



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



JÉSSICA TELES SOUZA

RUTINA PREVINE NEUROTOXICIDADE E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS EM MODELO ANIMAL DE DEGENERAÇÃO  
DOPAMINÉRGICA INDUZIDO POR AMINOCROMO

SALVADOR  
2025

**JÉSSICA TELES SOUZA**

**RUTINA PREVINE NEUROTOXICIDADE E ALTERAÇÕES  
COMPORTAMENTAIS EM MODELO ANIMAL DE DEGENERAÇÃO  
DOPAMINÉRGICA INDUZIDO POR AMINOCROMO**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – UFBA/SBBq, como requisito à obtenção do título de doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva  
Coorientadora em doutorado sanduíche: Profa. Dra.  
Maria Trinidad Herrero Ezquerro

**SALVADOR  
2025**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), pela Bibliotecária Maria Auxiliadora Neri Lima- CRB 5/516, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729 Souza, Jéssica Teles

Rutina previne neurotoxicidade e alterações comportamentais em modelo animal de degeneração dopaminérgica induzida por aminocromo / Jéssica Teles Souza. - Salvador, 2025.

94 f. : il.

Orientadora : Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva

Coorientadora : Profa Dra. María Trinidad Herrero Ezquerro

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde.

1. Neuroproteção. 2. Rutina. 3. Déficit comportamental. 4. Aminocromo.  
I. Silva, Victor Diogenes Amaral da Silva. II. Herrero Ezquerro, María  
Trinidad. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde.  
IV. Título.

CDU 577.164.3



## TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE TESE

**JÉSSICA TELES SOUZA**

**“Rutina previne neurotoxicidade e alteração comportamental em modelo de estudo de degeneração dopaminérgica induzido por aminocromo.”.**

17 de junho de 2025.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** VICTOR DIOGENES AMARAL DA SILVA  
Data: 18/06/2025 17:01:48-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** REJANE CONCEICAO SANTANA  
Data: 20/06/2025 19:42:48-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Profa. Dra. Rejane Conceição Santana - (UFBA) / (Membro Titular Interno)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** FLAVIA CARVALHO ALCANTARA GOMES  
Data: 30/06/2025 15:42:03-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Profa. Dra. Flavia Carvalho Alcantara Gomes - (UFRJ) / (Membro Titular Externo)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** GLAUCHE CRIVELARO DO NASCIMENTO MARANG  
Data: 09/07/2025 12:14:58-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Profa. Dra. Glauce Crivelaro do Nascimento - (USP) / (Membro Titular Externo)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** GABRIEL ARAUJO DA SILVA  
Data: 16/07/2025 12:49:41-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

Prof. Dr. Gabriel Araújo da Silva - (UEAP) / (Membro Titular Externo)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Professor Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva por sua orientação inestimável, paciência e dedicação durante todo o processo de pesquisa e elaboração desta tese. Agradeço especialmente pelo tempo e esforço dedicados a revisar e fornecer feedbacks construtivos, sempre com o intuito de aprimorar a qualidade deste estudo. Sua confiança em meu potencial e incentivo ao longo desta jornada foram de grande valia.

À minha família: meu pai Pinheiro, minha mãe Elza e aos meus irmãos Denise e Daniel, base na qual pude e posso me fortalecer a cada dia e que sempre incentivaram minha dedicação aos estudos. À minha pequena afilhada, Lorena, quem acrescentou significativamente sentido à minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LABNq) Flávia Sanches, Cleonice Creuza, Rafael Short, Érica Soares, Fernanda Vidal, e Deivison Argolo pelo ambiente colaborativo que criaram, apoio e aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, pela qualidade da capacitação ofertada.

À FAPESB e CAPES, pelo fomento a meu aperfeiçoamento científico e acadêmico.

Aos meus amigos, pelo apoio em todos os momentos acadêmicos e pessoais.

Ao meu parceiro Tanure Lima, por seu amor, paciência e encorajamento durante os momentos mais difíceis desta jornada.

Um agradecimento especial à Universidade Federal da Bahia e a Universidad de Murcia pelo suporte técnico e pelas facilidades oferecidas para a realização dos experimentos.

À Professora Dra. María Trinidad pela coorientação e acolhimento durante o doutorado sanduíche. Sua expertise e apoio foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios e prosseguir com o trabalho.

À Deus, pela força na qual pude e posso me sustentar a cada dia.

Finalmente, gostaria de expressar minha gratidão a todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta Tese. Sem o apoio e a colaboração de muitas pessoas e instituições, este trabalho não teria sido possível.

## RESUMO

O aminocromo é um composto produzido nos neurônios dopaminérgicos durante a formação da neuromelanina, com potencial em induzir estresse oxidativo, acúmulo de alfa-sinucleína e neuroinflamação, semelhante ao que ocorre na fisiopatologia da doença de Parkinson (DP). Mesmo avançando na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença, a DP permanece sem cura, pois o tratamento padrão ouro continua sendo a L-DOPA, uma droga incapaz de reduzir ou parar o processo neurodegenerativo. A rutina é um flavonoide com propriedades anti-inflamatória, antioxidante e neurogênica reconhecidas na literatura. Deste modo, este estudo tem como objetivo geral investigar o efeito comportamental e neuroprotetor da rutina em modelo *in vivo* de DP induzido por aminocromo. Para isso, ratos Wistar machos (270g–330g) (CEUA-ICS, Protocolo nº 3006070223) foram divididos em quatro grupos: controle (CTR), 10 mg/kg de rutina (RUT), 6 nmol de aminocromo (AMI) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) e submetidos à cirurgia estereotáxica para a injeção de aminocromo no corpo estriado. Os animais do grupo RUT e AMI + RUT foram tratados com doses orais diárias de rutina durante 21 dias. Todos os animais foram submetidos aos testes comportamentais no 14º dia. Amostras de mesencéfalo e estriado foram coletadas no 22º dia e fixadas com paraformaldeído a 4% para realização de imunohistoquímica para TH e SOX-10 e imunofluorescência para GFAP; S100B; IBA-1 e TH. O teste de campo aberto evidenciou uma redução na frequência total de rearing e grooming para os animais do grupo AMI em relação ao CTR; o teste do labirinto em cruz mostrou que os animais do grupo AMI transitaram menos pelo aparato e apresentaram menor frequência de entradas nos braços abertos, quando comparados aos animais do grupo CTR. A quantificação de células TH<sup>+</sup> por imunohistoquímica confirmou a redução da viabilidade celular induzida pelo aminocromo ao nível do terceiro par cranial da SNpc. Ademais, os animais do grupo AMI apresentaram aumento de células IBA1<sup>+</sup> e interações microglia-neurônio, quando comparado ao grupo CTR. A expressão colocalizada de GFAP<sup>+</sup> e S100b<sup>+</sup> também foi maior no grupo que recebeu aminocromo, quando comparado ao grupo CTR e AMI+RUT. A quantificação de células SOX10<sup>+</sup> não apresentou alteração significativa. Estes achados, em conjunto, demonstram que a injeção estriatal do aminocromo induz uma degeneração pronunciada na região medial da SNpc, acompanhada de reatividade glial, neuroinflamação e alterações comportamentais de caráter ansiogênico. Tais efeitos foram prevenidos pelo tratamento enteral com rutina. As consequências comportamentais de uma lesão unilateral do aminocromo no corpo estriado ainda não haviam sido bem descritas, portanto, este estudo contribui para a caracterização de um novo modelo de estudo da DP e para esclarecer o potencial terapêutico da rutina na doença.

**Palavras-chave:** Neuroproteção; rutina; aminocromo; déficit comportamental.

## ABSTRACT

Aminochrome is a compound produced in dopaminergic neurons during neuromelanin formation, with the potential to induce oxidative stress, alpha-synuclein accumulation, and neuroinflammation, resembling the pathophysiology of Parkinson's disease (PD). Despite advances in understanding the disease's pathophysiological mechanisms, PD remains incurable, as the gold-standard treatment, L-DOPA, is unable to halt or mitigate the neurodegenerative process. Rutin, a flavonoid with well-documented anti-inflammatory, antioxidant, and neurogenic properties, has been recognized in the literature. Thus, this study aims to investigate the behavioral and neuroprotective effects of rutin in an *in vivo* PD model induced by aminochrome. To this end, male Wistar rats (270–330 g) (CEUA-ICS, Protocol No. 3006070223) were divided into four groups: control (CTR), 10 mg/kg rutin (RUT), 6 nmol aminochrome (AMI), and aminochrome + rutin (AMI + RUT). The rats underwent stereotaxic surgery for aminochrome injection into the striatum. Animals in the RUT and AMI + RUT groups received daily oral doses of rutin for 21 days. All animals were subjected to behavioral tests on the 14th day. Midbrain and striatal samples were collected on the 22nd day and fixed with 4% paraformaldehyde for immunohistochemistry (TH and SOX-10) and immunofluorescence (GFAP, S100B, IBA-1, and TH). The open-field test revealed a reduction in the total frequency of rearing and grooming in the AMI group compared to the CTR group. The elevated plus-maze test showed that AMI group animals navigated the apparatus less and exhibited fewer entries into the open arms compared to the CTR group. Immunohistochemical quantification of TH<sup>+</sup> cells confirmed reduced cell viability induced by aminochrome at the level of the third cranial nerve pair in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Furthermore, the AMI group displayed an increase in IBA1<sup>+</sup> cells and microglia-neuron interactions compared to the CTR group. Colocalized expression of GFAP<sup>+</sup> and S100B<sup>+</sup> was also higher in the AMI group compared to the CTR and AMI + RUT groups. Quantification of SOX10<sup>+</sup> cells showed no significant changes. Collectively, these findings demonstrate that striatal aminochrome injection induces pronounced degeneration in the medial SNpc, accompanied by glial reactivity, neuroinflammation, and anxiogenic behavioral changes. These effects were prevented by enteral rutin treatment. The behavioral consequences of unilateral aminochrome lesions in the striatum had not been well described previously; thus, this study contributes to the characterization of a novel PD model and elucidates the therapeutic potential of rutin in the disease.

**Keywords:** Neuroprotection, rutin, aminochrome, behavioral changes.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuitos motores das vias diretas e indiretas dos núcleos da base em condição fisiológica e da doença de Parkinson (autoria própria - biorender).....	15
Figura 2. Processo de formação do aminocromo e leucoaminocromo-o-semiquinona que resulta na síntese de neuromelanina e neurodegeneração (autoria própria). .....	22
Figura 3. Estrutura química dos flavonoides (A) queracetina e (B) rutina (ChemSketch Freeware).....	26
Figura 4. Localização aproximada da injeção do aminocromo na região do estriado de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1986). .....	32
Figura 5. Representação esquemática em função do tempo pela qual os animais foram submetidos a experimentação com aminocromo e/ou rutina (Autoria própria). .....	33
Figura 6. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental dos ratos relacionado à ansiedade em teste do campo aberto.. .....	41
Figura 7. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à atividade locomotora em teste do campo aberto.. .....	42
Figura 8. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à distância percorrida em teste do campo aberto.. .....	43
Figura 9. Exposição ao aminocromo altera o padrão comportamental de ratos relacionado à atividade exploratória vertical e de autolimpeza em teste do campo aberto.. .....	44
Figura 10. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à emissão de excrementos em teste do campo aberto.. .....	45
Figura 11. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à assimetria locomotora em teste do cilindro.....	46
Figura 12. Exposição ao aminocromo e/ou rutina altera o padrão comportamental de ratos relacionado à ansiedade em teste do labirinto em cruz elevado.. .....	48

Figura 13. Padrão de expressão de células TH+ no mesencéfalo, com destaque para a SNpc, SNr e VTA.....	49
Figura 14. Imagens representativas do mesencéfalo utilizadas para demarcação das áreas analisadas (SNPc SNr e VTA), considerando o início da região da SN (rostral) e o final (caudal).....	50
Figura 15. O aminocromo induz degeneração de células dopaminérgicas na SNPc.....	51
Figura 16. O aminocromo induz degeneração de células dopaminérgicas na área medial da SNPc.....	53
Figura 17. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão de células TH+ na substância nigra reticulada de ratos com 21 dias de experimentação.....	54
Figura 18. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão de células TH+ na VTA de ratos com 21 dias de experimentação.....	55
Figura 19. Imagens imuno-histoquímicas de células TH+ delimitando a região rostral, médio e caudal da SNPc (Autoria própria).....	56
Figura 20. O aminocromo induz degeneração de células dopaminérgicas na região caudal da SNPc.....	57
Figura 21. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão da proteína SOX10+ na SNPc de ratos.....	58
Figura 22. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão da proteína SOX10+ no estriado de ratos.....	60
Figura 23. Exposição ao aminocromo e/ou rutina altera o padrão de expressão das proteínas GFAP+ e S100b+ na região da SNPc de ratos.....	62
Figura 24. Exposição ao aminocromo altera o padrão de expressão das proteínas TH+ e IBA1+ na região da SNPc de ratos.....	64
Figura 25. O aminocromo aumentou o número de interações entre células microgliais e neuronais.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA	6-Hidroxidopamina
AMI	aminocromo
AMI+RUT	aminocromo + rutina
BHE	Barreira hematoencefálica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CMC	Carboximetilcelulose
CTR	Grupo controle
DP	Doença de Parkinson
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FEBA	Frequência de entradas no braço aberto
FEBF	Frequência de entradas no braço fechado
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
GBD	Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IBA-1	Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
LabNq	Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular
L-DOPA	Levodopa (3,4-diidroxi L-fenilalanina)
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MDS	Movement Disorders Society
NQO1	DT-diaforase
NADPH + H <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NADH + H <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NRF2	Fator nuclear relacionado ao eritróide 2
PBS	Tampão Salino Fosfato
PBST	0,5 % Tween dissolvido em PBS
RUT	rutina
α-Syn	Alfa-sinucleína
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SNpc	Substância Negra Pars Compacta
SNr	Substância Negra Pars Reticulata
S100b	Proteína B de ligação ao cálcio S100
SHSY-5Y	Linhagem celular de neuroblastoma humano
SOX10	SRY-box transcription factor 10
STN	Núcleo subtalâmico
TBA	Tempo nos braços abertos
TBF	Tempo nos braços fechados

TH                    Tirosina hidroxilase  
UFBA               Universidade Federal da Bahia  
VTA                Área Tegmental Ventral

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	DOENÇA DE PARKINSON E PARKINSONISMO .....	12
2.2	ALTERAÇÕES DA FASE PRODRÔMICA DA DOENÇA DE PARKINSON E O DIAGNÓSTICO PRECOCE.....	17
2.3	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MODELOS ANIMAIS DE ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON .....	19
2.4	O AMINOCROMO COMO MODELO DE ESTUDO DO ESTÁGIO PRODRÔMICO DA DOENÇA DE PARKINSON .....	20
2.5	BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	23
2.6	EFEITOS BIOLÓGICOS E ANTIPARKINSONIANO DA RUTINA .....	25
3.	JUSTIFICATIVA .....	28
4.	OBJETIVOS .....	29
4.1	Geral .....	29
4.2	Específicos .....	29
5.	MATERIAL E MÉTODOS .....	30
5.1	Desenho experimental .....	30
5.2	Preparação da solução contendo o flavonoide rutina .....	31
5.3	Preparação do aminocromo.....	31
5.4	Cirurgia estereotáxica .....	31
5.5	Avaliação comportamental .....	33
5.5.1	<b>Campo aberto</b> .....	33
5.5.2	<b>Teste do cilindro</b> .....	34
5.5.3	<b>Labirinto em Cruz Elevado</b> .....	35
5.6	Processamento do material histológico.....	36
5.7	Imuno-histoquímica .....	36
5.8	Análise imuno-histoquímica das células SOX10 <sup>+</sup> .....	37
5.9	Análise imuno-histoquímica das células TH <sup>+</sup> .....	37
5.10	Imunofluorescência.....	38
5.11	Análise da imunofluorescência .....	39
5.12	Análise e quantificação dos contatos intercelular (TH <sup>+</sup> e IBA1 <sup>+</sup> ).....	39
5.13	Análises estatísticas.....	40
6.	RESULTADOS .....	41
6.1	Efeito dos tratamentos com rutina e/ ou aminocromo sobre o comportamento dos animais avaliados em teste do campo aberto. ....	41

6.1.1	Exploração dos quadrados centrais.....	41
6.1.2	Exploração dos quadrados periféricos .....	42
6.1.3	Comportamento exploratório e de mobilidade .....	42
6.1.4	Comportamento exploratório vertical e de autolimpeza.....	43
6.1.5	Padrão de emissão de excrementos .....	44
6.2	Efeito dos tratamentos com rutina e/ ou aminocromo sobre o comportamento dos animais avaliados em teste do cilindro.....	45
6.3	Efeito dos tratamentos com rutina e/ou aminocromo sobre o comportamento dos animais avaliados em teste do labirinto em cruz elevado.....	47
6.4	Delimitação da substância nigra a partir da expressão de células TH <sup>+</sup> .....	49
6.5	O aminocromo induz perda de células TH <sup>+</sup> na SNpc dos animais.....	51
6.6	O aminocromo induz perda de células TH <sup>+</sup> predominantemente na área medial da SNpc dos animais. ....	52
6.7	O aminocromo não induzi perda de células TH <sup>+</sup> na SNr dos animais. ....	53
6.8	O aminocromo não induziu perda de células TH <sup>+</sup> na VTA dos animais.....	54
6.9	O aminocromo induz perda de células TH <sup>+</sup> predominantemente na região caudal da SNpc	55
6.10	Aminocromo não altera a expressão de células SOX10 <sup>+</sup> na SNpc e estriado dos animais.	57
6.11	Aminocromo induz reatividade astrocitária na SNpc dos animais. ....	60
6.12	Aminocromo induz reatividade microglial na SNpc dos animais. ....	62
6.13	Aminocromo induz aumento do número de interações microglia-neurônio na SNpc dos animais.....	64
7.	DISCUSSÃO .....	67
8.	CONCLUSÃO .....	76
	<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>83</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os neurônios dopaminérgicos constituem um subgrupo de células do sistema nervoso central (SNC) que sintetizam dopamina e controlam os movimentos (CHEN; LI; HUANG; FAN *et al.*, 2024). A dopamina é um neurotransmissor que pode sofrer oxidação dentro das células neuronais com consequente produção de ortoquinonas neurotóxicas. Para estudos de degeneração dopaminérgica, o aminocromo é a ortoquinona mais importante do grupo, por possuir potencial para induzir alterações moleculares e celulares características da doença de Parkinson (DP). A ação citotóxica do aminocromo é consequência de sucessivas reações de oxirredução que culminam na geração do radical leucoaminocromo-*O*-semiquinona, uma espécie extremamente neurotóxica. O radical acumulado no interior da célula exerce sua ação neurodegenerativa por meio do estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e formação de protofibrilas neurotóxicas (ARRIAGADA; PARIS; SANCHEZ DE LAS MATAS; MARTINEZ-ALVARADO *et al.*, 2004; HUENCHUGUALA; SEGURA-AGUILAR, 2024; PARIS PIZARRO; MUÑOZ; HUENCHUGUALA; COUVE *et al.*, 2011; SEGURA-AGUILAR, 2017).

Embora constitua um precursor natural da neuromelanina — pigmento derivado da oxidação da dopamina na substância negra pars compacta (SNpc) — o acúmulo de aminocromo nos neurônios pode comprometer a transmissão dopaminérgica na via nigroestriatal desencadeando disfunção motora e cognitiva (DUBOIS; PILLON, 1996; KULISEVSKY, 2000; SCHNEIDER; POPE-COLEMAN, 1995). Por este motivo, o aminocromo tem sido sugerido como neurotoxina endógena com potencial neurodegenerativo para ajudar na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da DP, especialmente em seus estágios pré-clínicos.

Durante a fase inicial de uma doença neurodegenerativa — fase também referida como estágio prodrômico no âmbito clínico — os sinais e sintomas, quando presentes, apresentam-se de forma discreta, impossibilitando o fechamento de um diagnóstico preciso. Para a DP, esta fase usualmente inicia-se décadas antes do surgimento dos sintomas motores clássicos, enquanto que os sintomas não motores como a obstipação intestinal, alterações do sistema olfativo, comprometimento cognitivo e distúrbios do sono e do humor, já estão presentes (POSTUMA; AARSLAND; BARONE; BURN *et al.*, 2012; TOLOSA; GARRIDO; SCHOLZ; POEWE, 2021). Neste sentido, é cada vez mais urgente a caracterização de modelos experimentais que reproduzam de maneira fiel a progressão gradual e sistemática da DP, recriando com precisão as alterações iniciais que ocorrem na fase prodrômica. (ELSWORTH,

2020). Isto possibilitará novas chances em direção à descoberta de biomarcadores para o diagnóstico precoce da doença.

A DP é uma doença neurodegenerativa crônica do SNC. Ela é caracterizada pela perda gradativa e lenta de neurônios dopaminérgicos que resulta em sintomas parkinsonianos clássicos, como o tremor em repouso, rigidez e bradicinesia (GIRÁLDEZ-PÉREZ; ANTOLÍN-VALLESPÍN; MUÑOZ; SÁNCHEZ-CAPELO, 2014; KALIA; LANG, 2015). Classificada como a segunda enfermidade neurodegenerativa mais frequente nos países desenvolvidos, a incidência e prevalência da DP está associada principalmente a senilidade (DORSEY; ELBAZ; NICHOLS; ABBASI *et al.*, 2018). Como consequência do aumento da expectativa de vida, projeta-se que, até 2030, o número de indivíduos com DP acima dos 50 anos duplicará em escala global, quando comparado ao ano de 2005. (DORSEY; ELBAZ; NICHOLS; ABBASI *et al.*, 2018; PROCACCINI; SANTOPAOLO; FAICCHIA; COLAMATTEO *et al.*, 2016). A terapia atual da DP se baseia em medicamentos puramente anti-sintomáticos, com destaque para a levodopa (L-DOPA), que não tem capacidade de interromper o curso da doença e pode provocar efeitos adversos graves como consequência do uso prolongado (KIM; JEON; JENNER, 2017; SILVA; SEGURA-AGUILAR, 2021). Por esse motivo, a prospecção de compostos naturais com potencial neuroprotetor tem se destacado na comunidade científica.

Um importante grupo de compostos naturais são os flavonoides, que representam metabólitos secundários de plantas com potencial para a modulação de mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças, incluindo a mitigação das alterações celulares e moleculares presentes na DP e que são promovidas pelo aminocromo (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; CUENCA-BERMEJO *et al.*, 2023; SANTOS; MUÑOZ; ALMEIDA; DE LIMA DAVID *et al.*, 2020). A rutina, um flavonoide glicosilado presente em diversas plantas e produtos alimentícios, tem atraído atenção por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, sendo amplamente estudada em saúde humana. Estudos têm demonstrado que o flavonoide rutina apresenta potencial neuroprotetor para doenças do SNC (DA SILVA; COELHO; AMPARO; DE ALMEIDA CARNEIRO *et al.*, 2017; SILVA; SILVA; PINHEIRO; FREITAS *et al.*, 2007), em especial para doenças neurodegenerativas, atuando através de mecanismos anti-inflamatórios e protetores contra excitotoxicidade glutamatérgica (DA SILVA; COELHO; AMPARO; DE ALMEIDA CARNEIRO *et al.*, 2017; FERREIRA; TELES-SOUZA; DOS SANTOS SOUZA; PEREIRA *et al.*, 2021). Além disso, a neuroproteção frente a toxicidade induzida por aminocromo em cultura de células de neuroblastoma humano (SHSY-SY) e em modelo *in vivo* de estudo da DP também já foi demonstrada, sobretudo por meio da ação anti-inflamatória (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; CUENCA-BERMEJO *et al.*, 2023).

Apesar dos avanços, faltam estudos sobre os efeitos neuroprotetores *in vivo* da rutina, sobretudo em modelos de estudo prodrômico da DP, o que justifica investigações adicionais.

Diante do exposto, este estudo visa fomentar as evidências experimentais do potencial neurodegenerativo do aminocromo como modelo prodrômico e fisiológico da DP, além de avaliar a capacidade em induzir alterações comportamentais semelhantes às observadas no parkinsonismo. Em adição, o potencial da rutina na prevenção de alterações celulares induzidas após lesão estriatal com aminocromo também será discutida.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 DOENÇA DE PARKINSON E PARKINSONISMO**

A DP é um distúrbio progressivo crônico neurodegenerativo resultante da perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Este distúrbio foi relatado pela primeira vez pelo médico inglês James Parkinson em 1817 (HORNYKIEWICZ, 1966; PARKINSON, 2002) e, mesmo transcorridos dois séculos desde o reconhecimento clínico da “paralisia agitante”, seguimos sem um tratamento definitivo capaz de promover a cura da doença. Caracterizada como um grave e debilitante problema de saúde pública, a DP é reconhecida principalmente pelas suas disfunções motoras que envolve o tremor em repouso, bradicinesia, marcha alterada, instabilidade postural e rigidez — sinais que compõem um padrão de comprometimento denominado parkinsonismo — (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021). Além dos sintomas motores clássicos, a DP frequentemente está associada a uma variedade de sintomas não-motores, incluindo a ansiedade, depressão, redução cognitiva, demência e distúrbios autonômicos (como constipação, hipotensão e disfunção erétil), que podem ter um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes (GIRALDEZ-PÉREZ; ANTOLÍN-VALLESPÍN; MUÑOZ; SÁNCHEZ-CAPELO, 2014; KALIA; LANG, 2015; SILVA; DE OLIVEIRA; DIÓGENES; DE CASTRO AGUIAR *et al.*, 2023).

O parkinsonismo é uma condição patológica que resulta da disfunção do sistema dopaminérgico, podendo originar-se de processos neurodegenerativos ou de outras etiologias. No que concerne às causas não degenerativas, o parkinsonismo decorre de complicações cerebrovasculares (parkinsonismo vascular), medicamentosas (principalmente após uso de antipsicóticos), exposição às toxinas (por exemplo, manganês, monóxido de carbono) ou até mesmo como consequência de uma infecção viral (como a doença pós-encefalítica)

(ARMSTRONG; OKUN, 2020; TOLOSA; GARRIDO; SCHOLZ; POEWE, 2021). Embora todas estas condições sejam capazes de interferir na função dos neurônios dopaminérgicos, a neurodegeneração acompanhada de agregados dos corpos de Lewy na DP — principalmente de inclusões de proteína alfa-sinucleína ( $\alpha$ -Syn) — ainda é a principal causa do parkinsonismo (BRAAK; DEL TREDICI, 2017; ILJINA; GARCIA; HORROCKS; TOSATTO *et al.*, 2016; ROBERTS; BROWN, 2015).

Duas formas de DP são reconhecidas atualmente: a familiar e a esporádica. A forma esporádica corresponde à maioria dos casos, e sua causa ainda não está bem definida. No entanto, a associação de fatores genéticos e ambientais tem sido relatada como possíveis causadores da doença (PICCINI; BURN; CERAVOLO; MARAGANORE *et al.*, 1999; TANNER; KAMEL; ROSS; HOPPIN *et al.*, 2011). A forma familiar que acomete dez por cento dos pacientes, por sua vez, é causada por mutações genéticas sobretudo associadas ao gene da  $\alpha$ -Syn (YE; ROBAK; YU; CYKOWSKI *et al.*, 2023), uma proteína neuronal composta por aproximadamente 140 resíduos de aminoácidos que desempenha um papel importante no funcionamento sináptico normal das células nervosas (BURRÉ; SHARMA; SüDHOF, 2018; CASCELLA; BIGI; CREMADES; CECCHI, 2022). Em condições fisiológicas, a  $\alpha$ -Syn opera em sua forma original como um monômero solúvel e representa aproximadamente 1% do total de proteínas do SNC. No entanto, esta proteína pode dobrar-se de diferentes formas e apresentar-se em diferentes conformações, incluindo a forma oligomérica e fibrilar. Na DP, usualmente a  $\alpha$ -Syn sofre modificações pós-traducionais que favorece a sua agregação e a formação de fibrilas amiloides insolúveis e neurotóxicas. Espécies como estas são capazes de propagar-se como os príons, amplificando sua toxicidade entre os neurônios dopaminérgicos em todo o sistema nervoso central e periférico (KAYED; DETTMER; LESNÉ, 2020). Sugere-se inclusive que a causa principal dos primeiros sintomas não motores da DP tenha relação direta com a deposição localizada da  $\alpha$ -Syn na SNpc.

Somada às complicações induzidas pela agregação da  $\alpha$ -Syn, a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e a perda da homeostasia do cálcio também participam dos eventos de morte celular dopaminérgica associada a DP (SURMEIER, 2018). É importante ressaltar que existe uma susceptibilidade degenerativa para os neurônios dopaminérgicos que ocupam a camada ventrolateral do mesencéfalo, a SNpc, enquanto que a camada da área tegmental ventral (VTA) apresenta naturalmente mais resistência (TITOVA; PADMAKUMAR; LEWIS; CHAUDHURI, 2017). Convém ressaltar que, além dos neurônios dopaminérgicos, outras células do sistema nervoso central também são acometidas no curso da doença de Parkinson, sendo a disfunção das vias noradrenérgicas e serotoninérgicas eventos cruciais para o

surgimento de manifestações não motoras, tais como depressão e fadiga (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

A disfunção dos núcleos da base — um grupo interconectado de núcleos subcorticais junto ao tronco cerebral responsável por funções relacionadas à motivação, planejamento motor e aprendizagem processual — é a principal alteração patológica envolvida no parkinsonismo (GRAYBIEL; AOSAKI; FLAHERTY; KIMURA, 1994). O estriado, dentro dos núcleos basais subcorticais é um componente crítico dos sistemas motores. Esta região representa o principal núcleo de entrada dos gânglios, sendo composta, em cerca de 95%, por neurônios espinhosos médios GABAérgicos. Essas células recebem estímulos provenientes de fibras glutamatérgicas excitatórias aferentes originadas no córtex e no tálamo, além de uma densa inervação oriunda dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (BOLAM; HANLEY; BOOTH; BEVAN, 2000).

Há duas categorias diferentes de neurônios GABAérgicos baseadas na sua caracterização neuroquímica e nos seus alvos de projeção: neurônios GABAérgicos que expressam o gene para o receptor de dopamina D1 (DRD1) da via direta estriato-nigral e neurônios GABAérgicos que expressam DRD2 da via indireta. Os neurônios GABAérgicos de condução direta controlam os núcleos de saída dos núcleos da base, localizados no segmento interno do globo pálido (GPi) e na substância negra pars reticulata (SNr). A projeção dos neurônios GABAérgicos de via indireta ocorre no segmento externo do globo pálido (GPe) e no núcleo subtalâmico (STN). Os neurônios GABAérgicos da via direta e indireta têm efeitos contrários na regulação do movimento. Quando os receptores DRD1 são ativados pela dopamina, eles estimulam os neurônios GABAérgicos na via direta, o que reduz a ação inibitória dos núcleos de saída sobre o tálamo, induzindo e à estimulação do córtex motor e consequentemente o movimento. Por outro lado, na ativação da via indireta, o DRD2 inibe os neurônios GABAérgicos da via estriatonigral, levando à inibição dos neurônios talamocorticais e do córtex motor, o que promove à supressão do movimento (Figura 1).

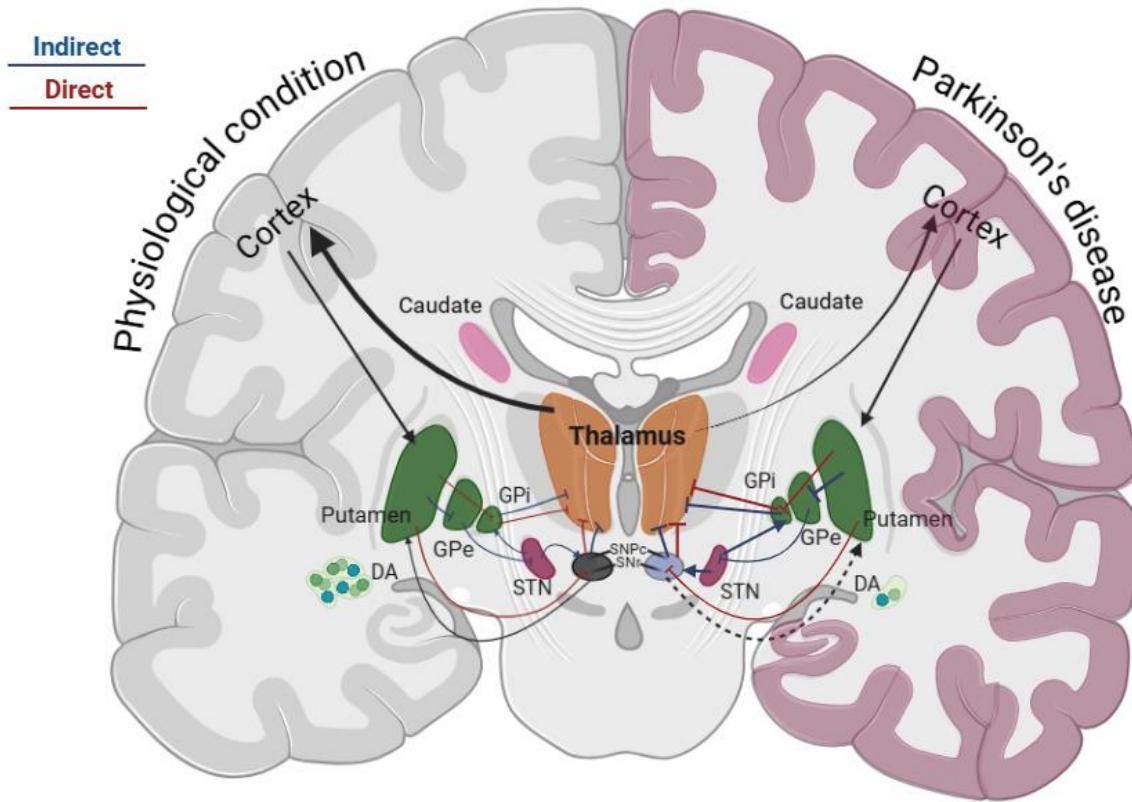


Figura 1. Circuitos motores das vias diretas e indiretas dos núcleos da base em condição fisiológica e da doença de Parkinson (autoria própria - biorender).

