

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde



Fillipe Mendes de Araújo

ESTABELECIMENTO DE UM NOVO MODELO *IN VITRO* DE NEUROINFLAMAÇÃO ASSOCIADA À DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO PELO AMINOCROMO E CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO NEUROPROTETORA DA APIGENINA

PMBqBM
Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular

Salvador
2016



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



FILLIPE MENDES DE ARAÚJO

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

Orientador: Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Salvador

2016

FILLIPE MENDES DE ARAÚJO

ESTABELECIMENTO DE UM NOVO MODELO *IN VITRO* DE NEUROINFLAMAÇÃO
ASSOCIADO À DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO PELO AMINOCROMO E
CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO NEUROPROTETORA DA APIGENINA.

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade
Federal da Bahia.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Victor Diogenes Amaral da Silva_____

Prof. Dr. Maria Luiza Saraiva Pereira_____

Prof^a. Dr^a. Mariana Borges Botura_____

AGRADECIMENTOS

Aprendi que devemos sempre agradecer por tudo que acontece em nossas vidas.

A Deus, primeiramente, por sempre iluminar nossos caminhos e por fazer com que mais esse sonho se realize.

A minha família que é à base das nossas vidas, sinônimo de amor, compreensão e dedicação. Em especial a minha Mãe que sempre buscou me dar uma boa educação.

A minha querida e amada noiva, pelo apoio constante em todas as etapas que envolveu o desenvolvimento deste trabalho e pela paciência.

Ao meu orientador, pela dedicação, pela sabedoria, pelo talento e acima de tudo, por ser uma pessoa incomparável e de virtudes inspiradoras.

A professora Silvia, que me acolheu no laboratório realizando meu sonho de seguir a carreira acadêmica na pesquisa científica.

A professora Fátima, pelo carinho que ele tem por todos nós.

A Keu, pelo grande apoio metodológico/científico, pela disponibilidade e por ser uma pessoa maravilhosa que está sempre disposta a contribuir para o crescimento do trabalho de todos no laboratório.

Aos nossos queridos técnicos Sr. Carlos, Lucia e Veronica. Por facilitar nossa vida no laboratório.

Aos amigos e colegas da minha turma do mestrado multicêntrico. Realmente vocês são sensacionais e verdadeiros vencedores.

Aos amigos do laboratório, que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho afinal de contas não se faz pesquisa sozinho. Em especial gostaria de agradecer de coração a Livinha e Rafa por trazerem mais alegria e companheirismo a nossa árdua rotina e as nossas queridas PIBCS Senhorita Juliana Helena e Senhorita Vanessa Bonfim pela grande ajuda em todos os momentos

Epígrafe

"Fazer pesquisa é um momento privilegiado. Poucos fazem, porém somente os que aceitam o desafio descobrem como é gratificante produzir algo."

Vânia Hirle

"A coisa mais maravilhosa que podemos experimentar é o ministério. É a fonte de toda a verdadeira arte e de toda a verdadeira ciência."

Albert Einstei

ARAÚJO, Fillipe Mendes de Estabelecimento de um novo modelo *in vitro* de neuroinflamação associado à doença de Parkinson induzido pelo aminocromo e caracterização da ação neuroprotetora da apigenina. 63fl. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

