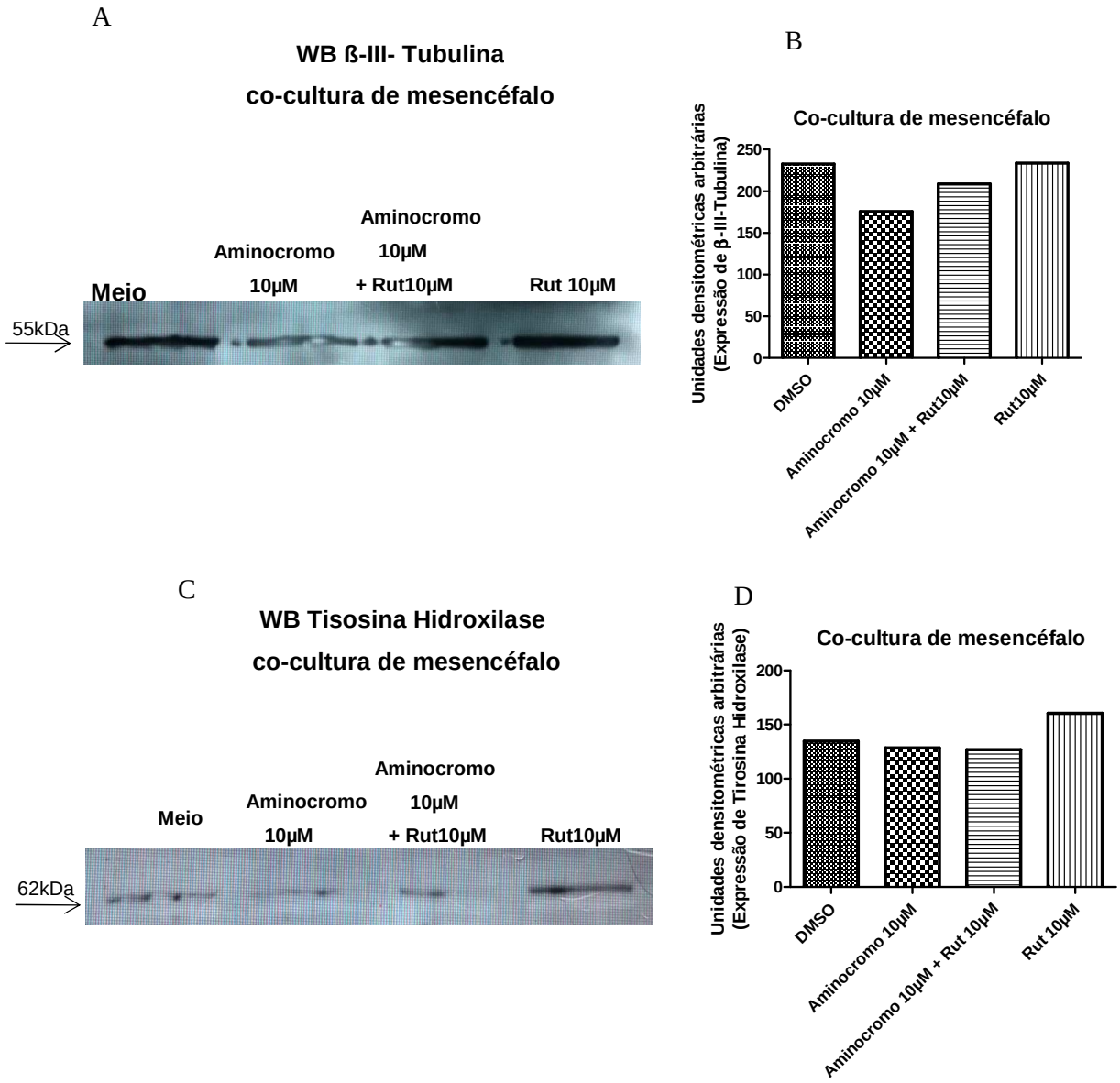

Figura 6 – Efeito do aminocromo e rutina na expressão de proteína marcadora de neurônios (β-III-Tubulina) e marcadora de neurônios dopaminérgicos (Tirosina Hidroxilase) em co-culturas mesencefálicas através de Western Blot e imunodetecção. As células foram mantidas na presença do aminocromo 10 µM e/ou rutina 10µM. Western blot e imunodeteção para expressão das proteínas β-III-Tubulina (A) e tirosina hidroxilase (C) foi realizado após 48h. A análise densitométrica das bandas de proteínas β-III-Tubulina (B) e tirosina hidroxilase (D) está representada graficamente em unidades arbitrárias, o grupo controle foi considerado como 100%.

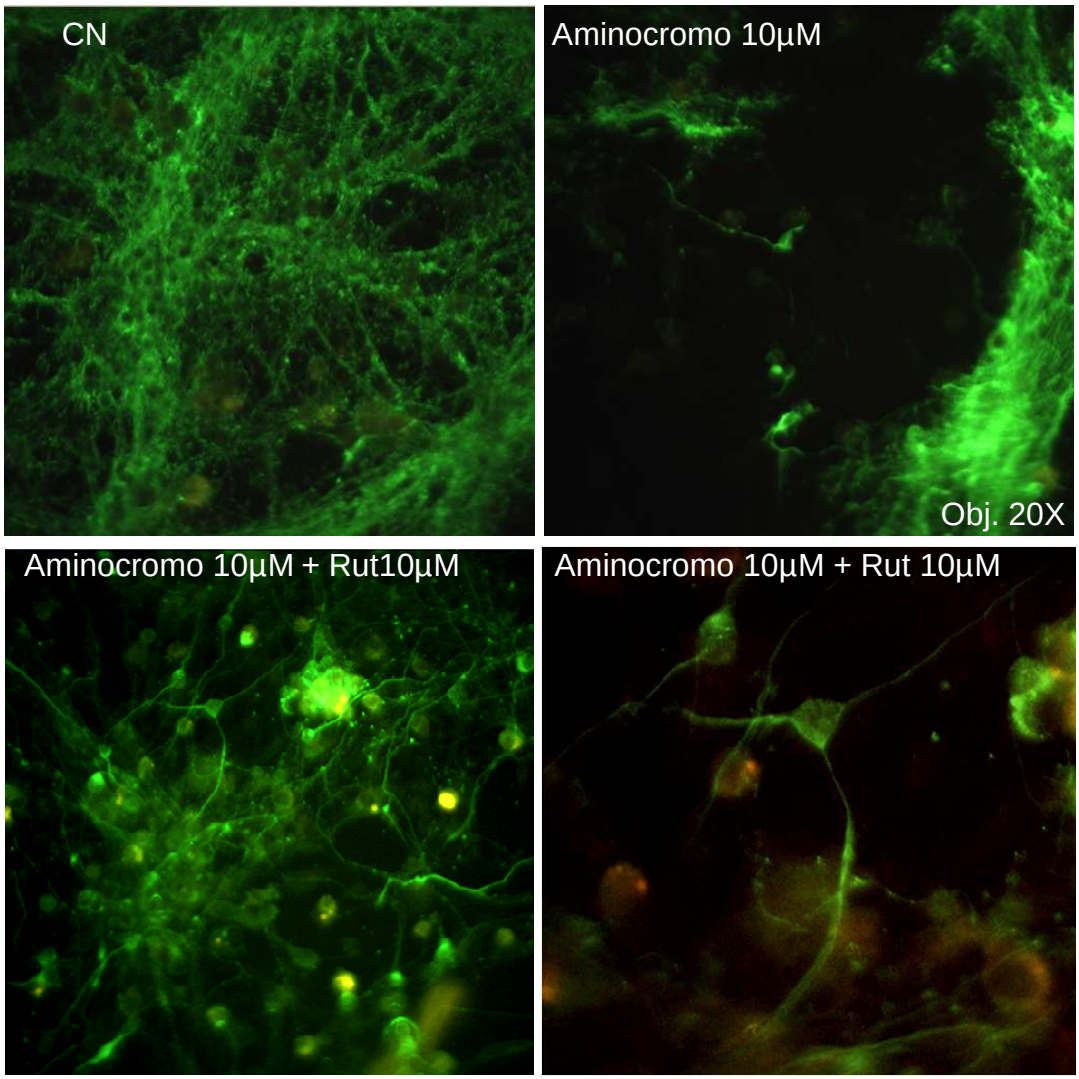

Figura 7 - Análise da expressão da proteína neuronal β-III-tubulina por imunocitoquímica em co-cultura de mesencéfalo. DMSO: Co-cultura mesencefálica tratada com o veículo de diluição das substâncias, por 48h como controle (DMSO 0,1%). Aminocomo 10 µM: Co-cultura mesencefálica expostas ao aminocromo na concentração de 10 µM, por 48h. Aminocromo 10 µM + Rut: Co-cultura mesencefálica exposta concomitantemente ao aminocromo na concentração de 10 µM e rutina na concentração de 10µM, por 48h, em imagens obtidas por microscopia de fluorescência usando objetiva (Obj) de 20 vezes ou 40 vezes de aumento.

