



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**



GABRIEL DE JESUS FERROLHO

**ESTUDO DO EFEITO DA RUTINA NA MOTILIDADE
GASTROINTESTINAL EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DA
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR AMINOCROMO**

Salvador - BA

2023

GABRIEL DE JESUS FERROLHO

**ESTUDO DO EFEITO DA RUTINA NA MOTILIDADE
GASTROINTESTINAL EM MODELO PRÉ-CLÍNICO DA
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR AMINOCROMO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva
Coorientadora: Profa. Dra. Silvia Lima Costa

Salvador - BA

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI, pela Bibliotecária Maria de Fátima Martinelli CRB5/551, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

F395 Ferrolho, Gabriel de Jesus

Estudo do efeito da Rutina na motilidade gastrointestinal em modelo pré-clínico da doença de Parkinson induzido por Aminocromo/Gabriel de Jesus Ferrolho. – Salvador, 2023.

44 f.: il.

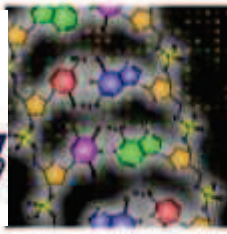
Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva; Coorientadora: Profª. Drª. Silvia Lima Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2023.

Inclui referências.

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

CDU 616.858



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

GABRIEL DE JESUS FERROLHO

Estudo do efeito da rutina na motilidade gastrointestinal em modelo pré-clínico da Doença de Parkinson induzido por aminocromo.

Salvador, Bahia, 28 de fevereiro de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva (Orientador/ UFBA)
Presidente

Prof. Dr. Rodrigo Portes Ureshino
Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

Profa. Dra. Rejane Conceição Santana
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente a Deus, por ter me permitido a graça da vida, e ter me dado toda a força e virtudes necessárias para chegar até aqui e desempenhar o meu trabalho, alcançando o título de mestre.

Sou extremamente grato à minha família, especialmente minha mãe, que me apoiou durante todo o percurso até aqui, ficando acordada nas madrugadas em que eu realizava os experimentos no laboratório, sempre preocupada e acolhedora.

Agradeço ao Prof. Dr. Victor Diógenes, por ser um orientador presente, preocupado, acolhedor e, principalmente, ter se mostrado humano em diversos momentos. Todas essas qualidades fazem muita diferença no fazer ciência do aprendiz.

Meus sinceros agradecimentos a minha coorientadora, Prof (a). Dra. Silvia Lima Costa, por fazer parte da construção desta pesquisa, bem como a, Prof (a). Dra. Juciele Valéria por ter acompanhado e ajudado em meu experimento *in vivo*, e pelas amistosas conversas sobre bioquímica.

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório e trabalho por toda assistência que me foi prestada, a amizade e cumplicidade durante o curso da construção do meu conhecimento técnico científico ao longo desses dois anos. Assim sendo, esse agradecimento é destinado a: Lucas Gonçalves, Érica Novaes, Cleonice Creusa, Deivison Argolo e Vinícius de Cássio. Contudo, agradeço de forma especial à Jéssica Teles, por ter me ensinado a trabalhar com modelo animal e por sua parceria durante essa jornada. A Fillipe Mendes, por ter enriquecido o meu trabalho e conhecimento, fornecendo sua expertise nas análises histológicas. A Mariana Pepe, por toda sua amizade e pelos debates acadêmicos. A Maria Victoria Lima, por sua parceria em muitos momentos de realização experimental, que se fizeram de forma descontraída e leve devido à sua sincera amizade, e por se fazer presente auxiliando na revisão deste trabalho.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq por permitirem que a ciência aconteça no Brasil. Mas, agradeço em especial, a FAPESB, por permitir que este trabalho fosse realizado, me fornecendo a bolsa de mestrado para subsidiar meu sustento e de meus familiares.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é um problema de saúde pública que afeta muitos indivíduos no mundo, inclusive no Brasil. Trata-se de uma doença neurodegenerativa de lenta progressão que acomete principalmente a população idosa. Apesar das pesquisas científicas terem avançado no intuito de procurar tratamentos efetivos para esta patologia, ainda não há uma terapia capaz de curar ou inibir a progressão da enfermidade. A comunidade científica vem prospectando compostos neuroprotetores, que inibam disfunções e morte em células envolvidas na patogênese da DP, dentre estes, é possível citar o flavonoide rutina, que vem apresentando potencial neuroprotor contra a excitotoxicidade glutamatérgica e citotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina. No entanto, a falta de esclarecimentos sobre a etiologia da enfermidade dificulta os avanços na descoberta de novos fármacos para o tratamento da DP. Uma importante alteração que precede os sintomas motores clássicos da DP é o distúrbio na motilidade gastrointestinal, associado à alterações no sistema nervoso entérico, que também apresenta etiologia desconhecida. Modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* têm revelado que muitas alterações celulares e moleculares presentes em pacientes com a doença apresentam relação com a toxicidade do aminocromo, um composto derivado da dopamina e precursor da neuromelanina, presente em neurônios dopaminérgicos remanescentes. No entanto, ainda não há relato que o mesmo é capaz de induzir alterações na função entérica. Neste sentido, o objetivo geral deste projeto foi avaliar o efeito da rutina em ratos Wistar machos com danos induzidos por aminocromo em termos de: 1- níveis de expressão de marcador de neurônio dopaminérgico (tirosina hidroxilase) na área tegmental ventral (VTA) e substância nigra pars compacta (SNpc) e, 2- tempo de trânsito gastrointestinal. Para tanto, os animais foram randomizados em quatro grupos, sendo um grupo controle (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI+RUT). A rutina foi administrada por gavagem, desde o primeiro até o vigésimo primeiro dia após a estereotaxia. O peso vivo dos animais foi avaliado do dia da cirurgia estereotáxica até o momento da perfusão. O tempo de trânsito intestinal foi avaliado pelo teste vermelho de carmim, visando analisar as alterações funcionais induzidas pelos tratamentos. Como resultado, a rutina promoveu uma redução no tempo de trânsito intestinal em comparação com o grupo controle. O aminocromo também reduziu a expressão de

tirosina hidroxilase (TH+) no lado ipsilateral da SNpc, que foi prevenida pelo tratamento com rutina. Por outro lado, não foi observada alteração na expressão de TH+ no VTA de animais tratados com aminocromo e/ou rutina. A rutina promoveu redução no peso dos animais tratados, apresentando um papel modulatório na regulação ponderal. Assim, estudos são necessários objetivando avaliar os mecanismos bioquímicos incitados para tal modulação, que se faz importante para pesquisas posteriores usando modelos pré-clínicos da DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, neurodegeneração, rutina , neuroproteção, intestino.

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a public health problem that affects many individuals in the world, including Brazil. It is a neurodegenerative disease of slow progression that mainly affects the elderly population. Although scientific research has advanced in order to seek effective treatments for this pathology, there is no therapy capable of curing or inhibiting the progression of the disease. The scientific community has been prospecting neuroprotective compounds, which inhibit dysfunctions and death in cells involved in PD pathogenesis; among them, it is possible to cite the flavonoid rutin, which has had neuroprotective potential against glutamatergic excitotoxicity and cytotoxicity induced by 6-hydroxydopamine. However, the lack of information on the disease's etiology makes difficult advances in the discovery of new drugs to treat PD. An important change that precedes the classic motor symptoms of PD is the disorder in gastrointestinal motility, associated with changes in the enteric nervous system, which also has an unknown etiology. *In vitro* and *in vivo* study models have revealed that many cellular and molecular changes present in patients with the disease are related to aminochrome toxicity, a compound derived from dopamine and precursor of neuromelanine, present in remnant dopaminergic neurons. However, there is still no report that it is able to induce changes in the enteric function. The overall objective of this project was to evaluate the effect of rutin in Wistar rats with damage induced by aminochrome in terms of: 1- levels of dopaminergic neuron marker expression (tyrosine hydroxylase) in the ventral tegmental area (VTA) and substantia nigra pars compacta (SNpc) and 2- gastrointestinal traffic time. The animals were randomized in four groups: control group (CTR), aminochrome (AMI), rutin (RUT) and aminochrome

+ rutin (AMI+RUT). Rutin was administered by gavage, from the first to the twentieth first day after stereotaxis. The living weight of the animals was evaluated from the day of stereotaxic surgery until the time of perfusion. Intestinal transit time was evaluated by the carmine red test, aiming to analyze the functional changes induced by the treatments. As a result, rutin promoted a reduction in intestinal timely time compared to the control group. The aminochrome also reduced the expression of tyrosine hydroxylase (TH+) on the ipsilateral side of the SNpc, which was prevented by rutin treatment. However, no change in TH+ expression in VTA of animals treated with aminochrome and/or rutin was observed. Rutin promoted a reduction in the weight of treated animals, with a modulatory role in weight regulation. Thus, studies are necessary to evaluate the incited biochemical mechanisms for such modulation, which is important for further research using preclinical DP models.

Keywords: Parkinson's disease, neurodegeneration, rutin, neuroprotection, gut.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	Revisão de literatura	14
2.1	Doença de Parkinson	14
2.2	Patogênese	15
2.3	Alterações celulares e moleculares associadas	15
2.4	Disfunções no trato gastrointestinal	18
2.5	Aminocromo: modelo endógeno de estudo da DP	20
2.6	Terapêuticas utilizadas	22
2.7	Rutina como potencial agente neuroprotetor	23
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	26
5	METODOLOGIA	26
6	RESULTADOS	33
7	DISCUSSÃO	39
8	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

Lista de figuras

Figura 1 - Reações neurotóxicas e neuroprotetoras de aminocromo.	21
Figura 2 - Linha do tempo do desenho experimental	28
Figura 3 - Linha do tempo do vermelho de carmim	30
Figura 4 - Anatomia do VTA e SNpc	31
Figura 5 - Fotomicrografia da fluorescência relativa na área tegumentar ventral	33
Figura 6 - Intensidade de fluorescência de TH+ em VTA	34
Figura 7 - Fotomicrografia da Fluorescência relativa na Substância Nigra Pars Compacta.	35
Figura 8 - Intensidade de fluorescência de TH+ em SNpc	36
Figura 9 - Avaliação de ganho ponderal.	37
Figura 10 - Avaliação do tempo de trânsito intestinal (razão T13/T0).	38
Figura 11 - Avaliação do tempo de trânsito intestinal (razão T21/T0).	39

Lista de abreviaturas e siglas

6-OHDA - 6-hidroxidopamina

AAV - vírus adeno-associado

AMI - Aminocromo

AMI+RUT - Aminocromo + rutina

CEUA/UFBA - Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Federal da Bahia

CMC - Carboximetilcelulose

COMT - Catecol-O-metiltransferase

CTR - Controle

DCV - Doenças cardiovasculares

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOPAL - 3,4-dihidroxifenilacetaldeído

DP- Doença de Parkinson

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GFP - Green fluorescent protein

GPx - Glutathione peroxidase

GSH - Glutathione reduzida

GSTM2 - Glutathione transferase humana M2

HFD - Dieta rica em gordura

IL-6 - Interleucina 6

IPANs - Neurônios aferentes primários intrínsecos

MAO - Monoamina oxidase

MAO-B - Monoamina oxidase B

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pael-R - Receptor semelhante ao receptor de endotelina associado a Parkin mal dobrado

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PINK1 - Quinase putativa induzida por PTEN

Q - Quercetina

Q-glc - Quercetina-3-glicosídeo
RUT - Rutina
SNC - Sistema nervoso central
SNE - Sistema nervoso entérico
SNM - Sintomas não motores
SNpc - Substância nigra pars compacta
SOD - Superóxido dismutase
TGI - Trato gastrointestinal
TH - Tirosina hidroxilase
TH+ - Positivo para tirosina hidroxilase
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
UPR - Resposta a proteínas mal enoveladas
VIP - Peptídeo intestinal vasoativo
VMAT-2 - Transportador vesicular de monoamina 2
VTA - Área tegumentar ventral

1 INTRODUÇÃO

Em 2016, 6,1 milhões de pessoas em todo o mundo foram diagnosticadas com Doença de Parkinson (DP), o que representa 2,4 vezes mais que o número de pessoas diagnosticadas em 1990 (DORSEY *et al.*, 2018; SIMON *et al.*, 2019). Além disso, estima-se que o número de casos ultrapassará 12 milhões de indivíduos em 2040 (DORSEY *et al.*, 2018; SIMON *et al.*, 2019). O número crescente de casos está relacionado principalmente ao aumento da expectativa de vida, uma vez que a DP é mais comum em indivíduos com mais de 40 anos, e sua incidência aumenta drasticamente após os 75 anos (ABDULLAH *et al.*, 2015; DORSEY *et al.*, 2018). A idade é o principal fator de risco para a DP, mas também há associação com fatores ambientais relacionados à industrialização, incluindo agrotóxicos, solventes e metais (CAUDLE *et al.*, 2012).

No Brasil, a DP não é uma doença de notificação compulsória, portanto, sua prevalência é desconhecida. No entanto, estima-se que 220 mil indivíduos são portadores da enfermidade no país (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016). Segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2015), durante o período de 2008 a 2015 foram internados 6.537 pacientes com o diagnóstico de Doença de Parkinson, gerando aos cofres públicos um gasto de R\$ 11.571.097,41. Esses dados alarmantes destacam a necessidade de pesquisas voltadas para a investigação da fisiopatologia da doença e possíveis formas de tratamento.