Uma vez que os núcleos da base regulam a iniciação e execução suave dos movimentos, em uma situação de perda dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, ocorre uma alteração na sinalização fisiológica entre SNpc e estriado (caudado e putâmen). A via direta torna-se menos ativa, reduz a desinibição do tálamo e, consequentemente a ativação do córtex motor, resultando em bradicinesia. A via indireta torna-se hiperativa, aumentando a inibição do tálamo, levando à dificuldade em iniciar e executar movimentos suaves. Dessa maneira, o comprometimento das sinapses e/ou degeneração axonal da via nigroestriatal contribui para as perturbações motoras antes mesmo da perda neuronal significativa (O'KEEFFE; SULLIVAN, 2018).

Do ponto de vista epidemiológico, a DP é considerada a segunda desordem neurológica mais prevalente do SNC, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer (DA). Estima-se que a doença afete aproximadamente 1% a 2% da população acima de 60 anos (COUTO; BESAGIO; DE ANDRADE; CARDOSO *et al.*, 2023; DE LAU; BRETELER, 2006; HIRSCH; JETTE; FROLKIS; STEEVES *et al.*, 2016; LLIBRE-GUERRA; PRINA; SOSA; ACOSTA *et al.*, 2022; PRINGSHEIM; JETTE; FROLKIS; STEEVES, 2014; WILLIS; ROBERTS; BECK; FISKE *et al.*, 2022); com uma incidência calculada de 160 casos por 100.000 indivíduos e uma prevalência de 100 a 200 por 100.000 habitantes (COUTO; BESAGIO; DE ANDRADE;

CARDOSO *et al.*, 2023; TWELVES; PERKINS; COUNSELL, 2003; TYSNES; STORSTEIN; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Segundo o Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study (GBD), o número de pessoas com DP havia mais que dobrado globalmente de 1990 a 2015 (DORSEY; ELBAZ; NICHOLS; ABBASI *et al.*, 2018; OU; PAN; TANG; DUAN *et al.*, 2021) e conforme a idade avança, presume-se que haverá cerca do dobro de pacientes em 2030 comparado a 2005 (DORSEY; ELBAZ; NICHOLS; ABBASI *et al.*, 2018; PROCACCINI; SANTOPAOLO; FAICCHIA; COLAMATTEO *et al.*, 2016).

A notificação da DP e do parkinsonismo no Brasil não é compulsória e os dados variam consideravelmente entre os relatórios de pesquisa, o que pode ter relação com a dificuldade em fechar um diagnóstico baseado nos critérios clínicos atuais (PEREIRA; SOARES; BRUSCATO; MORIGUCHI *et al.*, 2021; TYSNES; STORSTEIN; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Embora o país careça de estudos sobre a epidemiologia da DP, números não oficiais referentes à prevalência indicam pelo menos 220 mil pacientes acometidos com a doença no Brasil (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016). No entanto, um levantamento epidemiológico realizado com idosos de 64 anos somente em Minas Gerais, citou números ainda mais alarmantes. Cerca de 3,3% da população foi diagnosticada com DP, o que corresponde a mais que 600.000 parkinsonianos no Brasil (BARBOSA; CARAMELLI; MAIA; CUNNINGHAM *et al.*, 2006). O maior número de hospitalizações por DP no Brasil entre 2016 e 2020 foi de pacientes de 60 a 79 anos e a região do Sul do Brasil apresentou a maior taxa de mortalidade. Em adição, constatou-se que existiu uma diferença de risco entre os gêneros, sendo os homens mais acometidos e hospitalizados pela doença (SANTOS; DE QUEIROZ NUNES; MOREIRA; VERGUTZ *et al.*, 2022; VASCONCELLOS; RIZZOTTO; TAGLIETTI, 2023). A prevalência das demais síndromes parkinsonianas foi relatada em um estudo realizado no sudoeste do país e a prevalência bruta em indivíduos acima de 75 anos foi de 10,7% (VALE; BARBOSA; RESENDE; MAIA *et al.*, 2018).

O risco de desenvolvimento de DP parece estar associado a vários fatores, incluindo o histórico familiar da doença, a traumas repetitivos na cabeça e a exposição a produtos químicos e poluentes industriais, principalmente aos pesticidas. No entanto, a senilidade ainda é considerada o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de DP com alta prevalência na faixa etária dos 85 anos (COLEMAN; MARTIN, 2022; COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011; DRIVER; LOGROSCINO; GAZIANO; KURTH, 2009). Embora a doença clínica seja heterogênea e com diagnóstico inclusive em faixas etárias mais precoces, sabe-se que existe uma diminuição acentuada das funções fisiológicas inerentes ao envelhecimento e que, consequentemente, a incidência da doença aumenta de forma

exponencial na população idosa (COLEMAN; MARTIN, 2022; DRIVER; LOGROSCINO; GAZIANO; KURTH, 2009). Vale destacar que os eventos moleculares que conduzem para a morte celular no envelhecimento são diversos e comuns aos mecanismos envolvidos na morte neuronal da DP como: a disfunção mitocondrial, produção de radicais livres e estresse oxidativo, o que por sua vez, estão associados à instabilidade do genoma, a alterações no DNA e à redução da sobrevida (COLEMAN; MARTIN, 2022; COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011).

A DP constitui-se de uma enfermidade desafiadora para os cientistas, órgãos governamentais e sociedade. Não há cura, não há ferramentas que assegure o diagnóstico precoce e muito menos tratamento que retarde o curso da doença. Uma vez que a senilidade é um dos principais fatores de risco associado a patologia, a modelagem da doença e o desenvolvimento de terapias se torna ainda mais difícil. Os avanços na delimitação da biologia do envelhecimento e das alterações prodrômicas da doença oferecerão uma grande oportunidade para obter novos insights sobre a etiologia da DP e tratamento, devendo receber especial atenção (GUO; HUANG; DOU; YAN *et al.*, 2022; SPOTTKE; REUTER; MACHAT; BORNSCHEIN *et al.*, 2005).

## **2.2 ALTERAÇÕES DA FASE PRODRÔMICA DA DOENÇA DE PARKINSON E O DIAGNÓSTICO PRECOCE**

Atualmente, o método de diagnóstico mais confiável da DP é o exame patológico pós-morten dos cérebros positivos para inclusões de  $\alpha$ -Syn em células dopaminérgicas da SNpc (REES; ACHARYA; SCHRAG; NOYCE, 2018). O diagnóstico clínico, por outro lado, é baseado em um protocolo criterioso que considera o histórico médico do paciente e exame neurológico para avaliar possíveis sintomas clínicos (ARMSTRONG; OKUN, 2020; HUGHES; DANIEL; KILFORD; LEES, 1992). Isso revela a carência de métodos de diagnósticos eficazes para a DP, sobretudo para os casos esporádicos.

Braak e colaboradores foram os pioneiros na descrição detalhada do conceito de estadiamento da DP, fundamentado em um padrão de disseminação da  $\alpha$ -Syn específico. De acordo com essa teoria, um patógeno desconhecido (vírus ou bactéria) presente no intestino seria o responsável pelo início da DP esporádica (BRAAK; DEL TREDICI, 2017; BRAAK; DEL TREDICI; BRATZKE; HAMM-CLEMENT *et al.*, 2002; BRAAK; RÜB; GAI; DEL TREDICI, 2003). Mais tarde, uma hipótese dual-hit fomentou a pressuposição de Braak de uma

maneira mais abrangente, descrevendo que a doença começaria a partir da invasão de um patógeno neurotrópico por duas vias distintas e simultaneamente: uma nasal, com progressão anterógrada para o lobo temporal, e uma gástrica, com disseminação retrógrada para o núcleo motor dorsal (HAWKES; DEL TREDICI; BRAAK, 2009). Assim, a DP se espalharia concomitantemente através do trato olfativo e do nervo vago, respectivamente, em direção ao SNC. Recentemente, essa hipótese foi revisada por Borghammer e colaboradores em 2022 e um conjunto de novos dados sugeriram que a patologia de Lewy, associada ao surgimento da DP, comumente surge no sistema nervoso entérico sem necessariamente envolver o bulbo olfatório e vice-versa, ou seja, raramente no bulbo olfatório e no intestino simultaneamente (BORGHAMMER; JUST; HORSAGER; SKJÆRBÆK *et al.*, 2022). Apesar desse avanço, é amplamente reconhecido que existe um estágio prodromático da DP, proposto por Braak, caracterizado pelo predomínio de sintomas não motores, que precede o surgimento dos sintomas motores em pacientes por diversos anos.

A avaliação clínica de um paciente com suspeita de DP leva em consideração dois níveis de estadiamento para o diagnóstico: a DP clinicamente estabelecida e a DP prodromática ou “clinicamente provável”. Neste último, os sintomas não motores são analisados cautelosamente. No estágio prodromático se apresentam algumas manifestações clínicas sutis que não são suficientes para atender aos critérios de diagnósticos da doença e este estágio pode começar décadas antes do primeiro sintoma motor típico da DP (CERRI; BLANDINI, 2020).

Mesmo seguindo os critérios da International Parkinson and Movement Disorders Society (MDS), o diagnóstico da DP é difícil e por vezes equivocado (FOX; KATZENSCHLAGER; LIM; BARTON *et al.*, 2018). O quadro clínico da DP prodromática avaliado no momento do diagnóstico inclui uma série de características não motoras, como a disfunção olfativa, constipação, distúrbio comportamental do sono REM, disfunção urinária e lentidão motora sutil (BERG; POSTUMA; ADLER; BLOEM *et al.*, 2015; CHASTAN; BAIR; RESNICK; STUDENSKI *et al.*, 2019; POSTUMA; AARSLAND; BARONE; BURN *et al.*, 2012). Outras características adicionais incluem os transtornos do humor, como a depressão e a ansiedade (FANG; XU; PARK; HUANG *et al.*, 2010; POSTUMA; AARSLAND; BARONE; BURN *et al.*, 2012). Ademais, o MDS incluiu também o déficit cognitivo, inatividade física e baixos níveis de urato plasmático (em homens) entre os critérios atuais de diagnóstico precoce da DP (HEINZEL; BERG; GASSER; CHEN *et al.*, 2019).

Convém lembrar que existem pacientes que buscam atendimento médico em um estágio tão precoce da DP, que não se pode ser diagnosticado seguindo os critérios atuais, enquanto há outros que buscam em um estágio tão avançado que o problema já é demasiado grave. Desde

então, um número crescente de estudos tem destacado a importância de estudar os estágios iniciais da DP e caracterizar alterações além dos sintomas motores que auxiliem no desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico (JOHNSON; STECHER; LABRIE; BRUNDIN *et al.*, 2019; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017; TITOVA; CHAUDHURI, 2017).

Quando assertivo, o diagnóstico baseado na sintomatologia geralmente é tardio e acompanhado da perda de 30 a 50% de neurônios dopaminérgicos e da redução de 50 a 70% da dopamina estriatal (CRAMB; BECCANO-KELLY; CRAGG; WADE-MARTINS, 2023). Nas doenças neurodegenerativas, os mecanismos patológicos são ativados muitos anos antes do aparecimento dos sinais e sintomas típicos da doença, o que justifica a perda significativa das células antes do diagnóstico (CERRI; BLANDINI, 2020). Destarte, a busca por ferramentas de diagnóstico precoce e seguro da DP, com o objetivo de desacelerar o processo neurodegenerativo antes que a perda neuronal seja crítica, é contínua.

### **2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE MODELOS ANIMAIS DE ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Os modelos animais de estudo da DP podem ser reunidos em três grandes categorias: modelos tóxicos-farmacológicos (baseados na utilização de agentes neurotóxicos), modelos genéticos (a partir da superexpressão ou nocaute de proteínas envolvidas na DP familiar, sobretudo de proteínas como a  $\alpha$ -Syn) e modelos semelhantes a príons (baseados na inoculação de  $\alpha$ -Syn patogênica) (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; JELLINGER, 2019). Para que um desses modelos seja considerado verdadeiramente representativo, ele deve ser capaz de reproduzir de forma abrangente os mecanismos patogênicos da DP, além da mera modelagem dos sintomas motores. Isso inclui a replicação dos sinais prodrômicos que se manifestam décadas antes do aparecimento das alterações motoras, bem como a capacidade de prever e embasar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras. (BUHIDMA; RUKAVINA; CHAUDHURI; DUTY, 2020; CARTA; BOI; PISANU; PALMAS *et al.*, 2020).

No que concerne aos modelos tóxicos-farmacológicos, os principais agentes utilizados para modelagem da DP inclui o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), a rotenona e a 6-OHDA (6- hidróxidopamina), neurotoxinas reconhecidas por replicarem eficientemente os sintomas motores da doença e permitirem a investigação de potenciais terapias (CHIA; TAN; CHAO, 2020). No entanto, é necessário destacar que tais modelos apresentam algumas

importantes limitações: a indução de toxicidade aguda para neurônios dopaminérgicos que induz a perda rápida e maciça das células e a incapacidade de replicar a evolução gradual e lenta da doença. A 6OHDA, mais especificamente, por não ser uma neurotoxina seletiva para neurônios dopaminérgicos, pode provocar neurotoxicidade indiscriminada durante uma investigação experimental, afetando também neurônios noradrenérgicos (KOSTRZEWA; JACOBOWITZ, 1974; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Por falar em neurotoxicidade aguda, o MPTP é capaz de gerar parkinsonismo em humanos em apenas 3 dias de exposição, — fato relatado após uso ilegal de drogas contaminadas com a toxina por dependentes químicos (WILLIAMS, 1984). A rotenona por sua vez, embora seja capaz de desenvolver algumas características marcantes da DP, incluindo o acúmulo de  $\alpha$ -Syn, também é reconhecida por induzir toxicidade aguda e provocar a degeneração dopaminérgica em poucos dias (GASH; RUTLAND; HUDSON; SULLIVAN *et al.*, 2008).

A rapidez com a qual estas toxinas provocam a morte dos neurônios dopaminérgicos e induz o parkinsonismo, levanta questionamentos sobre a real capacidade desses modelos de refletirem com resultados a fisiopatologia da DP, já que em humanos o desenvolvimento dos primeiros sintomas motores é resultado de um processo de progressão que se estende por anos. Por esta razão, neurotoxinas exógenas não são empregadas para desenvolver modelos representativos do estágio prodromático da DP. Além disso, a maioria destas neurotoxinas não induzem a formação de inclusões semelhantes aos corpos de Lewy nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes, característica importante da DP (BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

#### **2.4 O AMINOCROMO COMO MODELO DE ESTUDO DO ESTÁGIO PRODRÔMICO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Os atuais modelos pré-clínicos de estudo da DP baseado em agentes neurotóxicos são exógenos e causam uma degeneração maciça e rápida dos neurônios dopaminérgicos. Para replicar o processo degenerativo observado em humanos é necessário que o modelo de estudo induza uma morte celular lenta, de maneira seletiva e desencadeie os principais processos degenerativos observados na patologia (SEGURA-AGUILAR; MANNERVIK, 2023).

O aminocromo é atualmente sugerido como o agente neurotóxico mais fisiológico para investigação da DP e tem sido frequentemente empregado para estudos *in vivo* e *in vitro* (FAYSAL; DEHBIA; ZEHRAVI; SWEILAM *et al.*, 2024). Ademais de ser uma neurotoxina

endógena — subproduto metabólico da oxidação da dopamina naturalmente produzido e que pode se acumular com o avançar da idade — o aminocromo tem sido sugerido como molécula promotora de eventos neurotóxicos chaves na patogênese da DP, como o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, disfunção dos sistemas proteossomal e lisossomal envolvidos na degradação de proteínas e a formação e estabilização de oligômeros neurotóxicos da  $\alpha$ -Syn (CUEVAS; HUENCHUGUALA; MUÑOZ; VILLA *et al.*, 2015; HUENCHUGUALA; MUÑOZ; ZAVALA; VILLA *et al.*, 2014; MUÑOZ; CARDENAS; HUENCHUGUALA; BRICEÑO *et al.*, 2015; PARIS PIZARRO; MUÑOZ; HUENCHUGUALA; COUVE *et al.*, 2011).

O efeito neurotóxico induzido pelo aminocromo parece estar relacionado à formação de ortoquinonas reativas durante a síntese da neuromelanina, um pigmento natural escuro contido em vesículas de neurônios dopaminérgicos (LIANG; NELSON; YAZDANI; PASBAKHSH *et al.*, 2004; SEGURA-AGUILAR; MUÑOZ; INZUNZA; VARSHNEY *et al.*, 2022). O termo, "orto-quinona", refere-se a compostos químicos que contêm um anel quinona com substituintes na posição orto e que, portanto, apresentam alta reatividade. O anel quinona é capaz de oxidar grupos funcionais de biomoléculas, reagir com grupos nucleofílicos, como grupos tiol (-SH) em proteínas, promover a quebra de fitas duplas no DNA e formar espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o processo de oxidação (ROSS; SIEGEL, 2024).

A oxidação da dopamina ocorre em várias etapas até finalmente polimerizar-se em neuromelanina (dopamina → dopamina o-quinona → aminocromo → 5,6-indolequinona → neuromelanina) (Figura 2). Dentro dos neurônios dopaminérgicos, o anel catecol da dopamina é oxidado (por dioxigênio, metais e enzimas) gerando três ortoquinonas. A primeira delas, a dopamina ortoquinona, é instável em pH fisiológico e cicliza para formar o aminocromo. O aminocromo — a segunda ortoquinona gerada no processo — pode ser reduzida por flavoenzimas citoplasmáticas (que utilizam nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida ( $\text{NADH} + \text{H}^+$ ) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido ( $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ) como doadores de elétrons), gerando a terceira ortoquinona — a leucoaminocromo — que se polimeriza para gerar a neuromelanina (SEGURA-AGUILAR; MUÑOZ; INZUNZA; VARSHNEY *et al.*, 2022). Quando não reduzido em dois elétrons pela  $\text{NADH}^+$  e  $\text{NADPH}^+$ , o aminocromo é reduzido em um elétron ao radical leucoaminocromo-o-semiquinona, o qual desempenha funções tóxicas ao promover o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e desenvolvimento de protofibrilas neurotóxicas (ARRIAGADA; PARIS; SANCHEZ DE LAS MATAS; MARTINEZ-ALVARADO *et al.*, 2004; PARIS PIZARRO; MUÑOZ; HUENCHUGUALA; COUVE *et al.*, 2011; SEGURA-AGUILAR, 2017).

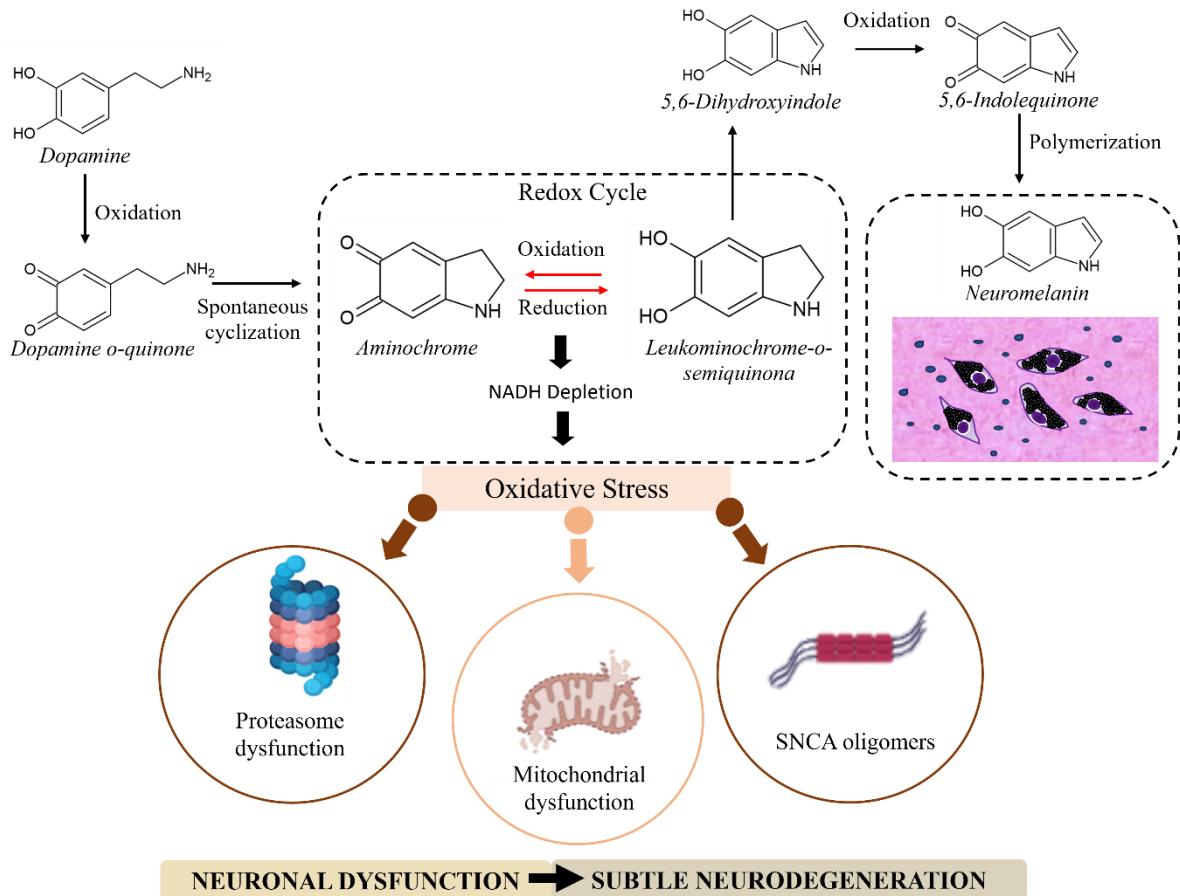


Figura 2. Processo de formação do aminocromo e leucoaminocromo-*o*-semiquinona que resulta na síntese de neuromelanina e neurodegeneração (autoria própria).

O processo da síntese de neuromelanina é natural e é majoritariamente inofensivo, uma vez que mesmo com o aumento da pigmentação induzida pelo acúmulo de neuromelanina inerente à idade, a maioria dos idosos são saudáveis e não apresentam qualquer tipo de alteração relacionada. No entanto, a produção de aminocromo em neurônios dopaminérgicos produtores de dopamina pode ser neurotóxico. O que define se o processo gerará ou não toxicidade é a eficiência dos mecanismos neuroprotetores fisiológicos que podem impedir tais efeitos em indivíduos saudáveis (SEGURA-AGUILAR; MUÑOZ; INZUNZA; VARSHNEY *et al.*, 2022). Neste sentido, a enzima DT-diaforase (NQO1) — a única flavoenzima que reduz quinonas com dois elétrons e impede a formação do radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona — parece proteger as células dopaminérgicas durante o processo de morte celular mediado pelo aminocromo. A NQO1 catalisa a redução de quinonas a hidroquinonas, um processo que ajuda a detoxificar compostos tóxicos, evitando a formação de semiquinonas altamente reativas (SIEGEL; KEPA; ROSS, 2012). Na sua forma ativa, esta enzima é responsável por inibir a formação do radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona e impedir, sobretudo, a geração de

radicais livres (PARIS; MUÑOZ; HUENCHUGUALA; COUVE *et al.*, 2011). É importante ressaltar que o equilíbrio entre a formação da neuromelanina e a prevenção da neurotoxicidade é complexo e a NQO1 é a enzima chave responsável por garantir que a neuromelanina seja produzida sem comprometer a viabilidade celular.

O aminocromo mostrou ser capaz de induzir todas as alterações patofisiológicas envolvidas no contexto da DP como: a formação de oligômeros neurotóxicos de  $\alpha$ -Syn (CASCELLA; CHEN; BIGI; CAMINO *et al.*, 2021; SANTOS; CARDIM-PIRES; SHVACHIY; FONSECA-FONSECA *et al.*, 2022); disfunção mitocondrial (HUENCHUGUALA; MUÑOZ; SEGURA-AGUILAR, 2017; SANTOS; ARAÚJO; FERREIRA; SILVA *et al.*, 2017), neuroinflamação (DE ARAÚJO; FERREIRA; SOUZA; DOS SANTOS *et al.*, 2018), estresse do retículo endoplasmático (HUENCHUGUALA; MUÑOZ; ZAVALA; VILLA *et al.*, 2014), disfunção dos sistemas lisossômicos e proteassômicos (MELÉNDEZ; MUÑOZ; SEGURA-AGUILAR, 2019; MUÑOZ; HUENCHUGUALA; PARIS; CUEVAS *et al.*, 2012) e estresse oxidativo (AGUIRRE; URRUTIA; TAPIA; VILLA *et al.*, 2012).

## **2.5 BIOPROSPECÇÃO FARMACOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS**

As terapias atualmente disponíveis para pacientes com DP, entre as quais a levodopa ou L-DOPA (3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina) se destaca como principal, possuem uma ação exclusivamente sintomática, sendo incapazes de reduzir ou impedir a degeneração neuronal, tampouco de promover a regeneração pós-lesão. Mesmo após exaustivas investigações, nenhuma das abordagens terapêuticas discutidas até o momento mostraram ter potencial modificador da doença realmente comprovado. Sobre os fatores que podem estar dificultando o processo da descoberta de um novo fármaco, destacam-se a existência de subgrupos heterogêneos da DP e a escassez de modelos pré-clínicos da DP que sejam bem representativos (VIJIRATNAM; SIMUNI; BANDMANN; MORRIS *et al.*, 2021). Neste sentido, a busca por novos candidatos à terapia parkinsoniana é um foco importante dos estudos atuais.

A utilização popular de plantas medicinais é uma prática humana desde os primórdios da civilização. Aproximadamente 80% da população mundial faz uso de produtos à base de vegetais pelo menos para os cuidados básicos da saúde, o que despertou, desde a muito tempo, o interesse das indústrias farmacêuticas na prospecção de metabólitos secundários vegetais com potencial terapêutico. Os metabólitos são compostos orgânicos produzidos pelas plantas que não estão diretamente envolvidos em processos vitais, como crescimento e reprodução, mas

desempenham funções essenciais na proteção e interação com o ambiente. Eles incluem uma variedade de compostos, como terpenos, fenóis e alcaloides, que apresentam reconhecida ou possível atividade biológica, incluindo ação antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória, (ATANASOV; WALTENBERGER; PFERSCHY-WENZIG; LINDER *et al.*, 2015; HUSSEIN; EL-ANSSARY, 2018).

Os flavonoides constituem um dos grupos fenólicos mais relevantes e diversificados de origem natural, destacando-se pela sua ampla presença e impacto biológico. Até o momento, seis subclasses de flavonoides foram identificadas com base em suas variações estruturais, refletindo a complexidade e a riqueza química desse grupo de compostos: 1) flavonóis (rutina, quercetina), 2) flavanóis (catequina, epicatequina e epigalocatequina), 3) isoflavonas (genisteína, daidzeína, glycinin e formanantine), antocianidinas (cianidina, malvidine e Delfnidina), flavanonas (hesperitina, naringenina) e flavonas (apigenina, luteolina) (FALCONE FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012; MANACH; SCALBERT; MORAND; RéMéSY *et al.*, 2004). Estes metabólitos são sintetizados a partir da via do ácido chiquímico e são encontrados em frutas, vegetais, sementes, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Apresentam uma estrutura básica de 15 átomos de carbonos com dois anéis benzenos ligados por um anel pirano heterocíclico, que estão ligados a um ou mais grupos hidroxila (OH) e são caracterizados por possuir uma ampla diversidade estrutural, com variações no esqueleto carbônico básico promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização (MAHMOUD; HERNANDEZ BAUTISTA; SANDHU; HUSSEIN, 2019; SOLANKI; PARIHAR; MANSURI; PARIHAR, 2015).

Na biologia vegetal, os flavonoides apresentam-se como agentes que possuem ação contra estresses ambientais, atuam na defesa contra patógenos e herbívoros, atraem polinizadores e regulam principalmente o crescimento e desenvolvimento das plantas (MATHESIUS, 2018). Contudo, uma investigação do potencial farmacológico desses metabólitos evidenciou que os flavonoides possuem diversas atividades biológicas cientificamente comprovadas incluindo a atividade antitumoral (SLIKA; MANSOUR; WEHBE; NASSER *et al.*, 2022), antidepressiva (GERMAN-PONCIANO; ROSAS-SÁNCHEZ; CUETO-ESCOBEDO; FERNÁNDEZ-DEMENEIGHI *et al.*, 2022; PANNU; SHARMA; THAKUR; GOYAL, 2021), antioxidante (OLSZOWY-TOMCZYK; WIANOWSKA, 2023; XU; ZHU; WANG; LIN *et al.*, 2021), antibacteriana (SONG; LIU; LI; LIU *et al.*, 2021; TAN; DENG; YE; ZHANG, 2022), antiviral (CASTRO E SILVA; SOUZA; SCHITINE; JÚNIOR *et al.*, 2022; JO; KIM; SHIN; KIM, 2020) e anti-inflamatória (LISKOVA;

SAMEC; KOKLESOVA; SAMUEL *et al.*, 2021; RAKHA; UMAR; RABAIL; BUTT *et al.*, 2022). Além disso, já foi demonstrado que os flavonoides são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (SOLANKI; PARIHAR; MANSURI; PARIHAR, 2015; YOUDIM; QAISSER; BEGLEY; RICE-EVANS *et al.*, 2004) e exercer efeito neuroprotetor (BUDZYNSKA; FAGGIO; KRUK-SLOMKA; SAMEC *et al.*, 2019),

A ação neuroprotetora dos flavonoides já vem sendo relatada em diversos modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* da DP, por mecanismos que envolvem principalmente ativação de enzimas antioxidantes endógenas (ENOGLIERU; HAYLETT; HISS; BARDIEN *et al.*, 2018), inibição de mediadores inflamatórios (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; CUENCA-BERMEJO *et al.*, 2023), proteção mitocondrial e modulação da expressão de genes em células neuronais (CHANG; HUANG; CHENG; CHEN *et al.*, 2021). Entretanto pouco se sabe sobre a ação neuroprotetora dos flavonoides frente aos danos induzidos pelo aminocromo em neurônios da SNpc.

## **2.6 EFEITOS BIOLÓGICOS E ANTIPARKINSONIANO DA RUTINA**

A rutina (quercetin-3-O-rutinoside) é um tipo de flavonoide glicosilado prevalente em diversas espécies vegetais que expressam vias metabólicas de flavonoides. Esses compostos são encontrados em uma vasta gama de matrizes vegetais, incluindo gêneros como *Sophora japonica* L., (Fabaceae) (HARBORNE, 2013); *Faopyrum esculentum* Moech, *F. tataricum* (L.) Gaenth., (Polygonaceae) (COUCH; NAGHSKI; KREWSON, 1946); *Dimophandra mollis* Benth, (Fabaceae). No Brasil, é possível encontrar a *Dimophandra mollis* Benth, membro da família Caesalpiniaceae, disseminada pelas regiões do cerrado — nos estados do Para, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e na Caatinga Nordestina (LORENZI; MATOS; CAVALLEIRO; BROCHINI *et al.*, 2021). Estruturalmente, a rutina é caracterizada pela presença de um núcleo flavonoide, que consiste em três anéis (A, B e C), e de um dissacarídeo formado por raminose e glicose à posição 3 do anel pirano, que o difere da sua forma não glicosilada, a quercetina (Figura 3).

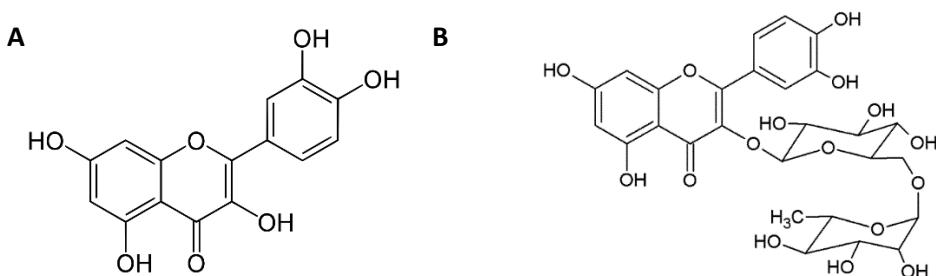


Figura 3. Estrutura química dos flavonoides (A) quercetina e (B) rutina (ChemSketch Freeware).