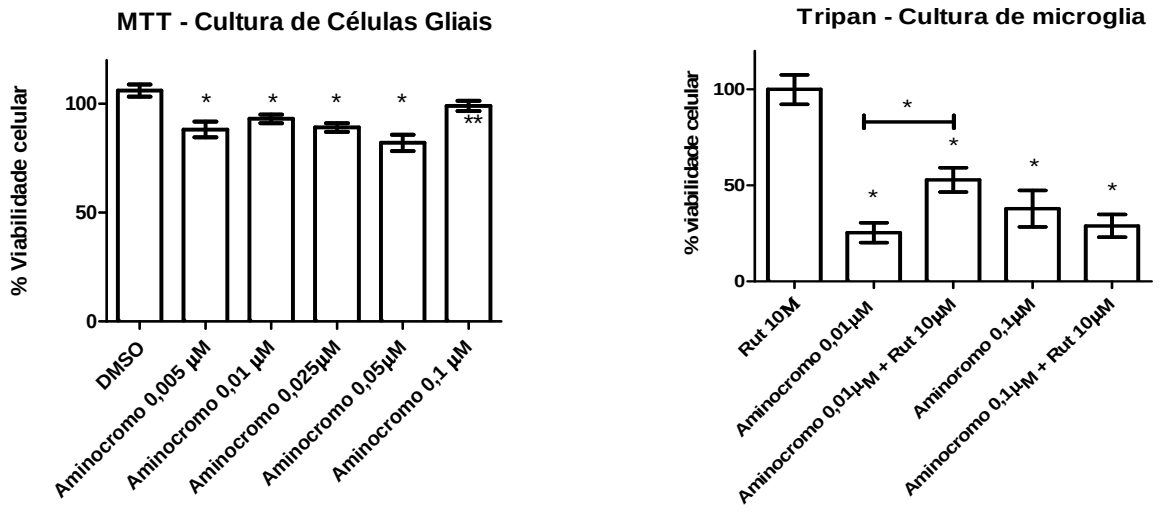

Figura 8 - (A) Análise da citotoxicidade do aminocromo e atividade protetora da rutina em cultura de células de microglia, através do teste de exclusão ao azul de tripan. (B) Análise da citotoxicidade do aminocromo em cultura de células gliais, através do teste de MTT. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste *One-Way* ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. (* $P < 0,05$ em relação ao controle).

.

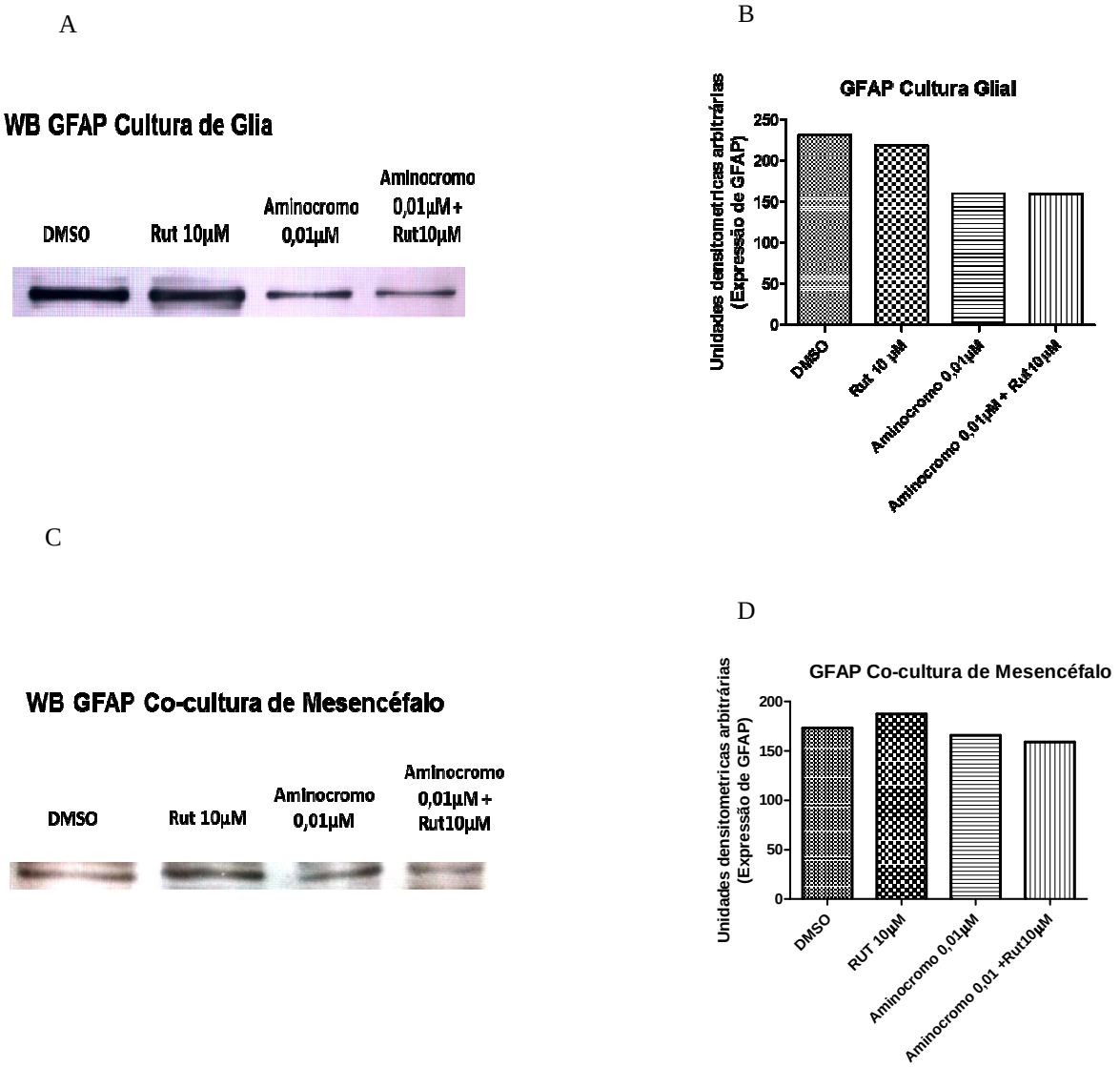

Figura 9 – Efeito do aminocromo e rutina na expressão de proteína marcadora de astrcitos (GFAP) em culturas de células gliais e co-culturas mesencefálicas através de Western Blot e imunodetecção. As células foram mantidas na presença do aminocromo 0,01 µM e/ou rutina 10µM. Western blot e imunodetecção para expressão da proteína GFAP em cultura de células gliais (A) ou co-culturas de mesencéfalo (C). A análise densitométrica das bandas de proteínas GFAP em cultura de células gliais (B) e co-culturas de mesencéfalo (D) está representada graficamente em unidades arbitrárias, o grupo controle foi considerado como 100%.