A doença de Parkinson é caracterizada principalmente pela perda de neurônios dopaminérgicos que contêm neuromelanina na substância nigra pars compacta. Os mecanismos responsáveis por esta neurodegeneração permanecem desconhecidos, contudo, algumas desordens celulares e moleculares são consideradas envolvidas neste processo, dentre estes, acúmulo de α -sinucleína, estresse oxidativo, dano mitocondrial, disfunção proteossomal, disfunção autofágica e neuroinflamação. Dentre estas, apenas a neuroinflamação ainda não foi associada com os efeitos deletérios induzidos pela neurotoxina endógena, aminocromo. Essa neurotoxina tem origem a partir da oxidação da dopamina em pH citosólico e é um precursor da neuromelanina que em condições específicas pode se acumular em neurônios dopaminérgicos e gerar citotoxicidade. Neste sentido, este trabalho tem como principal foco de estudo o potencial neuroinflamatório do aminocromo e seus efeitos regulados pela apigenina, um reconhecido composto flavonoide imunomodulador. Culturas organotípicas de fatias do mesencéfalo de ratos Wistar pós-natais com 8 dias foram cultivadas durante 3 dias com DMEM/F12, incubadas em 5% de CO₂ a 37 °C. Depois, as fatias foram tratadas com aminocromo (0,01 a 25 μ M) e ou com apigenina (10 μ M) e analisadas após 24 ou 48 h. A neurotoxicidade foi avaliada por meio de análise morfológica e da expressão de tirosina hidroxilase (TH) por Western Blot. A resposta neuroinflamatória foi avaliada por imuno-histoquímica para Iba1 e por análise de RTq-PCR para citocinas TNF e IL-1 β . O efeito modulador de fatores neurotróficos foi também avaliado por RTq-PCR. Nossos resultados demonstraram que o aminocromo induziu danos teciduais em culturas após 48h de exposição, associado à redução da expressão TH, a qual foi inibida pela apigenina. Além disso, a exposição ao aminocromo induziu alteração morfológica em células Iba1+ após 24 h, acompanhado por aumento na expressão do RNAm para TNF e IL-1 β , que também foram inibidas pela apigenina. O aminocromo reduziu a expressão do mRNA dos fatores neurotróficos CDNF e NGF e aumentou a expressão do BDNF. A apigenina inibiu os efeitos induzidos pelo aminocromo em relação à expressão do CDNF e NGF e aumentou a expressão destas neurotrofinas. Por outro lado, a apigenina reduziu os níveis de BDNF e GDNF. Estes resultados demonstraram que neuroinflamação e fatores neurotróficos também estão envolvidos na neurodegeneração induzida por aminocromo e que o flavonoide apigenina constitui um bom agente de proteção contra os danos celulares induzidos por esta toxina.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; aminocromo; apigenina; neuroinflamação; fatores neurotróficos.

ARAÚJO, Fillipe Mendes de. Establishment of a novel *in vitro* model of neuroinflammation associated to Parkinson's disease induced by aminochrome and characterization of neuroprotective action of apigenin. 63fl. 2016. Dissertation (Master) – Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Parkinson's disease is characterized mainly by loss of dopaminergic neurons containing neuromelanin in the substantia nigra pars compacta. The mechanisms responsible for this neurodegeneration remains unknown. However, some cellular and molecular disorders are involved in this process, among those, the accumulation of α -synuclein, oxidative stress, mitochondrial damage, proteosomal and autophagic dysfunction and neuroinflammation. Among these, only neuroinflammation has not yet been associated with the deleterious effects induced by aminochrome the endogenous neurotoxin. This neurotoxin originates from dopamine oxidation in cytosolic pH and is a precursor of neuromelanin, that in specific conditions can accumulate in dopaminergic neurons and generate cytotoxicity. In this sense, this work is mainly focused on study of the neuroinflammatory potential of aminochrome and the role of apigenin a well known immunomodulator flavonoid in reversing of this phenotype. Organotypic cultures of midbrain slices derived from wistar rats 8 days after birth, were cultivated for 3 days with DMEM/F12 medium, incubated in 5% CO₂, at 37 ° C. The slices were treated with aminochrome (0,01 e 25 μ M) and/or with apigenin (10 μ M), and analyzed after 24 or 48 hours. Neurotoxicity was evaluated by morphological analysis and by the expression levels of tyrosine hydroxylase (TH) by Western blot. The neuro inflammatory response was assessed by immunohistochemistry for Iba1 and for RTq-PCR for the cytokines TNF and IL-1 β . The modulatory effects of neurotrophic factors were also evaluated by RTq-PCR. Our results demonstrate that aminochrome induced tissue damage in culture after 48h of exposition, associated with the reduction of TH levels, which was inhibited by apigenin. Furthermore, exposure to aminochrome induced morphological changes in Iba1⁺ cells after 24 hours, followed by increased expression of mRNA for TNF and IL-1 β , which were also inhibited by apigenin. The aminochrome reduces mRNA expression of neurotrophic factors CDNF and NGF but increased BDNF. Apigenin inhibited the effects induced by aminochrome in relation to CDNF and NGF expression. On the other hand, apigenin treatment reduces the levels of BDNF and GDNF. These results demonstrated that neuroinflammation and neurotrophic factors are also involved in the neurodegeneration induced aminochrome and that the flavonoid apigenin is a potential protective agent against the cell damage induced by this toxin.