A DP é caracterizada por uma perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da região nigroestriatal (POEWE *et al.*, 2017; PRINGSHEIM *et al.*, 2014). Pacientes que são acometidos por esta enfermidade apresentam sintomas motores como bradicinesia (lentidão dos movimentos voluntários), rigidez muscular e tremor em repouso (POEWE *et al.*, 2017; PRINGSHEIM *et al.*, 2014). Entretanto, antes de apresentarem tais sinais clínicos, sintomas não motores, que incluem constipação intestinal, ansiedade, depressão, demência e distúrbios autonômicos, podem ser observados (GIRÁLDEZ-PÉREZ *et al.*, 2014; KALIA; LANG, 2015; SHULMAN *et al.*, 2010).

Inúmeras pesquisas sobre os mecanismos moleculares que levam à patogênese da DP são realizadas e diversos estudos relatam que estresse oxidativo (HEMMATI-DINARVAND *et al.*, 2019), agregação de α -sinucleína (XU; PU, 2016), disfunção mitocondrial (PARK; DAVIS; SUE, 2018), disfunção na degradação de

proteínas (LEHTONEN *et al.*, 2019) e inflamação (TRONCOSO-ESCUADERO *et al.*, 2018) estão envolvidos na patogênese desta enfermidade.

Além disso, o aminocromo, uma molécula endógena produzida por neurônios dopaminérgicos, é capaz de causar a morte de tais células e já está sendo utilizada como modelo mimético da DP (SEGURA-AGUILAR; HUENCHUGUALA, 2018; SEGURA-AGUILAR; KOSTRZEWA, 2015; SEGURA-AGUILAR, 2016). O aminocromo é derivado da oxidação da dopamina, e é um precursor da neuromelanina, presente nos primeiros neurônios acometidos, podendo se acumular em condições disfuncionais e gerar o radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona, que é extremamente reativo e gera danos mitocondriais e consequente ativação de mecanismos apoptóticos neuronais através de diferentes disfunções celulares associadas à sua patogênese (SEGURA-AGUILAR; HUENCHUGUALA, 2018; SEGURA-AGUILAR; KOSTRZEWA, 2015; SEGURA-AGUILAR, 2016).

Outros estudos mostraram que o ciclo redox gerado pelo aminocromo causa a formação de peróxido de hidrogênio e radical hidroxil com depleção de NADH e NADPH, causando disfunção mitocondrial e lisossomal com morte celular (MELENDÉZ *et al.*, 2019; PARIS *et al.*, 2011; SEGURA-AGUILAR; HUENCHUGUALA, 2018).

As atuais intervenções medicamentosas aplicadas aos pacientes com a Doença de Parkinson são direcionadas aos sintomas motores e, com o tempo, esses pacientes apresentam flutuações motoras e não motoras (HAYES *et al.*, 2019). Além disso, há poucos estudos direcionados ao tratamento dos sintomas que precedem a tríade clássica da doença. Dessa forma, também é necessária a utilização de terapias que atuem nas desordens não motoras da DP (HAYES *et al.*, 2019).

Diversos estudos desenvolvidos *in vitro* e *in vivo* relatam o efeito antioxidante, antiapoptótico, anti-inflamatório e inibidor da agregação de α -sinucleína induzido por compostos naturais (COSTA *et al.*, 2017; MALEKI; CRESPOCABANILLAS, 2019). O flavonoide rutina é um dos compostos naturais estudado em modelo agudo da Doença de Parkinson (COSTA, *et al.*, 2017; GANESHPURKAR; SALUJA, 2017; SALEHI *et al.*, 2019), no entanto, não há relatos de seus efeitos contra danos induzidos pelo aminocromo na modulação intestinal da DP (MOUHAPE *et al.*, 2019; FERREIRA JÚNIOR *et al.*, 2020).

Desse modo, tendo como referência o exposto, é necessária a avaliação do flavonoide rutina na modulação do tempo de trânsito intestinal em modelo pré-clínico da Doença de Parkinson induzido por aminocromo.

2 Revisão de literatura

2.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a Doença de Alzheimer (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; ZENG *et al.*, 2018). Sua descoberta surgiu quando um tipo de degeneração motora com paralisia foi descrita por James Parkinson em 1817, sendo posteriormente chamada de Doença de Parkinson em 1862 por Charcot e Vulpian (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; ZENG *et al.*, 2018).

Atualmente a DP é caracterizada como um distúrbio neurodegenerativo progressivo, onde os indivíduos portadores, em estado mais tardio cursam com sintomas motores graves, como tremor estático ou em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e alteração postural. Embora o comprometimento dos movimentos voluntários seja o fator preponderante, outros sintomas clínicos podem preceder o seu aparecimento, sendo eles a perda olfatória, distúrbio de humor e constipação intestinal (BRAAK *et al.*, 2004; CARRASCO; BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; TIMMERMANN; PEDROSA, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 1% da população com idade acima de 65 anos seja acometida pela DP. No ano de 2005, como estimativa, mais de 4 milhões de indivíduos com mais de 50 anos possuíam a doença, tendo como projeção ao ano de 2030 que esse número venha a duplicar. Embora os estudos epidemiológicos no Brasil sobre tal tema sejam escassos, tendo como estimativa, podem haver mais de 200 mil pessoas portadoras de DP (FERNANDES; FILHO, 2018).

O envelhecimento da população traz consigo um maior número de “doenças da terceira idade” e dentre elas, a Doença de Parkinson. Por se tratar de uma doença que apresenta longa sobrevida, o acometimento de indivíduos idosos desencadeia enormes encargos assistenciais. Essas pessoas têm uma maior probabilidade de hospitalização, necessidade de cuidados domésticos e consumo de medicamentos para o resto da vida (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016; BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021).

Devido as informações supracitadas, é necessário a realização de mais estudos para compreensão acerca desta doença, em busca da ampliação de tratamentos e redução de gastos aos cofres públicos.

2.2 Patogênese

A etiologia da Doença de Parkinson ainda não é clara. Levantamentos científicos avaliam e hipotetizam seis principais mecanismos associados a fisiopatologia da DP, sendo eles: a disfunção mitocondrial, aparecimento de fibrilas e oligômeros neurotóxicos formados de agregados de α -sinucleína, disfunção dos mecanismos de degradação proteica, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e neuroinflamação (KALINDERI *et al.*, 2016 apud SANTOS *et al.*, 2020). Um outro fator preponderante associado à DP e que tem sido estudado ultimamente é a produção endógena do aminocromo em neurônios dopaminérgicos. O metabolismo da dopamina, catalizado por monoamina oxidase (MAO) gera a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que estão associadas a sua oxidação não enzimática, levando a perda de dois elétrons e posterior ciclização, formando o aminocromo, uma O-quinona tóxica associada a todos os desfechos fisiopatológicos da DP, que causa uma degeneração lenta e progressiva de neurônios dopaminérgicos (FOLMMER; NETTO, 2013; SANTOS *et al.*, 2020).

A dopamina é um neurotransmissor que desempenha importantes papéis na neuromodulação, tais como o controle motor, função cognitiva e de recompensa. Contudo, a oxidação citoplasmática desse neurotransmissor ou sua metabolização através da MAO são fatores intimamente ligados à morte de neurônios dopaminérgicos. (FOLMMER; NETTO, 2013; NAVARRO, 2021; ZENG *et al.*, 2018).

A MAO, localizada na membrana externa da mitocôndria, catalisa a conversão da dopamina no metabólito 3,4-dihidroxifenilacetaldeído (DOPAL), que é uma neurotoxina capaz de inibir irreversivelmente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), uma enzima crucial para a viabilidade de células neuronais. Além disso, a inibição resulta na produção de espécies reativas de oxigênio que, em consonância, provocam a oxidação não enzimática da dopamina citosólica, gerando as neurotoxinas endógenas aminocromo e neuromelanina que causam neurotoxicidade e morte dos neurônios produtores da dopamina (VANLE *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2018).

2.3 Alterações celulares e moleculares associadas

2.3.1 Disfunção mitocondrial

Os distúrbios mitocondriais estão presentes em praticamente todas as doenças neurodegenerativas, sobretudo na DP. Dentre alguns fatores que podem gerar a alteração da funcionalidade da mitocôndria na DP, listam-se: toxinas exógenas que mimetizam a DP, neurotoxinas formadas por oxidação da dopamina, mutações de genes que apresentam ligação com a homeostase da atividade mitocondrial, número reduzido de cópias do DNA mitocondrial e acúmulo aberrante de α -sinucleína na mitocôndria (DEVI *et al.*, 2008; FOLMMER; NETTO, 2013; PERFEITO; REGO, 2012; WRIGHT, 2022; ZENG *et al.*, 2018).

O acúmulo de α -sinucleína na mitocôndria, em especial a mutante A53T, reduz em cerca de 39% a atividade dos complexos I/III da fosforilação oxidativa na substância nigra pars compacta em pacientes com DP (DEVI *et al.*, 2008). Essa redução está ligada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que, concomitantemente, pode gerar um decréscimo no potencial de membrana mitocondrial, com liberação de citocromo C e mediação do processo de apoptose causada por ativação de caspases (DEVI *et al.*, 2008; PERFEITO; REGO, 2012).

2.3.2 Estresse do retículo endoplasmático

Inúmeras evidências experimentais apontam que o acúmulo de proteínas mal enoveladas pode resultar no estresse do retículo endoplasmático, fator que contribui com a morte neuronal (ZENG *et al.*, 2018).

Um dos mecanismos causadores do estresse no retículo endoplasmático é a mutação do gene que codifica a proteína Parkin, subjacente à forma autossômica recessiva da doença. A Parkin serve como uma ubiquitina E3 ligase, que direciona substratos para a degradação no proteassoma (OMURA *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2018). A degradação do receptor semelhante ao receptor de endotelina associado a Parkin mal dobrado (Pael-R) por ação da Parkin suprime a morte celular, assim, a mutação de Parkin resulta no acúmulo de Pael-R e pode gerar morte celular induzida por estresse do retículo endoplasmático. Porém, algumas evidências contrastam com tais resultados, sugerindo a existência de outras moléculas com atividade de E3 ligase que possam degradar o Pael-R na ausência de Parkin (OMURA *et al.*, 2013; ZENG *et al.*, 2018).

A perturbação do equilíbrio da função do retículo endoplasmático também pode

ser causada por depleção de cálcio do seu lúmen e estresse oxidativo. Alguns estudos trazem que a alteração da comunicação entre retículo endoplasmático e mitocôndria na DP pode culminar em efeitos prejudiciais para as células neuronais, embora o papel exato dessas associações ainda não esteja claro (COSTA *et al.*, 2020).

2.3.3 Disfunção autofágica

O comprometimento autofágico é um dos mecanismos presentes em alterações bioquímicas da DP. A autofagia é um processo citoprotetor, uma vez que tem um papel crítico na degradação de organelas danificadas e proteínas anormalmente dobradas em acúmulo (ZENG *et al.*, 2018).

Mutações da quinase putativa induzida por PTEN (PINK1) e da proteína Parkin, são uma causa comum da DP de início precoce (HOU *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2018). Tais proteínas têm um importante papel na regulação da mitofagia, visto que a PINK1 se acumula na membrana de mitocôndrias disfuncionais, o que é necessário para iniciar a atividade de marcação de ubiquitina E3 da Parkin, e posterior degradação citoplasmática da mitocôndria (ZENG *et al.*, 2018). Dessa forma, a inibição da função de tais proteínas causadas por mutação, pode levar ao acúmulo de mitocôndrias danificadas, resultando, possivelmente, em uma neurodegeneração seletiva na SNpc (HOU *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2018).

As mutações de α -sinucleína, bem como modificações pós-traducionais da proteína do tipo selvagem, pode gerar alteração na função da via lisossomal de autofagia, encaminhando assim à morte neuronal (HOU *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2018).

2.3.4 Desregulação do sistema imune

O processo inflamatório crônico está associado com inúmeras doenças, e é considerado um fator patogênico importante, tanto no início, quanto na progressão da DP (KANNARKAT; BOSS; TANSEY, 2013). Em modelo de doenças neurodegenerativas, como a DP, a liberação de α -sinucleína para o espaço extracelular pode causar uma reatividade de astrócito e microglia, devido a essa proteína se ligar à receptores de reconhecimento de padrão, como o TLR2,

culminando no aumento da expressão de interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) e produção de óxido nítrico, tóxico para os neurônios. Porém, o potencial de ativação imunológica da α -sinucleína depende de seu tipo e solubilidade (KWON *et al.*, 2019; FERREIRA; RAMOS, 2018).

Além disso, o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica na Doença de Parkinson permite o influxo de células imunológicas provenientes da periferia, que podem ser ativadas por uma micróglia reativa, o que resulta na piora do processo neuroinflamatório da DP (KANNARKAT; BOSS; TANSEY, 2013).