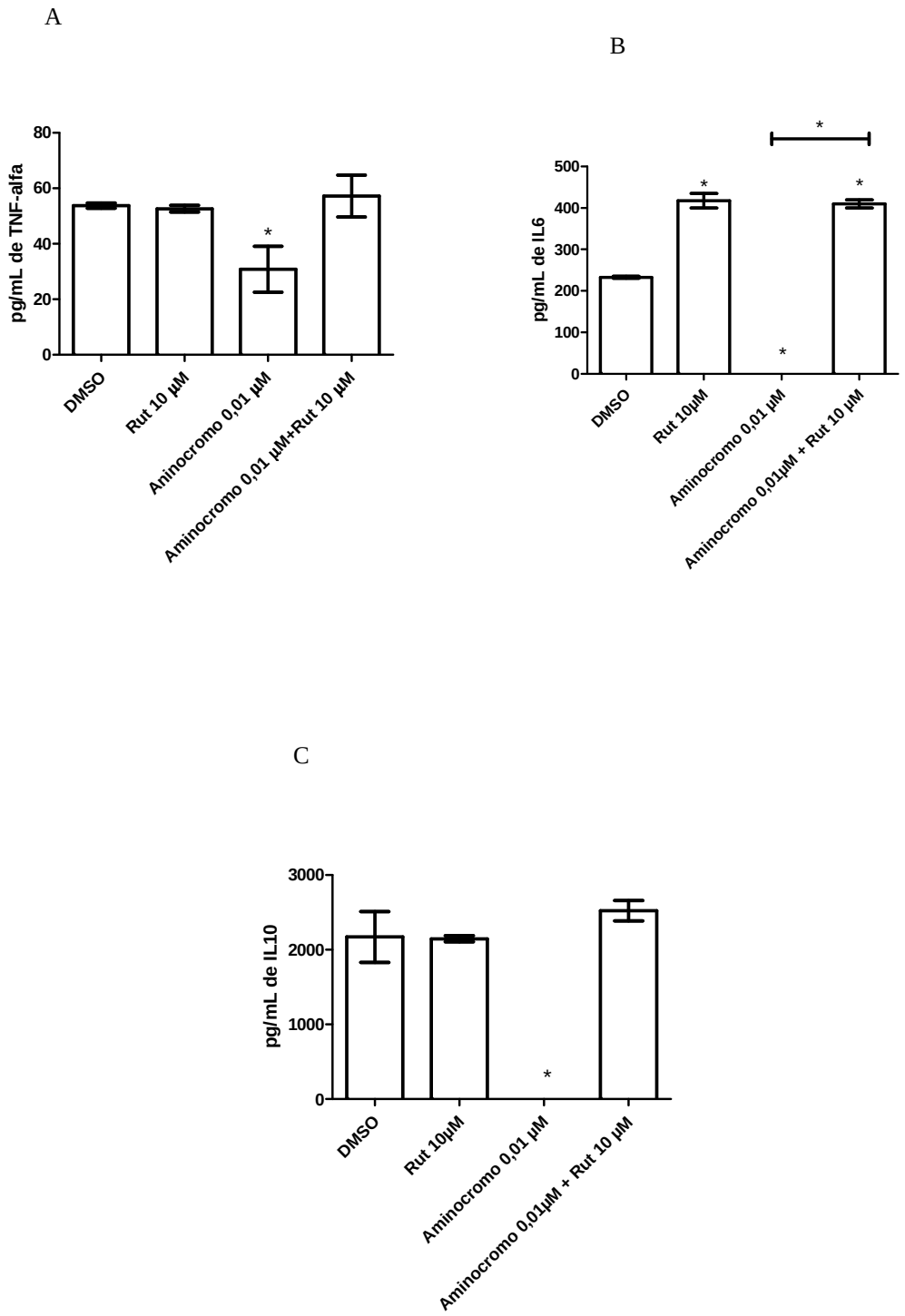

Figura 10 – Análise dos níveis de citocinas TNF-alfa (A), IL- 6 (B) e IL-10 (C), pelo método de ELISA, após 48h de exposição ao aminocromo (0,01µM) e/ou tratamento com rutina (10µM) em sobrenadante de co-cultura de mesencéfalo. Os dados apresentaram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações. (* $P < 0,05$ em relação ao controle).

7. DISCUSSÃO

Moléculas com potencial antioxidante e anti-inflamatório vêm sendo alvos de interesse farmacológico e dentre estas estão os flavonoides, que são compostos polifenólicos amplamente encontrados em alimentos de origem vegetal, aos quais têm sido atribuídos efeitos moduladores de células envolvidas na inflamação, inibidor da produção de citocinas pro inflamatórias e modulador de enzimas formadoras de óxido nítrico (LÓPEZ-POSADAS et al., 2008). O presente trabalho foi desenvolvido para prospectar compostos flavonoides como agentes farmacológicos, analisando o potencial neuroprotetor e imunomodulador em modelos i*n vitro* da doença de Parkinson. Para tanto, realizamos inicialmente um *screening* de citotoxicidade dos flavonoides em diferentes modelos de cultura de células neuronais *in vitro,* em seguida investigamos o efeito neuroprotetor dos flavonoides em diferentes modelos *in vitro* de danos celulares característicos da Doença de Parkinson e por fim analisamos o efeito imunomodulador do flavonoide de maior potencial morfogênico dentre aqueles testados em um sistema de cultura de células neuronais dopaminérgicas e gliais.

Nossos resultados de citotoxicidade realizados pelo método de MTT revelaram que os flavonoides rutina e quercetina não apresentaram um perfil citotóxico em diversos modelos de cultura de células neuronais, dentre elas: co-cultura primária de neurônio/células gliais corticais, linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY-5Y) e de Feocromocitoma de rato (PC12). Estudos de neurotoxicidade da rutina encontrados na literatura, que também foram realizados através da técnica de MTT revelam que este flavonoide em concentração de até 100µM não induziu citotoxicidade em culturas primárias corticais de astrócitos, culturas mistas de células gliais e células SHSY-5Y, após 24h de tratamento (SILVA et al., 2008; PARK et al., 2014).

Por outro lado, nossos resultados demonstraram que concentrações de 50 e 100µM de rutina e quercetina aumentaram a atividade mitocondrial detectada em culturas de células PC12 tratadas nestas condições, por 48h. Ocorre que o teste de MTT se baseia na capacidade das desidrogenases mitocondriais (principalmente succinato desidrogenases) em reduzirem este brometo em cristais de formazan insolúveis, de coloração violácea. A quantidade destes cristais é medida por espectofotometria e o teste pode ser utilizado na avaliação tanto de viabilidade quanto de proliferação celular (HANSEN, 1989). Neste caso, os flavonoides podem estar induzindo um aumento da sobrevida destas células neurais contra morte celular programada basal da cultura, como visto por Nones *et al*. (2012) em experimentos com rutina, mas não por quercetina, em células multipotentes e progenitoras de oligodendrócitos da crista

neural (NC). Por outro lado, a hipótese de que os flavonoides poderiam estar alterando o metabolismo celular por seu potencial de induzir diferenciação seria também teoricamente sustentável. Segundo Sagara *et al*. (2004) os flavonóides podem induzir a diferenciação de células PC12 e este efeito é mediado pela ativação da cascata de Ras-ERK, que parece estar induzida pela presença do grupo catecol no anel B, que por sua vez está presente na estrutura tanto da rutina quanto da quercetina. Paulsen *et al*. (2011) mostraram que o biflavonóide agathisflavona é um excelente potencializador da diferenciação neuronal induzida pelo ácido retinóico e neuroprotetor. Por outro lado, Sagara *et al*. (2004) demonstram que os flavonóides quercetina, fisetina, isorhamnetina e genisteína induzem diferenciação em células PC12, enquanto rutina não apresentou potencial para diferenciá-las.

Nossa hipótese de que rutina foi capaz de induzir diferenciação em células PC12 também foi sustentada por análises morfológicas que demonstraram que dose de 10 µM, por 24 h, abaixo daquelas que induziram aumento de atividade mitocondrial detectada pelo MTT, foi capaz de gerar alterações morfológicas nestas células, caracterizadas por contração do corpo celular, emissão de finos prolongamentos (neuritos) e algumas células com morfologia esferoidal. Sagara *et al*. (2004) caracterizaram a diferenciação neuronal em células da linhagem PC12 induzida por flavonoides, dentre eles quercetina à 10 µM, também após 24 h de e exposição, através da emissão de emissão de finos prolongamentos, o qual denominou de neuritos, que por outro lado, não foram visualizados em células expostas por 24h à rutina 10 µM. No entanto, a literatura apresenta alguns exemplos do potencial de indução de diferenciação de rutina, sem indução de proliferação, tal como a diferenciação de células do tipo osteoblastos (MG-63) e células tumorais de origem glial (GL-15) (HYUN et al., 2014; SANTOS, 2011).