Apesar da baixa biodisponibilidade limitar o uso e atividade biológica da rutina, estudos tem comprovado que o flavonoide é capaz de atravessar a BHE (RAMASWAMY; DWARAMPUDI; KADIYALA; KUPPUSWAMY *et al.*, 2017). Um estudo de revisão realizado por Habtemariam e Lentini sobre o perfil de absorção e farmacocinético da rutina após administração oral, reuniu evidências acerca da capacidade de pelo menos 5,6 % da rutina em sua forma livre, (2,5%) em forma de metabólitos de sulfato de rutina e (2,0%) em forma de glicuronídeo foi capaz de atravessar as células epiteliais do intestino intactas (ANDLAUER; STUMPF; FÜRST, 2001; HABTEMARIAM; LENTINI, 2015; MANACH; MORAND; DEMIGNÉ; TEXIER *et al.*, 1997; SHIMOI; YOSHIZUMI; KIDO; USUI *et al.*, 2003). Estes achados fomentam a hipótese de que a rutina e/ou seus metabólitos bioativos — principalmente a sua forma aglica, a quercetina — podem cruzar a BHE e servir como o princípio farmacologicamente ativo.

O potencial antiparkinsoniano da rutina envolve múltiplos mecanismos: neutraliza espécies reativas de oxigênio a partir da ação reguladora de enzimas antioxidantes aumentando enzimas antioxidantes como SOD e glutationa (MAGALINGAM; RADHAKRISHNAN; HALEAGRAHARA, 2013), e regulação de genes como a tirosina hidroxilase (TH), o membro da família de genes específicos neurônio 1 (Nsg1), o fator sensível N-etilmaleimida (NSF) e o homólogo atrófico óptico 1 (genes OPA1) (MAGALINGAM; RADHAKRISHNAN; RAMDAS; HALEAGRAHARA, 2015). Ademais, o efeito neuroprotetor da rutina pode ser mediado pela ativação da via Nrf2/Mac-1/caspase-1, envolvidos na regulação da piroptose e a polarização microglial (JI; MA; MA; WANG *et al.*, 2024), além de inibir a via NF-κB, reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) (TIAN; LIU; CHANG; WANG *et al.*, 2021), proteger mitocôndrias preservando o complexo I e o potencial de membrana (KESSAS; LOUNIS; CHOUARI; VEJUX *et al.*, 2024), reduz a agregação de  $\alpha$ -sinucleína prevenindo a formação de corpos de Lewy (CHRISTMANN; GRIES; SCHOLZ; STAHR *et al.*, 2022) e preserva a dopamina ao inibir a MAO-B e proteger os neurônios dopaminérgicos contra as

toxinas, promovendo a neuroproteção e atenuando a progressão da doença (AZAM; ABODABOS; TABAN; RFIEDA *et al.*, 2019).

Em experimentação *in vivo*, a rutina foi capaz de melhorar os prejuízos motores provocados pela 6-OHDA em ratos (KHAN; RAZA; JAVED; AHMAD *et al.*, 2012). Em modelos de estudo de isquemia cerebral a rutina foi neuroprotetora após inibir a apoptose celular e aumentar a expressão de enzimas antioxidantes concomitante a redução da peroxidação lipídica (KHAN; AHMAD; ISHRAT; KHUWAJA *et al.*, 2009). Além disso, a rutina também reduziu o estresse oxidativo, a inflamação e a expressão de proteínas pró-apoptóticas protegendo as células da lesão medular (SONG; ZHANG; WANG; LIU *et al.*, 2018). Em adição, a rutina mostrou ser capaz de atuar como agente anticonvulsivante e ser um candidato potencial para o tratamento da epilepsia (NIEOCZYM; SOCAŁA; RASZEWSKI; WLAŻ, 2014). Na DA a rutina apresentou propriedade anti-inflamatória associada a inibição da agregação da proteína tau e sua toxicidade *in vitro* (SUN; LI; DONG; ZHU *et al.*, 2021). A capacidade neuroprotetora em prevenir a excitotoxicidade glutamatérgica também já foi relatada (FERREIRA; TELES-SOUZA; DOS SANTOS SOUZA; PEREIRA *et al.*, 2021), bem como atividade modulatória da resposta inflamatória em micróglia e regulação do fator neurotrófico derivado das células da glia.

No contexto da DP, estudo envolvendo células SH-SY5Y mostrou que a rutina apresentou ação protetora contra a morte neuronal induzida por aminocromo (SANTOS; CARDIM-PIRES; SHVACHIY; FONSECA-FONSECA *et al.*, 2022). Ademais, estudos desenvolvidos no grupo de pesquisa do LABNq, também tem evidenciado a ação neuroprotetora da rutina contra a lesão nigroestriatal induzida pela injeção estereotáxica do aminocromo em ratos Wistar (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; CUENCA-BERMEJO *et al.*, 2023). Entretanto, apesar de algumas evidências promissoras sobre o potencial neuroprotetor da rutina, a literatura ainda carece de estudos que comprovem os mecanismos subjacentes à neuroproteção em função da administração do flavonoide, sobretudo em um modelo de estudo envolvendo o aminocromo.

### 3. JUSTIFICATIVA

A atual terapia considerada como “padrão ouro” que dispomos para o tratamento da DP, foi descoberta na década de sessenta do século passado (FEHLING, 1966). A L-DOPA, precursor metabólico da dopamina, continua sendo o medicamento mais eficaz para a reversão dos sintomas da DP, embora haja limitação de uso devido aos efeitos colaterais severos. Vale destacar que as atuais terapias destinadas aos pacientes com DP não diminuem, não param a degeneração neuronal e nem auxiliam na regeneração pós-lesão — apenas aliviam os sintomas da doença. Por esse motivo, se faz necessária a investigação de biocompostos com potencial farmacológico para o desenvolvimento de drogas mais eficazes, como a rutina, que é um polifenol com propriedades farmacológicas bem relatadas na literatura e pode ser um bom candidato para avançarmos nas estratégias terapêuticas da DP.

Para tanto, o avanço no tratamento da enfermidade de Parkinson depende da escolha de modelos pré-clínicos que espelhem de forma fiel as alterações motoras e celulares típicas da doença. Um modelo que seja altamente representativo permitirá o desenvolvimento de terapias, mas eficazes e precisas, aumentando as chances de sucesso na fase clínica. De acordo com Segura-Aguilar e Mannervik (2023), a neurotoxina ideal para estudo pré-clínico da DP idiopática deve atender os seguintes requisitos: ser endógena, induzir neurodegeneração focal e não maciça e deve ser capaz de desencadear todos os mecanismos envolvidos no processo degenerativo. A exposição ao aminocromo *in vivo* pode ser considerada o modelo mais fisiológico para estudo da DP, uma vez que a toxina atende a todos os requisitos supracitados. Neste sentido, o presente estudo buscou contribuir com a caracterização de um novo modelo pré-clínico da DP induzido pelo aminocromo, a partir da avaliação de parâmetros comportamentais, neuroquímicos e neuropatológicos. Além disso, o desenvolvimento deste projeto trará contribuições relevantes sobre a atuação neuroprotetora da rutina frente à toxicidade do aminocromo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Validar o modelo animal de degeneração dopaminérgica induzido pelo aminocromo e avaliar o efeito neuroprotector do flavonoide rutina.

### 4.2 Específicos

1. Validar através de testes comportamentais as alterações induzidas por injeção estriatal de aminocromo em ratos Wistar;
2. Validar através de análises histológicas as alterações induzidas por injeção estriatal de aminocromo na substância nigra e estriado de ratos Wistar;
3. Avaliar o efeito neuroprotector da rutina em modelo de estudo da DP induzido por injeção estriatal de aminocromo em ratos Wistar;

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos *in vivo* foram realizados utilizando 60 ratos machos da linhagem Wistar, com 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 280 e 330 g, procedentes do Biotério de ratos e camundongos do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). Os ratos foram alojados em grupos de dois a quatro animais por gaiola após o nascimento e mantidos sob um ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada ( $22\pm2^{\circ}\text{C}$ ) e acesso a comida e água *ad libitum*, exceto durante o momento dos testes comportamentais. Todos os procedimentos descritos com animais neste estudo foram realizados segundo os critérios aprovados pelos comitês internacionais para manipulação de animais de laboratório e de acordo com as regulações nacionais estabelecidas para a experimentação animal. Também foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS, Protocolo nº 3006070223).

### 5.1 Desenho experimental

Os animais foram numerados sequencialmente e, em seguida, divididos aleatoriamente e imparcialmente entre os grupos abaixo, de maneira que houvesse uma representação equitativa entre os grupos experimentais:

- G1 (controle - CTR): animais submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção estriatal de solução salina e tratamento com o veículo de diluição carboximetilcelulose 0,5% administrado por gavagem;
- G2 (aminocromo - AMI): animais submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção estriatal de aminocromo (6 nM) e tratamento com o veículo de diluição carboximetilcelulose 0,5% administrado por gavagem;
- G3 (rutina - RUT): animais submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção estriatal de solução salina e tratamento com rutina (10 mg/kg) administrada por gavagem;
- G4 (aminocromo + rutina – AMI+RUT): animais submetidos à cirurgia estereotáxica para injeção estriatal de aminocromo (6 nM) e tratamento com rutina (10 mg/kg) administrada por gavagem;

## 5.2 Preparação da solução contendo o flavonoide rutina

O flavonoide rutina foi obtido da Sigma-Aldrich, com 98% de pureza, e dissolvido em uma solução de carboximetilcelulose a 0,5% (CMC). A concentração utilizada do flavonoide foi de 10 mg/kg — dose definida de acordo com estudos anteriores do grupo de pesquisa LABNq (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; MACEDO *et al.*, 2022). A solução de rutina em CMC para administração era preparada a cada dia de tratamento e administrada por via intragástrica. Os tratamentos iniciavam 30 min antes da cirurgia estereotáxica e seguiam com uma administração diária durante 21 dias em horários fixos (com variação de 1h). Os demais grupos foram submetidos ao mesmo procedimento de gavagem intragástrica, sendo administrado o veículo CMC 0,5% em um volume equivalente aos respectivos pesos (1mL/kg) de cada animal.

## 5.3 Preparação do aminocromo

O aminocromo foi preparado e purificado de acordo com o protocolo descrito por Paris et al. (2010), com adaptações (PARIS; PEREZ-PASTENE; CARDENAS; ITURRA *et al.*, 2010). Para a síntese do aminocromo, utilizou-se uma solução de dopamina à 5 mM (Sigma Chemical Co. (St Louis, MO), que foi submetida a uma oxidação catalisada pela 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 cromatográfica foi preparada com o auxílio de uma seringa de 10 mL, a partir da resina CM-sephadex (Sigma Chemical Co. (St Louis, MO) previamente hidratada com MES 25 mM pH: 6,0. Após o tempo da corrida o aminocromo foi recolhido da coluna CM-Sephadex como produto da dopamina oxidada. Antes da cirurgia estereotáxica, a concentração do aminocromo foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar de 3058 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, após leitura por espectrofotometria de absorção na faixa de 480 nm de comprimento de onda. A produção do aminocromo foi confirmada por HPLC e espectrofotometria de UV.

## 5.4 Cirurgia estereotáxica

A indução de dano estriatal unilateral utilizando aminocromo para estudo da DP em ratos Wistar foi estabelecida a partir da cirurgia estereotáxica. Os ratos foram anestesiados por

via intraperitoneal com injeção única de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Confirmado o estado anestésico dos animais, estes foram immobilizados no equipamento estereotáxico para realização da assepsia do couro cabeludo com polividine, antisséptico tópico e tricotomizados. Após incisão longitudinal com bisturi e exposição do crânio, a sutura bregma (chamada de ponto zero) foi identificada. Então foram selecionados três pontos correspondentes a região do estriado para realização das incisões a partir das coordenadas estereotáxicas do atlas Paxinos e Watson (1986): **ponto 1** seguindo as coordenadas de anteroposterior, +0,5 mm; mediolateral -2,5 mm, dorsoventral -5,0 mm; **ponto 2** seguindo as coordenadas de anteroposterior, -0,5 mm; mediolateral -3,0 mm, dorsoventral -6,0 mm; **ponto 3** seguindo as coordenadas de anteroposterior, -0,9 mm; mediolateral -3,7 mm, dorsoventral -6,5 mm (Figura 4). Os animais do grupo AMI ou AMI + RUT receberam injeção de 2 µL de solução por cada orifício realizado, totalizando 6 µL de aminocromo (6 nmol), utilizando uma seringa calibre 28-Hamilton® (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; MACEDO *et al.*, 2022), enquanto os animais dos grupos CTR e RUT receberam injeção de 2 µL de solução salina 0,9%, também totalizando 6 µL. O fluxo de administração foi mantido a 2 µL/minuto em cada orifício.

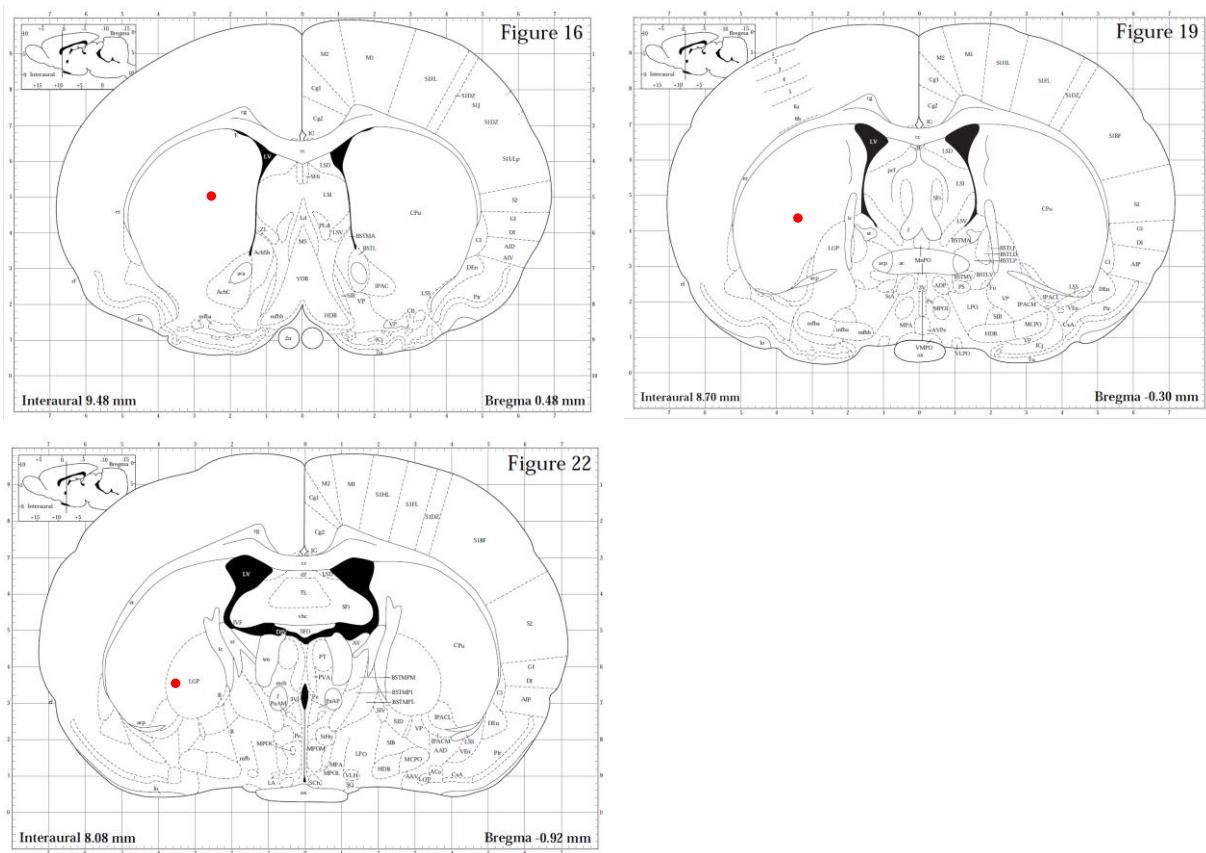


Figura 4. Localização aproximada da injeção do aminocromo na região do estriado de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1986).

Após a cirurgia, os animais foram colocados de volta em caixas limpas de alojamento e mantidos recebendo o flavonoide rutina ou a carboximetilcelulose 0,5% por via intragástrica durante 21 dias (Figura 5).

No 14º dia, os ratos foram submetidos aos seguintes testes comportamentais: o teste do campo aberto, o teste do cilindro, e o teste do labirinto em cruz elevado, seguindo esta ordem e sem intervalos de um teste para outro. Todos os testes comportamentais foram realizados entre as 09:00 e as 14:00 h (durante o período de luz dos ciclos de luz-escuro), sob condições de baixa iluminação e com baixos níveis de ruído. Antes dos testes, os animais foram habituados às salas de experimentos durante as noites que precediam os testes comportamentais.

Ao vigésimo segundo dia, os animais foram submetidos a perfusão transcardíaca com infusão de PBS 0,1M pH 7,2 e tiveram seus encéfalos removidos. Os tecidos cerebrais foram imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% em PBS 0,1M pH 7,2 durante 24h e em seguida lavados com água destilada (3 x 5 min) e conservados em álcool etílico absoluto a 4°C.

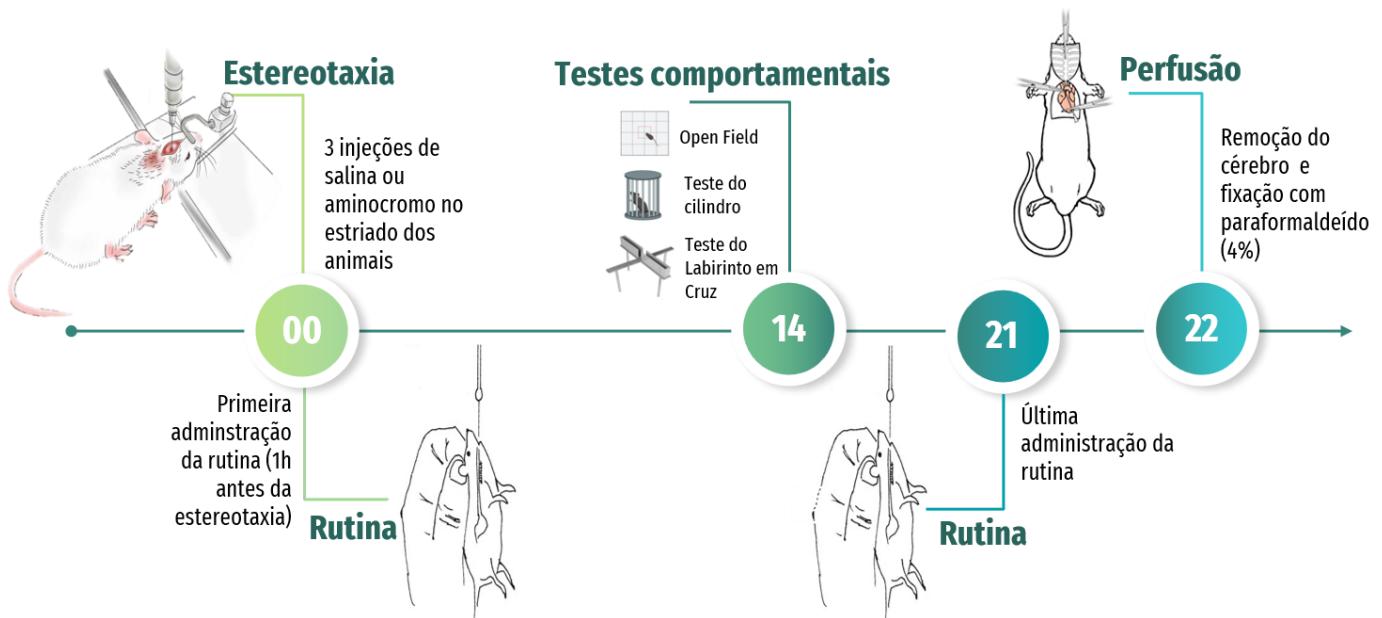


Figura 5. Representação esquemática em função do tempo pela qual os animais foram submetidos a experimentação com aminocromo e/ou rutina (Autoria própria).

## 5.5 Avaliação comportamental

### 5.5.1 Campo aberto

Os animais foram avaliados quanto à atividade locomotora espontânea no teste do campo aberto, que foi conduzido conforme descrito em estudos anteriores (WALSH;

CUMMINS, 1976). Os ratos foram individualmente colocados no centro de uma arena aberta (72 cm x 72 cm x 36 cm), com o campo subdividido em 20 quadrantes. O tempo de exploração foi de 10 min para cada animal e o teste foi realizado em um ambiente com baixa luminosidade por três observadores independentes, iniciando sempre às 9h da manhã. Antes de iniciar o teste, a fim de evitar a influência das pistas olfativas dos animais testados previamente, o aparato passou por um processo de higienização com álcool 70%, respeitado sempre um intervalo de pelo menos 1 minuto para que secasse completamente. Para auxiliar nos registros dos dados, uma câmera de vídeo foi fixada em suporte no teto acima do aparato, sendo capaz de cobrir todo o aparato.

O comportamento exploratório dos animais em cada quadrante central (área com 4 quadrados sem qualquer parede) e em cada quadrante periférico (área com 12 quadrados com uma parede adjacente) foi avaliado e registrado quanto ao: **número de linhas cruzadas; o tempo gasto no quadrante central e periférico; frequência de rearing/ criação** (ato de levantar e se esticar apoiando-se ou não com as patas dianteiras); e **frequência de grooming/aliciamento** (ato de limpar-se a partir de qualquer movimento feito com as patas e/ou dentes tocando partes do corpo). Três observadores treinados e cegos para os grupos experimentais testados também registraram o comportamento ao vivo dos animais. Para todos os dados, as médias foram calculadas a partir das anotações individuais de cada observador e da câmera de vídeo.

### 5.5.2 Teste do cilindro

Os animais foram avaliados quanto a assimetria locomotora espontânea dos membros anteriores no teste do cilindro (SCHALLERT; FLEMING; LEASURE; TILLERSON *et al.*, 2000). O teste é útil na análise da função sensório-motora em modelos de doença neurodegenerativa e consiste na utilização de um cilindro de vidro transparente com abertura na parte superior (30 cm de altura e 19 cm de diâmetro). Os ratos foram, individualmente, colocados dentro do cilindro e foram observados o número de vezes em que o animal se elevou e tocou a parede do aparato. O uso do membro anterior foi definido como a colocação total das patas na parede do cilindro durante apoio corporal. Três observadores independentes registraram a frequência de toques com a pata direita e esquerda ou ambas, quando o rato empinava contra a parede da arena. Também foi colocado um espelho atrás do cilindro para permitir que os experimentadores pudessem observar e registrar os movimentos dos membros anteriores quando o animal estivesse de costas. O teste durou 5 minutos para cada animal.

Durante uma retaguarda, a primeira colocação do membro anterior (direito, esquerdo ou ambos) na parede foi pontuada como um movimento independente para aquele membro. O uso simultâneo e repetitivo de ambos os membros com a parede do cilindro durante uma retaguarda, o movimento resultaria em uma série de pontuações como de ambos os membros (SCHALLERT; FLEMING; LEASURE; TILLERSON *et al.*, 2000). Movimentos ambíguos e difíceis de pontuar foram desconsiderados.

Cada movimentação foi calculada em termos de (1) **porcentagem de movimentos independentes do membro ipsilateral (não comprometido) em relação ao número total de uso dos membros anteriores** (incluindo os toques com membro comprometido, membro intacto e de ambos os membros); (2) **porcentagem de movimentos com o membro contralateral (comprometido) em relação ao número total membros anteriores;** (3) **porcentagem de movimentos simultâneos dos membros em relação ao número total de uso dos membros anteriores;** (4) **taxa de enviesamento do membro (taxa de assimetria)** que foi obtida subtraindo a porcentagem de uso do membro comprometido (contralateral) da porcentagem de uso do membro não comprometido (ipsilateral) (SCHALLERT; FLEMING; LEASURE; TILLERSON *et al.*, 2000).

### **5.5.3 Labirinto em Cruz Elevado**

Os animais foram avaliados quanto ao comportamento do tipo ansioso através do teste do labirinto em cruz elevado, o qual se baseia nas respostas de ansiedade imposta pela possibilidade de exploração de um ambiente novo simultaneamente a aversão natural a áreas abertas e elevadas (PELLOW; CHOPIN; FILE; BRILEY, 1985). O aparato consiste em quatro braços (dois abertos em paredes e dois fechados com paredes de 31cm de altura) elevados com 91 cm de comprimento e 10 cm de largura. Os ratos foram individualmente colocados na interseção dos quatro braços do equipamento que fica elevado a 68 cm do chão. Com acesso livre a todos os braços, o comportamento foi tipicamente registrado durante 5 minutos por três observadores independentes, os quais monitoravam o tempo gasto e a frequência de entradas nos braços abertos e fechados. Foi considerado entrada no braço aberto ou fechado quando o animal introduzia mais da metade do seu corpo. Para todos os dados, as médias foram calculadas a partir das anotações individuais de cada observador e da câmera de vídeo.

## 5.6 Processamento do material histológico

Os encéfalos preservados em PFA 4% passaram por processo de desidratação em álcool etílico concentrado durante três passagens de uma hora cada. A diafanização em xanol foi realizada a partir de três passagens de uma hora cada e a embebição em parafina ocorreu durante duas passagens de uma hora cada e uma última passagem de duas horas. Concluído o processamento, as amostras foram incluídas em blocos de parafina utilizando um sistema de inclusão (LEICA EG1150 H). Após a parafinização, a microtomia dos fragmentos foi realizada em micrótomo LEICA RM2235, obtendo-se cortes semi-seriados de 5 $\mu$ m de espessura da SNpc e do estriado, em lâminas de vidro silanizadas.

## 5.7 Imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada em secções do estriado e SNpc (5  $\mu$ m) usando anticorpos primários contra tirosina hidroxilase (TH) (1:500, MAB318, Millipore) e SRY-box transcription factor 10 (SOX10) (1:300, AB227680, Abcam). As seções foram desparafinizadas em duas lavagens de xanol durante 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram re-hidratados a partir de lavagens de álcool etílico crescentes a (100%, 95% e 70%) e lavadas em água corrente e destilada (5 min cada). O tratamento para recuperação antigênica foi realizado em banho maria, por 20 minutos a uma temperatura entre 94°C a 97°C, contados a partir dos cortes terem sido imersos em solução tampão citrato (ácido cítrico 10 mM, pH 6,0). Após atingirem a temperatura ambiente e lavados 2 vezes em PBST (0,5 % Tween dissolvido em PBS 0,1M) durante 3 minutos, os cortes foram expostos por 20 min à temperatura ambiente a 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (v/v) (Sigma-Aldrich) diluído em água destilada. Após mais 2 lavagens de 3 minutos em PBST, os cortes foram então bloqueados com soro de cabra 10% (Vector Laboratories, inc. Burlingame, CA, EUA) em PBST em estufa a 36°C durante 60 minutos. Os cortes foram incubados durante a noite em geladeira (2-8°C) em câmera úmida com os anticorpos primários indicados diluídos em PBST e 1% de soro de cabra. Após as duas lavagens de 3 minutos com PBST, as fatias de cérebro foram incubadas com anticorpo secundário biotinilado apropriado (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) diluído em PBST e soro de cabra a 1% durante 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com complexo avidina-biotina-peroxidase (kit ABC peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). A coloração foi visualizada por 3,3-diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) usada como

cromógeno. Os cortes então foram lavados em água corrente, água destilada por 5 min cada e corados com hematoxilina (DAKO, Agilent Technologies Singapore) por 5 minutos, seguido de desidratação com álcool (70%, 95% e 100%) e diafanização com xileno (2 lavagens de 5 minutos). Os cortes foram finalmente montados com meio de montagem EUKITT (Sigma-Aldrich).

### **5.8 Análise imuno-histoquímica das células SOX10<sup>+</sup>**

Para análise das imuno-histoquímicas, as fatias foram escaneadas em Microscópio Hall 100 zeiss com uma objetiva de 20x. As células foram quantificadas manualmente em fotomicrografias digitais da SNpc e estriado por 2 observadores às cegas usando o 3DHISTECH's hardware e um plugin em Java do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos). A SNpc foi cuidadosamente delineada para excluir outras subdivisões da substância nigra, como a substância nigra reticulata (SNr) e área tegmental ventral (VTA), usando o atlas do Paxinos & Watson. Para cada animal, o número de células positivas foi quantificado para o lado ipsilateral e os valores foram somados e gerado uma média do número total de células por animal. Um total de 6 lâminas contendo três fatias de cada animal foi avaliada. Para a avaliação do SOX10<sup>+</sup> na SNpc, foi obtida 1 imagem (7.5X) que enquadrasse a região do mesencéfalo ipsilateral na altura da SNpc para cada fatia. Para avaliação do SOX10<sup>+</sup> no estriado também foi selecionada a região ipsilateral, imediatamente abaixo do córtex e até 2 imagens (13X) para cada fatia foram quantificadas.

### **5.9 Análise imuno-histoquímica das células TH<sup>+</sup>**

Para cada animal examinado, as células TH<sup>+</sup> foram quantificadas manualmente em fotomicrografias digitais da SNpc obtidas de 10 secções imunocoradas, cobrindo o maior eixo ântero-posterior da SNpc, SNr e VTA. A porção rostral da SNpc foi estabelecida a partir das primeiras células TH<sup>+</sup> que estavam localizadas perto do final do núcleo subtalâmico. A porção caudal foi delimitada considerando o aparecimento do campo retrorubral. A cada quarta secção contendo SNpc, foi realizada a quantificação manual de modo que a amostragem fosse em intervalos de 20 µm, totalizando 10 secções analisadas por animal (sendo 6 animais por grupo). As fatias de tecidos foram escaneadas em Microscópio Hall 100 zeiss com uma objetiva de 20x e foram quantificadas por 2 observadores às cegas usando o 3DHISTECH's hardware e um plugin em Java do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos). Para cada animal,

o número de neurônios TH+ foi contado para o lado ipsilateral do cérebro das 10 lâminas contendo 3 fatias cada, e a média foi gerada em toda a SNpc, SNr e VTA.

### 5.10 Imunofluorescência

A análise da imunofluorescência foi realizada em secções do estriado e SNpc (5 µm) usando anticorpos primários contra a tirosina hidroxilase (TH) (1:500, MAB318, Millipore), molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (IBA1, AB178846 ou AB5076), proteína ácida fibrilar glial (GFAP, MAB360, Merck) e a proteína B de ligação ao cálcio S100 (S100B, ab52642, Abcam). Para a realização da marcação, foram selecionadas uma lâmina de cada animal, totalizando seis lâminas por grupo (cada lâmina contendo 3 fatias cada). A seleção das lâminas ocorreu após o pareamento da SNpc, garantindo que a região visivelmente susceptível à degeneração (a área localizada após o terceiro par de nervos cranianos de acordo com o resultado das análises imuno-histoquímicas para TH<sup>+</sup>) fosse selecionada para todos os grupos de maneira igualitária. Para a realização da técnica de imunofluorescência, os fragmentos foram desparafinizados em duas lavagens de xanol durante 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram reidratados a partir de lavagens de álcool etílico crescentes a (100%, 95% e 70) e lavadas em água destilada. O tratamento para recuperação antigênica foi realizado em banho maria, por 20 minutos a uma temperatura entre 94°C a 97°C, contados a partir dos cortes terem sido imersos em solução tampão citrato (ácido cítrico 10 mM, pH 6,0). Em seguida, foi necessário esperar os cortes atingirem a temperatura ambiente, para, então serem lavados 3 vezes em PBST (0,5 % Triton dissolvido em PBS 0,1M), durante 5 minutos cada e submetidos ao bloqueio dos sítios inespecíficos a partir da incubação das lâminas em Animal-Free Blocker® (Vector Laboratories, SP-5035) a 10% diluído em PBST (0,1M PBS + 0.5%) por 60 minutos em câmera úmida e em estufa a 36°C. Após isto, os cortes foram incubados durante a noite em geladeira (2-8°C) e em câmera úmida com os anticorpos primários indicados diluído em PBST e Animal-Free Blocker® 1% com o objetivo de bloquear ligações inespecíficas dos anticorpos. Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram lavadas três vezes com PBST e incubadas por 30 minutos com VectaFluor Duet Immunofluorescence Double Labeling Kit, Dylight 488 Anti-Rabbit (verde)/ Dylight 594 Anti-Mouse (vermelho) (Vector Laboratories, DK-8818). As amostras passaram por 3 lavagens de PBS 0,1 M de 5 minutos cada e montadas usando VECTASHIELD Hard SET+DAPI Antifade Mounting Medium, (Vector Laboratories, H-1200).