2.4 Disfunções no trato gastrointestinal

Evidências emergentes denotam uma importante participação dos circuitos intestinais para a patogenia da DP. A disfunção gastrointestinal, pode ser considerada como um importante biomarcador precoce, pois, é encontrada em todos os pacientes com a confirmação da doença (POIRIER *et al.*, 2016).

Em 2003, o neuroanatomista alemão Heiko Braak, através de suas pesquisas, cientificou que a doença tem início no intestino, espalhando-se posteriormente ao cérebro. Segundo a hipótese do anatomista, a doença é originada no núcleo motor dorsal do vago e olfativo anterior, com progressão caudo-rostral, e este processo se dá em seis estágios, sendo o primeiro estágio relacionado aos sintomas clínicos precedentes da tríade clássica da DP (ANDERSON *et al.*, 2007; ROSSO *et al.*, 2008). Neste estágio, a presença dos primeiros corpos neuríticos de Lewy em neurônios do núcleo motor dorsal do vago e a perda destes está associada ao quadro de constipação intestinal, devido a presença de acetilcolina como neurotransmissor em tais neurônios (ROSSO *et al.*, 2008). Contudo, tal hipótese não é amplamente aceita em vista da escassez de pacientes estudados, convergente com a carência de dados clínicos (POIRIER *et al.*, 2016). Porém, essa carência de dados pode ser explicada devido aos sintomas não motores (SNM) como depressão, déficit olfativo, disfagia e constipação intestinal não receberem tanta atenção pelos profissionais de saúde ou a falta de relato de tais sintomas pelos pacientes por constrangimento (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009; SAUERBIER; CHAUDHURI, 2014).

Assim como Braak, outros estudos sugerem a iniciação dos processos patológicos que levam à DP provinda do sistema nervoso entérico (SNE), antes de ser direcionado ao sistema nervoso central (SNC), sendo o nervo vago um condutor

(POIRIER *et al.*, 2016). Como exemplo para esta afirmação, o estudo de Holmqvist e colaboradores (2014), demonstrou a passagem de diferentes formas de α -sinucleína humana injetada no intestino de camundongos para o núcleo motor dorsal no tronco encefálico via nervo vago, o que corrobora com a hipótese de Braak.

Existem dois principais componentes neurais que regulam o trato gastrointestinal (TGI), sendo a via extrínseca, esta associada ao nervo vago, e o SNE que é componente do sistema nervoso autônomo. Conhecido como segundo cérebro, o SNE possui cerca de 100 milhões de neurônios e exibe capacidade de operar funções de forma independente do SNC.

A motilidade do TGI é controlada pelo plexo mioentérico profundo e submucoso superficial. O plexo mioentérico comporta a função de regular as atividades contráteis da musculatura externa. Já os neurônios motores do plexo submucoso exibem função de controle de atividades secretomotora e vasomotora da túnica mucosa (NASCIUTTI *et al.*, 2016). Sob ótica morfológica, ainda se carece de uma classificação abrangente das células do SNE, pois, a grande maioria do conhecimento destas se faz proveniente de estudos experimentais em animais de laboratório, particularmente, cobaias (FURNESS 2000; NATALE *et al.*, 2021).

A partir desse modelo, a classificação dos neurônios entéricos foi realizada da seguinte forma: neurônios motores, interneurônios, neurônios aferentes primários intrínsecos (IPANs), neurônios secretomotores e vasomotores e neurônios motores para células endócrinas (FURNESS 2000; NATALE *et al.*, 2021). Tais neurônios exibem diferentes funções de acordo com o peptídeo e ou neurotransmissor que produz, como, dopamina, acetilcolina, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), substância P, óxido nítrico (NO) e serotonina (POIRIER *et al.*, 2016).

Pesquisas anteriores demonstram o aparecimento de corpos de Lewy nos plexos mioentérico e submucoso do SNE em pacientes com DP, bem como um menor número de neurônios dopaminérgicos entéricos nestes pacientes (ANDERSON *et al.*, 2007).

Neste âmbito, o estudo de Anderson e colaboradores (2007) objetivou investigar as alterações de funcionalidade intestinal em um modelo da Doença de Parkinson induzido pela toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em camundongo. Como resultado, dez dias após o tratamento observou-se uma diminuição de 40% dos neurônios dopaminérgicos no SNE dos camundongos, no entanto, sem diferença na quantidade de neurônios colinérgicos. Também foi

evidenciado a partir de registro eletrofisiológico, um defeito do relaxamento da contração muscular no cólon mediada por neurônios associado à degeneração dopaminérgica. Em quesito comportamental, a administração de MPTP gerou um aumento transitório na motilidade do cólon.

Um outro estudo usando um vetor viral de alfa-sinucleína (vírus adeno-associado (AAV)- α -sinucleína) ministrado por injeção bilateral intranigral em Ratos Sprague-Dawley machos adultos, encontrou como resultado nos plexos mioentérico e submucoso, varicosidades inchadas ao longo dos axônios positivos para tirosina hidroxilase (TH+), podendo ser indicativo de morte axonal, além de uma redução da densidade neuronal no plexo submucoso (O'DONOVAN *et al.*, 2020). Estes resultados denotam a importância do estudo do SNE na DP, não só para uma melhor compreensão da doença, mas também para um possível tratamento de condições que precedem os sintomas motores clássicos da DP.

2.5 Aminocromo: modelo endógeno de estudo da DP

A maioria dos estudos tem utilizado neurotoxinas exógenas capazes de induzir neurodegeneração dopaminérgica intensa e aguda em modelos *in vitro* e *in vivo*, o que não corresponde ao processo lento e progressivo da degeneração de neurônios na enfermidade. As principais neurotoxinas usadas são: 6-hidroxidopamina (6-OHDA), MPTP, rotenona e paraquat (PERFEITO; REGO, 2012).

Outra categoria de neurotoxinas, são as formadas endogenamente em maior quantidade na DP já instalada, em neurônios dopaminérgicos que degeneram na enfermidade. Um exemplo, com uso em ascensão para mimetizar a DP *in vivo* e *in vitro* é o aminocromo, uma O-quinona formada pela oxidação da dopamina em neurônios dopaminérgicos. A oxidação de dopamina à neuromelanina confere a formação de várias o-quinonas (dopamina \rightarrow dopamina o-quinona \rightarrow aminocromo \rightarrow 5,6 indolequinona \rightarrow neuromelanina) (SEGURA-AGUILAR, 2017; HERRERA, 2016).

A produção dessas moléculas se faz de forma fisiológica, de modo que idosos saudáveis apresentam neurônios dopaminérgicos intactos com neuromelanina. Porém, sob certas condições, como visto na DP, pode apresentar um potencial neurotóxico (SEGURA-AGUILAR, 2017; HERRERA, 2016).

O motivo da não toxicidade das O-quinonas provenientes da oxidação de dopamina em indivíduos saudáveis é a existência de duas enzimas que atuam prevenindo o efeito neurotóxico, sendo elas: DT- diaforase e a glutathione transferase humana M2 (GSTM2) (SEGURA-AGUILAR, 2017; HERRERA, 2016).

As enzimas atuam por diferentes mecanismos, mas conjuntamente na transformação do aminocromo em compostos menos reativos. A DT- diaforase atua reduzindo o aminocromo em dois elétrons, gerando a formação de leucoaminocromo. Já a GSTM2 age sob a conjugação de glutathione reduzida (GSH) de aminocromo e a dopamina O-quinona para produtos não reativos. Embora a GSTM2 seja apenas expressa em astrócitos, curiosamente, tais células podem secretar a enzima no espaço extracelular, de modo em que os neurônios dopaminérgicos possam internalizar a mesma no citosol, visando sua própria proteção contra a neurotoxicidade induzida por aminocromo (SEGURA-AGUILAR, 2017; HERRERA, 2016).

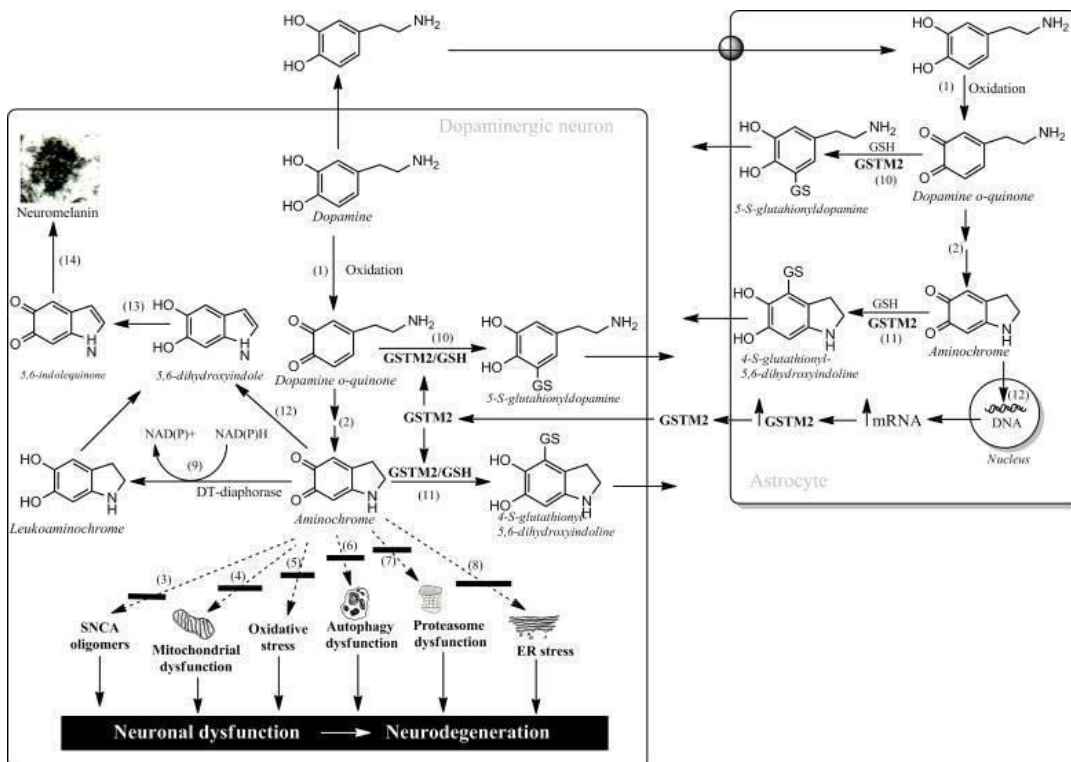


Figura 1: reações neurotóxicas do aminocromo. Fonte: Aguilar (2017).

O aminocromo induz a formação de oligômeros neurotóxicos de α -sinucleína, disfunção na degradação de proteínas via sistema proteassomal e lisossomal, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial (SEGURA-AGUILAR., 2017; HERRERA, 2016).

O mecanismo ao qual o aminocromo prejudica a função da mitocôndria advém da formação de adutos com o complexo mitocondrial I, que culmina na diminuição da produção de ATP, sendo este, um fator que associa o aminocromo ao prejuízo do transporte axonal anterógrado, uma vez que o ATP é essencial para a liberação de dopamina das vesículas sinápticas no estriado. Além disso, também reduz a respiração basal na SNpc e corpo estriado, o que leva à uma crise energética, também podendo explicar a menor quantidade de vesículas sinápticas monoaminérgicas e redução na liberação de dopamina (SEGURA-AGUILAR, 2017; HERRERA, 2016).

A indução da disfunção neuronal causada por aminocromo é semelhante ao curso da lenta neurodegeneração vista na DP, pois ocorre uma sobrevivência dos neurônios contendo neuromelanina, que, lentamente serão perdidos. A utilização de toxinas exógenas para mimetizar a DP não compactua com o caminho da doença, uma vez que leva à uma morte massiva de neurônios dopaminérgicos (SEGURA-AGUILAR., 2017; HERRERA, 2016). Por isso, o modelo de estudo induzido pelo aminocromo tem sido proposto visando a prospecção de compostos neuroprotetores, dentre eles, alguns derivados de plantas (SILVA; SEGURA-AGUILAR, 2021).

Assim, um estudo cujo o objetivo era avaliar o potencial neurotóxico do aminocromo foi realizado usando ratos Wistar machos infundidos com aminocromo por injeção estereotáxica no estriado direito. Foi evidenciada perda neuronal dopaminérgica a partir da redução do número de células com marcação positiva para tirosina hidroxilase nas fatias mesencefálicas da SNpc, evidenciando morte neuronal dopaminérgica (DE ARAÚJO *et al.*, 2022).

2.6 Terapêuticas utilizadas

De acordo com a Portaria N 228, de 10 de Março de 2010, Ministério da Saúde, antes de dar início à terapia farmacológica, o paciente deve ser diagnosticado com a DP através de critérios do Banco de Cérebro da Sociedade de Parkinson do Reino Unido, sendo necessário que o paciente tenha bradicinesia e pelo menos mais um

outro sintoma clínico, podendo ser: rigidez muscular, tremor de repouso, avaliado clinicamente e ou instabilidade postural não causada por distúrbios visuais, cerebelares, vestibulares ou proprioceptivos.