Ainda, a contagem de células viáveis contribui para fortalecer a idéia de que rutina está induzindo diferenciação e não proliferação em células da linhagem PC12, quando os resultados obtidos pelo método de exclusão ao azul de tripan demonstram que não ouve alteração significante na quantidade de células viáveis tratadas com rutina a 10µM, quando comparada com células em condição controle. Este resultado também evidenciou a neuroproteção da rutina contra morte celular induzida por MPTP, uma vez que cultura tratadas concomitantemente com rutina e a pré-toxina apresentaram a mesma quantidade de células viáveis em comparação com a condição controle, enquanto que as que foram tratadas apenas com o MPTP tiveram a quantidade de células viáveis reduzida. Estudos têm demonstrado que a rutina é capaz de proteger células da linhagem PC12 contra danos oxidativos induzidos por nitroprussiato e por hidroperóxido de ácido linoléico; proteger

neurônios em cultura cortical de camundongos contra danos oxidativos induzidos pelo fragmento 25-35 da proteína beta-amilóide (Aβ25-35); células da linhagem SHSY-5Y contra danos oxidativos induzidos por rotenona e morte celular induzida pelo fragmento 42 da proteína bata-amilóide (Aβ42); células ganglionares da retina contra morte induzida por hipóxia, glutamato e estresse oxidativo induzido por depleção de antioxidantes no meio de cultura (CHOI et al., 2014; SASAKI et al., 2003; PARK et al., 2014; ZHANG et al., 1999; NAKAYAMA et al., 2011). Ainda, em experimentos *in vivo*, que a rutina é capaz de proteger neurônios dopaminérgicos contra danos oxidativos em ratos que receberam 6-OHDA por estereotaxia no striatum; proteger neurônios piramidais contra morte induzida por trimetiltina; inibir a neuropatia periférica dolorosa em camundongos induzida por injeção de oxaliplatina, através de efeitos antioxidativos; e proteger neurônios hipocampais e corticais da morte induzida por isquemia cerebral em ratos (MOSHAHID KHAN et al., 2012; KODA et al., 2009; AZEVEDO et al., 2013; FENGLING et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013).

Estes achados, aliado ao fato de que a população neuronal alvo da morte celular em pacientes com Parkinson apresentarem neuromelanina, nortearam alguns estudos a ser desenvolvidos com a hipótese de que o aminocromo, composto precursor da neuromelanina e derivado da oxidação da dopamina, seria a principal toxina envolvida na patogênese desta enfermidade. Neste trabalho caracterizamos pela primeira vez danos celulares induzidos pelo aminocromo em modelos de cultura primária do sistema nervoso central. Nossos resultados demonstraram que exposição ao aminocromo em concentrações entre 250-1000µM é capaz de induzir, após 48 h do tartamento, redução da viabilidade celular de neurônios corticais, em concentrações entre 50-500 µM, redução da viabilidade de cultura de células gliais corticais, em concentrações de 100 e 1000 µM, redução da viabilidade em culturas de microglia (entre 250-500 µM) e redução da viabilidade de co-cultura mesencefálica, a partir de 100 µM. Estudos têm demonstrado aminocromo à 50µM tem ação direta sobre células RCSN-3, derivadas de substância *nigra* humana, induzindo morte celular após 48 h que é amplificada quando estas células são submetidas à inibição da DT-diaforase pelo dicumarol. Ainda, estudos têm demonstrado que aminocromo à 75µM tem ação direta sobre células de origem glial U373-MG silenciadas para GST-M2 (PARIS et al., 2011; CUEVAS et al., 2015). Os nossos modelos de culturas primárias são constituídos por uma porção heterogênea de neurônios corticais ou mesencefálicos e de células gliais, que não foram submetidas à inibição da enzima DT-diaforase ou de enzimas GST , o que pode explicar a demanda de maiores concentrações desta toxina endógena para gerar morte celular.

Igualmente, a que foi demonstrado que aminocromo à 50µM induz morte celular em culturas da linhagem neuronal SHSY-5Y, inibida por meio condicionado de células da linhagem astrocítica U373-MG contendo glutationa-S-tranferase da classe M2-2 (GSTM2),. Nossos resultados demonstram que doses superiores a esta (250-500µM) foram necessárias para induzir morte celular em neurônios mesencefálicos em co-cultura com células gliais. Neste caso, não podemos atribuir a maior resistência da cultura ao aminocromo especificamente a esta isoforma da enzima GST de astrócitos, pois nosso modelo é derivado de ratos e a isoforma GSTM2, à qual foi já atribuída a capacidade de conjugar aminocromo para formar produto estável, e é uma isoforma humana (Cuevaset al., 2015; BAEZ et al., 1997). Assim, podemos interpretar os resultados contraditórios no teste de citotoxicidade em concentrações de 1000µM de aminocromo, que não induziu morte em cultura de células gliais ou em co-cultura mesencefálica, como indicativo de proteção por reatividade astrocitária.

Ao investigar o potencial neuroprotetor do flavonoide rutina (10µM) em co-culturas mesencefálica de ratos, submetidas ao dano com aminocromo (10µM) verificamos que as células submetidas ao dano com aminocromo tiveram uma diminuição da expressão da proteína estrutural β-III-Tubulina e da enzima de neurônios dopaminérgicos indicando neurodegeneração destes neurônios. No entanto, quando essas células foram submetidas ao tratamento concomitante com o flavonoide rutina observou-se um aumento na expressão da proteína estrutural, mostrando que o flavonoide protegeu os neurônios da degeneração. Por outro lado, não foi possível observar a mesma inibição da redução de expressão da tirosina hidroxilase em células tratadas sob as mesmas condições com rutina, o que pode sugerir que parte da população preservada pelo efeito da rutina pode não ser especificamente formada por neurônios dopaminérgicos e sim outra população de neurônios Th-¯, ou mesmo as condições em que as células neuronais foram expostas ao aminocromo (dose e tempo) geraram um dano celular mais intenso do que foi possível o restabelecimento da expressão da tirosina hidroxilase induzida pela rutina. Estudos presentes na literatura revelam que alguns flavonoides e isoflavonoides (catequina, quercetina, crisina, naringenina e genísteina) também apresentam ação neuroprotetora em neurônios dopaminérgicos, os protegendo de insultos oxidativos induzidos por peroxido hidrogenio, 4-hidroxinonenal, rotenona e 6-hidroxidopamina (MERCER et al., 2005). O polifenol epigalocatequina-3-galato inibiu a diminuição da expressão da proteína tirosina hidroxilase e morte de neurônios dopaminérgicos em animais tratados com MPTP (LEVITAS et al., 2001). Por outro lado, estudos vêm mostrando que o mecanismo de proteção dos flavonoides contra insultos oxidativos é altamente específico para cada composto (ISHIGE et al., 2001). No caso da

rutina, sugerimos por estes resultados que o principal mecanismo de ação, que gera uma neuroproteção pela rutina é a neurogênese.

Trabalhos desenvolvidos por Nones *et al*. (2012) com cultura de células da crista neural (NC) mostraram que o flavonoide rutina na concentração de 20µM influencia no desenvolvimento celular e no aumento da população neuronal. Em nosso estudo, as co-culturas mesencefálicas que foram tratadas apenas com rutina à 10µM apresentaram aumento da expressão especificamente da tirosina hidroxilase, que sugere uma diferenciação destas células para o fenótipo de neurônios dopaminérgicos, principalmente quando este resultado foi associado às análises por imunocitoquímica para a proteína β-III-Tubulina que mostraram que a rutina, não só protegeu os neurônios da desestruturação da rede neuronal causada por aminocromo, como foi capaz induzir alteração da morfologia neuronal, caracterizada por aumento do volume do corpo celular e emissão de longos neuritos, caracterizando claramente a formação de neurônios mais maduros.