### **5.11 Análise da imunofluorescência**

A avaliação da imunofluorescência foi realizada após obtenção de 7 campos da SNpc ipsilateral de uma mesma fatia para cada animal. A quantificação das células imunopositivas foi realizada em uma objetiva de 63X usando um microscópio confocal Leica TCS-SP8 e uma série de secções ópticas com intervalos de 0,5 µm foi analisada para determinar um limite superior e inferior usando a posição Z/Y para configuração espacial das imagens em série. A série óptica cobria uma fatia de tecido com 5 µm de espessura. A SNpc foi delimitada de acordo com as coordenadas anatômicas do Atlas de Paxinos e Watson (1986) e com o auxílio de uma lente objetiva de menor aumento 10X. Para o aumento de 63X, foi utilizada lente objetiva de imersão em glicerol com zoom óptico de 0,75 (eixo x) e eixo y ( $1024 \times 1024$  pixels). Para evitar erros de quantificação e medição, todas as imagens foram obtidas nas mesmas condições de configuração. A quantificação das células imunopositivas foi realizada por 2 observadores às cegas usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos) e, em seguida, foi gerado uma média do número total de células. Além disso, a expressão de GFAP e S100b também foi analisada pela densidade óptica média, uma vez que as análises realizadas em confocal podem intensificar a presença de várias extensões de astrócitos sem a presença de corpo celular. Desta maneira, as imagens foram convertidas em tons de cinza de 8 bits e determinada a densidade óptica média.

### **5.12 Análise e quantificação dos contatos intercelular (TH<sup>+</sup> e IBA1<sup>+</sup>)**

Os contatos estabelecidos entre as células neuronais TH<sup>+</sup> e microglias IBA1<sup>+</sup> foram quantificados usando imagens da SNpc (63X) obtidas como descrito anteriormente. Os contatos foram considerados como positivos quando a fluorescência vermelha (TH<sup>+</sup>) e verde (IBA1<sup>+</sup>) colidiam ou se sobreporiam. Quatro categorias foram estabelecidas durante a classificação do tipo de contato: contato entre o processo microglial e o processo do neurônio dopaminérgico (PrM-PrN); contato entre o corpo celular da microglia e o prolongamento do neurônio dopaminérgico (CM-PrN); contato entre o prolongamento da microglia e o corpo do neurônio dopaminérgico (PrM-CN); contato entre o corpo celular da microglia e o corpo do neurônio dopaminérgico (CM-CN). As médias para cada categoria foram calculadas em relação ao total de células TH<sup>+</sup>. Todos esses parâmetros foram avaliados em 7 campos de uma mesma fatia. A quantificação dos contatos foi realizada por 2 observadores às cegas usando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, Estados Unidos) e, em seguida, foi gerado uma média do número de

contatos para cada categoria avaliada, além da média do número total de contatos para os grupos testados.

### **5.13 Análises estatísticas**

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 8.3.0 (California, EUA) e registrados como média ou mediana dos parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística entre os grupos, a distribuição normal e a homogeneidade da variação dos dados foram testadas pelo teste de normalidade do Kolmogorov – Smirnov, D'Agostino & Pearson ou Shapiro-Wilk test respectivamente. As análises de comparação de desfecho entre os grupos foram determinadas através do teste One Way ANOVA seguida pelo pós-teste Tukey's Multiple Comparison Test (RICE; ROBERTS; MELENDEZ-FERRO; PEREZ-COSTAS, 2016; SLÉZIA; HEGEDÜS; RUSINA; LENGYEL *et al.*, 2023). Para dados não-paramétricos, foram utilizados os testes Kruskal-Wallis test e pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 6. RESULTADOS

Devido a interferências externas no momento da aplicação dos testes, animais de diferentes grupos experimentais que apresentaram sinais de estresse e desvios atípicos durante as análises foram excluídos da pesquisa.

### 6.1 Efeito dos tratamentos com rutina e/ ou aminocromo sobre o comportamento dos animais avaliados em teste do campo aberto.

#### 6.1.1 Exploração dos quadrados centrais

O teste do campo aberto foi introduzido pela primeira vez por Calvin S. Hall em 1934 e desde então é usado para avaliar o comprometimento da atividade locomotora, ansiedade e motivação na DP (HALL; BALLACHEY, 1932). No presente estudo, os dados da atividade exploratória dos animais nos quadrantes centrais do campo aberto (figura 6) não evidenciaram alteração relacionada a um comportamento do tipo ansioso entre os grupos testados. Foram avaliados o número de entradas nos quadrantes centrais (CTR = 19; AMI = 19; RUT 21; AMI+RUT = 25;  $p > 0,05$ ); e o tempo em segundos gastos nestes quadrantes (CTR = 33; AMI = 28; RUT = 38.5; AMI+RUT = 40;  $p > 0,05$ ).

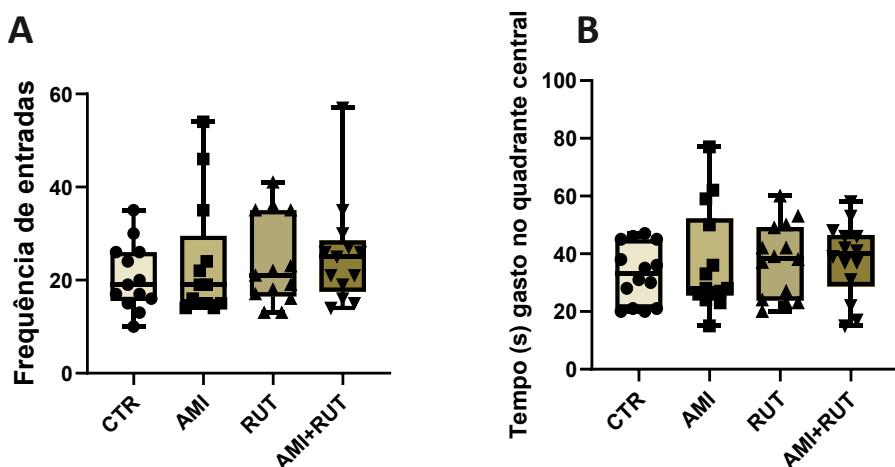


Figura 6. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental dos ratos relacionado à ansiedade em teste do campo aberto. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental dos ratos relacionado à ansiedade em teste do campo aberto. Gráficos representam dados da atividade comportamental dos animais nos quadrantes centrais do campo aberto no 14º dia de experimentação para os grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI+RUT (aminocromo + rutina). (A) representa a frequência de entradas nos quadrantes centrais e (B) representa o tempo de permanência nos quadrantes centrais. As barras representam os valores de mediana para 13 ratos por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de Kruskal-Wallis e pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 6.1.2 Exploração dos quadrados periféricos

Análise comportamental de roedores em campos periféricos do campo aberto, permite avaliar, sobretudo, a função locomotora de animais que foram submetidos a algum tipo de lesão no sistema locomotor. Os dados obtidos nos quadrantes periféricos deste estudo não apresentaram diferenças estatísticas para os parâmetros avaliados: a frequência de entradas nos quadrantes periféricos — CTR =  $157,1 \pm 24,5$ ; AMI =  $148,6 \pm 27,4$ ; RUT =  $164,7 \pm 20,6$ ; e AMI+RUT =  $170 \pm 33,3$ ;  $p > 0,05$  — (Figura 7A); e o tempo em segundo gasto na periferia do aparato — CTR = 572,0; AMI = 572,0; RUT = 565,0; e AMI+RUT = 561,0 (Figura 7B);

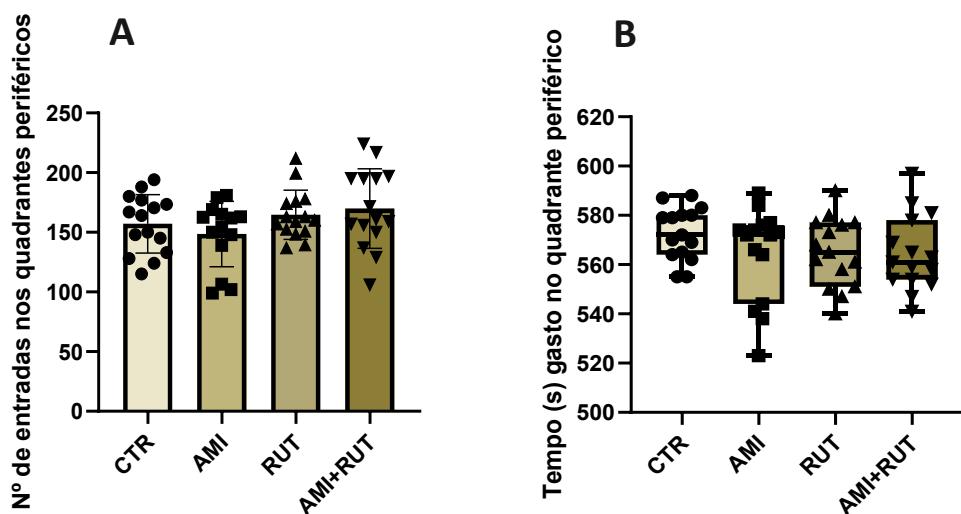


Figura 7. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à atividade locomotora em teste do campo aberto. Gráficos representam dados da atividade comportamental dos animais nos quadrantes periféricos do campo periférico no 14º dia de experimentação para os grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina). (A) representa a frequência de entradas nos quadrantes periféricos e (B) representa o tempo de permanência nos quadrantes periféricos. As barras representam os valores de média + desvio padrão ou mediana para 15 ratos por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise paramétrica one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de análise post hoc de Tukey ou do teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 6.1.3 Comportamento exploratório e de mobilidade

A avaliação do comportamento locomotor e exploratório dos animais com base na distância percorrida em campo aberto, pode fornecer informações sobre o estado físico e emocional dos animais de cada grupo. Neste estudo, foi avaliado a distância percorrida em centímetros nos quadrantes centrais do campo aberto — CTR = 342,0; AMI = 279,0; RUT = 378,0; AMI+RUT = 378,0; nos quadrantes periféricos do campo aberto — CTR = 2682; AMI = 2844; RUT = 2871; e AMI + RUT = 2880 — e a distância total percorrida por todo o campo

aberto – CTR = 3168; AMI = 3186; RUT = 3222; e AMI+RUT = 3429. Os parâmetros avaliados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos testados (figura 8).

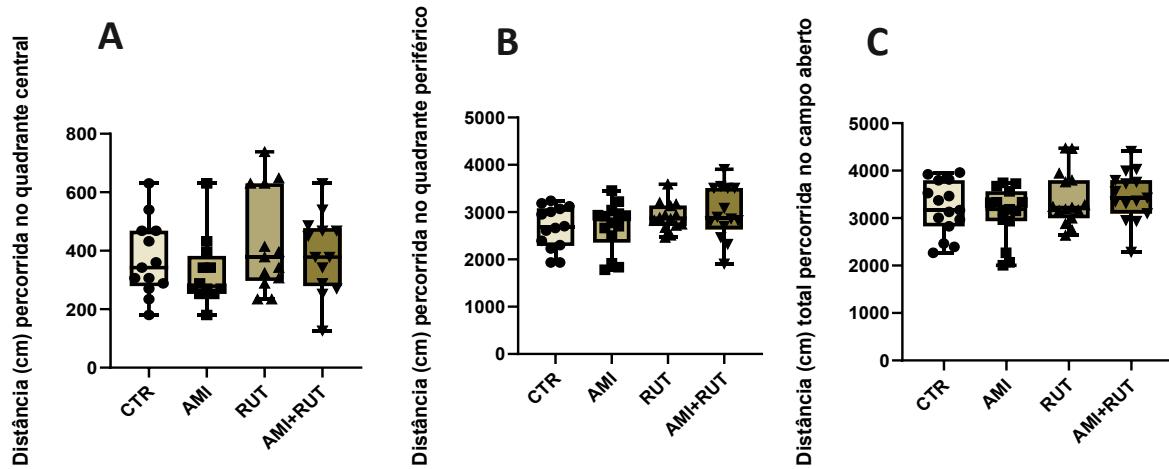


Figura 8. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à distância percorrida em teste do campo aberto. Gráficos representam dados da atividade comportamental dos animais no campo aberto no 14º dia de experimentação para os grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina). (A) representa a distância em centímetros percorrida pelos animais nos quadrantes centrais, (B) representa a distância em centímetros percorrida pelos animais nos quadrantes periféricos e (C) a distância em centímetros total percorrida no campo aberto. As barras representam os valores de mediana para 15 ratos por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

#### 6.1.4 Comportamento exploratório vertical e de autolimpeza

A análise do comportamento exploratório vertical (rearing) e de autolimpeza (grooming) pode fornecer informações valiosas sobre o estado emocional e motor dos animais em experimentação. Ambas as análises estão apresentadas nas figuras 9A e 9B, respectivamente. Em relação à atividade exploratória dos animais baseada na frequência total de levantadas (rearing/esticadas) no campo aberto, foi observado que o grupo injetado com aminocromo ( $58,36 \pm 13,96$ ) apresentou uma redução no parâmetro analisado quando comparado ao grupo controle ( $74,07 \pm 18,72$ ;  $p = 0,0294$ ). Os demais grupos — AMI+RUT ( $61,32 \pm 12,42$ ) e RUT ( $70,39 \pm 15,81$ ) — não apresentaram diferenças estatísticas.

Os dados de autolimpeza (grooming), por sua vez, apontaram uma redução significativa do comportamento nos animais do grupo AMI ( $4,500$ ;  $p = 0,0031$ ) e AMI+RUT ( $5,000$ ;  $p = 0,0484$ ), quando comparado ao grupo CTR ( $14,50$ ). É importante ressaltar que, diferente dos animais lesionados com aminocromo, os animais lesionados, mas tratados com rutina — grupo AMI+RUT — apresentaram uma diferença mais sutil na redução do grooming, quando

comparado ao grupo controle. Os dados analisados para os animais do grupo RUT (mediana = 8,500), por sua vez, não apresentaram alterações no padrão de grooming quando comparados aos demais grupos.

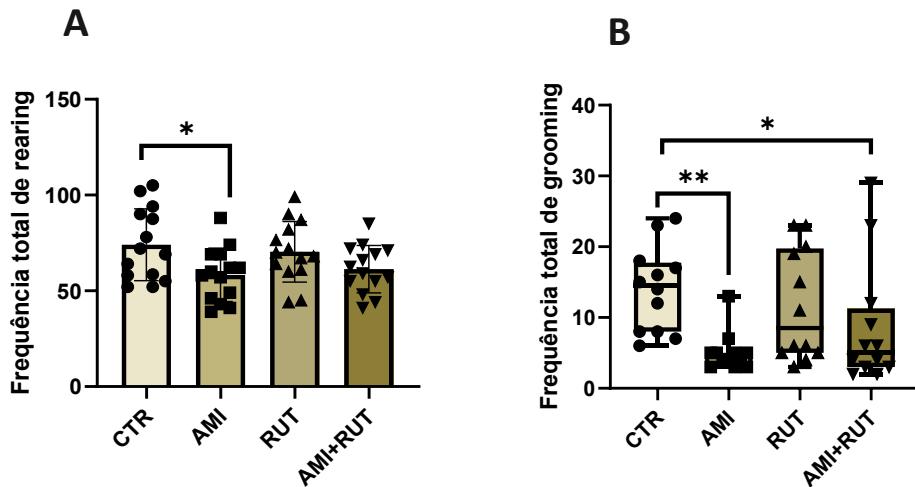


Figura 9. Exposição ao aminocromo altera o padrão comportamental de ratos relacionado à atividade exploratória vertical e de autolimpeza em teste do campo aberto. Gráficos representam dados da atividade comportamental dos animais no campo aberto após 14 dias de experimentação para os grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina). (A) representa a frequência total de levantadas/rearing no campo aberto, (B) representa a frequência total de autolimpeza/grooming. As barras representam os valores de média ± desvio padrão para 14 ratos por grupo na avaliação do rearing ou representam a mediana para 12 ratos por grupo na avaliação do grooming. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise paramétrica one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de análise post hoc de Tukey ou do teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. (\*) e (\*\*) representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR.

### 6.1.5 Padrão de emissão de excrementos

Alterações no padrão de emissão de excrementos — como fezes e urina — podem indicar problemas motores e autonômicos associados à DP. Como observado nos dados apresentados na figura 10 (A e B), não foram observadas alterações significativas no padrão de excreção de bolos fecais — CTR = 5,000; AMI = 5,000; RUT = 5,500; e AMI+RUT = 4,000;  $p > 0,05$  — ou poços de urina pelos animais — CTR =  $5,167 \pm 1,7$ ; AMI =  $4,667 \pm 1,3$ ; RUT =  $5,250 \pm 2,3$ ; AMI+RUT =  $3,667 \pm 1,9$ ;  $p > 0,05$ .

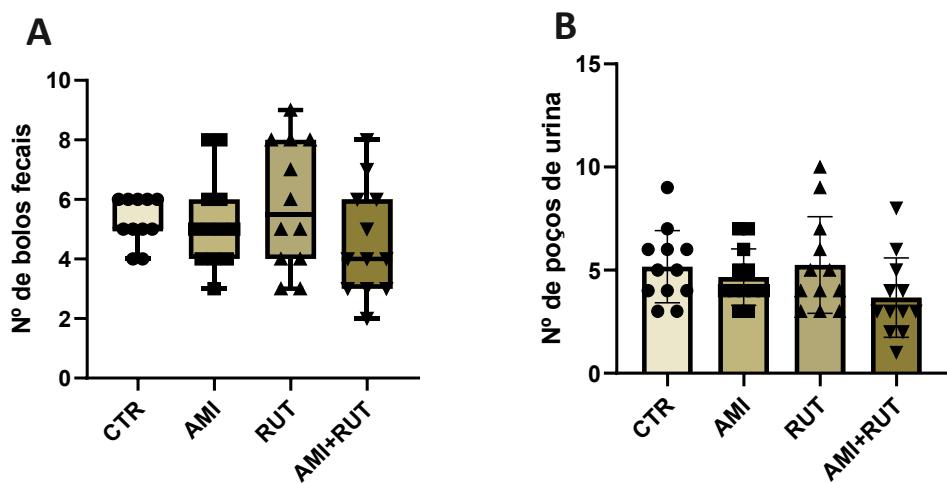


Figura 10. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à emissão de excrementos em teste do campo aberto. Gráficos representam dados da atividade comportamental dos animais no campo aberto no 14º dia de experimentação para os grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina). (A) representa o número total de bolas fecais e (B) representa o número total de poços de urina. As barras representam os valores de média ± desvio padrão para 12 ratos por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise paramétrica one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de análise post hoc de Tukey ou do teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 6.2 Efeito dos tratamentos com rutina e/ ou aminocromo sobre o comportamento dos animais avaliados em teste do cilindro.

A assimetria locomotora espontânea dos membros anteriores dos animais é uma importante medida do grau e da extensão da lesão motora. Análises como estas podem fornecer informações relevantes sobre a eficácia dos tratamentos experimentais em modelos de estudo da DP (SCHALLERT; FLEMING; LEASURE; TILLERSON *et al.*, 2000). A avaliação motora realizada durante 5 minutos de teste do cilindro não evidenciou efeitos significativos do aminocromo ou da rutina sobre os parâmetros analisados. Em modelos da DP induzidos por 6-OHDA, animais com lesão na via nigroestriatal usam preferencialmente a pata ipsilateral quando submetidos ao teste do cilindro, enquanto que animais saudáveis usam a pata direita e esquerda sem distinção (LUNDBLAD, 2005).

Dados obtidos da porcentagem de uso do membro contralateral (comprometido pelo aminocromo), evidenciaram que os animais do grupo AMI (14,00) e AMI+RUT (9,000) apresentaram uma redução sutil na frequência de uso desse membro específico, embora não significativa, quando comparado aos grupos CTR (17,50;  $p > 0,05$ ) e/ou RUT (18,00). A porcentagem de uso do membro ipsilateral (não comprometido) (Figura 11B) também não apresentou diferença estatística – CTR = 17,00; RUT = 16,00; AMI = 11,00; e AMI+RUT =

27,00;  $p > 0,05$ . Os valores da porcentagem do uso de ambos os membros também não variaram entre os grupos testados — medianas CTR = 69,0; AMI = 67,0; RUT = 62,0; e AMI+RUT = 68,5;  $p > 0,05$ — (Figura 11). Por último, também foi calculada a taxa de enviesamento do uso do membro contralateral (Figura 11D) — CTR = -2,0; AMI = 2,0; RUT = 0,0; e AMI+RUT = 13,0;  $p > 0,05$ — sem diferença estatística entre as medianas dos grupos testados (Figura 11A).

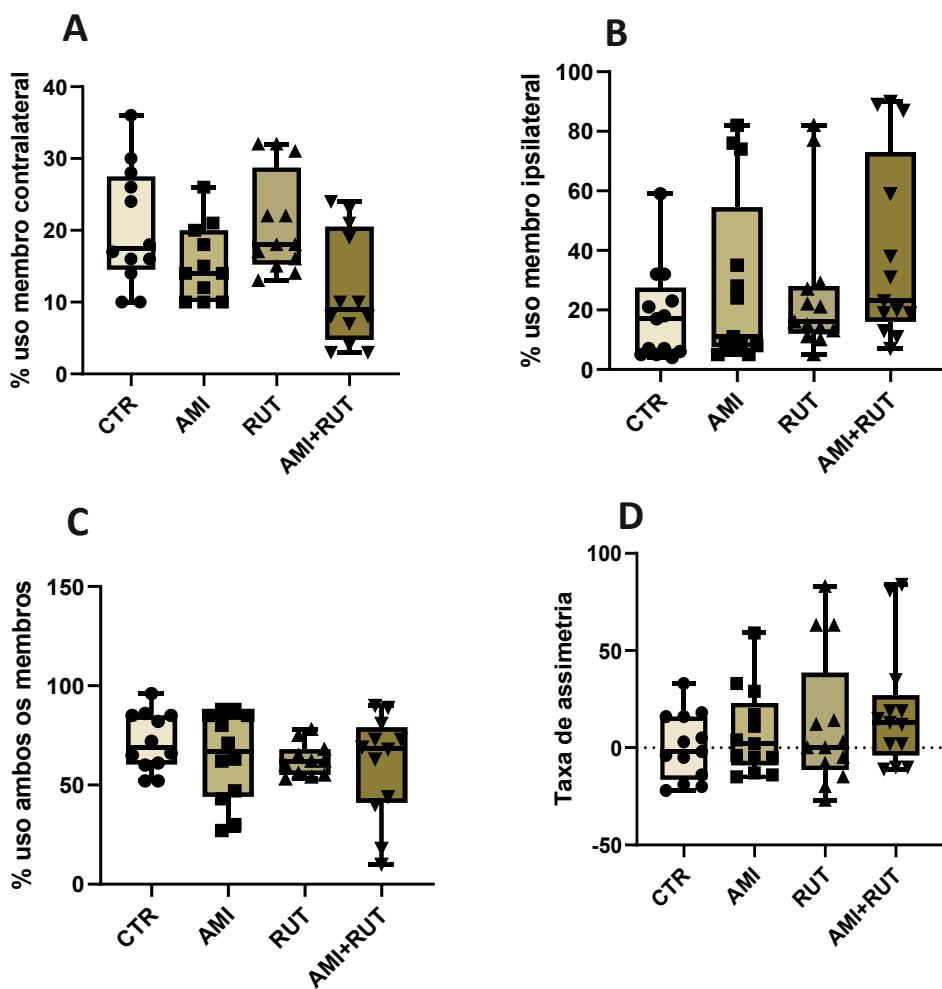


Figura 11. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão comportamental de ratos relacionado à assimetria locomotora em teste do cilindro. Gráficos representam os dados do viés de uso do membro anterior no teste do cilindro no 14º dia de experimentação para os grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina). (A) representa a porcentagem do uso do membro contralateral; (B) porcentagem do uso do membro ipsilateral; (C) porcentagem do uso de ambos os membros; e (D) taxa de enviesamento do uso do membro contralateral. As barras representam os valores de mediana para 12 ratos por grupo (incluídos nas análises de % de toque com o membro contralateral e ambos os membros) e para 13 ratos por grupo (incluídos nas análises de % de toque com o membro ipsilateral e análise de assimetria). As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### **6.3 Efeito dos tratamentos com rutina e/ou aminocromo sobre o comportamento dos animais avaliados em teste do labirinto em cruz elevado.**

O labirinto em cruz elevado é um teste que submete os animais a experiências que naturalmente provocariam aversão, sendo útil para avaliação do comportamento do tipo-ansioso de roedores (HILTON; SIMPSON; SHERMAN; RABY-SMITH *et al.*, 2023). Durante a experimentação, 5 parâmetros foram analisados: frequência de entradas no braço aberto (FEBA) (Figura 12A), frequência de entradas no braço fechado (FEBF) (Figura 12B), tempo nos braços abertos (TBA) (Figura 12C), tempo nos braços fechados (TBF) (Figura 12D) e transição total nos braços do labirinto em cruz (Figura 12E).

Para o parâmetro de FEBA, o grupo AMI ( $6,585 \pm 3,036$ ;  $p = 0,0066$ ) apresentou diferença estatística significante quando comparado ao grupo CTR ( $11,50 \pm 3,937$ ) e AMI+RUT ( $10,42 \pm 3,9$ ;  $p = 0,0478$ ). O grupo RUT ( $10,04 \pm 3,631$ ), por sua vez, não apresentou diferença estatística quando comparado aos demais grupos. Os valores obtidos das médias + desvios padrão da análise da TBA não apresentaram valores alterados significativamente entre os grupos analisados (CTR =  $136,8 \pm 48,29$ ; AMI =  $142,3 \pm 76,80$ ; RUT =  $189,9 \pm 33,87$ ; e AMI+RUT =  $181,6 \pm 40,85$ ;  $p > 0,05$ ).

Para o parâmetro FEBF, também não foi observado diferença estatística entre os grupos – CTR ( $9,114 \pm 3,407$ ); AMI ( $7,743 \pm 3,213$ ); RUT ( $7,571 \pm 2,556$ ) e AMI+RUT ( $8,571 \pm 3,626$ ;  $p > 0,05$ ). O TBF, por outro lado, evidenciou de maneira significante, que os animais do grupo AMI+RUT ( $118,3 \pm 42,29$ ;  $p = 0,012$ ) permaneceram menos tempo no braço fechado quando comparado ao grupo CTR ( $192,1 \pm 60,09$ ) e ao grupo AMI ( $185,8 \pm 72,17$ ;  $p = 0,0229$ ). Os animais tratados com rutina ( $119,2 \pm 45,85$ ) também permaneceram por um menor tempo neste braço do aparato, embora sem diferença estatística.

A análise da transição total dos animais pelos braços do labirinto em cruz elevado, evidenciou que os animais do grupo AMI ( $14,43 \pm 5,552$ ;  $p = 0,0235$ ) transitam e exploram menos o aparato quando comparado ao grupo CTR ( $20,86 \pm 5,106$ ). Os demais grupos não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si – RUT ( $17,96 \pm 5,257$ ) e AMI+RUT ( $19,39 \pm 6,943$ ;  $p > 0,05$ ).

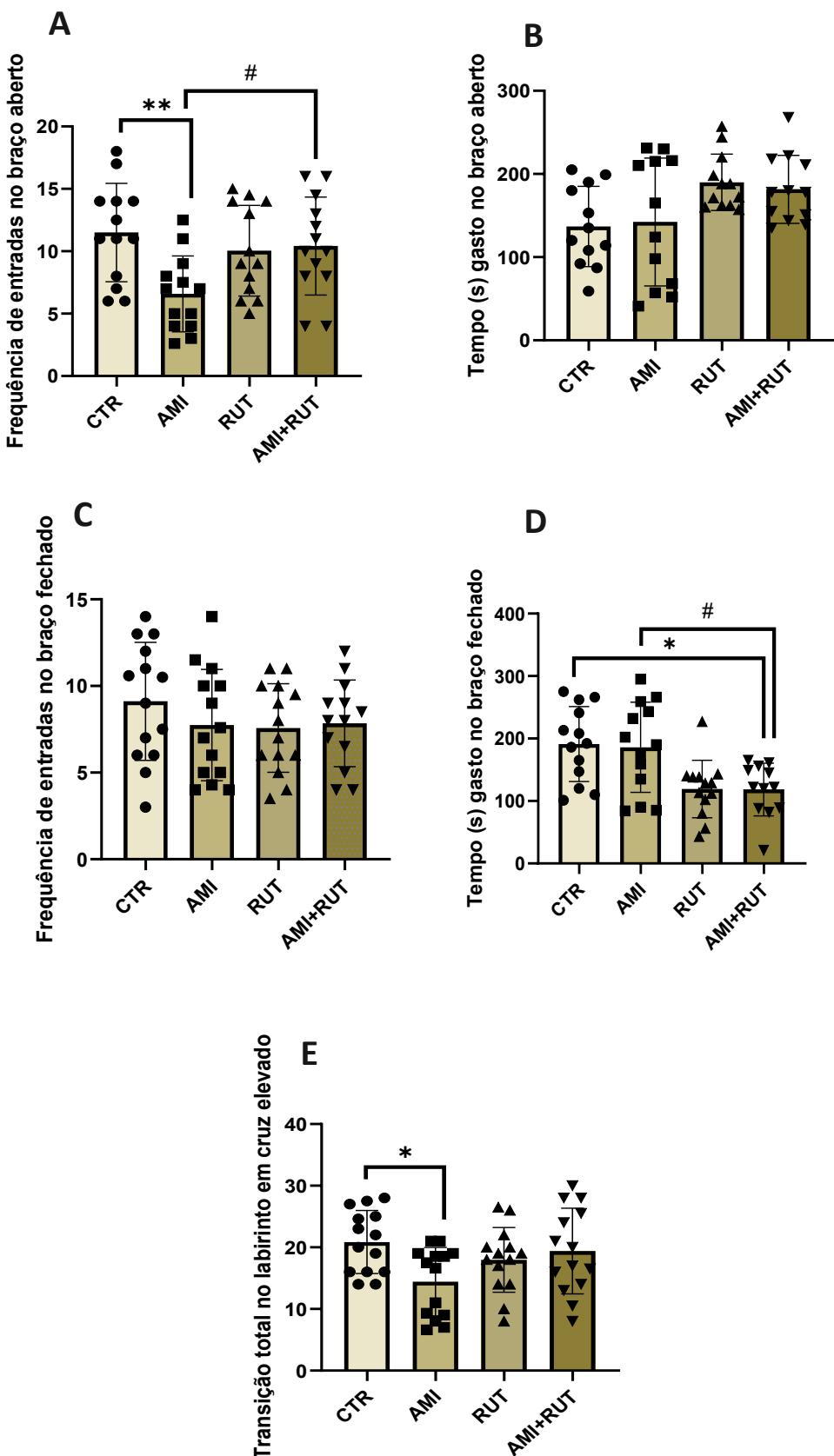


Figura 12. Exposição ao aminocromo e/ou rutina altera o padrão comportamental de ratos relacionado à ansiedade em teste do labirinto em cruz elevado. Gráficos representam dados da atividade comportamental dos animais no labirinto em cruz elevado no 14º dia de experimentação para os grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina). (A) representa a frequência total de entradas nos braços abertos; (B) tempo em segundos de permanência nos braços abertos; (C) frequência total de entradas nos braços fechados; (D) tempo em segundos de permanência nos braços fechados; e (E) número total de transição pelos braços abertos

e fechados. As barras representam os valores de média  $\pm$  desvio padrão para 13 ratos por grupo (FEBA e TBF); ou 14 ratos por grupo (FEBF e transições totais); ou 12 ratos por grupo (TBA). As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise paramétrica ANOVA de uma via, seguido do teste de comparação múltipla de análise post hoc de Tukey. (\*) e (\*\*) representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR e (#) representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo AMI.

#### **6.4 Delimitação da substância nigra a partir da expressão de células TH<sup>+</sup>.**

As medidas dimensionais da SN e as vias dopaminérgicas do mesencéfalo foram delineadas com o auxílio do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1986) a partir da análise das secções imunorreativas à tirosina hidroxilase — uma enzima limitante da síntese de catecolaminas. A SNpc, uma região nuclear densamente compactada e pigmentada, encontra-se mais dorsalmente no mesencéfalo, enquanto a pars reticulata, uma região nuclear menos compactada e com organização neuronal mais dispersa, está localizada mais ventralmente. Na linha média, a SNpc funde-se com a VTA — um grupo de neurônios encontrados perto da linha média no assoalho do mesencéfalo (Figura 13). No total, dez fotomicrografias dos mesencéfalos de cada animal (para cada grupo) foram pareadas e selecionadas para as análises imuno-histoquímicas (Figura 14). As subregiões da SN — pars compacta e pars reticulata — e VTA, foram delimitadas como descrito por Roostalu e colaboradores (ROOSTALU; SALINAS; THORBEK; SKYTTE *et al.*, 2019).