Key-words: Parkinson disease; aminochrome; apigenin; neuroinflammation; neurotrophic factors.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: A conversão do aminocromo a leucoaminocromo-o-semiquinona	22
FIGURA 2: DT - diaforase catalisando a redução do aminocromo em dois elétrons.	22
FIGURA 3: Estrutura básica dos flavonoides	26
FIGURA 4: Grupos dos flavonoides	27
FIGURA 5: Estrutura da Apigenina	29
FIGURA 6: Fotomicroscopia das fatias mesencefálicas tratadas com aminocromo e MPTP	38
FIGURA 7: Western Blot Tirosina Hidroxilase	39
FIGURA 8: Análise da ativação microglial por imunohistoquímica	41
FIGURA 9: Análises da expressão das citocinas pró-inflamatórias por RTq-PCR.....	42
FIGURA 10: Avaliação da expressão dos fatores neurotróficos por RTq-PCR.	44

ABREVIATURAS

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
ATP	Adenosina Trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Cérebro
CDNF	Fator Neurotrófico Conservador da Dopamina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COMT	Catecol-O-metiltransferase
COMT	Catecol-o-metiltransferase
COX-2	Ciclooxigenase-2
DA	Dopamina
DAPI	4,6diamidino-2-phenilindol
DAT	Transportador de Dopamina
DMEM/F12	Meio Dulbecco modificado água: mistura de nutrientes F12
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
FDA	Federal Drug Administration
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado de Glia
GFAP	Proteína acídica fibrila glial
GSH	Glutathiona Reduzida
GSSC	Glutathiona Oxidada
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Oxido Nítrico Sintetase
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
JNK	c-Jun N-terminal
L-DOPA	L-3,4-Dihidroxi-fenilalanina

LPS	lipopolissacarideo de <i>Escherichia coli</i>
MAO-B	Monoamina Oxidase – B
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MHC-II	Complexo Majo de Histocompatibilidade - II
MKK4	Proteínas cinases ativadas por mitógenos 4
MPP ⁺	1-methyl-4phenylpyridinium
MPTP	1-metil-4fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NADH ⁺ +H ⁺	Dinucleótido de adenina nicotinamida reduzida
NADPH ⁺ +H ⁺	Difosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida reduzida-β reduzida
NF-κβ	Factor nuclear kappa B
NGF	Fator Neurotrófico Derivado de Nervos
PARK2	Parkin RBR E3 Ubiquitina Proteína Ligase
pH	Potencial de Hidrogênio
PVDF	Fluoreto de polivinilidene
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SN	Substância nigra
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância nigra pós-compacta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VMAT-2	Transportador vesícula de monoamina-2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 DOENÇA DE PARKINSON.....	15
2.1.1 Fisiopatologia	16
2.1.2 Neuroinflamação e resposta glial	16
2.1.3 Principais abordagens terapêuticas	17
2.2 NEUROTOXINAS USADAS NA INDUÇÃO DE MODELOS PARA ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS NO DESENVOLVIMENTO DE DROGAS ANTIPARKINSONIANAS	18
2.2.1 Alterações celulares e moleculares induzidas por aminocromo ... 19	
2.2.1.1 <i>Danos oxidativos induzidos por aminocromo</i>	19
2.2.1.2 <i>Atuação do aminocromo na disfunção mitocondrial e indução de morte celular por apoptose</i>	23
2.2.1.3 <i>Formação de adutos com proteínas</i>	23
2.3 FLAVONOIDES.....	25
2.3.1 Efeitos neuroprotetores de flavonoides em modelos de estudo da doença de Parkinson	28
2.3.2 Efeitos neuroprotetores da apigenina	28
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE MESENCÉFALO	31
4.2 EXPOSIÇÃO ÀS NEUROTOXINAS.....	32
4.2.1 Exposição das culturas ao Aminocromo	32
4.2.2 Exposição das culturas ao MPTP	32
4.2.3 Exposição das culturas ao LPS	32
4.3 TRATAMENTO COM A APIGENINA	33
4.4 TESTES PARA AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA TECIDUAL, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DOS GRUPOS CONTROLES E TRATADOS	33
4.4.1 Avaliação da morfologia das fatias por microscopia óptica	33
4.4.2 Avaliação de dano neuronal por Western Blot	33
4.4.3 Avaliação de resposta microglial por imunohistoquímica	34
4.4.4 Extração de RNA e RTq-PCR	35
4.4.5 Análise estatística	36