Outros trabalhos desenvolvidos por Nones *et al*. (2012) caracterizaram que a rutina não induz diferenciação de células progenitoras corticais de camundongo para astrócitos. Nossos resultados demonstram um aumento da expressão de GFAP em co-culturas de mesencéfalo tratadas com rutina (10µM), mas não foi observada uma diferença em relação ao controle em culturas de células gliais, sugerindo que o aumento da expressão desta proteína em co-culturas seja em função de uma resposta glial induzida pelo flavonóide. Estudos prévios realizados pelo grupo de Neuroquímica e Biologia celular revelam efeitos ambíguos da rutina (50µM) sobre a expressão de GFAP em modelos de cultura distintos. Assim foi verificado por Silva *et al*. (2008) que a rutina foi capaz de induzir aumento na expressão de GFAP em culturas de astrócitos, entretanto induziu redução da expressão de GFAP em culturas de células gliais (astrócito/microglia). Ainda, sabe-se que a proteína acídica fibrilar glial (GFAP) são constituintes dos filamentos intermediários dos astrócitos, que portanto formam parte do seu citoesqueleto e que aumento na expressão desta, indicam reatividade astroglial (astrogliose) (para revisão ver LIEM; MESSING, 2009).

Em ambos os modelos de cultura verificamos uma redução da expressão de GFAP induzida por exposição ao aminocromo (100µM), que se manteve com o tratamento concomitante com a rutina (10µM). Estudos têm demonstrado que aminocromo forma adutos com outras proteínas estruturais como actina, β-tubulina e desestrutura a arquitetura do citoesqueleto (PARIS et al., 2010). Desta forma podemos sugerir que a proteína GFAP também pode ser alvo molecular do aminocromo (PARIS et al., 2010). Evidências apóiam a hipótese de que células gliais podem ser alvos primários em enfermidades neurodegenerativas

como a doença de Parkinson, doença de Alzheimer e encefalopatias espongiformes transmissíveis (CROISIER; GRAEBER, 2006). E nossos resultados apontam para um efeito direto do aminocromo sob astrócitos. Ocorre que estas células são fundamentais para manutenção da homeostasia do sistema nervoso central e apresentam um aparato enzimático, a exemplo das enzimas GSTs, que auxiliam na sobrevida de neurônios à danos gerados pelo aminocromo (CUEVAS et al., 2015). Na ausência de células gliais funcionais, a neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos deve ser amplificada.

É evidente que esta gliodegeneração induzida pelo aminocromo esteja influenciando nos resultados obtidos na dosagem de citocinas. Os modelos atuais de indução *in vitro* ou *in vivo*, vêm mostrando um processo inflamatório na patogenia da doença de Parkinson. Animais submetidos ao dano com a pré-toxina MPTP apresentaram uma resposta pró-inflamatória com o aumento dos níveis da IL-6, IL-10 e TNF-alfa (YU et al., 2015). Trabalho desenvolvido por Kumar *et al.* (2012) utilizando ratos submetidos ao dano com 6-OHDA verificaram que os animais apresentaram aumento dos níveis de IL-6 e TNF-α.

Por outro lado, as evidências mostradas em nossos resultados de uma perda astrocitária e microglial em culturas expostas ao aminocromo, aliadas a níveis ainda detectáveis de TNF-alfa, sugerem que células gliais remanescentes após exposição ao aminocromo estão respondendo com perfil de resposta M1.

Ainda, nossos resultados de dosagem de citocina sugerem que rutina, isoladamente induz uma resposta inflamatória por aumentar níveis de IL-6 em co-culturas. Estudos realizados por Silva *et al*. (2008), demonstraram que este flavonoide foi capaz de induzir ativação de astrócitos e microglia com evidências de aumento da liberação de NO e da citocina TNFα. Por outro lado, não podemos distinguir se os resultados obtidos em tratamento concomitantes deste flavonoide com o aminocromo, que demonstraram uma retomada dos níveis de citocinas à valores basais de IL-6, IL-10 e TNF-alfa indicam uma neuroinflamação induzida pelo flavonoide ou produção normalizada pelas células gliais que foram protegidas por este. Também devemos enfatizar que tratamento concomitante de células expostas ao aminocromo e rutina reestabelece níveis da citocina IL-10, de caráter modulatória.

Segundo Williams et al (2004), o flavonoide quercetina ativa a via de MAPK (ERK-2, JNK1, e p38), levando a expressão de genes de sobrevivência (c-Fos, c-Jun) e defesa (fase II enzimas desintoxicantes; glutationa *S* -transferase, a quinona redutase), ativando mecanismos de proteção e sobrevivência celular. E ainda pode atuar como neuroprotetor mediando resposta neuroinflatória (BUREAU et al., 2008). Neste estudo selecionamos o flavonoide rutina para investigar os efeitos neuroprotetores contra danos induzidos por

aminocromo em neurônios dopaminérgicos co-cultivados com células gliais, uma vez que este apresentou maior potencial morfogênico em culturas de células PC12. Com base em pesquisas desenvolvidas por outros pesquisadores sobre os efeitos neuroprotetoras induzidos pela quercetina, sugerimos que outros estudos sejam realizados para também investigar a neuroproteção de neurônios dopaminérgicos sob efeito do aminocromo induzida por este flavonoide.

8. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que os flavonoides Quercetina e Rutina não são tóxicos para células neurais.

O flavonoide Rutina induz alterações morfológicas em células PC-12.

O aminocrono induz dano neuronal e glial em modelo de culturas primárias de ratos, podendo o modelo de co-cultura de mesencéfalo constituir um modelo de eleição para se estudar a relação entre neurônios e células gliais durante a degeneração dopaminérgica induzida pelo aminocromo.

O flavonoide rutina protege neurônios mesencefálicos e células gliais apresentando-se, portanto, como uma molécula de interesse farmacológico para estudos pré-clínicos que buscam desenvolver novos medicamentos para o tratamento da enfermidade de Parkinson.

Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de dano e proteção que foram apresentados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ABOU-SLEIMAN PM, MUQIT MM, WOOD NW. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci** 7: 207–219, 2006.

ANTONINI, A. et al. A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. **Lancet Neurol.** 8, 929–937, 2009.

ARRIAGADA, A. et al. On the neurotoxicity of leukoaminochrome o – semiquinone radical derived of dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis and hydroxyl radical formation. **Rev. Neurobiol. Dis**. Vol.16, Nº2, p.468-477, jul. 2004.

AZEVEDO, MI. et al, The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain** 9, 53-59, 2013.

BARCIA, G.; FLEMING, MR; DELIGNIERE, A. ET AL. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. Nat Genet. 44 (11), 1255–1259, 2012.

BENDER, A, KRISHNAN, KJ, MORRIS, CM , TAYLOR GA , REEVE AK , PERRY RH , JAROS E , HERSHESON JS , BETTS J , KLOPSTOCK T , TAYLOR RW , TURNBULL DM .. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. **Nat. Genet**. 38, (5), 515-517, 2006.

BERMAN, SB; HASTINGS, TG. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. **J Neurochem.** 73, 3, 1127-37, 1999.

BRATIC A., LARSSON N-G. The role of mitochondria in aging. J Clin Invest. 123 (3),951–957, 2013.

BARZILAI, A., MELAMED, E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson’s disease. **Trends Mol Med. 9,126–132(2003).**

BEYER, K., ARIZA, A. Alpha-Synuclein Posttranslational Modification and Alternative Splicing as a Trigger for Neurodegeneration. **Mol Neurobiol**. 47, 509–524, 2013.

BURNS, R.S., CHIUEH, C.C., MARKEY, S.P., EBERT M.H., JACOBOWITZ, D.M., KOPIN, I.J. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons

in the pars compacta of substantia nigra by N-methyl-4-phenyl,1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80. 4546–4550, 1983.

CABEZAS, R A M, et al., Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. Front Cell Neurosci. 8, 211, 2014 .

CHAO, C.C., HU, S., MOLITOR, T.W., SHASKAN, E.G. AND PETERSON, P.K. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. J Immunol, 149, 8, 2736-2741, 1992.

CHARRON, G, et al., Astrocytosis in parkinsonism: considering tripartite striatal synapses in physiopathology? **Front Aging Neurosci**. 24,6,258,2014

CHEN, J.C., HO, F.M., PEI-DAWN LEE, C., CHEN, C.P., JENG, K.C., HSU, H.B., LEE,S.T., WEN TUNG, W., LIN, W.W. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I kappa B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV 2 microglia. Eur. J.Pharmacol. 521, 9–20. 2005

CHOI, WS. et al. JNK inhibition of VMAT2 contributes to rotenone-induced oxidative stress and dopamine neuron death. **Toxicology.** 328, 75-81, 2015.