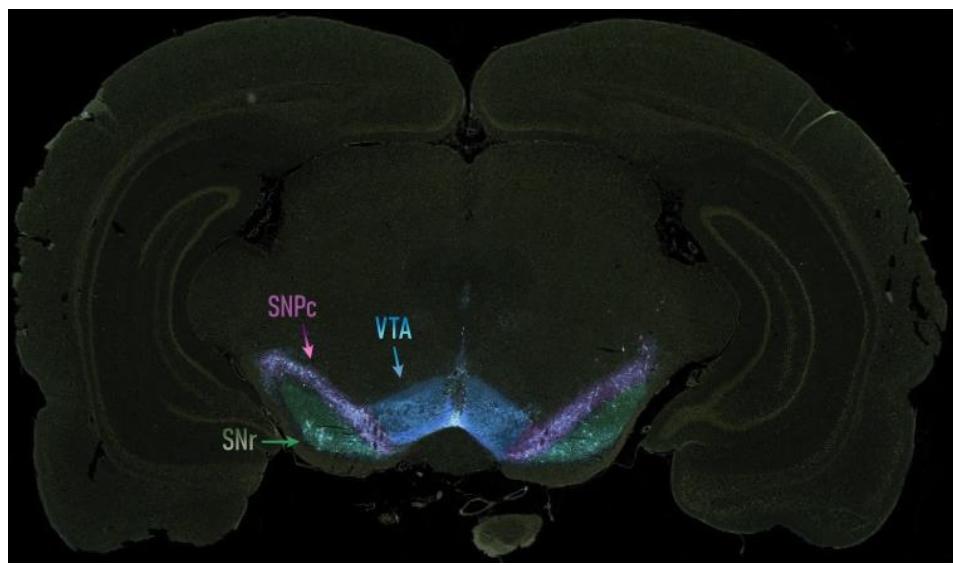


Figura 13. Padrão de expressão de células TH<sup>+</sup> no mesencéfalo, com destaque para a SNpc, SNr e VTA. Delimitações das subdivisões de acordo ao atlas Paxinos e Watson (1986).

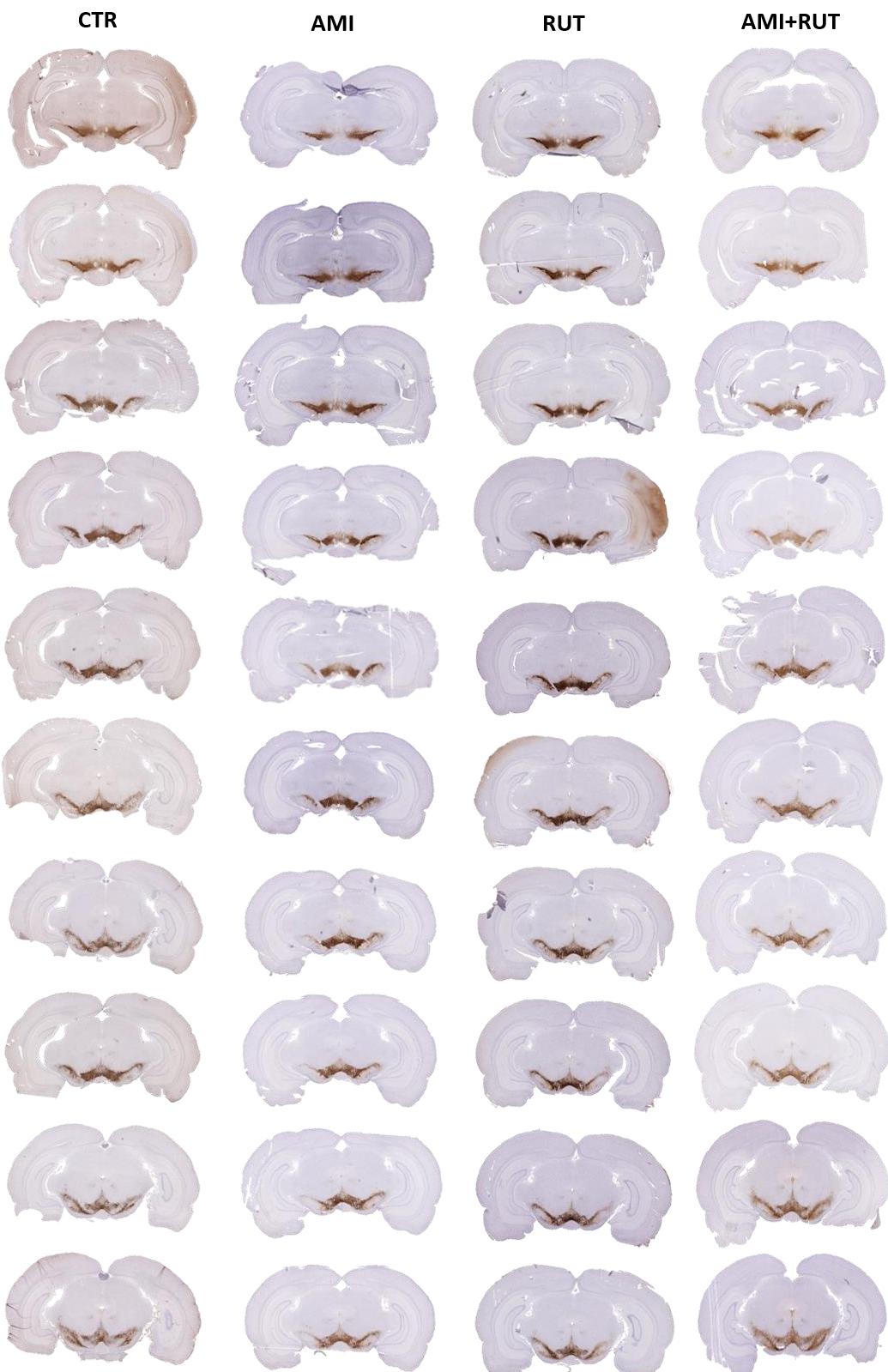


Figura 14. Imagens representativas do mesencéfalo utilizadas para demarcação das áreas analisadas (SNpc SNr e VTA), considerando o início da região da SN (rostral) e o final (caudal).

## 6.5 O aminocromo induz perda de células TH<sup>+</sup> na SNpc dos animais.

A quantificação de células TH<sup>+</sup> da SNpc revelou efeito citotóxico do aminocromo em amostras de encéfalo coletadas no 21º dia de experimentação (Figura 15). O número de neurônios imunorreativos para TH<sup>+</sup> foi reduzido de maneira significativa no grupo AMI (79,50;  $p = 0,0161$ ) quando comparado ao grupo CTR (113,0) e ao grupo RUT (118,4). Por outro lado, animais injetados com aminocromo e tratados com rutina – AMI+RUT (92,13) não apresentaram alterações significativas em relação aos animais do grupo controle e ao grupo rutina.

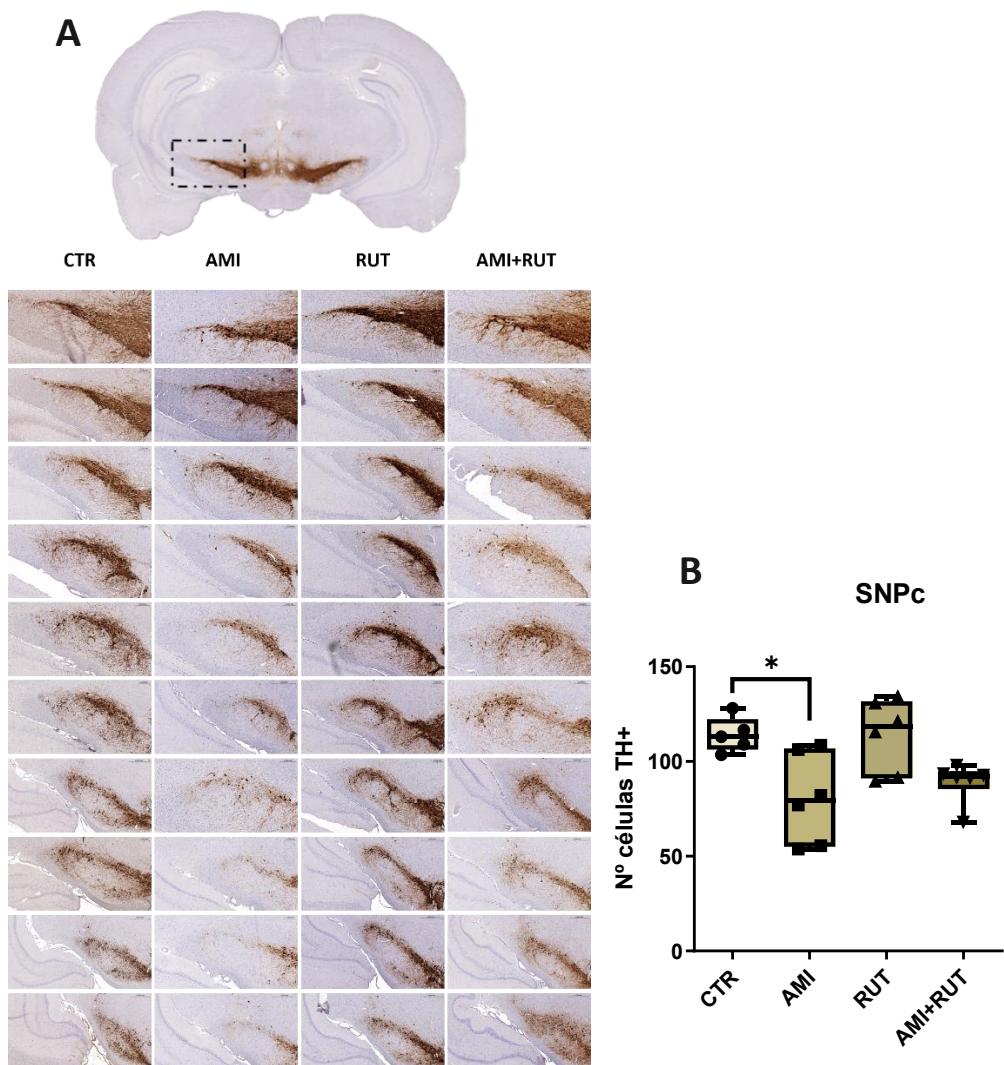
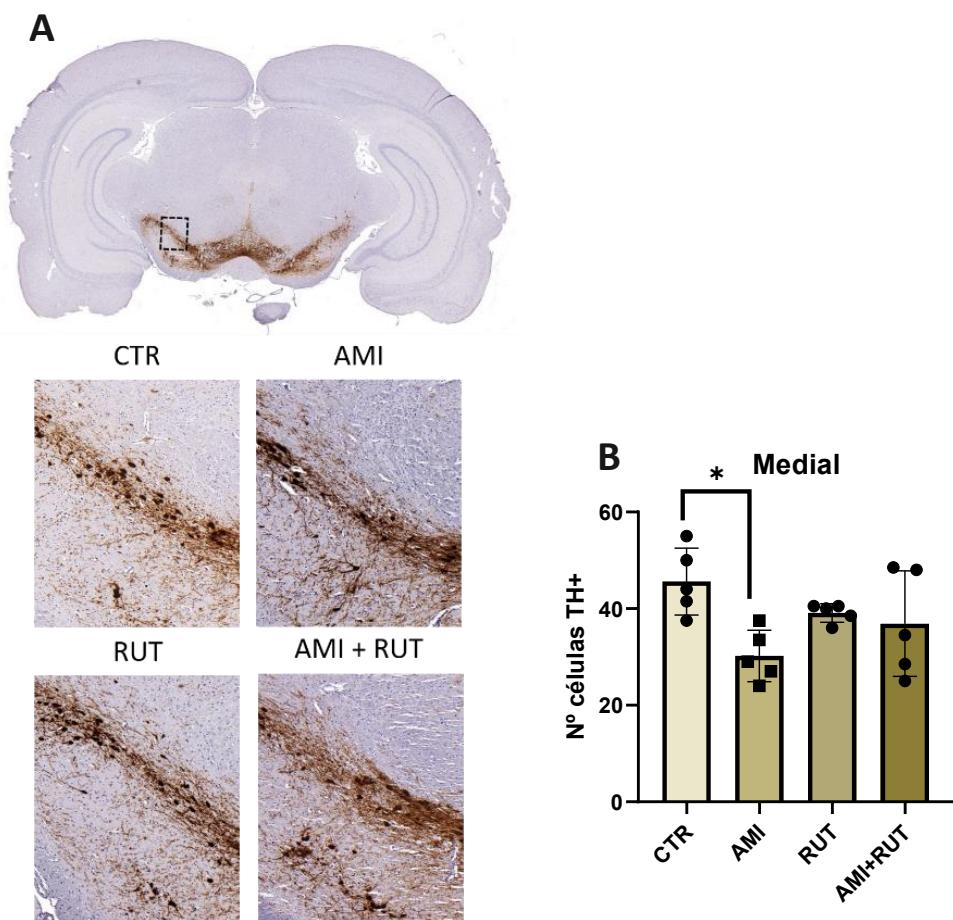


Figura 15. O aminocromo induz degeneração de células dopaminérgicas na SNpc. (A) Imagens representativas da imunohistoquímica para neurônios TH+ na SNpc de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 20x). (B) Quantificação de células TH<sup>+</sup> na SNpc de ratos com redução significativa de neurônios imunorreativo no grupo AMI em comparação ao grupo CTR. As barras representam os valores de mediana para um N de 6 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. (\*) representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR.

## 6.6 O aminocromo induz perda de células TH<sup>+</sup> predominantemente na área medial da SNpc dos animais.

A quantificação de células TH<sup>+</sup> revelou informações relevantes sobre a região da SNpc mais sensível ao efeito citotóxico do aminocromo aos 21 dias de experimentação (Figura 16). Neurônios imunorreativos TH<sup>+</sup> foram reduzidos de maneira significativa nas regiões mediais da SNpc do grupo AMI ( $30,2 \pm 5,346$ ;  $p = 0,0157$ ) quando comparado as mesmas regiões no grupo CTR ( $45,60 \pm 6,941$ ), grupo RUT ( $39,10 \pm 1,917$ ) e grupo AMI+RUT ( $36,90 \pm 10,91$ ). A quantificação também foi realizada para a área lateral/extremidades da SNpc, o que evidenciou um padrão de expressão de células TH<sup>+</sup> similar em todos os grupos – CTR ( $25,98 \pm 6,844$ ); AMI ( $22,50 \pm 6,000$ ); RUT ( $26,58 \pm 3,917$ ) e AMI+RUT ( $25,42 \pm 9,140$ );  $p > 0,05$ .



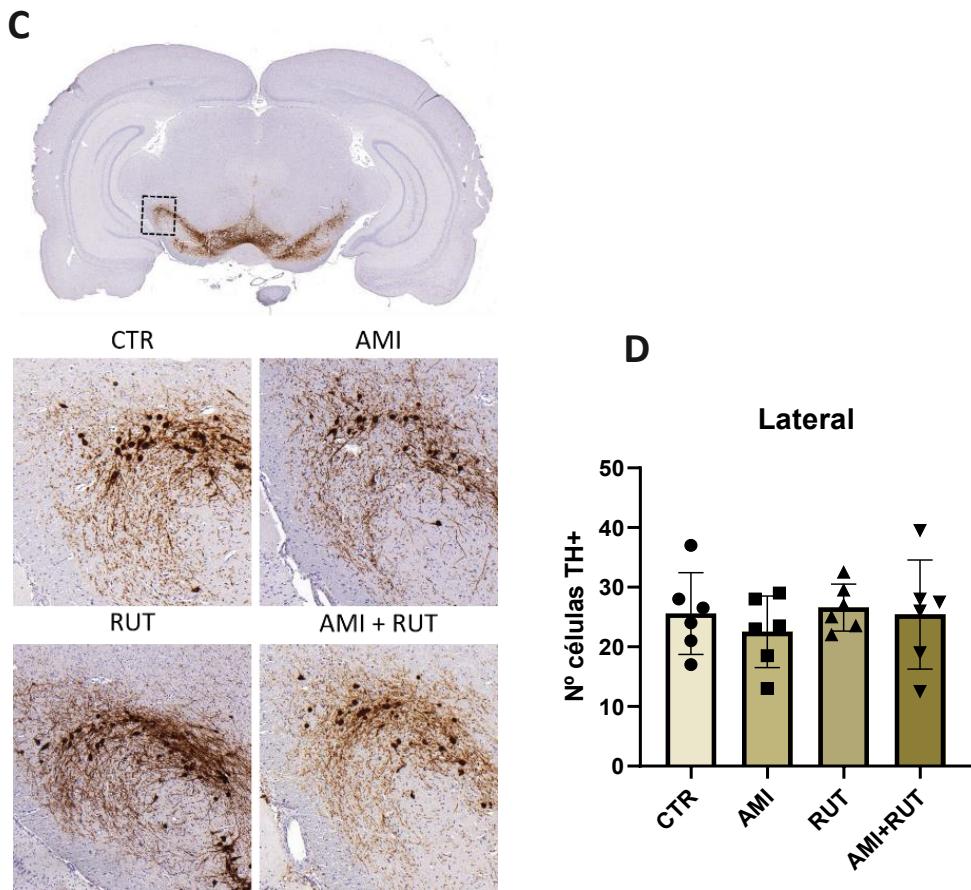


Figura 16. O aminocromo induz degeneração de células dopaminérgicas na área medial da SNpc. (A) e (C) Imagens representativas da imunohistoquímica para neurônios TH<sup>+</sup> na área medial e lateral da SNpc respectivamente. Grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina) (Ampliação 20x). (B) Quantificação de células TH<sup>+</sup> na área medial da SNpc de ratos com redução significativa de neurônios imunorreativo no grupo AMI em comparação ao grupo CTR. (D) Quantificação de células TH<sup>+</sup> na área lateral da SNpc de ratos. As barras representam os valores de mediana para um N de 5 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. (\*) representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR.

### 6.7 O aminocromo não induzi perda de células TH<sup>+</sup> na SNr dos animais.

A análise imuno-histoquímica da SN reticulata – CTR = 3,375; AMI = 0,2500; RUT = 4,375; e AMI+RUT = 1,250;  $p > 0,05$ – não revelou efeito citotóxico do aminocromo para células TH<sup>+</sup> aos 21 dias de experimentação (Figura 17). Os dados analisados, embora não apresentem diferença estatística, indicam uma redução sutil do número de neurônios dopaminérgicos residentes da SNr dos animais lesionados com aminocromo, quando comparado aos animais controle e rutina.

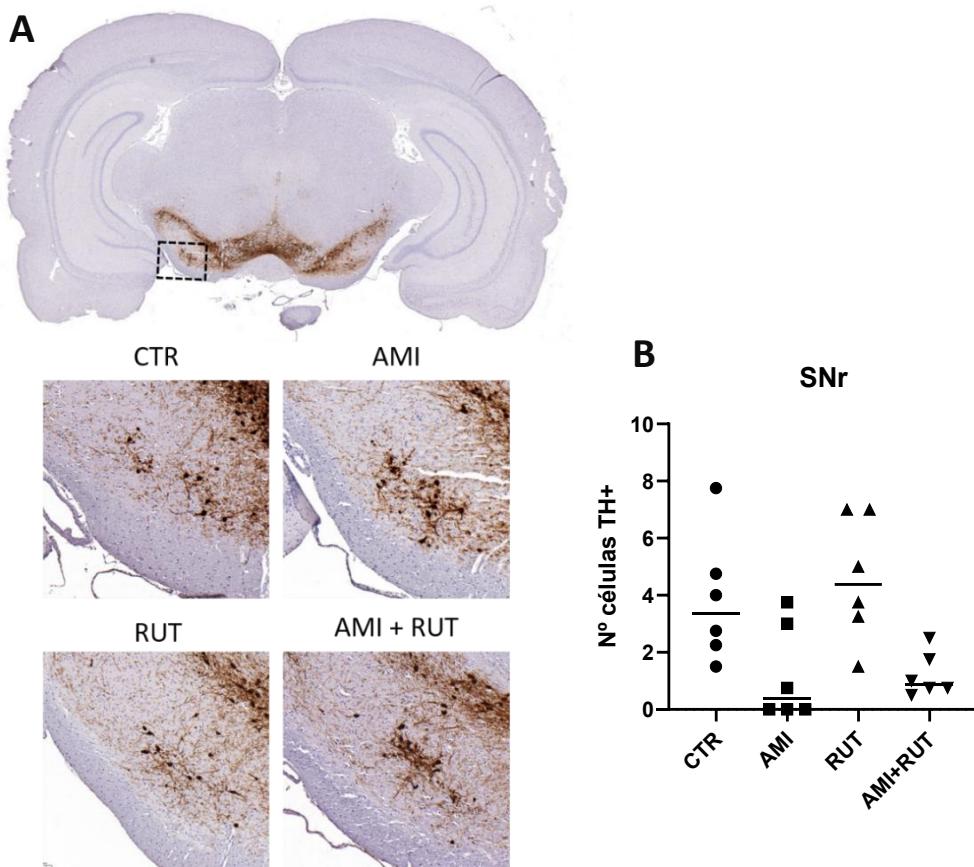


Figura 17. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão de células TH<sup>+</sup> na substância nigra reticulada de ratos com 21 dias de experimentação. (A) Imagens representativas de imunohistoquímica para neurônios TH<sup>+</sup> na SN reticulada de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 20x). (B) quantificação de células TH<sup>+</sup> na SN reticulada. As barras representam os valores de mediana para um N de 6 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 6.8 O aminocromo não induziu perda de células TH<sup>+</sup> na VTA dos animais.

A análise imuno-histoquímica da VTA (Figura 18), demonstrou que os neurônios dopaminérgicos residentes dessa região se mostraram resistentes à injeção de aminocromo, não sendo evidenciado nenhuma alteração significativa no número de células TH<sup>+</sup> para os diferentes grupos – CTR =  $120,2 \pm 17,9$ ; AMI =  $119,8 \pm 12,8$ ; RUT =  $125,3 \pm 15,6$ ; e AMI+RUT =  $125,8 \pm 16,7$ ;  $p > 0,05$ .

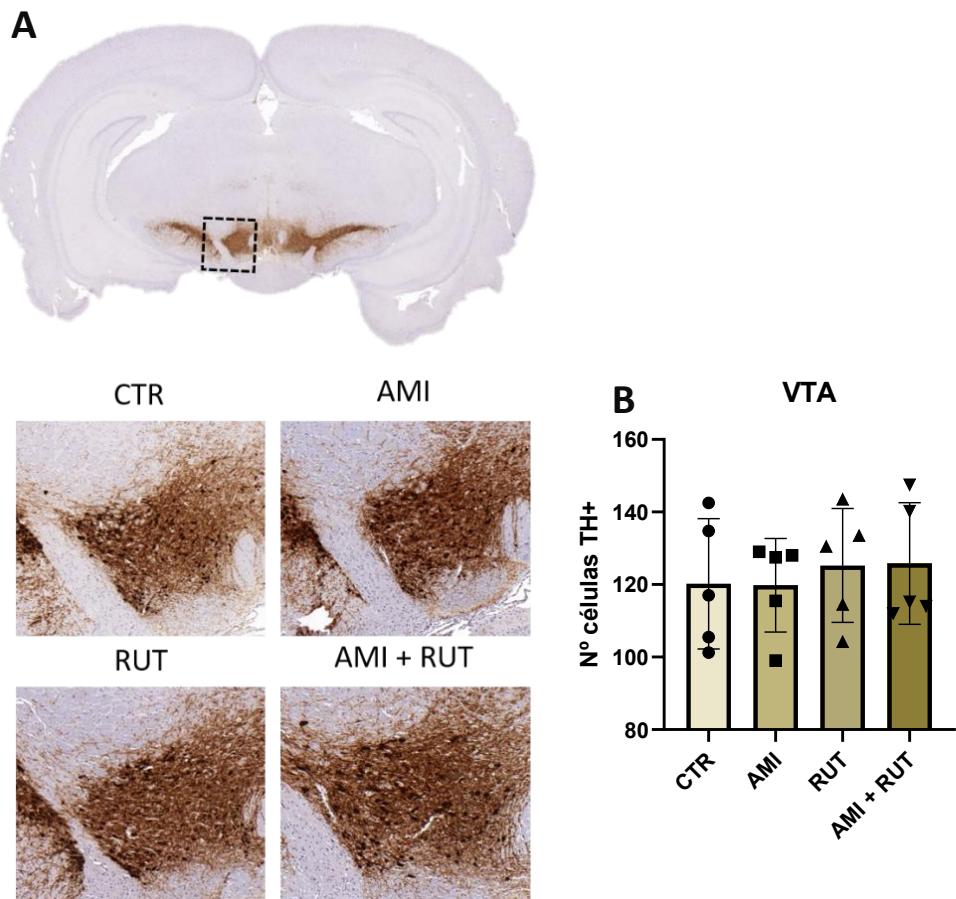


Figura 18. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão de células TH<sup>+</sup> na VTA de ratos com 21 dias de experimentação. (A) Imagens representativas de imunohistoquímica para neurônios TH<sup>+</sup> na VTA de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 20x). (B) quantificação de células TH<sup>+</sup> na VTA. As barras representam os valores de mediana para um N de 5 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 6.9 O aminocromo induz perda de células TH<sup>+</sup> predominantemente na região caudal da SNpc

As regiões rostral e caudal da SNpc foram selecionadas para quantificação de células TH<sup>+</sup>, separadamente, de acordo com a figura 19. Cinco secções anteriores a região médio-rostral foram quantificadas para determinação do número de células dopaminérgicas da região rostral. O mesmo foi realizado para quantificação de células TH<sup>+</sup> da região caudal, considerando 5 secções posteriores a região médio-caudal.

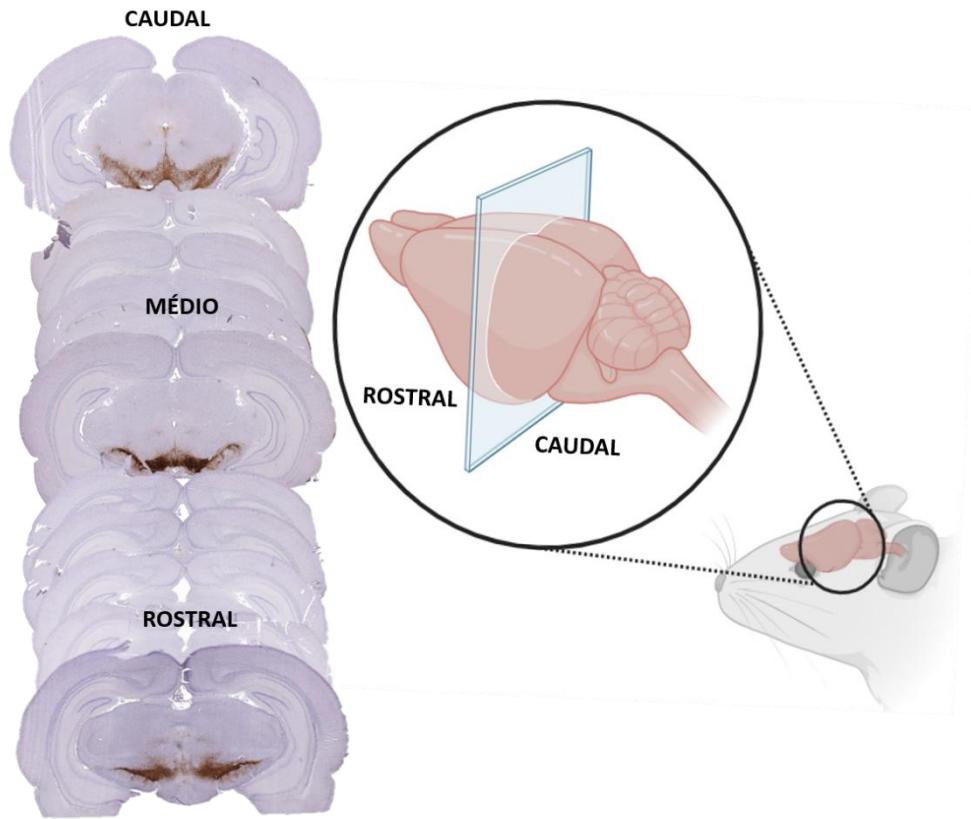


Figura 19. Imagens imuno-histoquímicas de células TH<sup>+</sup> delimitando a região rostral, médio e caudal da SNpc (Autoria própria).

Os dados da quantificação de células TH<sup>+</sup> na área rostral e caudal da SNpc revelaram que as células dopaminérgicas da região caudal, mais especificamente após o terceiro par do nervo craniano, foram mais sensíveis ao efeito citotóxico do aminocromo aos 21 dias de experimentação — CTR = 110,8; AMI = 66,0; RUT = 112,0; e AMI+RUT = 87,50; p = 0,0416 (Figura 20 A). Para a quantificação das células da região rostral da SNpc, não foram evidenciadas diferenças significativas — CTR =  $134,1 \pm 14,98$ ; AMI =  $123,6 \pm 34,93$ ; RUT =  $137,6 \pm 14,09$ ; e AMI+RUT =  $108,5 \pm 30,60$ ; p > 0,05 (Figura 20 B).

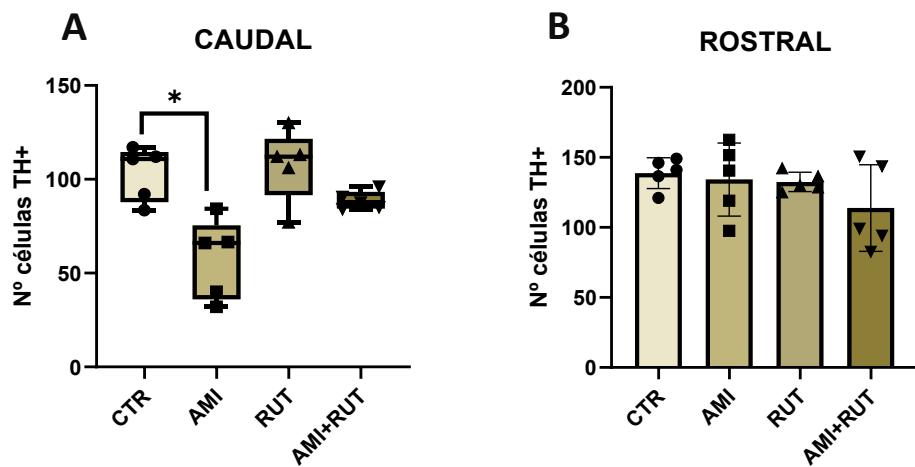


Figura 20. O aminocromo induz degeneração de células dopaminérgicas na região caudal da SNpc. Grupos CTR (controle), AMI (aminocromo), RUT (rutina) e AMI + RUT (aminocromo + rutina). (A) Quantificação de células TH<sup>+</sup> na região caudal da SNpc de ratos com redução significativa de neurônios imunorreativo no grupo AMI em comparação ao grupo CTR. (B) Quantificação de células TH<sup>+</sup> na região frontal da SNpc dos ratos. As barras representam os valores de mediana para um N de 5 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. (\*) representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR.

### 6.10 Aminocromo não altera a expressão de células SOX10<sup>+</sup> na SNpc e estriado dos animais.

O efeito do aminocromo em oligodendrócitos não foi relatado anteriormente. Por esta razão, realizamos marcação imuno-histoquímica no mesencéfalo (abrangendo toda a região da SNpc de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986)) para o fator de transcrição SOX10<sup>+</sup>. O resultado da quantificação de células SOX10<sup>+</sup> total na SNpc demonstrou que não houve diferença entre os grupos testados aos 21 dias pós-lesão com aminocromo — CTR =  $647,2 \pm 71,26$ ; AMI =  $687,1 \pm 83,92$ ; RUT =  $643,1 \pm 49,71$ ; e AMI + RUT =  $643,3 \pm 100,6$ ;  $p > 0,05$  (Figura 21A e B).