Dentre os fármacos utilizados para o tratamento da DP, estão listados: levodopa standard ou com formulações de liberação controlada, em associação com inibidor da levodopa descarboxilase, inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B), inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT), anticolinérgicos e antiglutamatérgicos. O medicamento a ser escolhido varia com o estágio da doença, sintomatologia apresentada, presença de efeitos colaterais, idade do paciente e outros medicamentos em uso (FERRAZ, 2004).

Se os sintomas forem leves e sem prejuízo funcional, recomenda-se a utilização de anticolinérgicos como terapia inicial, em especial, nos casos onde o tremor é uma manifestação predominante em indivíduos jovens e que não apresentam disfunção cognitiva. Já a levodopa é o tratamento inicial empregado para pacientes idosos que apresentam comprometimento da cognição. Porém, o tratamento de longa duração com a levodopa pode causar flutuações motoras e discinesias, onde há um encurtamento da duração de seu efeito, e, devido a isso, se faz necessária a associação de um agonista dopaminérgico (como o pramipexol) e redução da levodopa, ou utilização de inibidores da COMT visando a redução das flutuações motoras. Os inibidores da MAO também são utilizados na presença de flutuações motoras, em vista de aumentar a biodisponibilidade da levodopa (BRASIL, 2010; FERRAZ, 2004).

Apesar de muitas classes de fármacos serem utilizadas para o tratamento da DP, nenhuma envolve mecanismos que promovam cura, e sim, de forma contrária, durante um longo período de administração, podem causar efeitos adversos, como o exemplo da levodopa que induz flutuações motoras, discinesia, depressão, psicose e demência (CARDOSO, 1995; DEURWAERDÈRE; GIOVANNI; MILLAN, 2016). Por causa disto, a busca de fármacos neuroprotetores tem sido uma estratégia de interesse da comunidade científica. Para tanto, diferentes modelos pré-clínicos têm sido utilizados.

2.7 Rutina como potencial agente neuroprotetor

A rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-ramnoglicosídeo), conhecida como

vitamina P, rutosídeo, quercetina-3-rutinosídeo e/ou soforina, é um flavonol vastamente encontrado em plantas e frutos, como trigo sarraceno, maracujá e maçã (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). Quimicamente se trata de um glicosídeo composto de quercetina aglicona flavonólica junto à rutinose de dissacarídeo. A nível celular, possui notáveis ações antioxidantes, bem como a capacidade para modular a ação de inúmeras vias enzimáticas importantes. Desta forma, o consumo regular deste flavonoide se associa à redução do risco de doenças crônicas diversas, como doenças cardiovasculares (DCV), câncer e distúrbios neurodegenerativos (KOZLOWSKA; WEGIEREK, 2014).

No intestino, a biodisponibilidade dos flavonoides dietéticos subordina-se à absorção intestinal, que é em si determinada pela composição química destes, e, em especial, pela natureza da glicosilação. A microbiota intestinal exerce um importante papel neste metabolismo (RIVA *et al.*, 2020). Especificamente, a rutina pode ser metabolizada a seus produtos de degradação, a quercetina-3-glicosídeo (Q-glc) e quercetina (Q) (RIVA *et al.*, 2020; BOKKENHEUSER; SHACKLETON; WINTER, 1987).

Os glicoconjugados de Q exibem uma pequena absorção no trato intestinal superior, havendo um maior acúmulo no intestino grosso. No cólon, a microbiota residente pode hidrolisar a rutina, fazendo a remoção da porção de açúcar, o que permite a absorção da aglicona (AMARETTI *et al.*, 2015; RIVA *et al.*, 2020). Bactérias que possuem α -ramnosidases metabolizam a rutina em Q-glc, assim como a presença de β -glicosidases nestas é responsável pela conversão de Q-glc em Q (BRAUNE; BLAUT, 2016). Além disso, as β -glicosidases também podem converter rutina diretamente a quercetina. Atualmente, um número limitado de bactérias foram identificadas como responsáveis por esta conversão. Os *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Bifidobacterium dentium* foram identificados como produtores de α -ramnosidases, e a presença de β -glicosidases foi encontrada em *Parabacteroides distasonis* (RIVA *et al.*, 2020; BOKKENHEUSER; SHACKLETON; WINTER, 1987).

Diversos estudos têm demonstrado que o flavonoide exibe uma série de atividades farmacológicas, em especial, atividades antioxidantes, citoprotetoras vasoprotetoras e neuroprotetoras (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017; JAVED *et al.*, 2012; MELLOU *et al.*, 2006). Em um estudo experimental mimético de DP, conduzido por Magalingam e colaboradores (2013), a rutina foi usada como pré-tratamento em cultura de células PC-12, visando inibir os efeitos tóxicos na neurotoxina 6-OHDA. As

células foram pré-tratadas com diferentes concentrações de rutina por 4, 8 e 12 horas, e posteriormente, incubadas com 6-OHDA por 24 horas para indução de estresse oxidativo. Como resultado, em comparação com células tratadas somente com 6-OHDA, as células pré-tratadas com rutina tiveram ativação marcada de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione total. Além disso, o tratamento reduziu de forma significativa a peroxidação lipídica em células PC-12 impelida por 6-OHDA.

Além de estudos *in vitro*, estudos *in vivo* já demonstram o potencial efeito neuroprotetor da rutina em modelo de DP. O estudo de Khan e colaboradores (2012), com o objetivo de avaliar o efeito da rutina no estresse oxidativo induzido por 6-hidroxi-dopamina, utilizou ratos Wistar machos pré-tratados por 3 semanas de forma oral com o flavonoide. Após o pre-tratamento, foi realizada a cirurgia estereotáxica por administração unilateral intraestriatal de 6-OHDA. 4 semanas após a infusão de 6-OHDA, os animais foram perfundidos transcardialmente para coleta das amostras. Em resultado, a rutina reduziu de forma significativa os níveis de NO e preservou a concentração de glutathione reduzida no estriado. Além disso, os achados imunohistoquímicos mostraram que o pré-tratamento com rutina protegeu os neurônios da SNpc da toxicidade induzida por 6-OHDA.

3 HIPÓTESE

Nossa hipótese é que a alteração no sistema nervoso central gerada por aminocromo possa resultar na lentificação do tempo de trânsito intestinal que pode ser tratada por agentes neuroprotetores, como a rutina.

4 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da rutina na motilidade intestinal em modelo pré-clínico de estudo da Doença de Parkinson induzido por aminocromo.

Objetivo específico 1

Estudar o efeito neuroprotetor da rutina em modelo pré-clínico da Doença de Parkinson induzido por aminocromo.

Objetivo específico 2

Avaliar o efeito da rutina no tempo de trânsito intestinal em modelo pré-clínico da Doença de Parkinson induzido por aminocromo.

Objetivo específico 3

Avaliar o efeito da rutina no peso vivo em modelo pré-clínico da Doença de Parkinson induzido por aminocromo.

5 METODOLOGIA

5.1 Animais

Foram usados ratos Wistar machos adultos (280-300g), provenientes do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Todos os animais foram submetidos a distribuição de água e ração *ad libitum* e mantidos em condições ambientais de 20 à 22 °C, umidade relativa de 45-55% e ciclo de luz 12:12h.

Todos os testes e procedimentos realizados nos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade Federal da Bahia (CEUA/UFBA) (Protocolo CEUA nº 114/2016).

5.2 Randomização animal e indução de modelo *in vivo* de DP

Os animais foram divididos ao acaso em quatro grupos experimentais, sendo: 1- controle (CTR) , 2-aminocromo (AMI), 3-aminocromo+ rutina (AMI + RUT) e 4-rutina (RUT).

Os animais foram anestesiados com Cetamina (100 mg/kg, intraperitonealmente, ip) e Xilazina (5mg/kg, ip), colocados em um aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA), e a cirurgia estereotáxica foi realizada de acordo com (De Araújo et al., 2022). As coordenadas estereotáxicas relativas ao bregma para o estriado direito utilizadas foram: sítio 1 (L: -2,5, AP: +0,5, V: +5,0), sítio 2 (L: -3,0, AP: -0,5, V: +6,0) e sítio 3 (L: -3,7, AP: -0,9, V: +6,5) do bregma, segundo o Atlas de Paxinos e Watson (1986).

Um total de 6 µL de solução de aminocromo ou salina foi injetada em três sítios no lado direito do corpo estriado com uma taxa de 2 µL/ min/ sítio, usando uma microseringa Hamilton. O grupo aminocromo (AMI) recebeu um total de 6 nmol de aminocromo em 6 µL conforme descrito por De Araújo e colaboradores (2022).

Após 14 dias da realização da cirurgia estereotáxica (no décimo quinto dia), alguns animais foram anestesiados com Cetamina (100 mg/kg i.p.) e Xilazina (5 mg/kg i.p.), e foram perfundidos transcárdialmente. Posteriormente, foi realizada a coleta para o processamento do encéfalo e imunomarcção da SNpc e VTA , De acordo com De Araújo e colaboradores (2022).

O modelo mimético de DP *in vivo* com aminocromo ainda está sendo padronizado quanto a linha temporal de indução de dano e sintomas que precedem a tríade clássica motora da doença. Assim, o tempo de tratamento para alguns animais foi de 21 dias, visando a continuidade para o teste do vermelho de carmim, uma semana a mais do que o tempo usado por De Araújo e colaboradores (2022).

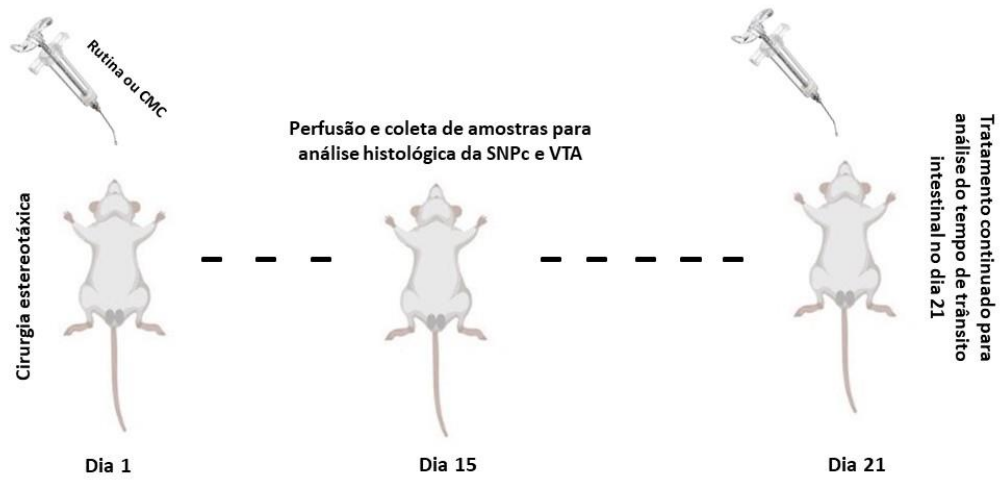


Figura 2: Linha do tempo do desenho experimental. No primeiro dia, todos os animais foram designados à cirurgia estereotáxica e gavados com rutina ou CMC de acordo com o grupo ao qual foram alocados. O tratamento se estendeu ao décimo quarto dia para alguns animais, que foram perfundidos no décimo quinto dia para análise histológica da SNpc e VTA. Outros animais foram destinados à 21 dias de tratamento para análise do tempo de trânsito intestinal com o vermelho de carmim.

5.3 Produção do aminocromo

O aminocromo foi preparado a partir da oxidação de dopamina com tirosinase (Sigma-Aldrich, Cat. nos. T3824-50KU and H8502-10G, respectivamente), com posterior purificação de acordo com Huenchuguala e colaboradores (2016).

5.4 Administração da rutina ou carboximetilcelulose (CMC)

A utilização da rutina foi de 10mg/kg/dia nos animais alocados a este grupo, diluída em carboximetilcelulose a 0,5% e administrada diariamente por gavagem. O grupo controle recebeu apenas CMC. A administração foi realizada do dia primeiro ao décimo quarto dia, para os animais designados a análise histológica perfundidos no décimo quinto dia após tratamento, e do primeiro ao vigésimo primeiro dia, para os animais alocados a análise do tempo de trânsito intestinal com o vermelho de carmim, em 21 dias de tratamento.

5.5 Avaliação do peso vivo do animal

Os animais alocados aos 21 dias de tratamento, foram pesados diariamente. Todos os animais foram submetidos a distribuição de água e ração *ad libitum*.

A média de ganho de peso dos animais foi realizada a partir da subtração do peso do dia da perfusão pelo peso do dia da estereotaxia.

5.6 Avaliação do tempo de trânsito intestinal

O tempo de trânsito intestinal foi determinado a partir da gavagem do corante vermelho de carmim. O período de tempo entre a gavagem do vermelho carmim e o aparecimento do primeiro pellet fecal vermelho (fezes avermelhada), é utilizado para a avaliação do tempo de trânsito intestinal dos animais. Em resumo, os ratos receberam oralmente uma solução de carboximetilcelulose a 0,5%, incluindo vermelho de carmim a 6%, sendo uma administração de 500 µL por animal. Após a administração da solução, os ratos foram deixados livres para alimentação e água *ad libitum* até que o primeiro grânulo fecal vermelho apareça. Adaptado de XU e colaboradores (2019).