5. RESULTADOS	37
5.1 ANÁLISE DA MORTE CELULAR INDUZIDA PELO AMINOCROMO EM MODELO DE CULTURA ORGANOTÍPICA MESENCEFÁLICA E NEUROPROTEÇÃO INDUZIDA PELA APIGENINA	37
5.2 ANÁLISE DA NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO AMINOCROMO E EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DA APIGENINA	40
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FATORES NEUROTÓFICOS INDUZIDA PELO AMINOCROMO E EFEITO MODULATÓRIO DA APIGENINA	43
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa marcada principalmente por características motoras, como bradicinesia, ataxia, rigidez postural e tremor em repouso. Porém, devido à lenta progressão da doença, alguns sintomas não-motores, como distúrbio do sono, déficit olfatório, ansiedade e depressão, apresentam-se antes mesmo do surgimento dos sintomas motores (GOLDMAN & POSTUMA, 2014). Essa doença é uma consequência da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da Substância nigra pars compacta (BRAAK et al. 2004).

Apesar da causa primária dessa doença ainda permanecer desconhecida, muitos estudos indicam que a DP possui uma causa multifatorial que desencadeia uma série de eventos citotóxicos provocando a morte dos neurônios dopaminérgicos (CAUDLE, 2009; SEGURA-AGUILAR et al., 2014; WANG & HAY, 2015; ZHANG et al., 2016), um desses mecanismos é a neuroinflamação (BLANDINI, 2013).

A morte celular por apoptose e a neurotoxicidade leva a ativação de uma resposta imunológica local com consequente ativação da microglia, macrófagos residentes no sistema nervoso central (SNC) (PETERSON & FLOOD, 2012). A microglia é responsável por orquestrar toda a resposta inflamatória no SNC liberando citocinas responsáveis pela ativação de vias apoptóticas nos neurônios danificados pela DP e liberando compostos tóxicos para a matriz extracelular, que geram uma morte não somente dos neurônios danificados, mas também dos neurônios saudáveis agravando a progressão da doença e seus sintomas. Além disso, a microglia libera quimiocinas que irão atrair linfócitos T auxiliar CD4⁺ amplificando ainda mais a resposta neuroinflamatória com indução da reação astrocitária, o que culmina em astrogliose e liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos astrócitos (HIRSCH & HUNOT, 2009).

Uma substância endógena que está sendo proposta como um novo modelo pré-clínico para o estudo da DP é o aminocromo (SEGURA-AGUILAR et al., 2016). Esta neurotoxina é formada a partir da oxidação da dopamina em pH citosólico e, em condições onde ocorram falhas nos sistemas de detoxificação, pode se acumular no citoplasma do neurônio dopaminérgico e induzir uma diversidade de alterações moleculares e celulares, dentre estas o estresse oxidativo (FUNTES et al., 2007),

disfunção mitocondrial (AGUIRRE et al., 2012), formação de adutos com proteínas do citoesqueleto, com proteínas do complexo I e IV mitocondrial, com a PARK2 (*Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase*) e a α -sinucleína (BRICENO, et al., 2015, VAN LAAR et al., 2009; LAVOIE et al., 2005; MUNOZ et al., 2015). Essas atividades citotóxicas não só relevam a importância do aminocromo como um modelo pré-clínico, mas também como uma molécula que pode exercer um papel chave na patogênese da DP. Relatos indicam que esta neurotoxina é responsável por desenvolver a maioria das causas multifatoriais apresentadas na patologia, com exceção da indução de neuroinflamação, que ainda não possui associação com danos celulares induzidos comprovados.