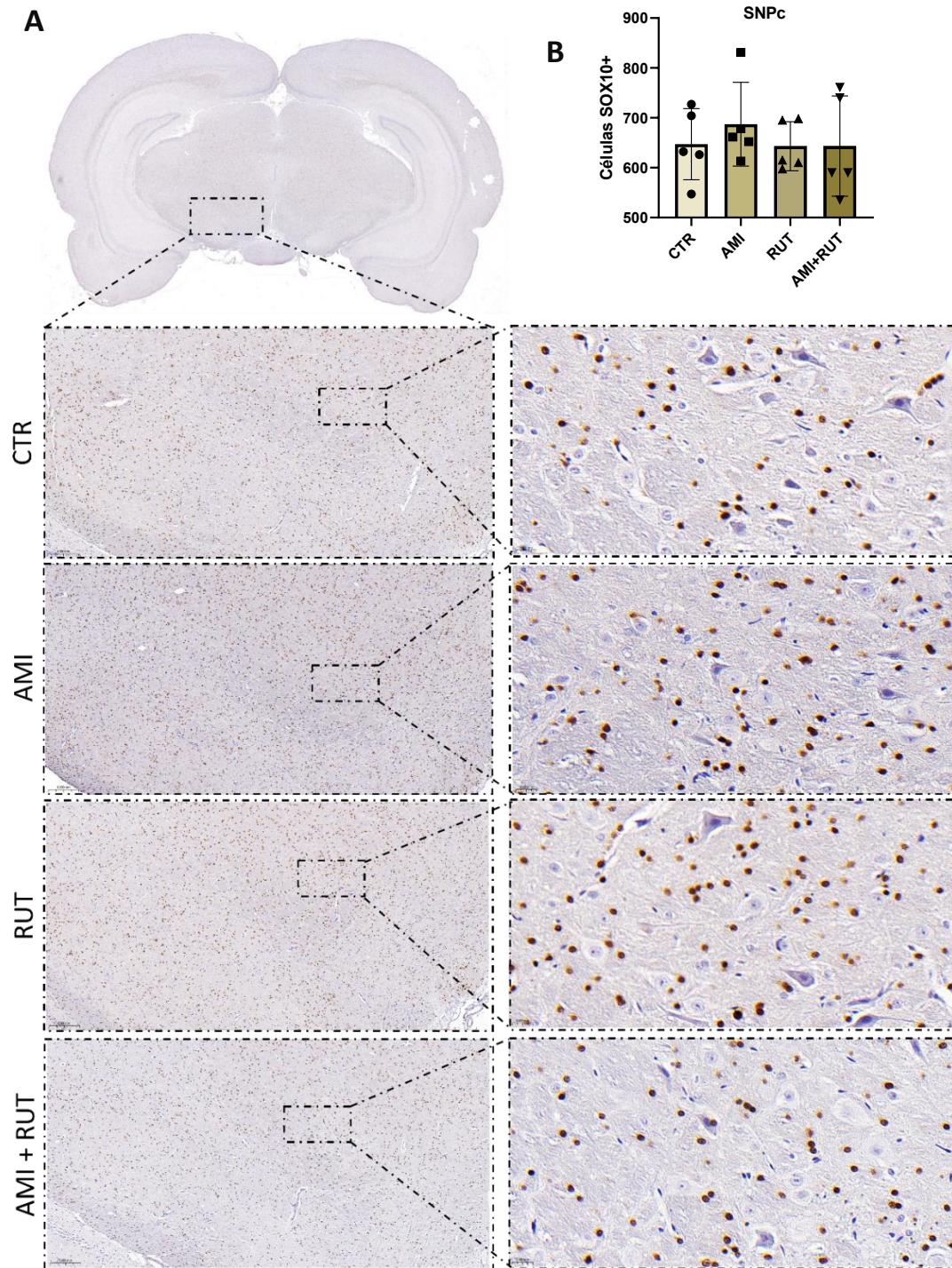


Figura 21. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão da proteína SOX10<sup>+</sup> na SNpc de ratos. Gráfico representa dados da expressão numérica da proteína após 21 dias de experimentação. (A) Imagens representativas da imunohistoquímica para células SOX10<sup>+</sup> no mesencéfalo de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 20x). Todos os pontos de coloração amarronzada (devido ao cromógeno DAB) são células positivas para células SOX10<sup>+</sup> no mesencéfalo de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 20x). Todos os pontos de coloração amarronzada (devido ao cromógeno DAB) são células positivas para o SOX10<sup>+</sup>. (B) Quantificação de células SOX10<sup>+</sup> na SNpc dos animais. As barras representam os valores de mediana para um N de 6 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise paramétrica one way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de análise post hoc de Tukey. Valores de p ≤ 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

Em adição às análises de expressão da proteína SOX10<sup>+</sup> na SNpc, também foi quantificado o número dessas células na região ipsilateral do estriado, região onde ocorreu a injeção do aminocromo no encéfalo dos animais. De maneira similar, as células imunorreativas SOX10<sup>+</sup> não apresentaram diferença estatística entre os grupos testados — CTR = 701,9 ± 128,1; AMI = 639,1 ± 66,35; RUT = 755,5 ± 152,9; e AMI + RUT = 584,7 ± 213,2; p > 0,05 (Figura 22A e B).

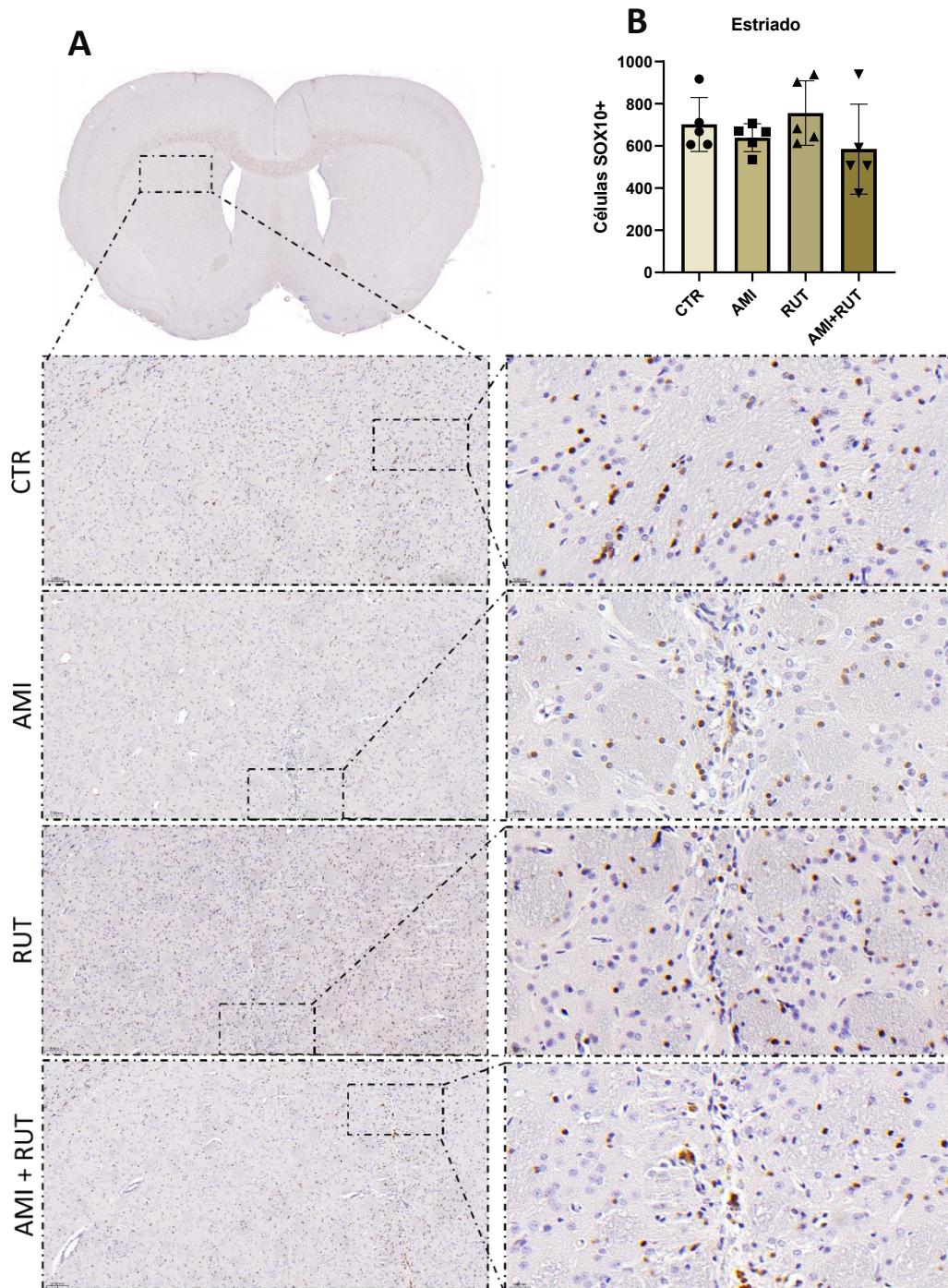
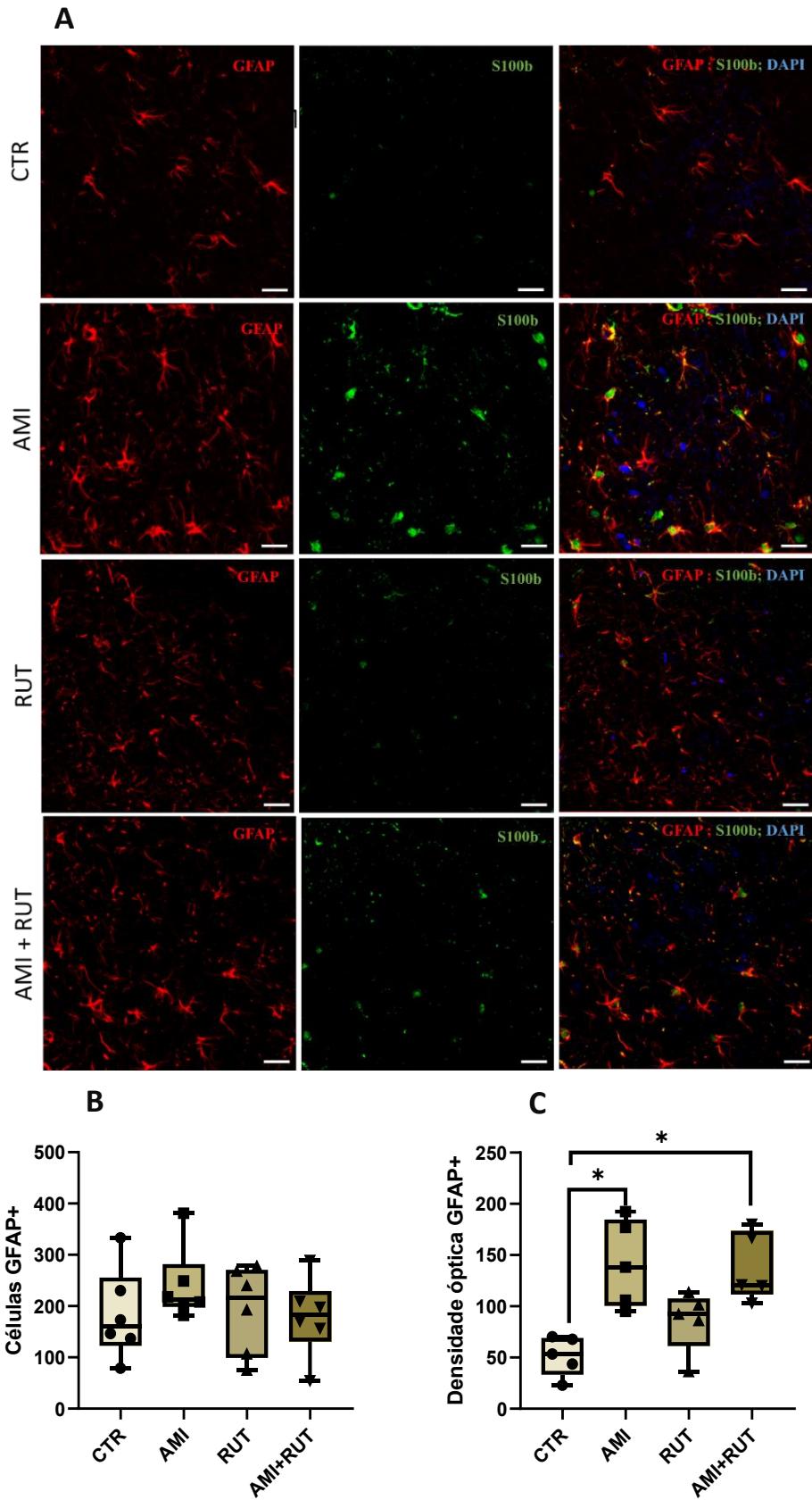


Figura 22. Exposição ao aminocromo e/ou rutina não altera o padrão de expressão da proteína SOX10<sup>+</sup> no estriado de ratos. Gráfico representa dados da expressão numérica da proteína após 21 dias de experimentação. (A) Imagens representativas da imunohistoquímica para células SOX10<sup>+</sup> no estriado de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 20x). Todos os pontos de coloração amarronzada (reação ao cromógeno DAB) são células positivas para o SOX10<sup>+</sup>. (B) Quantificação de células SOX10<sup>+</sup> no estriado dos animais. As barras representam os valores de média + desvio padrão para um N de 5 animais por grupo. A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise paramétrica one way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de análise post hoc de Tukey. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### **6.11 Aminocromo induz reatividade astrocitária na SNpc dos animais.**

A reatividade astroglial induzida pelo aminocromo foi analisada utilizando a marcação imunofluorescente para GFAP<sup>+</sup> e S100b<sup>+</sup> (Figura 23A). A SNpc foi delimitada seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986). Os dados da quantificação de células GFAP<sup>+</sup> não evidenciaram alteração significativa entre os grupos testados — CTR = 159,8; AMI = 213,0; RUT = 216,3; AMI + RUT = 183,8;  $p > 0,05$ . Por outro lado, os dados de densidade óptica baseada na análise da intensidade de fluorescência emitida pelas células imunorreativas GFAP<sup>+</sup>, demonstrou uma diferença estatística significativa quando os grupos que receberam injeção de aminocromo — grupo AMI = 138,2;  $p = 0,0166$  e AMI+RUT = 120,9;  $p = 0,0139$  — foi comparado ao grupo CTR = 53,50. O grupo RUT (92,40) não apresentou diferença estatística (Figura 23 B e C).

Os dados da análise da ativação astrocitária baseada na quantificação de células com expressão colocalizada do GFAP<sup>+</sup> e S100b<sup>+</sup> no grupo AMI (103,5) foi significativamente aumentada quando comparada ao grupo AMI + RUT (44,75;  $p = 0,0329$ ). Os grupos CTR (51,50) e RUT (33,50) não apresentaram diferenças estatisticamente significante (Figura 23 D). Para confirmar os resultados da quantificação manual de células GFAP<sup>+</sup> e S100b<sup>+</sup>, foi realizada uma análise de densidade óptica baseada na intensidade de fluorescência emitida por estas células. Os resultados demonstraram que o grupo AMI (76,95;  $p = 0,0027$ ) mais uma vez apresentou aumento da densidade óptica quando comparado ao grupo CTR (15,85), mas sem diferença para os demais grupos — RUT (19,00) e AMI + RUT (33,05) (Figura 23 E). Além disto, a razão S100b<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> — proporção de células que expressam S100b<sup>+</sup> em relação às que expressam GFAP — também foi estabelecida. Embora o grupo AMI (0,423) tenha apresentado um aumento do número de células S100b<sup>+</sup> em relação a GFAP<sup>+</sup> quando comparado aos demais grupos (CTR = 0,348; RUT = 0,322; e AMI+RUT = 0,245;  $p > 0,056$ ), não foi observado nenhuma alteração estatisticamente significante.



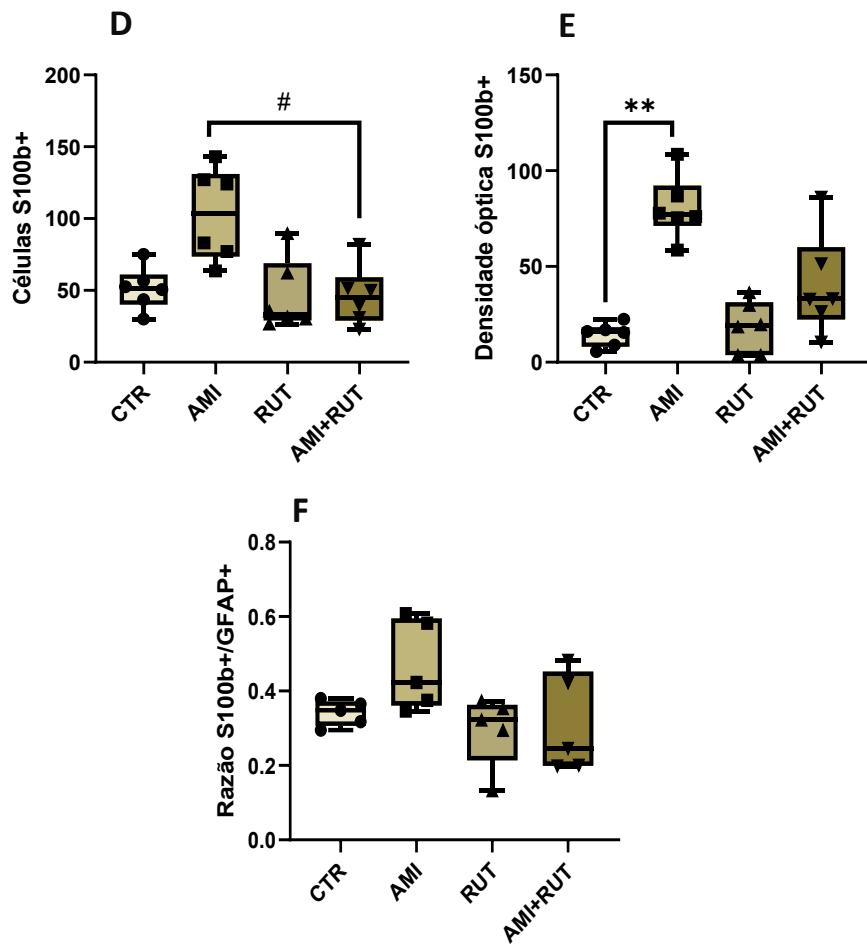
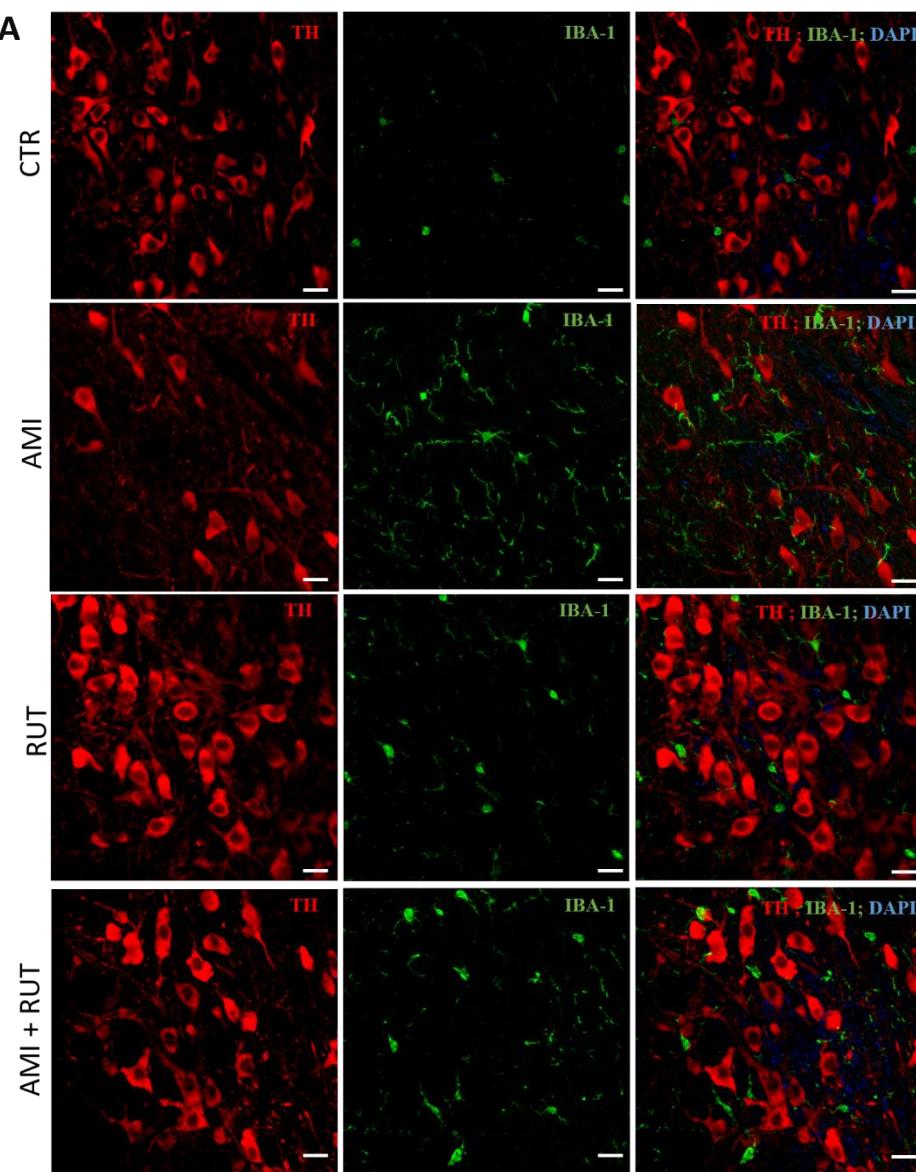


Figura 23. Exposição ao aminocromo e/ou rutina altera o padrão de expressão das proteínas GFAP<sup>+</sup> e S100b<sup>+</sup> na região da SNpc de ratos. Gráficos representam dados da expressão numérica e da densidade óptica das proteínas após 21 dias de experimentação. A) Imagens confocais com dupla imunofluorescência para S100b<sup>+</sup> verde e GFAP<sup>+</sup> vermelho em cortes coronais na SNpc de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 63x). (B) Quantificação de células GFAP<sup>+</sup>; (C) Análise da densidade óptica média GFAP<sup>+</sup>; (D) Quantificação de células S100b<sup>+</sup>; (E) Análise de densidade óptica média S100b<sup>+</sup>; (F) Análise da razão S100b<sup>+/</sup>GFAP<sup>+</sup>. As barras representam os valores de mediana para um N de 5 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. (\*) e (\*\*) representam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR e (#) representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo AMI.

### 6.12 Aminocromo induz reatividade microglial na SNpc dos animais.

A análise de reatividade microglial após os 21 dias de lesão do aminocromo, foi realizada a partir de imunofluorescência do mesencéfalo (na região da SNpc de acordo com as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (1986)) utilizando a molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1 (IBA-1) (Figura 27). Ademais, foi realizada análise de interação entre contatos de células dopaminérgicas (TH<sup>+</sup>) e células microgliais (IBA-1<sup>+</sup>), uma vez que a formação de contatos entre células é um evento importante que precede a degeneração neuronal (Figura 24).

Os dados analisados apontam para uma toxicidade dopaminérgica estatisticamente significante do aminocromo ( $7,65 \pm 2,9$ ;  $p = 0,044$ ) quando comparado ao grupo CTR ( $15,5 \pm 4,2$ ). A expressão de células TH<sup>+</sup> não foi alterada para os grupos RUT ( $13,9 \pm 7,3$ ) e AMI+RUT ( $12,3 \pm 5,507$ ) (Figura 24 B). Em relação a expressão de IBA-1<sup>+</sup>, o grupo AMI ( $17,7$ ;  $p = 0,0414$ ) apresentou expressão significativamente alterada quando comparada ao grupo CTR ( $11,0$ ), evidenciando reatividade microglial como indicador de neuroinflamação nos animais a longo prazo. Os grupos RUT ( $16,5$ ) e AMI+RUT ( $15,5$ ), por sua vez, não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 24 C).



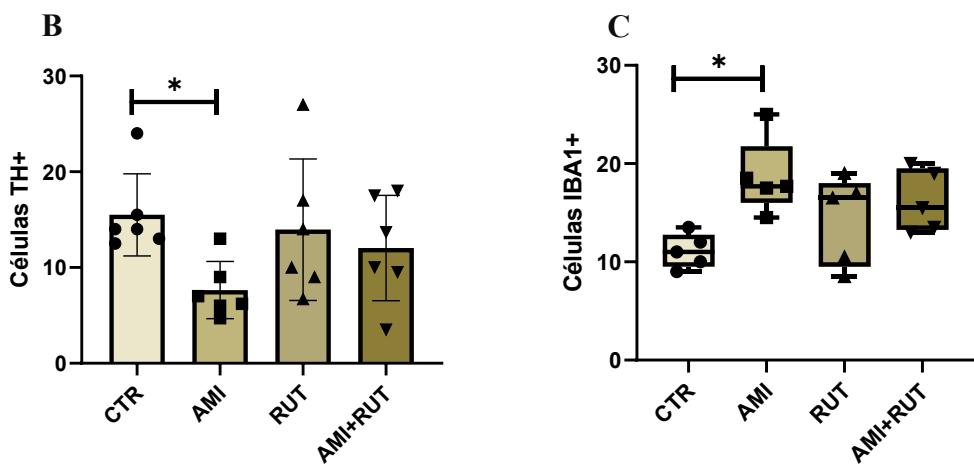


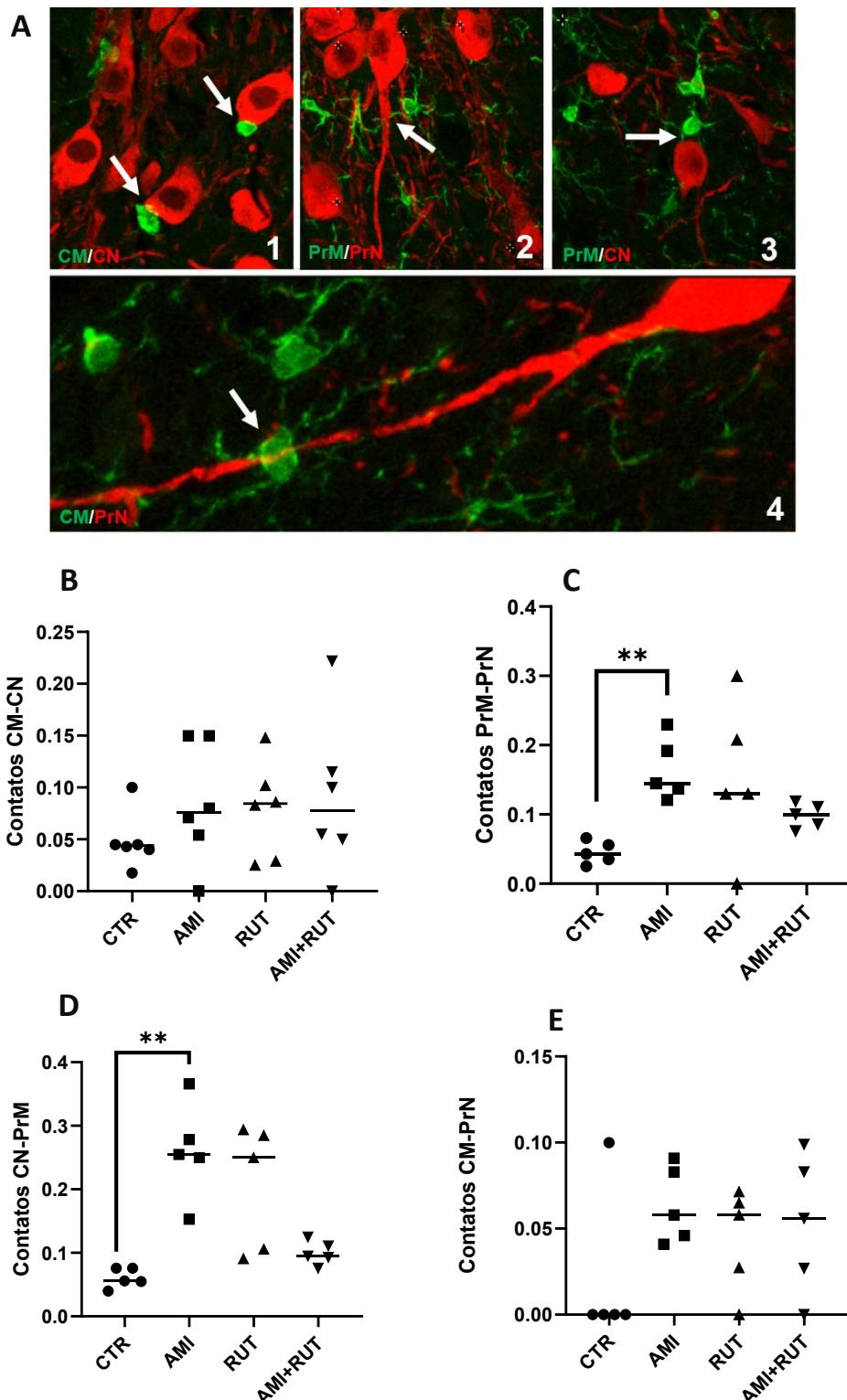
Figura 24. Exposição ao aminocromo altera o padrão de expressão das proteínas TH<sup>+</sup> e IBA1<sup>+</sup> na região da SNpc de ratos. Gráficos representam dados da expressão numérica das proteínas após 21 dias de experimentação. (A) Imagens confocal com dupla imunofluorescência para IBA-1<sup>+</sup> verde e TH<sup>+</sup> vermelho em cortes coronais na SNpc de ratos injetados com: solução salina (CTR), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT) (Ampliação 63x). (B) Quantificação de células TH<sup>+</sup> na SNpc de ratos. (C) Quantificação de células IBA-1<sup>+</sup> na SNpc de ratos. As barras representam os valores de mediana para um N de 5 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise paramétrica one-way ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de análise post hoc de Tukey ou do teste Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. (\*) representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR.

### 6.13 Aminocromo induz aumento do número de interações microglia-neurônio na SNpc dos animais.

A análise dos contatos microglia-neurônio após indução de dano com o aminocromo pode revelar informações valiosas sobre o processo de eliminação neuronal mediada pela microglia. As análises concentraram-se na medição do número de interações entre o prolongamento da microglia/corpo neuronal (CN-PrM); prolongamento da microglia/prolongamento neuronal (PrM-PrN); contatos entre o corpo celular microglial/prolongamento neuronal (CM-PrN); e contato entre o corpo celular microglial/corpo celular neuronal (CM-CN), evidenciados através de imagem confocal na figura 25A.

Os dados foram gerados considerando o número total de células TH<sup>+</sup>. Após finalizado as análises, foi observado uma tendência no aumento de contatos CM-CN para os grupos AMI (0,075%), RUT (0,084%) e AMI+RUT (0,07%), quando comparado ao grupo CTR (0,044%;  $p > 0,05$ ), embora sem diferença estatística (Fig. 25B). Os contatos entre os prolongamentos de ambas as células apresentaram valores estatisticamente significante em relação ao grupo controle — CTR (mediana = 0,04%); AMI (0,145%); RUT (0,130%); e AMI+RUT (0,1000%;  $p = 0,009$ ) (figura 25C). As análises dos contatos CN-PrM evidenciaram uma diferença estatística entre o grupo AMI (0,255%) quando comparado ao grupo CTR (0,056%;  $p = 0,003$ ).

(figura 25D). Sobre as interações entre CM-PrN, não foram observadas alterações significativas — CTR (0,0%) (figura 25D); AMI (0,058%); RUT (0,058%); e AMI+RUT (0,056%);  $p > 0,05$  (figura 25E). A soma de todos os contatos por número de células TH<sup>+</sup> apresentou diferença significante entre o grupo AMI (0,58 %) e o grupo CTR (0,15%);  $p = 0,0066$ . Os demais grupos não apresentaram diferenças significantes — RUT (0,55%) e AMI+RUT (0,33%) (figura 25F).



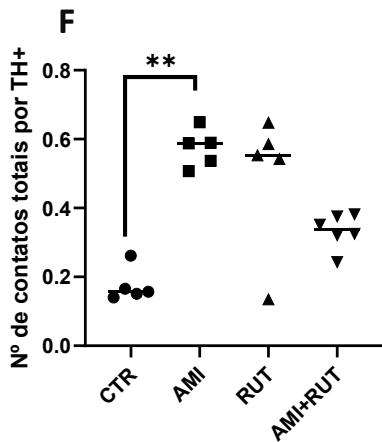


Figura 25. O aminocromo aumentou o número de interações entre células microgliais e neuronais. (A) Imagem confocal mostrando células microgliais (verde) em contato com neurônios dopaminérgicos (vermelho). As setas brancas indicam um contato entre micróglio e neurônio. (A1) Um corpo celular microglial em contato com um corpo celular de um neurônio dopaminérgico (CM-CN); (A2) Um neurito de célula microglial em contato com um neurito dopaminérgico (PrM-PrN); (A3) Um neurito de célula microglial em contato com um corpo dopaminérgico (CN- PrM); (A4) Um corpo celular microglial em contato com um neurito dopaminérgico (CM-PrN). (B) Quantificação do número de interações CM-CN. (C) Quantificação do número de interações PrM-PrN. (D) Quantificação do número de interações CN/ PrM. (E) Quantificação do número de interações CM-PrN. (F) Quantificação do total de contatos em relação ao número total de neurônios imunorreativos TH<sup>+</sup>. Os valores foram estabelecidos em relação ao número total de células TH<sup>+</sup>. Grupos experimentais: solução salina (CT), aminocromo (AMI), rutina (RUT) e aminocromo + rutina (AMI + RUT). As barras representam os valores de mediana para um N de 5 ou 6 animais por grupo. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste de análise não paramétrica Kruskal-Wallis seguido de pós-teste Dunn's Multiple Comparison Test. (\*) representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao grupo CTR.

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo, alterações comportamentais e histológicas associadas aos estágios iniciais da DP foram caracterizadas em um modelo de degeneração dopaminérgica unilateral induzido por injeção de aminocromo no estriado de ratos Wistar. Em adição, o efeito neuroprotetor do flavonoide rutina frente às alterações induzidas pelo aminocromo também foi demonstrado.