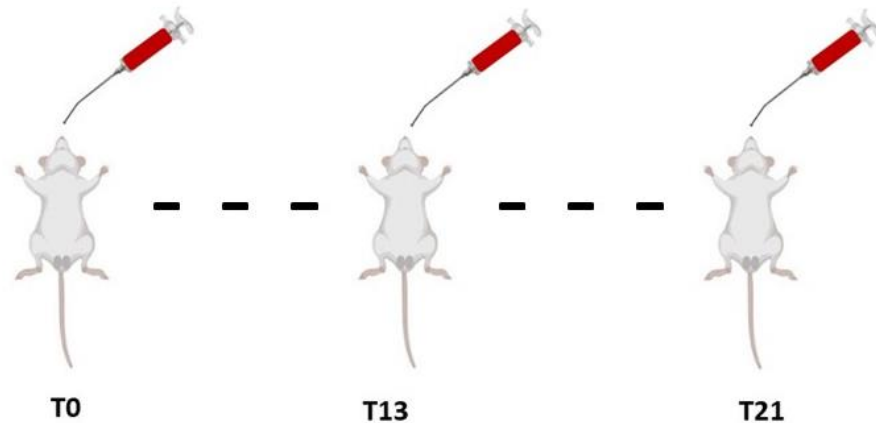


Figura 3: Linha do tempo do vermelho de carmim. O teste do vermelho de carmim foi realizado em três momentos distintos, sendo o primeiro para avaliar o tempo de trânsito intestinal de antes da cirurgia estereotáxica (linha de base) T0, treze dias após, (T13) e vinte e um dia após a cirurgia (T21), com intuito de avaliar alterações no tempo de trânsito intestinal em diferentes momentos após indução de dano com aminocromo e tratamento com rotina.

5.7 Preparação da amostra

Para análise histológica, os animais foram perfundidos com solução salina tamponada com fosfato (0,1M, pH 7,4) (PBS 0,1M) e os cérebros foram extraídos e fixados durante a noite a 4°C em paraformaldeído 4% em PBS 0,1M. A seguir, os cérebros foram lavados com PBS 0,1M, colocados em etanol 100% durante a noite e incluídos em parafina, de acordo com De Araújo et al (2022). O mesencéfalo foi dissecado de acordo com as coordenadas contidas no Atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson (2013).

As seções cortadas em micrótomo no plano coronal (5 μ m) abrangendo a SNpc e o VTA foram processadas por imunofluorescência para a detecção de células TH+ (positivas para tirosina hidroxilase). As áreas SNpc e VTA foram delimitadas de acordo com as coordenadas anatômicas do Atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson (2013).

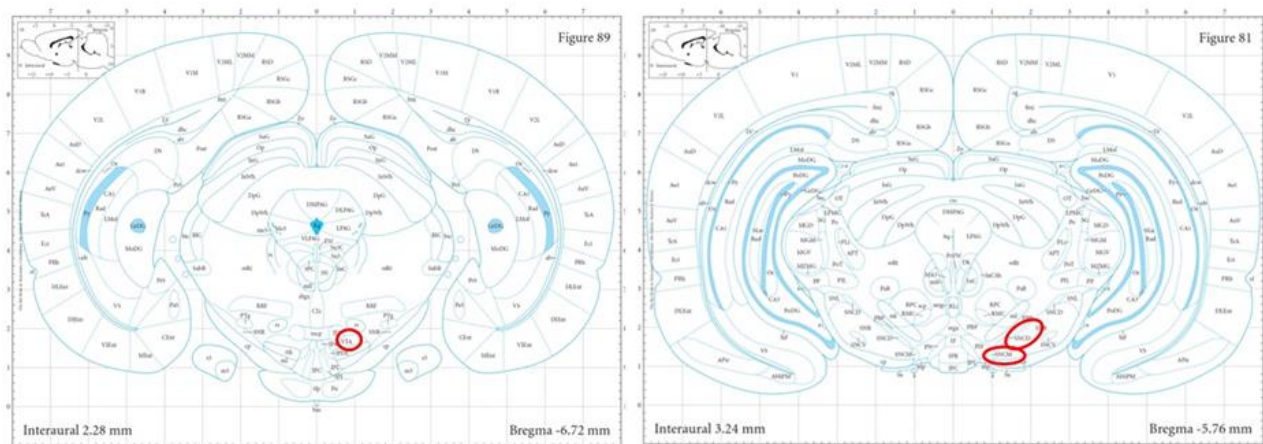


Figura 4: Anatomia do VTA e SNpc. As imagens compreendem, da esquerda para direita, respectivamente, a visão em corte coronal do VTA e SNpc de rato. Sendo criado um auxílio com círculo vermelho para apontar o VTA e a substância nigra compacta medial (SNCM) e substância nigra compacta dorsal (SNCD) que compreendem a SNpc. Modificado de Paxinos e Watson (2013).

5.8 Análise histológica da substância nigra pars compacta por imunofluorescência

5.8.1 Fluorescência de células TH-positivas (TH+)

A fluorescência relativa de células TH+ na região da SNpc e VTA foi determinada usando a objetiva de 5x, e os resultados foram expressos como o número de células TH+ fluorescentes. A fluorescência de neurônios TH+ imunorreativos foi apresentado como a porcentagem de células TH+ considerando a média do grupo controle negativo como 100%. A análise de fluorescência foi realizada no programa Image J (64-bit). A média de fluorescência para cada grupo foi designada a partir da relação do lado do dano (lado ipsilateral) pelo lado contrário ao dano (contralateral).

5.7 Análises estatísticas

Os dados gerados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software GraphPad Prism 5:00 e 6:00 (GraphPad, San Diego, EUA) para Windows, expressos como média e erro padrão da média ou mediana e percentil do histograma de frequência. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas com $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$. Os resultados obtidos com distribuição normal foram representados pela média (testes de normalidade D'Agostino ou teste de Shapiro-Wilk e Pearson ou teste de comparações múltiplas de Bonferroni) sendo escolhidos testes estatísticos paramétricos utilizados nas comparações entre os grupos tratado e controle. Para os resultados representados pela mediana (distribuição não normal) foram utilizados testes não-paramétricos.

6 RESULTADOS

6.1 Fluorescência de células TH-positivas (TH+)

Através da imunofluorescência para TH+ na área tegumentar ventral, foram observados os respectivos valores de fluorescência relativa: CTR: $0,695 \pm 0,15$, AMI: $0,67 \pm 0,2538$, RUT: $0,657 \pm 0,1261$ e AMI+RUT: $0,758 \pm 0,1546$. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos.

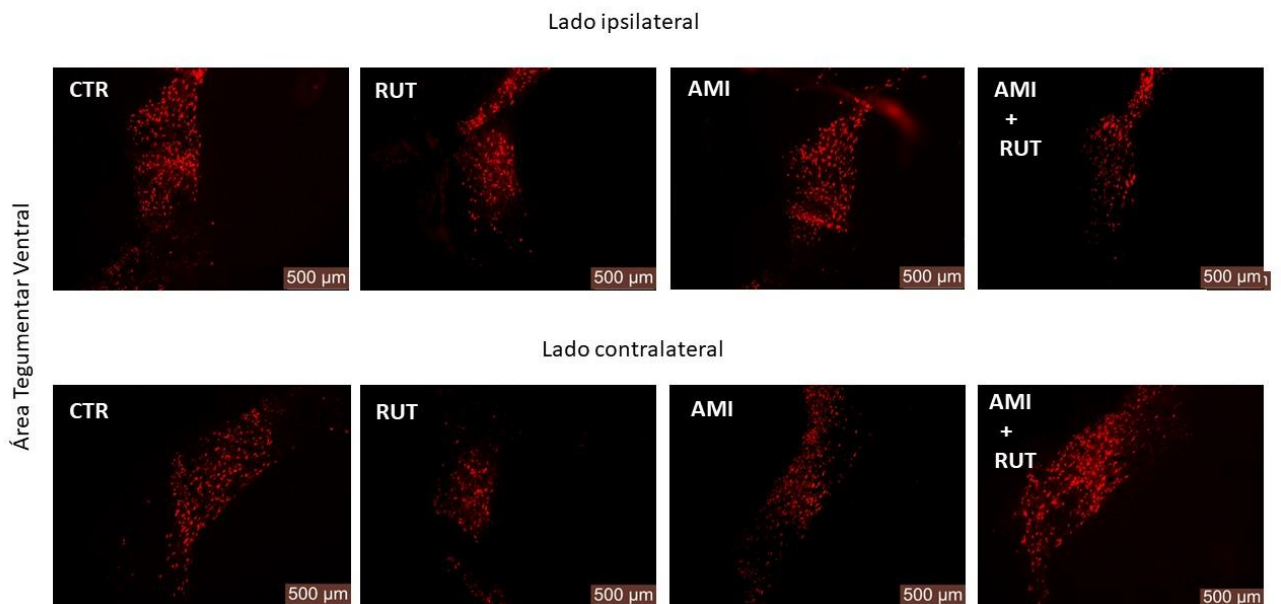


Figura 5: Fotomicrografia da fluorescência relativa na área tegumentar ventral. Análise da fluorescência relativa do lado do dano (lado ipsilateral) e do lado contrário ao dano (contralateral) no VTA. A partir da leitura de fluorescência relativa no programa Image J (64-bit), não foi encontrada diferença estatística da razão ipsilateral/contralateral entre os grupos.

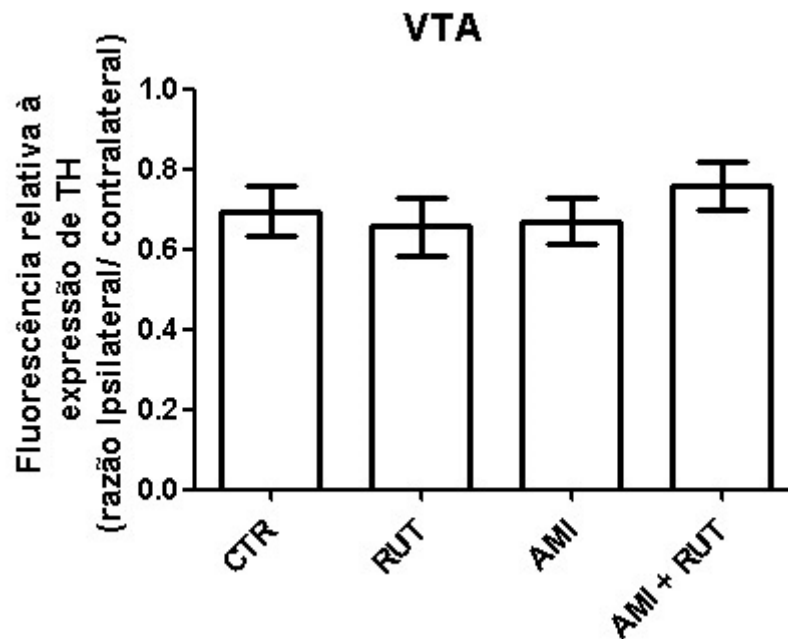


Figura 6. Intensidade de fluorescência de TH+ em VTA. O aminocromo não promoveu perda de fluorescência relativa na Área Tegmentar Ventral. Em comparação ao grupo CTR, os grupos RUT e AMI + RUT e AMI não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa, com os valores brutos de fluorescência relativa de 0,6947 para o grupo CTR, 0,6574 para o grupo RUT, 0,6708 para o grupo AMI e 0,7587 para o AMI + RUT. Os dados são representados por médias e desvio padrão de cada grupo e comparação entre grupos. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise paramétrica ANOVA one-way com a realização do pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Através da imunofluorescência para TH+ na substância nigra pars compacta observamos os respectivos valores de fluorescências relativas: CTR: $0,762 \pm 0,207$, AMI: $0,5114 \pm 0,1856$, RUT: $0,674 \pm 0,0062$ e AMI+RUT: $0,6708 \pm 0,2383$. Em comparação com o grupo controle, os animais alocados ao grupo aminocromo apresentaram um menor valor de fluorescência relativa quando comparado com os outros grupos, RUT e AMI + RUT.