CLAYTON D. F. ,GEORGE J. M. The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. **Trends Neurosc**i. 21, 249-54, 1998.

CONWAY, K. A., ROCHET, J. C., BIEGANSKI, R. M., AND LANSBURY, P. T., JR. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopa-mine-alpha-synuclein adduct. Science, 294, 1346-1349,(2001).

COOKSON, M.R.; MEAD, C.; AUSTWICK, S.M.; PENTREATH, V.W. Use Of The Mtt Assay For Estimating Toxicity In Primary Astrocye And C6 Glioma Cell Cultures. Toxic In Vitro; 9, 39-48, 1995.

CROISIER, E.; GRAEBER, MB.Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration. **Acta Neuropathol**. 112, 517-30,2006.

CUEVAS, C. et al. Glutathione Transferase-M2-2 Secreted from Glioblastoma Cell Protects SH-SY5Y Cells from Aminochrome Neurotoxicity. **Neurotox Res.** 3,217-28, 2015.

CZŁONKOWSKA, A. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. Rev. Med Sci Monit. Vol.8, Nº8, p.165- 177, aug. 2002

DAJAS F, RIVERA-MEGRET F, BLASINA F, ARREDONDO F, ABIN-CARRIQUIRY JA, COSTA G, ECHEVERRY C, LAFON L, HEIZEN H, FERREIRA M, MORQUIO A. Neuroprotection by flavonoids. **Braz J Med Biol Res**. 36(12):1613-20, 2003.

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

DAVIE, CA. A review of Parkinson's disease. **Br Med Bull**. 86, 109-127, 2008.

DAWSON, TM., DAWSON, VL. Vias moleculares de neurodegeneração na doença de Parkinson. 819-822(2003),

DORSEY, ER., CONSTANTINESCU, R., THOMPSON, J. P., BIGLAN, K. M., HOLLOWAY, R. G., KIEBURTZ, K., MARSHALL, F. J.,RAVINA, B. M., SCHIFITTO, G., SIDEROWF, A., TANNER, C. M.,. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**. 68, 384-386, 2007.

DUARTE, J., FRANCISCO, V., PEREZ-VIZCAINO, F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. **Food Funct.** 5, 1653-1668, 2014.

EBADI M, LEUSCHEN MP, EL-REFAEY H, HAMADA FM, ROJAS P. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. **Neurochem Int**. 29:159–166,1996.

ECHEVERRI, D.et al. Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. **Int J Vasc Med.** 83, 40-60, 2010.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. J Neurosci Methods. 139, 121-143,2004.

FAHN, S. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? **J. Neurol.** Vol. 252, Suppl. 4, IV37-IV42, 2005.

FIORANI, M. et al. Mitochondria accumulate large amounts of quercetin: prevention of mitochondrial damage and release upon oxidation of the extramitochondrial fraction of the flavonoid. **J. Nutr. Biochem**. 21, 397–404, 2010.

FITCH, MT., SILVER, J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. Experimental Neurology. 209, 294–301,2008.

FRANCO, E.A.P. A diversidade etnobotânica no quilombo Olho d'água dos Pires, Esperantina, Piauí, Brasil. 2005. 104p.Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - PRODEMA, Universidade Federal de Piauí, Teresina.

FORNO,L.S., DELANNEY,, L.E., IRWIN, I., LANGSTON, J.W., Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease: Neuropathologic considerations. **Adv. Neurol**., 60, pp. 600–608Adv. Neurol., v60, p. 600-608,1993

FU, S-P, et al., Anti-inflammatory effects of BHBA in both *in vivo* and *in* J *vitro* Parkinson's disease models are mediated by GPR109A- dependent mechanisms. **Neuroinflammation.** 12, 9, 2015.

FUENTES, P.; PARIS, I.; NASSIF, M.; CAVIEDES, P.; and SEGURA-AGUILAR, J. Inhibition of VMAT-2 and DT-diaphorase induce cell death in a substantia nigra-derived cell line-an experimental cell model for dopamine toxicity studies. **Rev. Chem. Res. Toxicol.** Vol.20, Nº5, 2007.

GAO, G.; WANG, X.; HE, S.; LI, W.; WANG, Q.; LIANG, Q;• ZHAO, Y.; HOU, F.; •CHEN, L.; LI, A. Clinical Study for Alleviating Opiate Drug Psychological Dependence by a Method of Ablating the Nucleus accumbens with Stereotactic Surgery. Stereotact Funct Neurosurg. 81, 96–104,2003.

GIRÁLDEZ-PÉREZ,R M. et al. Models of α-synuclein aggregation in Parkinson's disease. Acta Neuropathologica. 2, 176, 2014.

GREENAMYRE, J. T., HASTINGS, T. G.,. Biomedicine. Parkinson's--divergent causes, convergent mechanisms. Science. 304,1120-1122, 2004.

HALLIDAY,GM., STEVENS, CH. Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease.**Movement Disorders.** 26, 1, 2011.

HAMBY, M E, et al Inflammatory Mediators Alter the Astrocyte Transcriptome and Calcium Signaling Elicited by Multiple G-Protein-Coupled Receptors. J Neurosci.; 32(42): 14489–14510, 2012.

HANSEN MB, NIELSEN SE, BERG K (1989). re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill**. j immunol methods**. 119:203-10.

HENCHCLIFFE, C. and BEAL, M. F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. **Rev. Nat Clin Pract Neurol.** Vol. 4, Nº11, p.600-609, nov. 2008.

HENZE, C., EARL, C., SAUTTER, J., SCHMIDT, N., THEMANN, C., HARTMANN, A. AND OERTEL, W. H. Reactive oxidative and nitrogen species in the nigrostriatal system following striatal 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Brain Res**. 1052, 97-104,2005.

HIRSCH, J A., ALONSO, J-M., REID, C R., MARTINEZ, L M. Synaptic Integration in Striate Cortical Simple Cells. **J. Neurosci**. 18, 9517-952, 1998.

HORNYKIEWICZ, O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. **Pharmacol Rev**. 18, 925-964, 1966.

HYUN, H. et al. Effects of Watercress Containing Rutin and Rutin Alone on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Osteoblast-like MG-63 Cells. **Korean J Physiol Pharmacol.** 18, 347－352, 2014.

JAKES R , SPILLANTINI MG , GOEDERT M., Identification of two distinct synucleins from human brain. 345, 27-32, 1994.

JANSEN, D, et al Brief Communication: Newly developing rift in Larsen C Ice Shelf presents significant risk to stability. The Cryosphere Discuss. 9, 861–872, 2015

JENNER P; MARSDEN CD. Chronic pharmacological manipulation of dopamine receptors in brain. **Neuropharmacology**. 26, 7B, 931-40, 1987.

JIANG, BP. Et al. Minocycline inhibits ICAD degradation and the NF-κB activation induced by 6-OHDA in PC12 cells. Brain Res. 1586, 1–11, 2014.

KABADERE S. et al. Quercetin both partially attenuates hydrogen peroxide-induced toxicity and decreases viability of rat glial cells. **Acta Biol Hung.** 62, 3, 221-7,2011

KANNARKAT, GT., BOSS, JM., TANSEY, MG. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson’s disease. **J Parkinsons Dis.** 3, 493-514, 2013.

KANG, S., BADER, A. G., VOGT, P. K. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**. 102, 802–807,2005.

KARUPPAGOUNDER, SS. et al 2013 Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. **Neuroscience.** 236, 136–148, 2013.

KEENEY, P M., XIE, J., C,R A., BENNETT ,J P. JR. Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. **J. Neurosci**. 26, 19, 5256-5264, 2006.

KETTENMANN H, HANISCH UK, NODA M. VERKHRATSKY A.Physiology of Microglia. **Physiol Rev.** 91(2), 461-553, 2010.

KHAN, MM. et al. Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol. **Neurochem Int.** 62, 379-88,2013

KIENZL, E., PUCHINGER, L., JELLINGER, K., LINERT, W., STACHELBERGER, H. AND JAMESON, R. F.,The role of transition metals in the pathogenesis of Parkinson's disease. J **Neurol Sci**. 134, 69-78, 1995.

KIENZL, E., JELLINGER, K., STACHELBERGER, H. AND LINERT, W. Iron as catalyst for oxidative stress in the pathogenesis of Parkinson's disease? **Life Sci**. 65, 1973-1976,1999.