Neste estudo, as alterações comportamentais motoras e não motoras foram avaliadas através do teste do campo aberto, do cilindro e do labirinto em cruz elevado. Até o presente momento, apenas dois estudos experimentais avaliaram as alterações motoras em modelo animal de DP induzido por aminocromo. Díaz-Véliz e colaboradores (2002) foram os pioneiros na caracterização das alterações comportamentais associadas à injeção unilateral do aminocromo (1,2 nM) na SNpc. Eles demonstraram uma assimetria motora significativa em ratos, observada sete dias após uma cirurgia estereotáxica, mediante administração subcutânea de apomorfina, um agonista dopaminérgico. Quatorze anos se passaram até um novo estudo confirmar os achados de Díaz-Véliz. No novo estudo, Herrera e colaboradores (2016) injetaram unilateralmente 1,6 nmol de aminocromo no estriado de ratos Wistar e observaram o mesmo efeito induzido pela apomorfina após 7, 14, 21 e 28 dias da cirurgia estereotáxica. O teste rotacional com apomorfina é considerado o padrão-ouro para a avaliação do desempenho motor em roedores. Essa metodologia permite identificar lesões unilaterais no sistema dopaminérgico nigroestriatal, caracterizando-se pela resposta dos animais, que, quando lesionados, exibem rotações na direção contralateral à lesão após uma injeção aguda de apomorfina, um agonista dopaminérgico (WINKLER; WEISS, 1986). Os resultados evidenciados por Díaz-Véliz (2002) e Herrera (2016) são achados de grande relevância por confirmar o potencial do aminocromo em estabelecer lesões motoras em modelos pré-clínicos da DP.

O teste de campo aberto é uma ferramenta convencional, utilizada há décadas para avaliar a atividade motora, comportamentos de natureza ansiosa e padrões estereotipados em roedores, incluindo comportamentos de autolimpeza (KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019; LIEBSCH; MONTKOWSKI; HOLSBOER; LANDGRAF, 1998). Quando preferem explorar mais perto das paredes e ficam limitados a periferia do aparato, os ratos estão exibindo um comportamento conhecido como tigmotaxia (tendência em permanecer perto das paredes), um sinal interpretado como comportamento do tipo ansioso. Em contraste, animais sem alterações nos circuitos cerebrais associadas à ansiedade, passam mais tempo na área central aberta da caixa e realizam naturalmente a exploração do aparato (BALE; CONTARINO; SMITH; CHAN *et al.*, 2000; CRAWLEY, 1985; KRAEUTER; GUEST; SARNYAI, 2019). Díaz-Véliz e

colaboradores (2002), demonstraram que, embora a lesão dopaminérgica tenha sido verdadeiramente comprovada com o teste da apomorfina, não foram observados efeitos significativos da injeção intranigral do aminocromo sobre a atividade motora espontânea no campo aberto após 14 dias da cirurgia estereotáxica. Nossos resultados foram semelhantes aos observados por Díaz-Véliz e colaboradores (2002), uma vez que também não revelaram alteração comportamental com significância estatística em nenhum dos parâmetros avaliados — frequência de entrada e tempo de permanência nos quadrantes centrais e periféricos e distância percorrida no aparato pelos animais.

Além de avaliar a locomoção dos animais, o teste do campo aberto também é uma ferramenta útil para analisar a atividade vertical, que inclui grooming — em que o animal se envolve em atividades de limpeza do próprio corpo — e rearing — no qual o animal fica temporariamente apoiado nas patas traseiras enquanto explora o ambiente novo. Dessa forma, foi possível obter informações adicionais sobre o estado de saúde geral e o bem-estar dos animais (LEVER; BURTON; O'KEEFE, 2006). As análises da frequência de esticadas no campo aberto evidenciaram que os animais lesionados com aminocromo apresentaram uma redução do comportamento exploratório vertical e de interesse (rearing), quando comparado ao grupo controle e ao grupo aminocromo administrado com rutina durante 21 dias. Vale destacar que a dopamina desempenha um papel fundamental na motivação e no interesse em explorar algo novo, o que nos permite inferir que o aminocromo pode estar reduzindo a liberação de dopamina na fenda sináptica e, consequentemente, provocando a interrupção da sinalização dos receptores de dopamina (D1 — associado principalmente à sensação de recompensa e prazer — e D2 — que regula aspectos de motivação e comportamento compulsivo). Desta maneira, o aminocromo contribui para os sintomas de apatia, depressão e anedonia (incapacidade de sentir prazer), que são comuns em distúrbios dopaminérgicos (COOLS; D'ESPOSITO, 2011; GERFEN; SURMEIER, 2011; MARTEL; GATTI MCARTHUR, 2020).

De maneira similar, os dados do comportamento de autolimpeza mostraram uma diminuição da frequência de grooming para os animais do grupo aminocromo quando comparado aos animais do grupo controle. Animais lesionados com aminocromo, mas tratados com rutina, por sua vez, não apresentaram alterações relacionadas à redução de autolimpeza. Diante deste achado, é possível concluir que a disfunção nigroestriatal induzido pela neurotoxina, mimetiza um padrão associado a depressão e desinteresse pelo autocuidado, sinais muito comuns em pacientes com DP em estágios iniciais. A função estriatal é crucial para coordenar as sequências de limpeza. Particularmente, quando o dano atinge a região dorsolateral do estriado, há uma ruptura perceptível do fluxo de autolimpeza pelos animais

(CROMWELL; BERRIDGE, 1996), que é resultante da interrupção da sinalização dopaminérgica que envolve mais uma vez a ativação dos receptores D1 e D2. O efeito antidepressor evidenciado neste estudo mediado pela rutina, pode ter relação com o aumento dos níveis de serotonina, norepinefrina e dopamina nas regiões corticais e hipocampais do encéfalo dos ratos (FOUDAH; ALQARNI; ALAM; DEVI *et al.*, 2022). Além disso, a rutina é um flavonoide que aumenta a sinalização BDNF/TrkB, capaz de regular o desenvolvimento e a sobrevivência neuronal, a sinaptogênese, a plasticidade, o aprendizado e a memória (SREELATHA; CHOI; LEE; INTURU *et al.*, 2024)

A disfunção dos núcleos da base desencadeia alterações que vão além do desinteresse pela autolimpeza e pela exploração de um ambiente novo. Desequilíbrios na produção e/ou liberação de dopamina em decorrência da degeneração dopaminérgica também influencia diretamente na perda do controle dos movimentos na DP, incluindo a lentidão e/ou o excesso dos movimentos (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989);(MAGNO; COLLODETTI; TENZA-FERRER; ROMANO-SILVA, 2019). Em modelos de DP, onde há lesão unilateral da via dopaminérgica, os animais frequentemente apresentam um comportamento de preferência pelo uso de uma das patas dianteiras, indicando um comprometimento motor assimétrico. Neste estudo, embora não tenha sido observado efeitos significativos do aminocromo na assimetria do uso dos membros anteriores dos animais submetidos ao teste do cilindro, notou-se uma tendência para a diminuição do uso do membro contralateral (comprometido) e uma tendência para o aumento do uso do membro ipsilateral (não comprometido) nos animais do grupo aminocromo quando comparado ao grupo controle.

É concludente que o aminocromo induz perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; CUENCA-BERMEJO *et al.*, 2023) no entanto, há um indicativo de que a morte celular no contexto da DP prodrómica causada pelo aminocromo, seja de forma lenta, afetando um único neurônio por vez (HUENCHUGUALA; SEGURA-AGUILAR, 2024). Isso nos permite concluir que os prejuízos motores induzidos pela toxicidade do aminocromo são sutis e graduais, de maneira que, assim como ocorre na condição humana da DP, o efeito motor significativo só seria proeminente e perceptível com o passar do tempo. A rutina, por sua vez, não alterou o padrão comportamental dos animais no teste do cilindro. Neste sentido, há dois pontos chaves que devem ser melhor investigados no estudo neuroprotector e comportamental da rutina: a utilização de concentrações mais altas do flavonoide, uma vez que alguns efeitos biológicos da rutina, incluindo a inibição do prejuízo motor, é dependente da sua concentração (SUN; LI; DONG; ZHU *et al.*, 2021; YANG; GUO;

YUAN, 2008); ou utilização de nanoformulações que aumentem a biodisponibilidade do flavonoide (NEGAHDARI; BOHLOULI; SHARIFI; MALEKI DIZAJ *et al.*, 2021).

O labirinto em cruz elevado é utilizado para modelar sinais característicos de transtorno de ansiedade em roedores expostos à situações que naturalmente provocariam aversão (HILTON; SIMPSON; SHERMAN; RABY-SMITH *et al.*, 2023). No teste, avaliou-se os sinais que poderiam ser interpretados como agorafobia semelhante à ansiedade, mais precisamente quando os animais evitavam frequentar e/ou passar tempo nos braços abertos do aparato (WALF; FRYE, 2007). Os dados obtidos durante as análises do labirinto em cruz elevado, evidenciaram que o grupo de animais lesionado com o aminocromo transitou significativamente menos por ambos os braços do labirinto em cruz elevado quando comparado ao grupo controle. Este achado confirma que o aminocromo impacta diretamente na locomoção e no comportamento exploratório dos animais. No que concerne ao interesse e à frequência de entradas no braço aberto, evidenciou-se que os animais do grupo aminocromo frequentaram menos este braço quando comparado aos demais grupos. Os animais lesionados com aminocromo, porém tratados com a rutina, por sua vez, frequentou significativamente mais o braço aberto quando comparado ao grupo controle, bem como, passou menos tempo no braço fechado. Estes dados em conjunto corroboram com resultados apresentados por Foudah (2022) e Schatzberg (2015), que evidenciaram efeito do tipo antidepressivo e ansiolítico da rutina, além de prevenir o déficit motor em animais (NICOLA; ATTAII; ABDEL-RAHEEM; MOHAMMED *et al.*, 2024; SUGANYA; SUMATHI, 2017). Nossa hipótese é que o aminocromo limita a disponibilidade de dopamina na fenda sináptica e, consequentemente, altera a atividade exploratória e locomotora dos animais. Isto decorre de danos ao transporte axonal anterógrado, que pode estar associado a montagem prejudicada de microtúbulos e cinesina, bem como a agregação de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulinas (BRICEÑO; MUÑOZ; BRITO; HUENCHUGUALA *et al.*, 2016; PARIS; PEREZ-PASTENE; CARDENAS; ITURRA *et al.*, 2010). A rutina parece promover o efeito inverso, prevenindo a degeneração destas células e estimulando a via dopaminérgica nigroestriatal.

Além da caracterização comportamental, este estudo teve como objetivo avaliar o grau de degeneração dopaminérgica induzido pelo aminocromo em três diferentes regiões do mesencéfalo de ratos Wistar — na SNpc, área mais densamente povoada do cérebro em termos de neurônios dopaminérgicos (ROOSTALU; SALINAS; THORBEK; SKYtte *et al.*, 2019), e a mais impactada pela injeção unilateral de neurotoxinas no estriado; na SNr e na VTA, outras duas regiões onde esses neurônios também podem sofrer degeneração na DP. Coincidindo com o comprometimento da atividade comportamental 21 dias pós-lesão, foi observada uma redução significativa no número de células TH<sup>+</sup> na SNpc dos animais. De Araújo *et al.* (2023)

demonstraram o mesmo efeito neurotóxico 14 dias após a injeção estereotáxica única de aminocromo no estriado de ratos Wistar, permitindo-nos inferir que a degeneração induzida por injeção única de aminocromo permanece detectável por mais tempo, que a observado em estudos conduzidos até o presente momento (DE ARAÚJO; FROTA; DE JESUS; CUENCA-BERMEJO *et al.*, 2023; DÍAZ-VÉLIZ; MORA; DOSSI; GOMEZ *et al.*, 2002; HERRERA; MUÑOZ; PARIS; DÍAZ-VELIZ *et al.*, 2016).

Em humanos a degeneração dopaminérgica afeta de forma predominante os neurônios da SNpc, com uma vulnerabilidade inicial na região dorsolateral da SNpc, especialmente em áreas próximas à região caudal. Essa degeneração tende a se estender progressivamente ao longo do eixo rostrocaudal, abrangendo regiões ventrolaterais à medida que a doença avança, conforme observado em estudos post-mortem de cérebros humanos controles (LU; NEFF; FISCHER; HENZE *et al.*, 2006). Em parte, o padrão de degeneração dopaminérgica que ocorre em humanos também ocorre neste modelo de estudo, uma vez que foi observado populações de células TH<sup>+</sup> menos densas na região caudal da SNpc. Convém destacar que as subdivisões da SNpc — a área dorsolateral (lateral), uma área dorsomedial (medial) e a transição ventral para a pars reticulata — apresentam projeções estriatais e corticais aferentes e eferentes de maneira distintas. Isto pode justificar a diferença na susceptibilidade para degeneração de células TH<sup>+</sup> em regiões específicas da SNpc, uma vez que a vulnerabilidade celular parece ser dependente da área do estriado que foi lesionada (HABER, 2014; HABER; KNUTSON, 2010). Desta maneira, o grau e a área de degeneração dopaminérgica estabelecida na SNpc dos ratos Wistar neste estudo, indicam que o efeito do aminocromo foi decorrente de uma alteração na conexão estriado-SNpc dorso-medial.

Embora neste estudo tenha sido evidenciada uma densidade de células TH<sup>+</sup> mais reduzida na região medial da SNpc, Roostalu et al. (2019) demonstraram que a perda de neurônios TH<sup>+</sup> induzida por MPTP em camundongos pareceu mais pronunciada na região lateral da SNpc. Essa discrepância pode ser explicada devido às diferenças metodológicas dos estudos, uma vez que Roostalu et al. quantificaram células TH<sup>+</sup> através de uma plataforma de escaneamento por imunofluorescência de órgãos inteiros, com alta resolução celular e capacidade para o mapeamento em 3D de todo o cérebro de maneira automatizada, enquanto o presente estudo empregou contagem manual. Além disso, a administração intraperitoneal de MPTP promove uma neurodegeneração mais difusa, afetando preferencialmente a SNpc lateral, enquanto a injeção estriatal unilateral de aminocromo, realizada em três locais distintos do estriado, pode ter induzido um padrão de morte celular mais focal, influenciando a SNpc

medial. Estes achados sugerem que o padrão de neurodegeneração na SNpc varia conforme o modelo experimental e a metodologia empregada.

Neste estudo, além da SNpc, quantificamos células imunorreativas TH<sup>+</sup> na VTA e na SNr. Nessas regiões, o número de células dopaminérgicas permaneceu inalterado, indicando um efeito neurotóxico seletivo do aminocromo sobre os neurônios da região pars compacta, além de diferenças moleculares sutis entre subgrupos de neurônios dopaminérgicos das distintas regiões do mesencéfalo. Enquanto os neurônios dopaminérgicos da SNpc estão fortemente envolvidos no controle do movimento, os neurônios da SNr são predominantemente células de projeção GABAérgica e pobres em neuromelanina, um pigmento que pode estar associado ao aumento da susceptibilidade à neurodegeneração (MORENO-GARCÍA; KUN; CALERO; CALERO, 2021). Os neurônios dopaminérgicos da VTA, por sua vez, são responsáveis pela regulação da recompensa, comportamento emocional e vício. Embora esteja envolvida na fisiopatologia da DP, a presença de distintas populações neuronais residentes na VTA, a menor expressão do transportador de dopamina (DAT) e a baixa densidade de canais de cálcio nessa área (ALBERICO; CASSELL; NARAYANAN, 2015; SURMEIER; SCHUMACKER; GUZMAN; ILIJIC *et al.*, 2017), podem explicar a resistência dessas células aos efeitos do aminocromo. A vulnerabilidade das células da VTA também pode ser dependente da dose da neurotoxina utilizada. TSENG e colaboradores (2006) evidenciou, em um modelo de lesão nigroestriatal induzido por 6-OHDA em rato, que diferentes doses de neurotoxina resultaram em graus variados de lesão a neurônios dopaminérgicos de VTA, demonstrando que a resistência observada neste estudo pode ser reflexo da dose utilizada (TSENG; KARGIEMAN; GACIO; RIQUELME *et al.*, 2005). Assim, o aminocromo exerce um efeito neurotóxico seletivo sobre os neurônios da SNpc, influenciado pela presença de neuromelanina, pela expressão de DAT nas células e pela dose da neurotoxina utilizada.

A magnitude da degeneração de células dopaminérgicas neste modelo de estudo foi observada como um processo focal e gradual, contrastando com os modelos agudos de toxicidade induzidos por 6-OHDA ou MPTP, que promovem um efeito neurotóxico mais expansivo. Há diversos mecanismos pelos quais o aminocromo exerce a sua toxicidade: a partir da formação de adutos com a-syn e indução da formação de oligômeros neurotóxicos (MUÑOZ; CARDENAS; HUENCHUGUALA; BRICEÑO *et al.*, 2015); da interferência na cadeia respiratória mitocondrial, da inibição do complexo I e diminuição significativa na produção de ATP, afetando o transporte vesicular axonal (PARIS PIZARRO; MUÑOZ; HUENCHUGUALA; COUVE *et al.*, 2011); da indução da disfunção da autofagia-lisossomal através do impedimento da formação dos microtúbulos que participam da fusão entre os

vacúolos autofágicos e lisossomos (HUENCHUGUALA; MUÑOZ; ZAVALA; VILLA *et al.*, 2014); ou do estresse do retículo endoplasmático e inibição do proteassoma (XIONG; SIEGEL; ROSS, 2014). Todos os mecanismos mencionados podem mediar a toxicidade focal induzida pelo aminocromo, particularmente em células com deficiência na expressão ou atividade da enzima NQO1, que favorece o acúmulo de maneira individualizada da neurotoxina.

Embora não tenha sido observada diferença estatística no número de células dopaminérgicas TH<sup>+</sup> na SNpc entre o grupo tratado apenas com aminocromo e o grupo tratado com aminocromo e rutina, também não houve diferença significativa entre o grupo aminocromo com rutina e o grupo controle. Esses resultados indicam que a rutina pode ter atenuado a perda de células TH<sup>+</sup> causada pelo aminocromo, aproximando os valores do grupo controle, embora sem significância estatística. O potencial neuroprotetor da rutina frente a toxicidade induzida pelo aminocromo foi discutida recentemente por De Araújo *et al.*, (2023), que demonstraram o potencial antioxidante e anti-inflamatório do flavonoide a partir da regulação dos níveis de mRNA de interleucina-1β (IL-1β), do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e do fator neurotrófico derivado do nervo (NGF). Todos esses eventos estão implicados na neuroproteção da rutina evidenciada em modelos *in vivo* da DP.

Dada a relevância da atividade glial na toxicidade observada em modelos de DP, também investigamos os efeitos do aminocromo e/ou rutina em células da glia. Os astrócitos, as mais numerosas células gliais do SNC, podem desempenhar um papel duplo no contexto das doenças neurodegenerativas, podendo tanto estimular quanto prevenir danos neurais. A perda do equilíbrio entre as funções neurotóxicas ou neuroprotetoras é crucial para o início e progressão da DP (MORALES; SANCHEZ; RODRIGUEZ-SABATE; RODRIGUEZ, 2016), uma vez que os astrócitos podem sofrer uma ativação crônica, tornando-se hipertróficos e reativos. Neste estado, eles liberam substâncias tóxicas que contribuem para a neurodegeneração, perdendo assim suas funções fisiológicas normais e de proteção aos neurônios (SOFRONIEW, 2020). Desta maneira, a reatividade formada em resposta às lesões no SNC está associada à promoção da patogenicidade em consequência do ganho de função tóxica por parte dos astrócitos (PHATNANI; MANIATIS, 2015). De Araújo *et al.*, (2023) observou um aumento da reatividade astrocitária marcada por co-expressão dos marcadores GFAP<sup>+</sup> e S100b<sup>+</sup> na SNpc dos animais no 14º dia após injeção estereotáxica do aminocromo. De maneira similar, nossos resultados sustentaram a hipótese de que o aminocromo é indutor de uma reatividade astrocitária capaz de acompanhar o processo neurodegenerativo mesmo após 21 dias de exposição a neurotoxina. A rutina, por sua vez, reduziu a astrogliese nos grupos que receberam aminocromo, o que indica que a modulação da reatividade astroglial pode ser um dos efeitos neuroprotetores exercidos

pelo flavonoide (MAGALINGAM; RADHAKRISHNAN; RAMDAS; HALEAGRAHARA, 2015).

A ativação neuroinflamatória de células gliais já foi associada à neurotoxicidade induzida por aminocromo 14 dias após a lesão, o que promoveu níveis aumentados de células IBA-1<sup>+</sup>, microglia ativada (IBA-1<sup>+/CD68<sup>+</sup>), bem como níveis aumentados de mRNA de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , NLRP3, CCL5 e CCR2 na SNpc (DE ARAÚJO; FERREIRA; SOUZA; DOS SANTOS *et al.*, 2018). Em parte, nossos resultados foram similares ao de De Araújo (2023), que evidenciaram alta expressão de células IBA-1<sup>+</sup> no grupo aminocromo, quando comparado aos outros grupos. É importante destacar que a reatividade microglial observada no estudo de De Araújo (2023), ocorreu em um período menor do que o analisado neste estudo. Portanto, nossos resultados demonstram que as alterações mais significativas na ativação da microglia e dos astrócitos não só surgem alguns dias após a injeção do aminocromo, mas também se estendem até 21 dias após a lesão. Estes dados coincidem com a correlação entre o número de células IBA1<sup>+</sup> e GFAP<sup>+/S100b<sup>+</sup> na SNpc e a perda de neurônios TH<sup>+</sup> nesta região, sugerindo a importância da resposta glial para a estabilidade do modelo do aminocromo neste estudo. Embora o papel da microglia no contexto das doenças neurodegenerativas seja multifacetado, o reconhecimento dos fenótipos M1 e M2 trouxe novas perspectivas. A polarização excessiva para o fenótipo M1 pode exacerbar a neuroinflamação e prejudicar os neurônios, enquanto a promoção do fenótipo M2 pode mitigar danos neurais e cognitivos (Michels *et al.*, 2020). Assim, a rutina, ao reduzir a reatividade microglial nos grupos tratados com aminocromo, pode estar modulando esses fenótipos, contribuindo para seu efeito neuroprotetor (MICHELS; ABATTI; VIEIRA; ÁVILA *et al.*, 2020).</sup></sup>

O mapeamento dos contatos célula-célula entre neurônios TH<sup>+</sup> e microglia IBA-1<sup>+</sup> neste modelo de estudo também foi avaliado. Após 21 dias da lesão nigroestriatal causada por aminocromo, e apesar da redução no número de neurônios dopaminérgicos, os animais injetados com aminocromo apresentaram um número de contatos significativamente maior entre as células em comparação aos outros grupos, com destaque para os contatos entre as extensões de ambas as células e entre as extensões da microglia e o corpo do neurônio dopaminérgico. O papel da microglia no contexto da neurotoxicidade induzida pelo aminocromo observada neste estudo, parece ser semelhante ao descrito por Virgone-Carlotta e colaboradores, que sugeriram a microglia como célula fundamental na mediação da morte celular programada de neurônios dopaminérgicos em um modelo murino de DP induzido por injeção intraestriatal de 6-OHDA (VIRGONE-CARLOTTA; UHLRICH; AKRAM; RESSNIKOFF *et al.*, 2013). Esses resultados indicam que a neurotoxicidade induzida pelo

aminocromo intensifica os contatos microglia-neurônio, sugerindo um papel crucial da microglia na mediação da morte neuronal programada.

Embora a perda de neurônios dopaminérgicos na DP seja seletiva, há um entendimento crescente de que as células oligodendrocíticas também podem desempenhar um papel na patogênese da DP. A mielinização neuronal foi mencionada como uma condição associada à vulnerabilidade neuronal à patologia de Lewy (ORIMO; UCHIHARA; KANAZAWA; ITOH *et al.*, 2011). Neste estudo, avaliamos o efeito citotóxico do aminocromo na população de células SOX10<sup>+</sup> no SNpc e no estriado, mas nenhuma toxicidade significativa foi observada. Este resultado reforça a hipótese de que o aminocromo pode ser uma toxina que afeta seletivamente os neurônios dopaminérgicos no SNpc. No entanto, como este é o primeiro estudo a investigar o efeito citotóxico do aminocromo em células oligodendrogliais SOX10<sup>+</sup>, é essencial conduzir análises mais detalhadas além dos efeitos citotóxicos induzidos pela neurotoxina. Recentemente, Bae e colaboradores (2023) demonstraram que os oligodendrócitos podem exibir assinaturas moleculares alteradas e específicas de DP em um modelo de camundongo injetado com fibrilas  $\alpha$ -Syn, destacando o envolvimento dessa população de células no processo de morte celular associado à doença (BAE; PéREZ-ACUÑA; RHEE; LEE, 2023).

## 8. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstra que a injeção unilateral de aminocromo no estriado interfere na conexão nigroestriatal, induzindo alterações que mimetizam aspectos de um estágio inicial da DP idiopática. Os déficits motores sutis, a redução da atividade exploratória e de autolimpeza, assim como o comportamento do tipo ansioso observados neste estudo, estão associados à citotoxicidade seletiva para neurônios dopaminérgicos TH<sup>+</sup>, bem como à gliose, caracterizada pela ativação microglial e astrocitária persistente até 21 dias após a lesão. A rutina, por sua vez, exibe potencial neuroprotetor por atenuar o comportamento ansioso e depressor dos animais, além de prevenir a morte expressiva de neurônios dopaminérgicos e reduzir astrogliose. Assim, os modelos de estudo da DP induzidos pelo aminocromo mimetizam um estágio em que as intervenções possíveis podem ser mais eficazes, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens neuroprotetoras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, P.; URRUTIA, P.; TAPIA, V.; VILLA, M. *et al.* The dopamine metabolite aminochrome inhibits mitochondrial complex I and modifies the expression of iron transporters DMT1 and FPN1. **Biometals**, 25, p. 795-803, 2012.
- ALBERICO, S. L.; CASSELL, M. D.; NARAYANAN, N. S. The vulnerable ventral tegmental area in Parkinson's disease. **Basal ganglia**, 5, n. 2-3, p. 51-55, 2015.
- ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in neurosciences**, 12, n. 10, p. 366-375, 1989.
- ANDLAUER, W.; STUMPF, C.; FÜRST, P. Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. **Biochemical pharmacology**, 62, n. 3, p. 369-374, 2001.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: a review. **Jama**, 323, n. 6, p. 548-560, 2020.
- ARRIAGADA, C.; PARIS, I.; SANCHEZ DE LAS MATAS, M. J.; MARTINEZ-ALVARADO, P. *et al.* On the neurotoxicity mechanism of leukoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. **Neurobiol Dis**, 16, n. 2, p. 468-477, Jul 2004.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.-M.; LINDER, T. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology advances**, 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- AZAM, F.; ABODABOS, H. S.; TABAN, I. M.; RFIEDA, A. R. *et al.* Rutin as promising drug for the treatment of Parkinson's disease: An assessment of MAO-B inhibitory potential by docking, molecular dynamics and DFT studies. **Molecular Simulation**, 45, n. 18, p. 1563-1571, 2019.
- BAE, E.-J.; PÉREZ-ACUÑA, D.; RHEE, K. H.; LEE, S.-J. Changes in oligodendroglial subpopulations in Parkinson's disease. **Molecular Brain**, 16, n. 1, p. 65, 2023.
- BALE, T. L.; CONTARINO, A.; SMITH, G. W.; CHAN, R. *et al.* Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nature genetics**, 24, n. 4, p. 410-414, 2000.
- BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M. C. Q. *et al.* Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, 21, n. 6, p. 800-808, 2006.
- BERG, D.; POSTUMA, R. B.; ADLER, C. H.; BLOEM, B. R. *et al.* MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 30, n. 12, p. 1600-1611, 2015.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **The FEBS journal**, 279, n. 7, p. 1156-1166, 2012.

BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **The Lancet**, 397, n. 10291, p. 2284-2303, 2021.

BOLAM, J. P.; HANLEY, J.; BOOTH, P.; BEVAN, M. Synaptic organisation of the basal ganglia. **The Journal of Anatomy**, 196, n. 4, p. 527-542, 2000.

BORGHAMMER, P.; JUST, M. K.; HORSAGER, J.; SKJÆRBÆK, C. *et al.* A postmortem study suggests a revision of the dual-hit hypothesis of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, 8, n. 1, p. 166, 2022.

BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A. C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **SciELO Brasil**. 14: 7-9 p. 2016.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. Neuropathological staging of brain pathology in sporadic Parkinson's disease: separating the wheat from the chaff. **Journal of Parkinson's disease**, 7, n. s1, p. S71-S85, 2017.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; BRATZKE, H.; HAMM-CLEMENT, J. *et al.* Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). **Journal of neurology**, 249, p. iii1-iii5, 2002.

BRAAK, H.; RÜB, U.; GAI, W.; DEL TREDICI, K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. **Journal of neural transmission**, 110, p. 517-536, 2003.

BRICEÑO, A.; MUÑOZ, P.; BRITO, P.; HUENCHUGUALA, S. *et al.* Aminochrome toxicity is mediated by inhibition of microtubules polymerization through the formation of adducts with tubulin. **Neurotoxicity research**, 29, n. 3, p. 381-393, 2016.

BUDZYNSKA, B.; FAGGIO, C.; KRUK-SLOMKA, M.; SAMEC, D. *et al.* Rutin as neuroprotective agent: from bench to bedside. **Current medicinal chemistry**, 26, n. 27, p. 5152-5164, 2019.

BUHIDMA, Y.; RUKAVINA, K.; CHAUDHURI, K. R.; DUTY, S. Potential of animal models for advancing the understanding and treatment of pain in Parkinson's disease. **NPJ Parkinson's disease**, 6, n. 1, p. 1, 2020.

BURRÉ, J.; SHARMA, M.; SÜDHOF, T. C. Cell biology and pathophysiology of  $\alpha$ -synuclein. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 8, n. 3, p. a024091, 2018.

CARTA, A.; BOI, L.; PISANU, A.; PALMAS, M. *et al.* Advances in modelling alpha-synuclein-induced Parkinson's diseases in rodents: Virus-based models versus inoculation of exogenous preformed toxic species. **Journal of Neuroscience Methods**, 338, p. 108685, 2020.

CASCELLA, R.; BIGI, A.; CREMADES, N.; CECCHI, C. Effects of oligomer toxicity, fibril toxicity and fibril spreading in synucleinopathies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 79, n. 3, p. 174, 2022.

CASCELLA, R.; CHEN, S. W.; BIGI, A.; CAMINO, J. D. *et al.* The release of toxic oligomers from  $\alpha$ -synuclein fibrils induces dysfunction in neuronal cells. **Nature communications**, 12, n. 1, p. 1814, 2021.

CASTRO E SILVA, J. H.; SOUZA, J. T.; SCHITINE, C.; JÚNIOR, A. D. F. S. *et al.* Pharmacological Potential of Flavonoids against Neurotropic Viruses. **Pharmaceuticals**, 15, n. 9, p. 1149, 2022.

CERRI, S.; BLANDINI, F. In vivo modeling of prodromal stage of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, 342, p. 108801, 2020.

CHANG, W.-T.; HUANG, S.-C.; CHENG, H.-L.; CHEN, S.-C. *et al.* Rutin and gallic acid regulates mitochondrial functions via the SIRT1 pathway in C2C12 myotubes. **Antioxidants**, 10, n. 2, p. 286, 2021.

CHASTAN, N.; BAIR, W.-N.; RESNICK, S. M.; STUDENSKI, S. A. *et al.* Prediagnostic markers of idiopathic Parkinson's disease: Gait, visuospatial ability and executive function. **Gait & posture**, 68, p. 500-505, 2019.

CHEN, H.; LI, J.; HUANG, Z.; FAN, X. *et al.* Dopaminergic system and neurons: role in multiple neurological diseases. **Neuropharmacology**, p. 110133, 2024.

CHIA, S. J.; TAN, E.-K.; CHAO, Y.-X. Historical perspective: models of Parkinson's disease. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 7, p. 2464, 2020.

CHRISTMANN, A.; GRIES, M.; SCHOLZ, P.; STAHR, P. L. *et al.* The antioxidant Rutin counteracts the pathological impact of  $\alpha$ -synuclein on the enteric nervous system in vitro. **Biological chemistry**, 403, n. 1, p. 103-122, 2022.

COLEMAN, C.; MARTIN, I. Unraveling Parkinson's disease neurodegeneration: does aging hold the clues? **Journal of Parkinson's disease**, 12, n. 8, p. 2321-2338, 2022.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. **Nature Reviews Neuroscience**, 12, n. 6, p. 359-366, 2011.

COOLS, R.; D'ESPOSITO, M. Inverted-U-shaped dopamine actions on human working memory and cognitive control. **Biological psychiatry**, 69, n. 12, p. e113-e125, 2011.

COUCH, J. F.; NAGHSKI, J.; KREWSON, C. F. Buckwheat as a source of rutin. **Science**, 103, n. 2668, p. 197-198, 1946.

COUTO, L. C.; BESAGIO, B. P.; DE ANDRADE, E. C.; CARDOSO, G. G. *et al.* Doença de Parkinson: epidemiologia, manifestações clínicas, fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Brazilian Journal of Health Review**, 6, n. 4, p. 18331-18342, 2023.