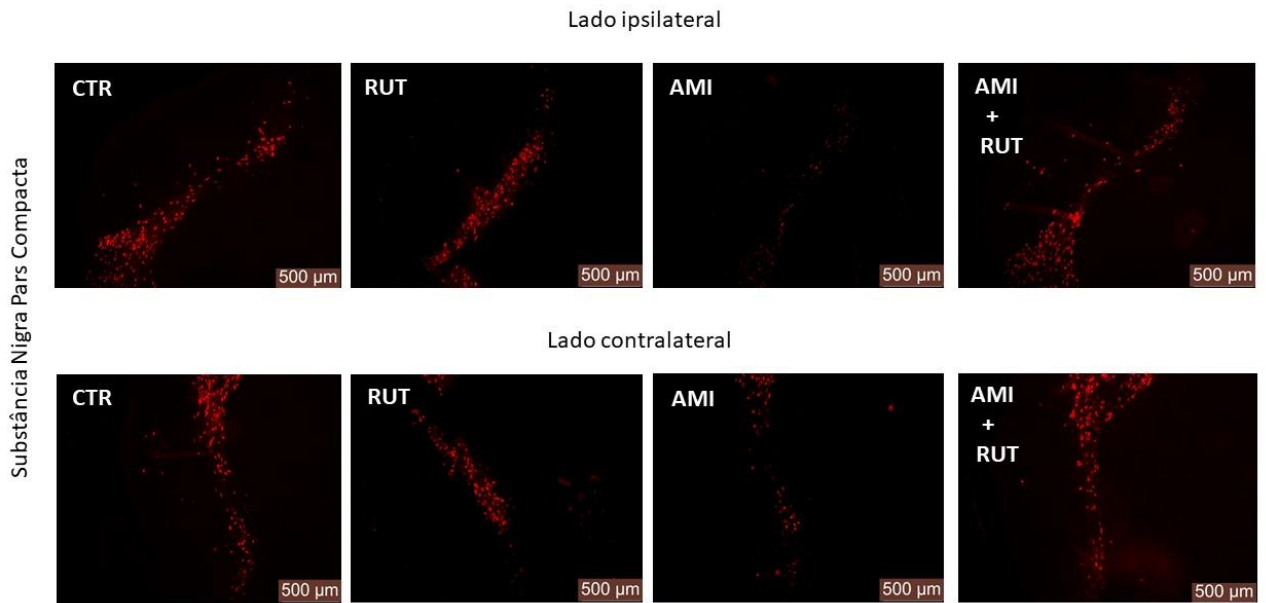


Figura 7: Fotomicrografia da fluorescência relativa na substância nigra pars compacta. Análise da fluorescência relativa do lado do dano (lado ipsilateral) e do lado contrário ao dano (contralateral) na SNPc. A partir da leitura de fluorescência relativa no programa Image J (64-bit), foi encontrada diferença estatística da razão ipsilateral/contralateral entre o grupo aminocromo e controle.

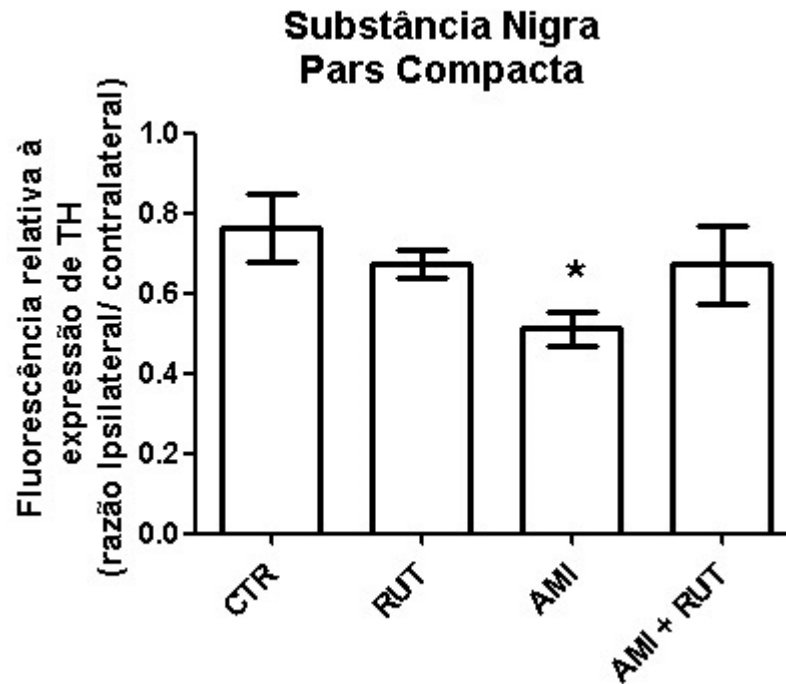


Figura 8. Intensidade de fluorescência de TH+ em SNpc. O aminocromo promove perda de fluorescência relativa na substância nigra pars compacta. Em comparação ao grupo CTR, o grupo AMI dentre os outros grupos (RUT e AMI + RUT) apresentou uma diferença estatisticamente significativa, com o valor bruto de fluorescência relativa de 0,5114, comparado ao controle com 0,7623 ($p < 0,05$). Os dados são representados por média e desvio padrão de cada grupo e comparação entre grupos. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise paramétrica ANOVA one-way com a realização do pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

6.2 Ganho ponderal

Como resultado da média de ganho de peso para cada grupo lista-se: CTR: $76,50 \pm 21,81$ gramas, AMI: $56,67 \pm 18,32$ gramas, RUT: $47 \pm 7,348$ gramas e AMI+RUT: $50,90 \pm 15,83$ gramas. Os animais alocados ao grupo rotina e aminocromo + rotina tiveram uma redução estatística de peso quando comparados ao grupo controle. Apresentando assim uma diferença estatisticamente significante para: RUT vs CTR: valor de $p < 0,01$. AMI + RUT vs CTR: $p < 0,01$.

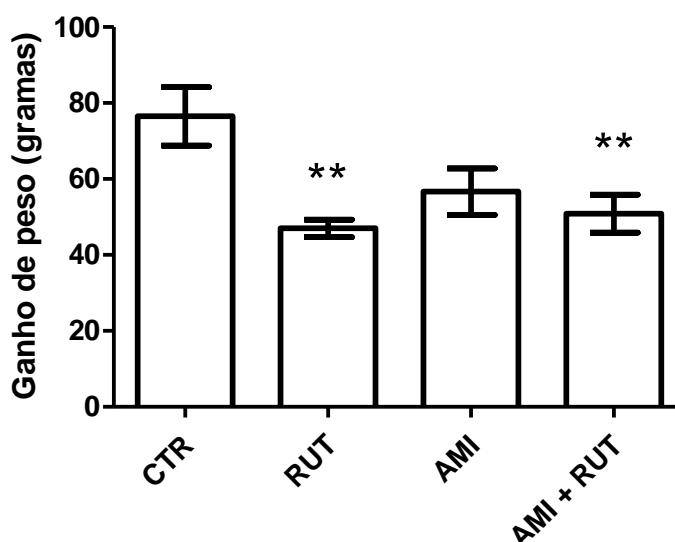


Figura 9. Avaliação de ganho ponderal. A rotina promove perda de peso. Em comparação ao grupo CTR, os grupos RUT e AMI + RUT demonstraram uma perda de peso estatisticamente significativa, com os valores brutos de - 29,5 ($p < 0,01$) e - 25,6 gramas ($p < 0,01$) respectivamente. Os dados são representados por média e desvio padrão de cada grupo e comparação entre grupos. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise paramétrica ANOVA one-way com a realização do pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

6.3 Tempo de trânsito intestinal

Os gráficos listam a diferença entre tempo de trânsito intestinal avaliado pelo teste com o vermelho de carmim feito antes da cirurgia estereotáxica (linha de base) (T0), e após a cirurgia para os diferentes grupos em tempos diferentes, sendo o décimo terceiro dia após cirurgia (T13) ou vigésimo primeiro dia após cirurgia (T21). Em resumo, no gráfico T13 uma diferença estatística foi observada comparando o grupo rotina ao grupo controle, assim denotando uma aceleração do tempo de trânsito intestinal pela administração do flavonoide. Contudo, nenhum resultado estatístico foi conseguido em T21.

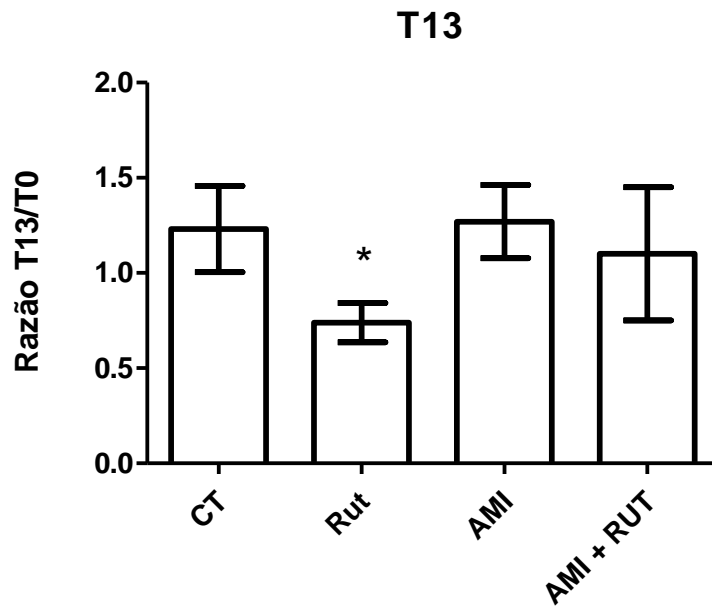


Figura 10. Avaliação do tempo de trânsito intestinal (razão T13/T0). A razão T13/T0 foi realizada para os animais dos 4 grupos, sendo designada a seguinte média para cada grupo: CTR: $1,23 \pm 0,22$, AMI: $1,270 \pm 0,1931$ RUT: $0,7393 \pm 0,1037$ e AMI+RUT: $1,101 \pm 0,3496$. Houve uma diferença estatística com um valor de $p < 0,05$ quando o grupo rotina foi comparado ao controle. Os dados são representados por média e desvio padrão de cada grupo e comparação entre grupos. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise paramétrica ANOVA one-way com a realização do pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

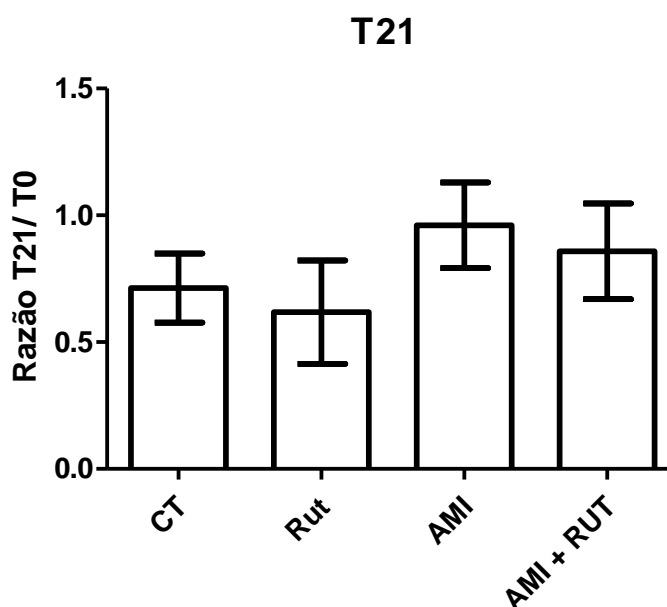


Figura 8. Avaliação do tempo de trânsito intestinal (razão T21/T0). A razão T21/T0 foi realizada para os animais dos 4 grupos, sendo designada a seguinte média para cada grupo: CTR: 0,7131 ± 0,1368, AMI: 0,9603 ± 0,1690 RUT: 0,6184 ± 0,2036 e AMI+RUT: 0,8586 ± 0,1889. Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos. Os dados são representados por médias e desvio padrão de cada grupo e comparação entre grupos. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise paramétrica ANOVA one-way com a realização do pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

7 DISCUSSÃO

7.1 Neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral são mais resistentes a morte celular

Corroborando com o resultado encontrado, outros estudos de revisão denotam que, embora os neurônios dopaminérgicos da SNpc e VTA possuam a liberação do mesmo neurotransmissor, eles apresentam diferente susceptibilidade à degeneração na DP ou modelos miméticos da doença (BRICHTA; GREENGARD, 2014; NI; ERNST, 2022).

Em tecido post-mortem mesencefálico de indivíduos com DP idiopática, comparados a aqueles que não apresentam a doença, existe uma degeneração em cerca de 80% dos neurônios produtores de dopamina da substância nigra pars compacta. No entanto, na região do VTA, esta média cai para cerca de 50% de degeneração em comparação à indivíduos não acometidos por DP (BRICHTA;

GREENGARD, 2014; NI; ERNST, 2022).

Alguns estudos mostram uma preservação de neurônios dopaminérgicos presentes no VTA em comparação à neurônios dopaminérgicos da SNpc quando submetidos a toxinas exógenas que mimetizam a DP ou frente a superexpressão de α -sinucleína (BRICHTA; GREENGARD, 2014; NI; ERNST, 2022). Por exemplo, o estudo de Mangay e colaboradores (2006), trouxe como resultado que a superexpressão de α -sinucleína A53T humana não afetou a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos na área tegumentar ventral, contudo, acarretou uma perda significativa de tais neurônios na substância nigra pars compacta.

A diferença na resistência a degeneração em neurônios do VTA em comparação aos da SPNc parece estar relacionada à expressão gênica pós insulto. Um estudo de Phani e colaboradores (2010) que mimetizou a DP usando a toxina MPTP em camundongos transgênicos que expressam GFP (green fluorescent protein) que marca especificamente neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo ventral, mostrou que o insulto causado por esta neurotoxina exógena aumentou especificamente no VTA a expressão de 148 genes como resposta precoce, e 113 genes como resposta tardia à toxicidade do MPTP. Dentre tais genes, em especial, um de regulação de proteínas (Phf6). A proteína Phf6 faz parte de uma grande família de proteínas dedo de zinco. Um domínio PHD dessa proteína representa uma parte importante de uma proteína E3 ligase, e, o aumento da expressão de tal proteína frente ao insulto em neurônios dopaminérgicos do VTA parece se relacionar com a menor degeneração destes neurônios nesta região quando comparados aos neurônios produtores de dopamina da SNpc, pois, mesmo após o insulto com MPTP, o aumento da expressão da Phf6 não é vista na SNpc. A atividade de ligase da Phf6 está relacionada à resposta a proteínas mal enoveladas (UPR), que direciona proteínas enoveladas incorretamente à degradação proteassomal, mitigando a morte celular.