Os flavonoides, compostos originados do metabolismo secundário das plantas, estão amplamente distribuídos no reino vegetal (HADACEK et al., 2011). Vários efeitos biológicos vêm sendo atribuídos a este grupo de substâncias, bem como atividades antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais e anti-inflamatórias (VIDAK et al., 2015; COELHO et al., 2016; SROKA et al., 2015; LANI et al., 2015; STOCLET & SCHINI-KERTH, 2011). Nessa perspectiva, pesquisas apontam estes compostos fenólicos como importantes ferramentas para a proteção do organismo e consequente manutenção da homeostasia.

A apigenina (4,5,7 – tri-hidroxiflavona) é um flavonoide da classe das flavonas, produzido por vegetais, com propriedade terapêutica em humanos (LIU et al., 2010; PATEL et al., 2007). Esta flavona é encontrada em abundância nas frutas e vegetais, como salsa, cebola, laranja, chá, camomila, trigo, brotos e flor do maracujá (*Passiflora*) (PATEL et al., 2007). Dentre seus benefícios à saúde, a sua atividade anti-inflamatória relacionada à imunomodulação microglial, torna este composto um importante agente neuroprotetor para doenças neurodegenerativas, visto que a neuroinflamação agrava os sintomas deste grupo de patologias (REZAI-ZADEH et al., 2008).

Tendo em vista que o aminocromo tem sido proposto como modelo mais fisiológico por ser uma substância endógena e que seu potencial em induzir neuroinflamação como uma das alterações marcantes na DP ainda não foi demonstrado, o presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a resposta neuroinflamatória induzida pelo aminocromo e ainda verificar a imunomodulação desta resposta pela apigenina, um flavonoide de reconhecido efeito modulador da resposta microglial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817, é uma doença neurodegenerativa crônica, progressiva, caracterizada por sintomas motores que incluem bradicinesia, ataxia, rigidez e tremor em repouso (HORNYKIEWICZ, 1966; RIEDERER e WUKETICH, 1976). Mas que também é acompanhada por uma série de manifestações não-motoras, incluindo ansiedade, depressão, redução cognitiva e distúrbios autonômicos (DAWSON; DAWSON, 2003; GIRÁLDEZ-PÉREZ et al., 2014; DAS & SHARMA, 2016), que segundo Goldman e Postuma (2014) podem preceder o desenvolvimento de sintomas motores.

Os principais sintomas motores estão associados a uma perda progressiva lenta de neurônios dopaminérgicos na substância nigra pars compacta do mesencéfalo (SNpc) (JELLINGER, 2012). Além desses sintomas, outras manifestações generalizadas são observadas como consequência de alterações em diferentes áreas do cérebro (tálamo, hipotálamo, bulbo olfatório e tronco encefálico), indicando que esta enfermidade não é apenas uma alteração motora, mas sim, um distúrbio sensorial, cognitivo e psiquiátrico (GIRÁLDEZ-PÉREZ et al., 2014).

A incidência da DP aumentou exponencialmente a partir dos anos 60, com o aumento da expectativa de vida em países desenvolvidos, de forma que atualmente ela representa a segunda enfermidade neurodegenerativa mais comum nestes países (DORSEY et al., 2007). E há previsões que este aumento de incidência continue em associação com o crescente aumento da população senil.

No Brasil, segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS, 2015), durante o período de 2008 a 2015 foram internados 6.537 pacientes com o diagnóstico da doença de Parkinson, gerando aos cofres públicos um gasto de R\$ 11.571.097,41. Estes valores destacam a necessidade de pesquisas voltadas para a investigação da fisiopatologia da doença e possíveis formas de tratamento.