CRAMB, K. M.; BECCANO-KELLY, D.; CRAGG, S. J.; WADE-MARTINS, R. Impaired dopamine release in Parkinson's disease. **Brain**, 146, n. 8, p. 3117-3132, 2023.

CRAWLEY, J. N. Exploratory behavior models of anxiety in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 9, n. 1, p. 37-44, 1985.

CROMWELL, H. C.; BERRIDGE, K. C. Implementation of action sequences by a neostriatal site: a lesion mapping study of grooming syntax. **Journal of Neuroscience**, 16, n. 10, p. 3444-3458, 1996.

CUEVAS, C.; HUENCHUGUALA, S.; MUÑOZ, P.; VILLA, M. *et al.* Glutathione transferase-M2-2 secreted from glioblastoma cell protects SH-SY5Y cells from aminochrome neurotoxicity. **Neurotoxicity research**, 27, n. 3, p. 217-228, 2015.

DA SILVA, A. B.; COELHO, P. L. C.; AMPARO, J. A. O.; DE ALMEIDA CARNEIRO, M. M. A. *et al.* The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. **Chemico-Biological Interactions**, 274, p. 89-99, 2017.

DE ARAÚJO, F. M.; FERREIRA, R. S.; SOUZA, C. S.; DOS SANTOS, C. C. *et al.* Aminochrome decreases NGF, GDNF and induces neuroinflammation in organotypic midbrain slice cultures. **Neurotoxicology**, 66, p. 98-106, 2018.

DE ARAÚJO, F. M.; FROTA, A. F.; DE JESUS, L. B.; CUENCA-BERMEJO, L. *et al.* Protective Effects of Flavonoid Rutin Against Aminochrome Neurotoxicity. **Neurotoxicity Research**, p. 1-18, 2023.

DE ARAÚJO, F. M.; FROTA, A. F.; DE JESUS, L. B.; MACEDO, T. C. *et al.* Aminochrome Induces Neuroinflammation and Dopaminergic Neuronal Loss: A New Preclinical Model to Find Anti-inflammatory and Neuroprotective Drugs for Parkinson's Disease. **Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 1-17, 2022.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, 5, n. 6, p. 525-535, 2006.

DIAZ-VÉLIZ, G.; MORA, S.; DOSSI, M.; GOMEZ, P. *et al.* Behavioral effects of aminochrome and dopachrome injected in the rat substantia nigra. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 73, n. 4, p. 843-850, 2002.

DORSEY, E. R.; ELBAZ, A.; NICHOLS, E.; ABBASI, N. *et al.* Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, 17, n. 11, p. 939-953, 2018.

DRIVER, J. A.; LOGROSCINO, G.; GAZIANO, J. M.; KURTH, T. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. **Neurology**, 72, n. 5, p. 432-438, 2009.

DUBOIS, B.; PILLON, B. Cognitive deficits in Parkinson's disease. **Journal of neurology**, 244, p. 2-8, 1996.

ELSWORTH, J. D. Parkinson's disease treatment: Past, present, and future. **Journal of neural transmission**, 127, n. 5, p. 785-791, 2020.

ENOGIERU, A. B.; HAYLETT, W.; HISS, D. C.; BARDIEN, S. *et al.* Rutin as a potent antioxidant: implications for neurodegenerative disorders. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2018, 2018.

FALCONE FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in plant science**, 3, p. 222, 2012.

FANG, F.; XU, Q.; PARK, Y.; HUANG, X. *et al.* Depression and the subsequent risk of Parkinson's disease in the NIH-AARP Diet and Health Study. **Movement Disorders**, 25, n. 9, p. 1157-1162, 2010.

FAYSAL, M.; DEHBIA, Z.; ZEHRAVI, M.; SWEILAM, S. H. *et al.* Flavonoids as Potential Therapeutics Against Neurodegenerative Disorders: Unlocking the Prospects. **Neurochemical Research**, p. 1-19, 2024.

FEHLING, C. TREATMENT OF PARKINSON'S SYNDROME WITH L-DOPA A DOUBLE BLIND STUDY. **Acta Neurologica Scandinavica**, 42, n. 3, p. 367-372, 1966.

FERREIRA, R. S.; TELES-SOUZA, J.; DOS SANTOS SOUZA, C.; PEREIRA, É. P. *et al.* Rutin improves glutamate uptake and inhibits glutamate excitotoxicity in rat brain slices. **Molecular Biology Reports**, 48, n. 2, p. 1475-1483, 2021.

FOUDAH, A. I.; ALQARNI, M. H.; ALAM, A.; DEVI, S. *et al.* Rutin Improves Anxiety and Reserpine-Induced Depression in Rats. **Molecules**, 27, n. 21, p. 7313, 2022.

FOX, S. H.; KATZENSCHLAGER, R.; LIM, S. Y.; BARTON, B. *et al.* International Parkinson and movement disorder society evidence-based medicine review: update on treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 33, n. 8, p. 1248-1266, 2018.

GASH, D. M.; RUTLAND, K.; HUDSON, N. L.; SULLIVAN, P. G. *et al.* Trichloroethylene: Parkinsonism and complex 1 mitochondrial neurotoxicity. **Annals of neurology**, 63, n. 2, p. 184-192, 2008.

GERFEN, C. R.; SURMEIER, D. J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. **Annual review of neuroscience**, 34, n. 1, p. 441-466, 2011.

GERMAN-PONCIANO, L. J.; ROSAS-SÁNCHEZ, G. U.; CUETO-ESCOBEDO, J.; FERNÁNDEZ-DEMENEGLI, R. *et al.* Participation of the serotonergic system and brain-derived neurotrophic factor in the antidepressant-like effect of flavonoids. **International Journal of Molecular Sciences**, 23, n. 18, p. 10896, 2022.

GIRÁLDEZ-PÉREZ, R. M.; ANTOLÍN-VALLESPÍN, M.; MUÑOZ, M. D.; SÁNCHEZ-CAPELO, A. Models of  $\alpha$ -synuclein aggregation in Parkinson's disease. **Acta neuropathologica communications**, 2, n. 1, p. 1-17, 2014.

GRAYBIEL, A. M.; AOSAKI, T.; FLAHERTY, A. W.; KIMURA, M. The basal ganglia and adaptive motor control. **Science**, 265, n. 5180, p. 1826-1831, 1994.

GUO, J.; HUANG, X.; DOU, L.; YAN, M. *et al.* Aging and aging-related diseases: From molecular mechanisms to interventions and treatments. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 7, n. 1, p. 391, 2022.

HABER, S. N. The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit. **Neuroscience**, 282, p. 248-257, 2014.

HABER, S. N.; KNUTSON, B. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. **Neuropsychopharmacology**, 35, n. 1, p. 4-26, 2010.

HABTEMARIAM, S.; LENTINI, G. The therapeutic potential of rutin for diabetes: an update. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, 15, n. 7, p. 524-528, 2015.

HALL, C.; BALLACHEY, E. L. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to method in comparative psychology. **University of California Publications in Psychology**, 1932.

HARBORNE, J. B. The flavonoids: advances in research since 1980. 2013.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1170, n. 1, p. 615-622, 2009.

HEINZEL, S.; BERG, D.; GASSER, T.; CHEN, H. *et al.* Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 34, n. 10, p. 1464-1470, 2019.

HERRERA, A.; MUÑOZ, P.; PARIS, I.; DÍAZ-VELIZ, G. *et al.* Aminochrome induces dopaminergic neuronal dysfunction: a new animal model for Parkinson's disease. **Cellular and molecular life sciences**, 73, n. 18, p. 3583-3597, 2016.

HILTON, J. R.; SIMPSON, S. R.; SHERMAN, E. R.; RABY-SMITH, W. *et al.* Reactivity to conditioned threat cues is distinct from exploratory drive in the elevated plus maze. **European Journal of Neuroscience**, 57, n. 1, p. 54-63, 2023.

HIRSCH, L.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. *et al.* The incidence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Neuroepidemiology**, 46, n. 4, p. 292-300, 2016.

HORNYKIEWICZ, O. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. **Pharmacological reviews**, 18, n. 2, p. 925-964, 1966.

HUENCHUGUALA, S.; MUÑOZ, P.; SEGURA-AGUILAR, J. The importance of mitophagy in maintaining mitochondrial function in U373MG cells. Baflomycin A1 restores aminochrome-induced mitochondrial damage. **ACS chemical neuroscience**, 8, n. 10, p. 2247-2253, 2017.

HUENCHUGUALA, S.; MUÑOZ, P.; ZAVALA, P.; VILLA, M. *et al.* Glutathione transferase mu 2 protects glioblastoma cells against aminochrome toxicity by preventing autophagy and lysosome dysfunction. **Autophagy**, 10, n. 4, p. 618-630, 2014.

HUENCHUGUALA, S.; SEGURA-AGUILAR, J. Single-neuron neurodegeneration as a degenerative model for Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, 19, n. 3, p. 529-535, 2024.

HUGHES, A. J.; DANIEL, S. E.; KILFORD, L.; LEES, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. **Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry**, 55, n. 3, p. 181-184, 1992.

HUSSEIN, R.; EL-ANSSARY, A. Plants secondary metabolites: The key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants, herbal medicine, Philip F. Builders, IntechOpen. 2018.

ILJINA, M.; GARCIA, G. A.; HORROCKS, M. H.; TOSATTO, L. *et al.* Kinetic model of the aggregation of alpha-synuclein provides insights into prion-like spreading. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113, n. 9, p. E1206-E1215, 2016.

JELLINGER, K. A. Animal models of synucleinopathies and how they could impact future drug discovery and delivery efforts. **Expert Opinion on Drug Discovery**, 14, n. 10, p. 969-982, 2019.

JI, Y.; MA, Y.; MA, Y.; WANG, Y. *et al.* Rutin prevents pyroptosis and M1 microglia via Nrf2/Mac-1/caspase-1-mediated inflammasome axis to improve POCD. **International Immunopharmacology**, 127, p. 111290, 2024.

JO, S.; KIM, S.; SHIN, D. H.; KIM, M.-S. Inhibition of SARS-CoV 3CL protease by flavonoids. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, 35, n. 1, p. 145-151, 2020.

JOHNSON, M. E.; STECHER, B.; LABRIE, V.; BRUNDIN, L. et al. Triggers, facilitators, and aggravators: redefining Parkinson's disease pathogenesis. **Trends in neurosciences**, 42, n. 1, p. 4-13, 2019.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, 386, n. 9996, p. 896-912, 2015.

KATAN, H. P. H. M. Analysis and health effects of flavonoids Food Chem 574346. Hollman, PCH, Hertog, MGL, and Katan, MB (1996). Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chem**, 57, p. 43-46, 1996.

KAYED, R.; DETTMER, U.; LESNÉ, S. E. Soluble endogenous oligomeric  $\alpha$ -synuclein species in neurodegenerative diseases: Expression, spreading, and cross-talk. **Journal of Parkinson's Disease**, 10, n. 3, p. 791-818, 2020.

KESSAS, K.; LOUNIS, W.; CHOUARI, Z.; VEJUX, A. et al. Benefits of rutin on mitochondrial function and inflammation in an aluminum-induced neurotoxicity rat model: Potential interest for the prevention of neurodegeneration. **Biochimie**, 222, p. 1-8, 2024.

KHAN, M.; RAZA, S. S.; JAVED, H.; AHMAD, A. et al. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, 22, n. 1, p. 1-15, 2012.

KHAN, M. M.; AHMAD, A.; ISHRAT, T.; KHUWAJA, G. et al. Rutin protects the neural damage induced by transient focal ischemia in rats. **Brain research**, 1292, p. 123-135, 2009.

KIM, H. J.; JEON, B. S.; JENNER, P. Hallmarks of treatment aspects: Parkinson's disease throughout centuries including L-dopa. **International review of neurobiology**, 132, p. 295-343, 2017.

KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWITZ, D. M. Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. **Pharmacological reviews**, 26, n. 3, p. 199-288, 1974.

KRAEUTER, A.-K.; GUEST, P. C.; SARNYAI, Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior. **Pre-clinical models: techniques and protocols**, p. 99-103, 2019.

KULISEVSKY, J. Role of dopamine in learning and memory: implications for the treatment of cognitive dysfunction in patients with Parkinson's disease. **Drugs & aging**, 16, p. 365-379, 2000.

LEVER, C.; BURTON, S.; O'KEEFE, J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. **Reviews in the Neurosciences**, 17, n. 1-2, p. 111-134, 2006.

LIANG, C. L.; NELSON, O.; YAZDANI, U.; PASBAKHSH, P. *et al.* Inverse relationship between the contents of neuromelanin pigment and the vesicular monoamine transporter-2: human midbrain dopamine neurons. **Journal of Comparative Neurology**, 473, n. 1, p. 97-106, 2004.

LIEBSCH, G.; MONTKOWSKI, A.; HOLSBOER, F.; LANDGRAF, R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. **Behavioural brain research**, 94, n. 2, p. 301-310, 1998.

LISKOVA, A.; SAMEC, M.; KOKLESOVA, L.; SAMUEL, S. M. *et al.* Flavonoids against the SARS-CoV-2 induced inflammatory storm. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 138, p. 111430, 2021.

LLIBRE-GUERRA, J. J.; PRINA, M.; SOSA, A. L.; ACOSTA, D. *et al.* Prevalence of parkinsonism and Parkinson disease in urban and rural populations from Latin America: A community based study. **The Lancet Regional Health–Americas**, 7, 2022.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A.; CAVALLEIRO, A. D. S.; BROCHINI, V. F. *et al.* Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2021.

LU, L.; NEFF, F.; FISCHER, D. A.; HENZE, C. *et al.* Regional vulnerability of mesencephalic dopaminergic neurons prone to degenerate in Parkinson's disease: a post-mortem study in human control subjects. **Neurobiology of disease**, 23, n. 2, p. 409-421, 2006.

LUNDBLAD, M. Chapte B7-Utility of 6-hydroxydopamine lesioned rats in the preclinical screening of novel treatments for Parkinson disease. *In: Animal models of movement disorders*: Academic Press, 2005. p. 193-208.

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, n. 1, p. 235-240, 2013.

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, n. 3, p. 609-617, 2015.

MAGNO, L. A. V.; COLLODETTI, M.; TENZA-FERRER, H.; ROMANO-SILVA, M. A. Cylinder test to assess sensory-motor function in a mouse model of Parkinson's disease. **Bio-protocol**, 9, n. 16, p. e3337-e3337, 2019.

MAHMOUD, A. M.; HERNANDEZ BAUTISTA, R. J.; SANDHU, M. A.; HUSSEIN, O. E. Beneficial effects of citrus flavonoids on cardiovascular and metabolic health. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2019, 2019.

MANACH, C.; MORAND, C.; DEMIGNÉ, C.; TEXIER, O. *et al.* Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **FEBS letters**, 409, n. 1, p. 12-16, 1997.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American journal of clinical nutrition**, 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARTEL, J. C.; GATTI MCARTHUR, S. Dopamine receptor subtypes, physiology and pharmacology: new ligands and concepts in schizophrenia. **Frontiers in pharmacology**, 11, p. 1003, 2020.

MATHESIUS, U. Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms. MDPI. 7: 30 p. 2018.

MELÉNDEZ, C.; MUÑOZ, P.; SEGURA-AGUILAR, J. DT-diaphorase prevents aminochrome-induced lysosome dysfunction in SH-SY5Y cells. **Neurotoxicity Research**, 35, n. 1, p. 255-259, 2019.

MICHELS, M.; ABATTI, M.; VIEIRA, A.; ÁVILA, P. *et al.* Modulation of microglial phenotypes improves sepsis-induced hippocampus-dependent cognitive impairments and decreases brain inflammation in an animal model of sepsis. **Clinical Science**, 134, n. 7, p. 765-776, 2020.

MORALES, I.; SANCHEZ, A.; RODRIGUEZ-SABATE, C.; RODRIGUEZ, M. The astrocytic response to the dopaminergic denervation of the striatum. **Journal of Neurochemistry**, 139, n. 1, p. 81-95, 2016.

MORENO-GARCÍA, A.; KUN, A.; CALERO, M.; CALERO, O. The neuromelanin paradox and its dual role in oxidative stress and neurodegeneration. **Antioxidants**, 10, n. 1, p. 124, 2021.

MUÑOZ, P.; CARDENAS, S.; HUENCHUGUALA, S.; BRICEÑO, A. *et al.* DT-diaphorase prevents aminochrome-induced alpha-synuclein oligomer formation and neurotoxicity. **Toxicological Sciences**, 145, n. 1, p. 37-47, 2015.

MUÑOZ, P.; HUENCHUGUALA, S.; PARIS, I.; CUEVAS, C. *et al.* Protective effects of nicotine against aminochrome-induced toxicity in substantia nigra derived cells: implications for Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, 22, n. 2, p. 177-180, 2012.

NEGAHDARI, R.; BOHLOULI, S.; SHARIFI, S.; MALEKI DIZAJ, S. *et al.* Therapeutic benefits of rutin and its nanoformulations. **Phytotherapy Research**, 35, n. 4, p. 1719-1738, 2021.

NICOLA, M. A.; ATTAII, A. H.; ABDEL-RAHEEM, M. H.; MOHAMMED, A. F. *et al.* Neuroprotective effects of rutin against cuprizone-induced multiple sclerosis in mice. **Inflammopharmacology**, 32, n. 2, p. 1295-1315, 2024.

NIEOCZYM, D.; SOCAŁA, K.; RASZEWSKI, G.; WLAŻ, P. Effect of quercetin and rutin in some acute seizure models in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 54, p. 50-58, 2014.

O'KEEFFE, G. W.; SULLIVAN, A. M. Evidence for dopaminergic axonal degeneration as an early pathological process in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 56, p. 9-15, 2018.

OLSZOWY-TOMCZYK, M.; WIANOWSKA, D. Antioxidant Properties of Selected Flavonoids in Binary Mixtures—Considerations on Myricetin, Kaempferol and Quercetin. **International Journal of Molecular Sciences**, 24, n. 12, p. 10070, 2023.

ORIMO, S.; UCHIHARA, T.; KANAZAWA, T.; ITOH, Y. *et al.* Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease. **Neuropathology and applied neurobiology**, 37, n. 7, p. 791-802, 2011.

OU, Z.; PAN, J.; TANG, S.; DUAN, D. *et al.* Global trends in the incidence, prevalence, and years lived with disability of Parkinson's disease in 204 countries/territories from 1990 to 2019. **Frontiers in public health**, 9, p. 776847, 2021.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, 5, p. e47, 2016.

PANNU, A.; SHARMA, P. C.; THAKUR, V. K.; GOYAL, R. K. Emerging role of flavonoids as the treatment of depression. **Biomolecules**, 11, n. 12, p. 1825, 2021.

PAOLICELLI, R. C.; BOLASCO, G.; PAGANI, F.; MAGGI, L. *et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. **science**, 333, n. 6048, p. 1456-1458, 2011.

PARIS, I.; MUÑOZ, P.; HUENCHUGUALA, S.; COUVE, E. *et al.* Autophagy protects against aminochrome-induced cell death in substantia nigra-derived cell line. **Toxicological Sciences**, 121, n. 2, p. 376-388, 2011.

PARIS, I.; PEREZ-PASTENE, C.; CARDENAS, S.; ITURRA, P. *et al.* Aminochrome induces disruption of actin, alpha-, and beta-tubulin cytoskeleton networks in substantia-nigra-derived cell line. **Neurotoxicity research**, 18, n. 1, p. 82-92, 2010.

PARIS PIZARRO, I.; MUÑOZ, P.; HUENCHUGUALA, S.; COUVE, E. *et al.* Autophagy protects against aminochrome-induced cell death in substantia nigra-derived cell line. 2011.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, 14, n. 2, p. 223-236, 2002.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of neuroscience methods**, 14, n. 3, p. 149-167, 1985.

PEREIRA, G. M.; SOARES, N. M.; BRUSCATO, N. M.; MORIGUCHI, E. H. *et al.* Prevalence and incidence of Parkinson's disease and other forms of parkinsonism in a cohort of elderly individuals in Southern Brazil: protocol for a population-based study. **BMJ open**, 11, n. 12, p. e054423, 2021.

PHATNANI, H.; MANIATIS, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 7, n. 6, p. a020628, 2015.

PICCINI, P.; BURN, D. J.; CERAVOLO, R.; MARAGANORE, D. *et al.* The role of inheritance in sporadic Parkinson's disease: evidence from a longitudinal study of dopaminergic function in twins. **Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society**, 45, n. 5, p. 577-582, 1999.

POSTUMA, R. B.; AARSLAND, D.; BARONE, P.; BURN, D. J. *et al.* Identifying prodromal Parkinson's disease: pre-motor disorders in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 27, n. 5, p. 617-626, 2012.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. D. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Movement disorders**, 29, n. 13, p. 1583-1590, 2014.

PROCACCINI, C.; SANTOPAOLO, M.; FAICCHIA, D.; COLAMATTEO, A. *et al.* Role of metabolism in neurodegenerative disorders. **Metabolism**, 65, n. 9, p. 1376-1390, 2016.

RAKHA, A.; UMAR, N.; RABAIL, R.; BUTT, M. S. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic potential of dietary flavonoids: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 156, p. 113945, 2022.

RAMASWAMY, S.; DWARAMPUDI, L. P.; KADIYALA, M.; KUPPUSWAMY, G. *et al.* Formulation and characterization of chitosan encapsulated phytoconstituents of curcumin and rutin nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, 104, p. 1807-1812, 2017.

REES, R. N.; ACHARYA, A. P.; SCHRAG, A.; NOYCE, A. J. An early diagnosis is not the same as a timely diagnosis of Parkinson's disease. **F1000Research**, 7, 2018.

RICE, M. W.; ROBERTS, R. C.; MELENDEZ-FERRO, M.; PEREZ-COSTAS, E. Mapping dopaminergic deficiencies in the substantia nigra/ventral tegmental area in schizophrenia. **Brain Structure and Function**, 221, p. 185-201, 2016.

ROBERTS, H. L.; BROWN, D. R. Seeking a mechanism for the toxicity of oligomeric  $\alpha$ -synuclein. **Biomolecules**, 5, n. 2, p. 282-305, 2015.

ROOSTALU, U.; SALINAS, C. B.; THORBEK, D. D.; SKYTTE, J. L. *et al.* Quantitative whole-brain 3D imaging of tyrosine hydroxylase-labeled neuron architecture in the mouse MPTP model of Parkinson's disease. **Disease models & mechanisms**, 12, n. 11, p. dmm042200, 2019.

ROSS, D.; SIEGEL, D. Quinone reductases. 2024.

SANTOS, C. C.; ARAÚJO, F. M.; FERREIRA, R. S.; SILVA, V. B. *et al.* Aminochrome induces microglia and astrocyte activation. **Toxicology In Vitro**, 42, p. 54-60, 2017.

SANTOS, C. C.; CARDIM-PIRES, T. R.; SHVACHIY, L.; FONSECA-FONSECA, L. A. *et al.* JM-20, a Benzodiazepine-Dihydropyridine Hybrid Molecule, Inhibits the Formation of Alpha-Synuclein-Aggregated Species. **Neurotoxicity Research**, p. 1-13, 2022.

SANTOS, C. C.; MUÑOZ, P.; ALMEIDA, Á. M. A.; DE LIMA DAVID, J. P. *et al.* The Flavonoid Agathisflavone from Poincianella pyramidalis Prevents Aminochrome Neurotoxicity. **Neurotoxicity Research**, p. 1-6, 2020.

SANTOS, G. F.; DE QUEIROZ NUNES, G.; MOREIRA, D. R.; VERGUTZ, B. G. *et al.* Doença de Parkinson: Padrão epidemiológico de internações no Brasil. **Research, Society and Development**, 11, n. 1, p. e13511124535-e13511124535, 2022.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; TILLERSON, J. L. *et al.* CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **neuropharmacology**, 39, n. 5, p. 777-787, 2000.

SCHAPIRA, A. H.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, 18, n. 7, p. 435-450, 2017.

SCHNEIDER, J.; POPE-COLEMAN, A. Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. **Neurodegeneration**, 4, n. 3, p. 245-255, 1995.

SEGURA-AGUILAR, J. On the role of endogenous neurotoxins and neuroprotection in Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, 12, n. 6, p. 897, 2017.

SEGURA-AGUILAR, J.; MANNERVIK, B. A Preclinical Model for Parkinson's Disease Based on Transcriptional Gene Activation via KEAP1/NRF2 to Develop New Antioxidant Therapies. **Antioxidants**, 12, n. 3, p. 673, 2023.

SEGURA-AGUILAR, J.; MUÑOZ, P.; INZUNZA, J.; VARSHNEY, M. *et al.* Neuroprotection against Aminochrome Neurotoxicity: Glutathione Transferase M2-2 and DT-Diaphorase. **Antioxidants**, 11, n. 2, p. 296, 2022.

SHAERZADEH, F.; PHAN, L.; MILLER, D.; DACQUEL, M. *et al.* Microglia senescence occurs in both substantia nigra and ventral tegmental area. **Glia**, 68, n. 11, p. 2228-2245, 2020.

SHIMOI, K.; YOSHIZUMI, K.; KIDO, T.; USUI, Y. *et al.* Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin, and αG-rutin, a water soluble flavonoid, in rats. **Journal of agricultural and food chemistry**, 51, n. 9, p. 2785-2789, 2003.

SIEGEL, D.; KEPA, J. K.; ROSS, D. NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) localizes to the mitotic spindle in human cells. 2012.

SILVA, A. B. R. L.; DE OLIVEIRA, R. W. G.; DIÓGENES, G. P.; DE CASTRO AGUIAR, M. F. *et al.* Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's disease: a new clinical state of the art. **Ageing research reviews**, 84, p. 101834, 2023.

SILVA, A. M. M. D.; SILVA, A. R.; PINHEIRO, A. M.; FREITAS, S. R. V. B. D. *et al.* Alkaloids from Prosopis juliflora leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. **Toxicon**, 49, n. 5, p. 601-614, 2007.

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

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity research**, 11, p. 151-167, 2007.

SLIKA, H.; MANSOUR, H.; WEHBE, N.; NASSER, S. A. *et al.* Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 146, p. 112442, 2022.

SLÉZIA, A.; HEGEDÜS, P.; RUSINA, E.; LENGYEL, K. *et al.* Behavioral, neural and ultrastructural alterations in a graded-dose 6-OHDA mouse model of early-stage Parkinson's disease. **Scientific Reports**, 13, n. 1, p. 19478, 2023.

SOFRONIEW, M. V. Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity. **Trends in immunology**, 41, n. 9, p. 758-770, 2020.

SOLANKI, I.; PARIHAR, P.; MANSURI, M. L.; PARIHAR, M. S. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. **Advances in nutrition**, 6, n. 1, p. 64-72, 2015.

SONG, H.-L.; ZHANG, X.; WANG, W.-Z.; LIU, R.-H. *et al.* Neuroprotective mechanisms of rutin for spinal cord injury through anti-oxidation and anti-inflammation and inhibition of p38 mitogen activated protein kinase pathway. **Neural regeneration research**, 13, n. 1, p. 128, 2018.

SONG, M.; LIU, Y.; LI, T.; LIU, X. *et al.* Plant natural flavonoids against multidrug resistant pathogens. **Advanced science**, 8, n. 15, p. 2100749, 2021.

SPOTTKE, A. E.; REUTER, M.; MACHAT, O.; BORNSCHEIN, B. *et al.* Cost of illness and its predictors for Parkinson's disease in Germany. **Pharmacoconomics**, 23, p. 817-836, 2005.

SREELATHA, I.; CHOI, G.-Y.; LEE, I.-S.; INTURU, O. *et al.* Neuroprotective Properties of Rutin Hydrate against Scopolamine-Induced Deficits in BDNF/TrkB/ERK/CREB/Bcl2 Pathways. **Neurology International**, 16, n. 5, p. 1094-1111, 2024.

SUGANYA, S. N.; SUMATHI, T. Effect of rutin against a mitochondrial toxin, 3-nitropropionicacid induced biochemical, behavioral and histological alterations-a pilot study on Huntington's disease model in rats. **Metabolic brain disease**, 32, p. 471-481, 2017.

SUN, X.-Y.; LI, L.-J.; DONG, Q.-X.; ZHU, J. et al. Rutin prevents tau pathology and neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of neuroinflammation**, 18, n. 1, p. 1-14, 2021.

SURMEIER, D. J. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. **The FEBS journal**, 285, n. 19, p. 3657-3668, 2018.

SURMEIER, D. J.; SCHUMACKER, P. T.; GUZMAN, J. D.; ILIJIC, E. et al. Calcium and Parkinson's disease. **Biochemical and biophysical research communications**, 483, n. 4, p. 1013-1019, 2017.

TAN, Z.; DENG, J.; YE, Q.; ZHANG, Z. The antibacterial activity of natural-derived flavonoids. **Current topics in medicinal chemistry**, 22, n. 12, p. 1009-1019, 2022.

TANNER, C. M.; KAMEL, F.; ROSS, G. W.; HOPPIN, J. A. et al. Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environmental health perspectives**, 119, n. 6, p. 866-872, 2011.

TIAN, C.; LIU, X.; CHANG, Y.; WANG, R. et al. Rutin prevents inflammation induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 cells via conquering the TLR4-MyD88-TRAF6-NF- $\kappa$ B signalling pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 73, n. 1, p. 110-117, 2021.

TITOVA, N.; CHAUDHURI, K. R. Personalized medicine and nonmotor symptoms in Parkinson's disease. **International review of neurobiology**, 134, p. 1257-1281, 2017.

TITOVA, N.; PADMAKUMAR, C.; LEWIS, S. J.; CHAUDHURI, K. R. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? **Journal of Neural Transmission**, 124, p. 907-914, 2017.

TOLOSA, E.; GARRIDO, A.; SCHOLZ, S. W.; POEWE, W. Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, 20, n. 5, p. 385-397, 2021.

TSENG, K. Y.; KARGIEMAN, L.; GACIO, S.; RIQUELME, L. A. et al. Consequences of partial and severe dopaminergic lesion on basal ganglia oscillatory activity and akinesia. **European Journal of Neuroscience**, 22, n. 10, p. 2579-2586, 2005.

TWELVES, D.; PERKINS, K. S.; COUNSELL, C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, 18, n. 1, p. 19-31, 2003.

TYSNES, O.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Neural Transm (Vienna)**. 2017; 124 (8): 901–905.

TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of neural transmission**, 124, p. 901-905, 2017.

VALE, T. C.; BARBOSA, M. T.; RESENDE, E. D. P. F.; MAIA, D. P. *et al.* Parkinsonism in a population-based study of individuals aged 75+ years: The Pietà study. **Parkinsonism & related disorders**, 56, p. 76-81, 2018.

VASCONCELLOS, P. R. O.; RIZZOTTO, M. L. F.; TAGLIETTI, M. Morbidade hospitalar e mortalidade por Doença de Parkinson no Brasil de 2008 a 2020. **Saúde em Debate**, 47, p. 196-206, 2023.

VIJIARATNAM, N.; SIMUNI, T.; BANDMANN, O.; MORRIS, H. R. *et al.* Progress towards therapies for disease modification in Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, 20, n. 7, p. 559-572, 2021.

VIRGONE-CARLOTTA, A.; UHLRICH, J.; AKRAM, M. N.; RESSNIKOFF, D. *et al.* Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease. **Glia**, 61, n. 10, p. 1645-1658, 2013.

WALF, A. A.; FRYE, C. A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. **Nature protocols**, 2, n. 2, p. 322-328, 2007.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological bulletin**, 83, n. 3, p. 482, 1976.

WILLIAMS, A. MPTP parkinsonism. **British Medical Journal (Clinical research ed.)**, 289, n. 6456, p. 1401, 1984.

WILLIS, A.; ROBERTS, E.; BECK, J.; FISKE, B. *et al.* Incidence of Parkinson disease in North America. **npj Parkinson's Disease**, 8, n. 1, p. 170, 2022.

WINKLER, J. D.; WEISS, B. Reversal of supersensitive apomorphine-induced rotational behavior in mice by continuous exposure to apomorphine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 238, n. 1, p. 242-247, 1986.

XIONG, R.; SIEGEL, D.; ROSS, D. Quinone-induced protein handling changes: implications for major protein handling systems in quinone-mediated toxicity. **Toxicology and applied pharmacology**, 280, n. 2, p. 285-295, 2014.

XU, Q.-N.; ZHU, D.; WANG, G.-H.; LIN, T. *et al.* Phenolic glycosides and flavonoids with antioxidant and anticancer activities from Desmodium caudatum. **Natural Product Research**, 35, n. 22, p. 4534-4541, 2021.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT-Food Science and Technology**, 41, n. 6, p. 1060-1066, 2008.

YE, H.; ROBAK, L. A.; YU, M.; CYKOWSKI, M. *et al.* Genetics and pathogenesis of Parkinson's syndrome. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 18, n. 1, p. 95-121, 2023.

YOUSIM, K. A.; QAISER, M. Z.; BEGLEY, D. J.; RICE-EVANS, C. A. *et al.* Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. **Free radical biology and medicine**, 36, n. 5, p. 592-604, 2004.