7.2 Os neurônios dopaminérgicos da substância nigra pars compacta são mais vulneráveis ao dano com aminocromo que pode ser prevenido com rotina.

Os neurônios dopaminérgicos da SNpc estão intimamente envolvidos no controle do movimento, sendo que, a perda superior a 60 % desses neurônios promove indução dos sintomas motores da Doença de Parkinson (BRICHTA;

GREENGARD, 2014; Segura-Aguilar *et al.*, 2022). Estes neurônios sustentam uma alta demanda metabólica. A característica de linha de base com alta demanda de produção de ATP faz com que estas células sejam mais vulneráveis ao estresse oxidativo e insultos genéticos e moleculares que alteram a função do primeiro complexo da fosforilação oxidativa (JIANG *et al.*, 2021; NI; ERNST, 2022).

Outra característica que deixa os neurônios dopaminérgicos dessa região mais vulneráveis a morte celular é a menor expressão de vesículas que carregam a dopamina no citosol, o transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT-2), quando comparados a neurônios que produzem dopamina no VTA (SEGURA-AGUILAR *et al.*, 2022). A VMAT-2 é uma vesícula acídica que abarca a dopamina evitando sua oxidação citosólica à aminocromo, que induz alterações moleculares que podem levar a morte da célula, como formação de oligômeros neurotóxicos de alfa-sinucleína, disfunção na degradação de proteínas, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e disfunção mitocondrial (SEGURA-AGUILAR, 2017; HERRERA, 2016; SEGURA-AGUILAR., 2022).

Corroborando com o resultado encontrado em nosso estudo, o mesmo resultado foi obtido a partir do estudo de De Araújo e colaboradores (2022), onde, para mimetizar a Doença de Parkinson foram usados ratos Wistar machos infundidos com aminocromo por injeção estereotáxica no estriado direito. No grupo aminocromo, foi evidenciada perda neuronal dopaminérgica marcada pela redução de células TH+ nas fatias mesencefálicas de secções de corte de micrótomo no plano coronal abrangendo a SNpc.

Além disso, um outro estudo de Khan MM e colaboradores (2012) usando ratos Wistar machos para mimetizar DP com 6-OHDA, demonstrou que o pré-tratamento com rutina protegeu os neurônios da substância nigra pars compacta do efeito deletério da 6-OHDA, avaliado por imuno-histoquímica da SNpc.

7.3 A rutina promove modulação do peso dos animais

O menor ganho de peso observado em animais tratados com rutina converge com os resultados do estudo de Gao e colaboradores (2013), realizado com camundongos machos C57BL/6 onde a administração de rutina intraperitoneal duas vezes por semana à uma dosagem de 50 mg/kg solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO), promoveu supressão da dislipidemia e obesidade nestes camundongos

alimentados com dieta rica em gordura (HFD), onde, os animais administrados com rotina eram em média 9,8 gramas mais leves em comparação aos não tratados com rotina que estavam alocados em HFD. Além disso, o impacto da administração de rotina na obesidade não foi relacionado a ingestão alimentar, pois esta não foi alterada estatisticamente, e sim pela supressão de genes envolvidos na inflamação do tecido adiposo branco, como TNF- α e *Mcp1* que estão envolvidos na hipertrofia do tecido adiposo.

A perda de peso é comum em pessoas que têm Doença de Parkinson, podendo ser explicado pela redução da ingestão energética, inadequações nutricionais, aumento do gasto energético basal, e, também parece estar associada com o contexto do parkinsonismo e como ele é instalado nos indivíduos, bem como em associação ao declínio cognitivo (CUMMING et al 2017; KIM et al., 2022). Contudo, nossos resultados não demonstram perda de peso comparando o grupo aminocromo entre os demais.

Um estudo de Guimarães e outros (2013), com o objetivo de avaliar o perfil de peso e estado nutricional de Ratos machos Sprague-Dawley mimetizados para DP por 6-hidroxidopamina, mostrou que, 6 semanas após a injeção estereotáxica de 6-OHDA, em comparação com o grupo controle, não houve efeito no ganho de peso corporal e na ingestão alimentar.

Apesar de estudos em humanos denotarem perda de peso em indivíduos com DP, é importante avaliar o contexto social, nutricional e metabólico, sendo que a perda de peso pode ser passível de uma relação causa-efeito indireta, impelida também por outras patologias de base, acompanhamento nutricional inadequado e, falta de realização de exercícios físicos, sendo a falta desta associada com a perda de massa magra durante o envelhecimento, levando em conta que, a grande maioria dos indivíduos portadores de DP são idosos. Além de tais fatores, a institucionalização dos pacientes portadores de DP oferece um forte fator contributivo para o baixo peso destas pessoas (CUMMING et al 2017; KIM et al., 2022).

7.4 A rotina, mas não o aminocromo promove alteração no tempo de trânsito intestinal

Um dos sintomas que precedem a tríade clássica motora da Doença de Parkinson é a constipação intestinal. Sendo assim, a avaliação do desfecho intestinal

da DP se faz de grande valia, visando também um possível tratamento de condições que precedem os sintomas motores da doença (POIRIER *et al.*, 2016).

Convergendo com nossos resultados, um estudo de Tasseli e colaboradores (2013), com objetivo de avaliar o tempo de trânsito intestinal em modelo *in vivo* de DP, usou camundongos machos C57BL6 e rotenona para mimetizar a doença. Como resultado, mesmo havendo uma redução significativa nos neurônios imunorreativos à TH+ na SNPc, não houve resultado estatístico para a diferença de tempo de trânsito intestinal entre os animais rotenona e os controle.

Em nosso estudo, embora não tenha promovido uma diferença estatística quando comparado aos outros grupos, os animais aminocromo exibiram uma média de tempo de trânsito intestinal mais alta, reforçando assim a necessidade da realização de mais estudos para padronização do dano entérico, em vista de um acometimento de constipação intestinal.

Neste estudo, os animais que receberam rutina, tiveram um aumento da velocidade do trânsito intestinal comparado aos grupos que receberam placebo. No entanto, estudos trazem resultados contrastantes quanto à associação de compostos naturais derivados de planta e modulação do tempo de trânsito intestinal. O estudo de Dogra A e colaboradores (2020), com objetivo de avaliar o papel da rutina na modulação farmacocinética do diclofenaco utilizando ratas Wistar fêmeas, demonstrou como resultado que a rutina aumentou a eficácia e disponibilidade oral do fármaco, no entanto, não apresentou nenhum efeito na modulação do tempo de trânsito intestinal avaliado pelo teste *in vivo* da farinha de carvão.

No entanto, Kim JE e colaboradores (2018), mostram em seu estudo, que a quercetina (um metabólito da rutina) melhorou a constipação induzida por loperamida em ratos Sprague-Dawley, avaliando o tempo de trânsito intestinal pelo teste *in vivo* da farinha de carvão.

Dessa forma, novos estudos são necessários para avaliar a ação de compostos naturais derivados de plantas, e seus metabólitos no tempo de trânsito intestinal em modelo *in vivo*.

8 CONCLUSÃO

Como já bem estabelecido em outros estudos, nossos resultados reforçam que o aminocromo causa perda dos neurônios produtores de dopamina presentes na substância nigra pars compacta, e que o tratamento com a rutina preveniu esta perda. Contudo, isso não parece acontecer com os neurônios dopaminérgicos da área tegumentar ventral que são mais resistentes a morte celular. A rutina promoveu uma aceleração no tempo de trânsito intestinal em comparação ao grupo controle e causou uma modulação significativa no peso dos animais tratados, o que merece atenção, abrindo perspectiva para realização de novos estudos associados ao metabolismo do tempo de trânsito intestinal e modulação de peso nesta doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLAH, R. et al. Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. **Experimental Gerontology**, 2015.
- AL-BACHARI, S. et al. Blood–Brain Barrier Leakage Is Increased in Parkinson's Disease. **Frontiers in Physiology**, v. 11, n. December, p. 1–12, 2020.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Amburana cearensis – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, 2011.
- AMARETTI, A. et al. Hydrolysis of the rutinose-conjugates flavonoids rutin and hesperidin by the gut microbiota and bifidobacterial. **Nutrients**, 2015.
- ANDERSON, G.; NOORIAN, AR.; TAYLOR, G. Loss of enteric dopaminergic neurons and associated changes in colon motility in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, 2007.
- BLOEM, B.R.; OKUN, M.S, KLEIN, C. Parkinson's disease. **Lancet**, 2021.
- BOKKENHEUSER, V. D.; SHACKLETON, C. H.; WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal Bacteroides from humans. **Biochem J**, 1987.
- BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A. C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein**, Sao Paulo, v. 14, n. 3, p. 7–9, 2016.
- BRATIC, A; LARSSON, N. The role of mitochondria in aging. **Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 3, 2013.
- BRAUNE, A.; BLAUT, M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. **Gut Microbes**, 2016.
- BRICENO, A. et al. Aminochrome toxicity is mediated by inhibition of microtubules polymerization through the formation of adducts with tubulina. **Neurotox**, 2016.
- BRICHTA, L.; GREENGARD, P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. **Front Neuroanat**, 2014.
- CARDOSO, F. Tratamento da Doença de Parkinson. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, 1995.

CARRASCO, A.; TIMMERMANN.; PEDROSA, D. Management of constipation in patients with Parkinson's disease. **Npj Parkinson's Disease**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2018.

CAUDLE, W. et al. Industrial toxicants and Parkinson's disease. cearensis—uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, 2010.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H.; Non-motor symptoms of Parkinson's disease:dopaminergic pathophysiology and treatment. **Lancet Neurol**, 2009.

CHUNG, H. J.; ISLAM, M. S.; RAHMAN, M. M.; HONG, S. T. Neuroprotective function of Omi to α -synuclein-induced neurotoxicity. **Neurobiol Dis**, 2020.

CORTINES, J. FOLLMER, C. α -Synuclein as an intrinsically disordered monomer—fact or artefact?. **The FEBS journal**, 2013.

COSTA, C. A. et al. The Endoplasmic Reticulum Stress/Unfolded Protein Response and Their Contributions to Parkinson's Disease Physiopathology. **Cells**, 2020.

COSTA, I. et al. Supplementation with Herbal Extracts to Promote Behavioral and Neuroprotective Effects in Experimental Models of Parkinson's Disease: A Systematic Review. **Phytotherapy Research**, v.31, n.7, 2017.

COSTA, M.; SPENCER, N. J.; BROOKES, S. J. H. The role of enteric inhibitory neurons in intestinal motility. **Auton Neurosci**, 2021.

CUMMING, K.; MACLEOD, A. D.; MYINT, P. K. Early weight loss in parkinsonism predicts poor outcomes: Evidence from an incident cohort study. **Neurology**, 2017.

DATASUS. Departamento de Informática do SUS, Brasil. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>, 2015.

DAVIE, C. A review of Parkinson's disease. **British Medical Bulletin**, 2008.

DE ARAÚJO, F. M. et al. Aminochrome Induces Neuroinflammation and Dopaminergic Neuronal Loss: A New Preclinical Model to Find Anti-inflammatory and Neuroprotective Drugs for Parkinson's Disease. **Cell Mol Neurobiol**, 2022.

DE DEURWAERDÈRE, P.; DI GIOVANNI, G.; MILLAN, M. J. Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: A comprehensive review of its functional neurochemistry. **Prog Neurobiol**, 2016.

DEVI, L. et al. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 14, p. 9089–9100, 2008.

DOGRA, A. et al. Effect of rutin on pharmacokinetic modulation of diclofenac in rats. **Xenobiotica**, 2020.

DORSEY, E. R.; Sherer, T.; Okun, M. S.; BLOEM, B.R. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. **J Parkinsons Dis**, 2018.

FERNANDES, I.; FILHO, A. D. S. A. Estudo clínico-epidemiológico de pacientes com doença de Parkinson em Salvador-Bahia. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 22, n. 1, p. 45–59, 2018.

FERRAZ, H. B. Agonistas Dopaminérgicos no tratamento da Doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, 2004.

FERREIRA JÚNIOR, C. Bases biológicas para um possível efeito do canabidiol na doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v.42, n.2, 2020.

FERREIRA, S. A.; ROMERO-RAMOS, M. Microglia response during Parkinson's disease: Alpha-synuclein intervention. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 2018.

FOLLMER, C. Monoamine oxidase and α -synuclein as targets in Parkinson's disease therapy. **Expert Rev Neurother**, 2014.

FOLLMER, C.; NETTO, H. J. C. B. Fármacos multifuncionais: Monoaminaoxidase e α -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 306–313, 2013.

FRANCO, R.; REYES-RESINA, I.; NAVARRO, G. Dopamine in Health and Disease: Much More Than a Neurotransmitter. **Biomedicines**, 2021.