KIM, W S., KÅGEDAL, K., HALLIDAY ,G M. Alpha-synuclein biology in Lewy body diseases. **Alzheimers Res Ther.** 6(5), 73, 2014. 2009 Jun;. doi: 10.1007/s10571-008-9344-4. Epub 2009 Jan 21.

KODA, T.ET AL. Rutin supplementation in the diet has protective effects against toxicant-induced hippocampal injury by suppression of microglial activation and pro-inflammatory cytokines: protective effect of rutin against toxicant-induced hippocampal injury. **Cell Mol Neurobiol.** 29,523-31,2009.

KUMAR, A. et al. Neuroprotective potential of ator vastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine(6-OHDA)induced Parkinson-likesymptoms.Brain inresearch. 471, 13–22, 2012.

KURKOWSKA-JASTRZEBSKA I., WRONSKA A., KOHUTNICKA M., CZLONKOWSKI A.,CZLONKOWSKA A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. **Exp. Neurol.** 156, 50–61,1999.

LEE HJ1, et al. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. **J Biol Chem**. 285(12), 9262-72, 2010

LEVITES, Y.; AMIT, T.; MANDEL, S.; YOUDIM, M. B. Neuroprotection and neurorescue against Abeta toxicity and PKCdependent release of nonamyloidogenic soluble precursor protein by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. FASEB J., 17, 952–954, 2003.

LEVITES, Y.; YOUDIM, M. B.; MAOR, G.; MANDEL, S. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-κB (NF-κB) activation and cell death by tea extracts in neuronal. 56, 13, 21–29, 2008.

LI, C., BEAL, M F., Leucine-rich repeat kinase 2: A new player with a familiar theme for Parkinson's disease pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci US A**.; 102 (46), 16535-16536, 2005

LIN, W B.A; KANG, U J. Neuroprotective Therapy in Parkinson's Disease: Current Status and New Directions from Experimental and Genetic Clues. **J Clin Neurol**. 1, 2, 107–120, 2005.

LIU, W. et al Defect Causes Mitochondrial Dysfunction, Proteasomal Deficit and a-Synuclein Aggregation in Cell Culture Models of Parkinson's Disease **PloS One.** 4, 4597, 2009.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; Mar Snez-Augus7n, O.; de Medina,F. S. **Biochem. Pharmacol**., 76, 495,2008.

MAGALINGAM,K. B., RADHAKRISHNAN, A., RAMDAS, P., HALEAGRAHARA, N. Quercetin glycosides induced neuroprotection by changes in the gene expression in a cellular model of Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**. 55, 609–617, 2015.

MAGALINGAM,K. B., RADHAKRISHNAN, A., HALEAGRAHARA, N. Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity. **International Journal of Molecular Medicine.** 32, 235–240, 2013.

MANN, V. M., COOPER, J. M., DANIEL, S. E., SRAI, K., JENNER, P., MARSDEN, C. D., SCHAPIRA, A. H. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. **Ann Neurol**. 36, 876-881, 1994.

MARAGAKIS, N J, ROTHSTEIN, J D, Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nature Clinical Practice Neurology**. 2 , 679-689, 2006.

MARINI, A.M. et al. Accumulation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultured cerebel- lar astrocytes, J. Neurochem. 58, 1250–1258, 1992.

MCGEER, PL., ITAGAKI, S., AKIYAMA, H., MCGEER, EG. Rate of cell death in parkinsonism indicate active neuropathological process. **Ann Neurol**. 24: 574–576, 1988.

MERCER, L. D.; KELLY, B.L.; HORNE, M. K.; BEART, P.M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. **Biochem Pharmacol**. 69, 339-34, 2005

MOEHLE, MS. et al. Inibição LRRK2 LRRK2 Inhibition Attenuates Microglial Inflammatory Responses. Journal of Neuroscience.32, 1602-1611, 2012.

MOGI M., HARADA M., KONDO T., RIEDERER P., INAGAKI H., MINAMI M., AND NAGATSU T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci**.180, 147–150, 1994a

MOGI, M., HARADA M., RIEDERER P., NARABAYASHI H., FUJITA K., NAGATSU T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. **Neurosci**.165, 208–210, 1994b

MOORE, D. J., WEST, A. B., DAWSON, V. L., DAWSON, T. M. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. **Annu Rev Neurosci**. 28, 57-87, 2005.

MOTAMEDSHARIATY,VS. et al. Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity. **Daru**v.22, 1, 27, 2014.

NAKAYAMA, M. et al. Neuroprotective effects of flavonoids on hypoxia-, glutamate-, and oxidative stress-induced retinal ganglion cell death. Mol Vis. 17, 1784-93, 2011.

NICHOLLS, D. Mitochondrial bioenergetics, aging, and aging-related disease. Rev. Sci Aging Knowledge Environ. 12, 31, 2002.

NONES, J. et al. Effects of the flavonoid hesperidin in cerebral cortical progenitors in vitro: indirect action through astrocytes. International Journal of Developmental **Neuroscience**. 30, 303-313, 2012a.

NONES, J.et al. The flavonoids hesperidin and rutin promote neural crest cell survival. **Cell and Tissue Research.** 350, 305-315, 2012b.

NORRIS, E H., GIASSON, B. I., HODARA, R., XU, S., TROJANOWSKI, J Q., ISCHIROPOULOS, H., LEE, V M. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alter-ations. **J. Biol. Chem**. 280, 21212-21219, (2005).

PAN ,T. et al Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and on MPP+ -induced dopamine neuron injury. **Life Sci.** 72, 9, 1073-83, 2003.

PARIS, I.; DAGNINO-SUBIABRE, A.; MARCELAIN, K.; BENNETT, L. B.; CAVIEDES, P.; CAVIEDES, R.; OLEA-AZAR, C.; SEGURA-AGUILAR, J. Copper neurotoxicity is dependent on dopamine-mediated copper uptake and one – electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. **J. Neurochem**. Vol.77, Nº2, p.519-529, apr. 2001.

PARIS, I.; MARTINEZ-ALVARADO, P.; PEREZ-PASTENE, C.; VIEIRA, M. N.; OLEA-AZAR, C.; RAISMAN-VOZARI, R.; CARDENAS, S.; GRAUMANN, R.; CAVIEDES, P. AND SEGURA-AGUILAR, J. Monoamine transporter inhibitors and norepinephrine reduce dopamine-dependent iron toxicity in cells derived from the substantia nigra. **J. Neurochem**., 92, 5, 1021-1032, 2005a.

PARIS, I.; MARTINEZ-ALVARADO, P.; CARDENAS, S.; PEREZ-PASTENE, C.; GRAUMANN, R.; FUENTES, P.; OLEA-AZAR, C.; CAVIEDES, P.; SEGURA-AGUILAR, J. Dopamine-dependent iron toxicity in cells derived from rat hypothalamus. **Rev. Chem. Res. Toxicol**. Vol.18, Nº3, p.415-419, mar. 2005b.

PARIS, I. et al. Aminochrome as preclinical model to study degeneration of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neurotox Res**. 12, 125–134, 2007.

PARIS, I.; MUÑOZ, P.; HUENCHUGUALA, S.; COUVE, E.; SANDERS, L.H.; GREENAMYRE, J.T.; CAVIEDES, P.; SEGURA-AGUILAR, J.(2011). Autophagy Protects Against Aminochrome-Induced Cell Death in Substantia Nigra-Derived Cell Line. Toxicological sciences. 121: 376388.

PARIS, I.; MUÑOZ, P.; HUENCHUGUALA, S.; COUVE, E.; SANDERS, LH.; GREENAMYRE, JT.; CAVIEDES, P.; SEGURA-AGUILAR, J. Autophagy Protects Against Aminochrome-Induced Cell Death in Substantia Nigra-Derived Cell Line. Rev. Toxicological sciences. 121, 2, 376-388, 2011.

PARK, S-E. et al. Rutin from Dendropanax morbifera Leveille Protects Human Dopaminergic Cells Against Rotenone Induced Cell Injury Through Inhibiting JNK and p38 MAPK Signaling. **Neurochem Res**. 39, 707–718, 2014.

PERIER, C., VILA, M. Mitochondrial biology and Parkinson's disease. **Cold Spring Harb. Perspect Med**. 4, p. a009332, 2012.