FUNG, C.; VANDEN, B. P. Functional circuits and signal processing in the enteric nervous system. **Cell. Mol. Life Sci**, 2020.

FURNESS, J. B. Types of neurons in the enteric nervous system. **J Auton Nerv Syst**, 2000.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharm J**, 2017.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. GIRÁLDEZ-PÉREZ, R. et al. Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica Communications**, 2014.

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. Rutin suppresses palmitic acids-triggered inflammation in macrophages and blocks high fat diet-induced obesity and fatty liver in mice. **Pharm Res**, 2013.

GÓMEZ-SUAGA, P. et al. ER-mitochondria signaling in Parkinson's disease review-article. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 3, 2018.

GUIMARÃES, J. et al. Assessment of Metabolic Status in a Striated Rat Model of Parkinson's Disease: before and after Deep Brain Stimulation. **J Obes Weight Loss**, 2014.

HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol methods**, 1989.

HAYES, M. Parkinson's Disease and Parkinsonism. **The American Journal of**

Medicine, v. 132, n.7, 2019.

HEMMATI-DINARVAND, M. Oxidative stress and Parkinson's disease: conflict of oxidant-antioxidant systems. **Neuroscience Letters**, 2019.

HERRERA, A. et al. Aminochrome induces dopaminergic neuronal dysfunction: a new animal model for Parkinson's disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 18, p. 3583–3597, 2016.

HOLMQVIST, S. et al. Direct evidence of Parkinson pathology spread from the gastrointestinal tract to the brain in rats. **Acta Neuropathol.** 2014.

HOU, X. et al. Autophagy in Parkinson's Disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 432, n. 8, p. 2651–2672, 2020.

HUENCHUGUALA, S. et al. DT-diaphorase protects astrocytes from aminochrome-induced toxicity. **NeuroToxicology**, 2016.

HUENCHUGUALA, S. et al. Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. **Autophagy**. Vol.10, 2014.

IDRIZAJ, E.; TRAINI, C.; VANNUCCHI, M. G.; BACCARI, M.C. Nitric Oxide: From Gastric Motility to Gastric Dysmotility. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V. M. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. **J. Biol.Chem**, 2005.

JAVED, H. et al. Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuroinflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. **Neuroscience**, 2012.

JIANG, S.; LIU, H.; LI C. Dietary Regulation of Oxidative Stress in Chronic Metabolic Diseases. **Foods**, 2021.

KALIA, L; LANG, A. Parkinson's disease. **Lancet**, 2015.

KALINDERI, K.; BOSTANTJOPOULOU, S.; FIDANI, L. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. **Acta Neurologica Scandinavica**, 2016.

KANNARKAT, G. T.; BOSS, J. M.; TANSEY, M. G. The role of innate and adaptive immunity in parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 3, n. 4, p. 493–514, 2013.

KHAN, M. M.; RAZA, S. S.; JAVED, H. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, 2012.

KIM, J. E. et al. Quercetin promotes gastrointestinal motility and mucin secretion in loperamide-induced constipation of SD rats through regulation of the mAChRs downstream signal. **Pharm Biol**, 2018.

KIM, R.; CHOI, S.; BYUN, K. Association of Early Weight Change With Cognitive Decline in Patients With Parkinson Disease. **Neurology**, 2022.

KLEIN, M. O. et al. Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.

KOZLOWSKA, A.; SZOSTAK-WEGIEREK, D. Flavonoids--food sources and health benefits. **Rocz Panstw Zakl Hig**, 2014.

KWON, S. et al. Targeting microglial and neuronal toll-like receptor 2 in synucleinopathies. **Experimental Neurobiology**, v. 28, n. 5, p. 547–553, 2019.

LAKE, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: Relevance for human risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 423– 453, 1999.

LEAL, L. K. et al. Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, 1997.

LEHTONEN, S. et al. Dysfunction of Cellular Proteostasis in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, 2019.

LOPES, A. A. **Avaliação da atividade antiinflamatória e antioxidante das cápsulas do extrato seco padronizado e da afrormosina, isoflavonóide, obtidos de *Amburana cearensis* A.C. Smith**. 2010. Dissertação - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

LYNCH-DAY, M. A. et al. The Role of Autophagy in Parkinson ' s Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 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. **Int J Mol Med**, 2013.

MAINGAY, M.; ROMERO-RAMOS, M.; CARTA, M.; KIRIK, D. Ventral tegmental area dopamine neurons are resistant to human mutant alpha-synuclein overexpression. **Neurobiol Dis**, 2006.

MALEKI, S; CRESPO, J; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, 2019.

MELENDÉZ, C. DT-Diaphorase Prevents Aminochrome-Induced Lysosome Dysfunction in SH-SY5Y Cells. **Neurotoxicity Research**, v.35, n1, 2019.

MELLOU, F.; LOUTRARI, H.; STAMATIS, H.; ROUSSOS, C.; KOLISIS, F. N. Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. **Process Biochem**, 2006.

MOUHAPE, C. et al. Nicotine-Induced Neuroprotection in Rotenone In Vivo and In Vitro Models of Parkinson's Disease: Evidences for the Involvement of the Labile Iron

- Pool Level as the Underlying Mechanism. **Neurotoxicity Research**, v.35, n.1, 2019.
- MUNOZ, P. et al. DT-diaphorase prevents aminochrome-induced alpha- synuclein oligomer formation and neurotoxicity. **Society Toxicology**, 2015.
- MUÑOZ, S; SEGURA-AGUILAR, J. Why We Cannot Translate Successful Results to New Therapies in Parkinson's Disease. **Clinical Pharmacology and Translational Medicine**, v. 1, n.1, 2017.
- NASCIUTTI, Luiz Eurico; NARCISO, Marcelo Sampaio; LIMA, Ana Valêsca Pinto de; BRITO, Gerly Anne de Castro; ORLÁ, Reinaldo Barreto; "Histologia do Tubo Digestório", p. 273 -314. In: **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016.
- NATALE, G. et al. The Baseline Structure of the Enteric Nervous System and Its Role in Parkinson's Disease. **Life (Basel)**, 2021.
- NI, A, ERNST, C. Evidence That Substantia Nigra Pars Compacta Dopaminergic Neurons Are Selectively Vulnerable to Oxidative Stress Because They Are Highly Metabolically Active. **Front Cell Neurosci**, 2022.
- NORRIS, E. H. et al. Reversible inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopaminochrome-mediated conformational alterations. **J Biol Chem**, 2005.
- O'DONOVAN, S. M. et al. Nigral overexpression of α -synuclein in a rat Parkinson's disease model indicates alterations in the enteric nervous system and the gut microbiome. **Neurogastroenterol Motil**, 2020.
- OMURA, T. et al. Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: The role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- PARIS, I. et al. Autophagy protects against aminochrome induced cell death in substantia nigra derived cell line. **Toxicological sciences**, 2011.
- PARK, J. S.; DAVIS, R. L.; SUE, C. M. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease: New Mechanistic Insights and Therapeutic Perspectives. **Curr Neurol Neurosci Rep**, 2018.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in stereotaxic coordinates**. Elsevier, 2013.
- PERFEITO, R.; REGO, A. C. papel da alfa sinucleína e da disfunção mitocondrial associada a DP. **Rev Neurocienc**, v. 20, n. 2, p. 273–284, 2012.
- PESSOA, C.; OLIVEIRA, R. A.; SILVEIRA, E. R.; CANUTO, K. M.; VIANA, G. S. B. Phagocytic characteristics of microglia in the substantia nigra of long-term Parkinsonian macaques. **J Neuroimmunol**, 2013.
- PHANI, S.; GONYE, G.; LACOVITTI, L. VTA neurons show a potentially protective transcriptional response to MPTP. **Brain Res**, 2010.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, 2017.

POIRIER, A. A. et al. Gastrointestinal Dysfunctions in Parkinson's Disease: Symptoms and Treatments. **Parkinsons Dis**, 2016.

PORTARIA SAS/MS nº 228 de 10 de maio de 2010 - **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas** - Doença de parkinson. p. 1–24, 2010.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v.29, n.13, 2014.

REIS BARBOSA, E. Tratamento Da Doença De Parkinson. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, v. 14, n. 11–12, p. 378–382, 1985.

RIVA, A. et al. Conversion of Rutin, a Prevalent Dietary Flavonol, by the Human Gut Microbiota. **Front Microbiol**, 2020.

RIZZUTO, R. et al. Calcium and apoptosis: Facts and hypotheses. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8619–8627, 2003.

ROSSO, A.; NICARETTA, D.; MATTOS, J. Correlações anatomoclínicas na doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Neurologia**, v. 44, n. 4, 2008.

SÁ, M. B. et al. Phytochemistry and Preliminary Assessment of the Antibacterial Activity of Chloroform Extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm. against *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Strains. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2014.

SALEHI, B. et al. The Therapeutic Potential of Apigenin. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, n.6, 2019.

SAMPSON, T. R. et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1469-1480, 2016.

SANDERS, K. M.; WARD, S. M. Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract. **Br J Pharmacol**, 2019.

SANTOS, C. C. The Flavonoid Agathisflavone from *Poincianella pyramidalis* Prevents Aminochrome Neurotoxicity. **Neurotoxicity Research**, v. 38, n. 3, p. 579-584, 2020.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, 2017.

SAUERBIER, A.; RAY, CHAUDHURI, K. Non-motor symptoms: the core of multi-morbid Parkinson's disease. **Br J Hosp Med (Lond)**, 2014.

SCHMID, J.; AMRHEIN, N. Molecular Organization of the Shikimate Pathway in

Higher Plants. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 737-749, 1995.

SEGURA-AGUILAR, J. Aminochrome as preclinical model for Parkinson's disease. **Oncotarget**, v. 8, n. 28, 2017.

SEGURA-AGUILAR, J. et al. Aminochrome as new preclinical model to find new pharmacological treatment that stop the development of Parkinson's disease. **Current Medicinal Chemistry**, 2016.

SEGURA-AGUILAR, J. et al. Neuroprotection against aminochrome neurotoxicity: Glutathione Transferase M2-2 and DT-Diaphorase. **Antioxidants**, 2022.

SEGURA-AGUILAR, J. On the neurotoxicity mechanism of leukoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. **Neurobiol Dis**, 2004.

SEGURA-AGUILAR, J.; HUENCHUGUALA, S. Aminochrome Induces Irreversible Mitochondrial Dysfunction by Inducing Autophagy Dysfunction in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, 2018.

SEGURA-AGUILAR, J.; KOSTRZEWA, M. R. Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: An update. **Neurotox Res**, 2015.

SHIN, C. et al. Plasma Short-Chain Fatty Acids in Patients With Parkinson's Disease. **Movement Disorders**, v. 35, n. 6, p. 1021–1027, 2020.

SHULMAN, L. et al. The clinically important difference on the unified Parkinson's disease rating scale. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 1, 2010.

SILVA, V. D. A.; COSTA, S. L. *Amburana cearensis* seed extract protects brain mitochondria from oxidative stress and cerebellar cells from excitotoxicity induced by glutamate. **Journal of Ethnopharmacology**, 2017.

SILVA, V.; SEGURA-AGUILAR, J. State and perspectives on flavonoid neuroprotection against aminochrome-induced neurotoxicity. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 9, p. 1797-1798, 2021.

SILVA, V.D.A.; Costa, S.L. *Amburana cearensis*: Pharmacological and Neuroprotective Effects of Its Compounds. **Molecules**, 2020.

SIMON, D, et al. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, 2019.

SUBRAMANIAM, S. R.; ELLIS, E. M. Neuroprotective effects of umbelliferone and esculetin in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Research**, v. 91, n. 3, p. 453–461, 2013.

TASSELLI, M. et al. Effects of oral administration of rotenone on gastrointestinal functions in mice. **Neurogastroenterol Motil**, 2013.

TENG, Y. et al. Complex of EGCG with Cu (II) Suppresses Amyloid Aggregation and Cu(II)-Induced Cytotoxicity of α -Synuclein. **Molecules**, 2019.

TIAN, X. et al. Distinctive effect on nerve growth factor-induced PC12 cell neurite outgrowth by two unique neolignan enantiomers from *Illicium merrillianum*. **Sci Rep**, 2015.

TRONCOSO-ESCUADERO, P.; PARRA, A.; NASSIF, M.; VIDAL, R. L. Outside in: Unraveling the Role of Neuroinflammation in the Progression of Parkinson's Disease. **Front Neurol**, 2018.

VANLE, B. C. et al. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by the dopamine metabolite, 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 492, n. 2, p. 275–281, 2017.

WRIGHT, R. Disfunção mitocondrial e doença de Parkinson. **Nat Neurosci**, 2022.

XU, L.; PU, J. Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease: From Pathogenetic Dysfunction to Potential Clinical Application. **Parkinson's Disease**, 2016.

XU, X. et al. Alteration of GLP-1/GPR43 expression and gastrointestinal motility in dysbiotic mice treated with vancomycin. **Sci Rep**, 2019.

ZENG, X. S. et al. Cellular and molecular basis of neurodegeneration in Parkinson disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 2018.

ZONDLER, L. et al. Proteasome impairment by α -synuclein. **Plos One**, v. 12, n. 9, p. 1–14, 2017.