PETERSON LJ; FLOOD PM. Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. **Mediators Inflamm**, 12, 401264, 2012.

PRINGSHEIM, T., JETTE, N., FROLKIS, A., STEEVES, TD., The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis.**Mov Disord.** 29, 1583–1590, 2014.

PRZEDBORSKI, S., TIEU, K., PERIER, C., VILA, M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. **J Bioenerg Biomembr.** 36, 375-379, 2004.

RANSOM, B R et al. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP +. **Neuroscience Letler**. 75, 323- 328, 1987.

RECASENS, A., DEHAYN, B., Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. **Frente Neuroanat.** 8, 159, 2014.

RIEDERER, P., WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. J Neural Transm. 38, 277-301, 1976.

RIEDERER, P., WUKETICH, S. Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. J Neural Transm. 38, 277-301,1976.

RIO-HORTEGA, P DEL. Microglia. In Penfield W (ed): “Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System.” New York: Hocker, 481-584,1932.

RODRIGUES, AM. et al. Therapeutic potential of treatment with the flavonoid rutin after cortical focal ischemia in rats. **Brain Res**. 1503, 53-61, 2013.

SAGARA, Y.; VANHNASY, J.; MAHER, P. induction of PC12 cell differretiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. **Journal of Neurochemistry**. 90, 1144-1155, 2004.

SANDOVAL-ACUÑA, C., FERREIRA, J., SPEISKY, H. Polyphenols and mitochondria: an update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. **Arch. Biochem. Biophys**. 559, 75–90, 2014.

SANTOS, B.L. et al. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food Chemistry**. 127, 404-411, 2011.

SASAK, T.et al. Effects of staphylococci on cytokine production from human keratinocytes. **British Journal of Dermatology**. 148, 46–50, 2003.

SAWADA, H., SUZUKI, H., ONO, K., IMAMURA, K., NAGATSU, T., SAWADA, M. Role of Microglia in Inflammatory Process in Parkinson's Disease. Disease, tiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease, Prof**.** Abdul Qayyum Rana (Ed.), ISBN: 978-953-307-462-7, InTech, Available from: ACESSO 12/12/2014 Disponível: http://www.intechopen.com/books/etiology-and-pathophysiology-of-parkinson-s disease/role-of-microglia-ininflammatory-process-in-parkinson-s-disease

SCHAPIRA, A. H. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**. 7, 97-109, 2008

SCHAPIRA, A.. et al. Rasagiline. **Nat. Rev. Drug Discov**. 4, 625–626, 2005.

SCHAWKAT, K., DI SANTO, S., SEILER, S., DUCRAY, AD., WIDMER, HR., Loss of Nogo-A-expressing neurons in a rat model of Parkinson's disease. Neuroscience. 288, 59–72, 2015.

SCHROETER, H. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. 29, 1222–1233, 2000.

SCHROETER, H. et al. (-)Epicatechin stimulates ERK-dependent cyclic AMP response element activity and up-regulates GluR2 in cortical neurons. **JNC.** 101, 6, 1596–1606, 2007.

SEGURA-AGUILAR, J.; PARIS, I. Mechanisms of Dopamine Oxidation and Parkinson's Disease, **Handbook of Neurotoxicity.** 865-883,2014.

SHULMAN, G L. et al. Right Hemisphere Dominance during Spatial Selective Attention and Target Detection Occurs Outside the Dorsal Frontoparietal Network. **The Journal of Neuroscience**. 30,10,3640 –3651, 2010.

SILVA, A.R., PINHEIRO, A.M. SOUZA, C.S. FREITAS, S.R.V.B., FREIRE, S.M., VELOZO, E. TARDY, M., EL-BACHA, R.S., COSTA, M. F. D. and COSTA, S. L. The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. **Cell Biology and Toxicology**. 24, 75-86, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; Farmacognosia – da Planta ao Medicamento, 5ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004. Singsaas, E. L; Lerdau, M.; Winter, K.; Sharkey, T. D.; Isoprene increases thermotolerance of isoprene-emitting species. **Plant Physiol.,** 115, 1413-1420, 1997.

SMITH,Y., WICHMANN, T., FACTOR,S.A. DELONG,M.R. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. **Neuropsychopharmacology**. 37, 213–246, 2012.

SOONG, NW.; HINTON, DR.; CORTOPASSI, G. AND ARNHEIM, N. Mosaicism for a specific somatic mitochondrial DNA mutation in adult human brain. **Rev. Nat Genet**. Vol.2, Nº4, p.318-323, dec. 1992.

SPOHR, T. C. L. S. ; STIPURSKY, J ; SASAKI A ; BARBOSA P ; MARTINS V ; BENJAMIM C ; ROQUE N ; COSTA S ; GOMES, F. C. A. . Effects of the flavonoid Casticin from brazilian Croton betulaster in cerebral cortical progenitors in vitro: direct and indirect action through astrocytes (aceito). **Journal of Neuroscience Research**. 88, 530-541, 2010.

SURGUCHOV, A., SURGUCHEVA, I., SOLESSIO, E. Synoretin—A New Protein Belonging to the Synuclein Family. **Mol Cell Neurosci**.13 (2): 95-103,1999.

SURMEIER, D J, GUZMAN, J N, SANCHEZ-PADILLA, J. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Cell Calcium. 47, 175-182, 2010.

SURMEIER, D. J., GUZMAN, J. N., SANCHEZ-PADILLA, J. AND SCHUMACKER, P. T., The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neuroscience.** 198, 221-231, 2011.

TANG DQ. Et al. Protective effects of rutin on rat glomerular mesangial cells cultured in high glucose conditions. **Phytother Res.** 11, 1640-7, 2011.

TANNER, CM, DORSEY, ER, BRANDABUR, M. Parkinson Disease: A Global View Parkinson Report . 9-11, 2008.

TIEU, K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. Cold Spring Harb Perspect Med, 1,(1),a009316,2011.

VAN LAAR, VS; MISHIZEN, AJ; CASCIO, M; HASTINGS, TG. Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells.**Neurobiol Dis.** 34, 3, 487-500, 2009.

VAUZOUR, D. et al.Activation of pro-survival Akt and ERK1/2 signalling pathways underlie the anti-apoptotic effects of flavanones in cortical neurons. **J Neurochem.** 103, 4, 1355-67, 2007.

VAUZOUR,D. Dietary Polyphenols as Modulators of Brain Functions: Biological Actions and Molecular. **Mechanisms Underpinning Their Beneficial Effects**. 16, 914273, 2012

WANG, YUE et al. Interleukin-1β Induces Blood–Brain Barrier Disruption by Downregulating Sonic Hedgehog in Astrocytes**. PLoS One**.; 9, 10, e110024, 2014.

WILLIAMS, R.J; SPENCER, J.P.E . & RICE-EVANS ,C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radic Biol Med**. 36, 838–849,2004.

WONG, S S. et al. Oxidative stress induced by MPTP and MPPq: selective vulnerability of cultured mouse astrocytes. **Elsevier Science**. 836, 237-44, 1999.

.

WU, CH. Et al. Rutin inhibits oleic acid induced lipid accumulation via reducing lipogenesis and oxidative stress in hepatocarcinoma cells. **J Food Sci.** 76, 65-722011

YANG. J., GUOA, J., YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT**, 41, 1060–1066, 2008.

YOON, J. H.; BAEK, S. J. YONSEI**.** Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Med. J**. 46, 585, 2005.

YU,Z. et al. Neuroglobin overexpression inhibits oxygen-glucose deprivation-induced mitochondrial permeability transition pore opening in primary cultured mouse cortical neurons. **Neurobiol Dis.** 56, 95-103, 2013.

ZECCA, L., FARIELLO, R., RIEDERER, P., SULZER, D., GATTI, A., TAMPELLINI, D. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinsons disease. **FEBS Letters.** 510, 216-220, 2002.

ZECCA, L., BELLEI, C., COSTI, P., ALBERTINI, A., MONZANI, E., CASELLA, L., GALLORINI, M., BERGAMASCHI, L., MOSCATELLI, A.,TURRO, N. J., et al. New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**. 105, 17567-17572, 2008.

ZHANG, J. et al. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. **Rev. Am J Pathol**. Vol.154, N5, 1423-1429,