2.1.1 Fisiopatologia

Embora a causa da doença ainda seja desconhecida, várias teorias têm sido estudadas e vêm demonstrando que a DP possui causas multifatoriais que levam à degeneração neuronal como, por exemplo, neuroinflamação (BLANDINI, 2013), excitotoxicidade (CAUDLE E ZHANG, 2009), depleção de antioxidantes endógenos (SEGURA-AGUILAR et al., 2014), toxicidade por α -sinucleína (WANG & HAY, 2015), disfunção mitocondrial (LUO et al., 2015) e disfunção na degradação de proteínas com alterações associadas à neurodegeneração (ZHANG et al., 2016).

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

Outro importante mecanismo responsável pela perda neuronal tem sido discutido durante anos. Este sugere que a oxidação da dopamina (DA) citosólica (e seus metabólitos) conduz à produção de radicais livres citotóxicos (GREENAMYRE e HASTINGS, 2004). Uma possível fonte endógena de radicais livres nos processos degenerativos subjacentes à DP é a produção do radical leucoaminocromo-O-semiquinona a partir da oxidação da dopamina citosólica ao aminocromo (ARRIAGADA et al., 2004).

2.1.2 Neuroinflamação e resposta glial

Em particular, a inflamação, termo que abrange a neuroinflamação e as respostas inflamatórias periféricas, estão documentadas na DP atuando não somente como uma mera disfunção que ocorre no processo da doença, mas também como um importante fator da modificação dessa patologia ou mesmo aceleração (SCHLACHETZKI et al., 2013).

A ativação microglial é característica patológica típica de doenças neurodegenerativas (WANG et al., 2014). Nestas desordens, há um aumento na

expressão de receptores de antígenos do complexo de histocompatibilidade (HLA), citocinas e componentes do sistema complemento (McGEER et al., 1988; HIRSCH et al., 1998; KURKOWSKA-JSTRZEBSKA et al., 1999). Durante o dano cerebral crônico, as células microgliais induzem a liberação de citocinas como TNF e IL-1 β , os quais, por sua vez, são importantes na ativação autócrina e parácrina da microglia e, conseqüente, morte neuronal. Neste caso, a morte de neurônios dopaminérgicos, ocorre provavelmente através da ativação de apoptose pela TNF (HIRSCH & HUNOT, 2009; PETERSON & FLOOD, 2012).

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

2.1.3 Principais abordagens terapêuticas

Ainda que a L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-Dopa), um precursor da dopamina, produza efeitos colaterais importantes, que geralmente aparecem vários anos após o uso crônico, como desenvolvimento de flutuações motoras, discinesia e psicose, há mais de três décadas o tratamento principal para a DP tem sido a utilização de L-Dopa, utilização de agonistas de receptores de dopamina e o uso de inibidores da monoamina oxidase B (MAO-B E.C. 1.4.3.4), que reduzem a depleção da dopamina. Estes medicamentos são aprovados pelo *Federal Drug Administration* (FDA), organismo regulamentador dos Estados Unidos da América, para uso em pacientes com a DP em estágios precoce e avançado, enquanto que inibidores da catecol-O-metiltransferase (COMT), que tem a função de bloquear a metilação de L-DOPA na periferia aumentando os níveis disponíveis no cérebro, são aprovados apenas para pacientes com sintomas flutuantes (SCHAPIRA et al., 2005; SMITH et al., 2011).

Os agonistas da dopamina para tratar a DP eram considerados como opções de primeira linha para a monoterapia no início da doença em muitas diretrizes nacionais e internacionais. Entretanto, devido ao conhecimento de que o tratamento em longo prazo gera o risco de desenvolver transtornos do controle dos impulsos, edema periférico, sonolência diurna e fibrose valvular cardíaca, em muitos

países o seu uso passou a ser restrito para opções de segunda linha, com monitoramento de segurança (ANTONINI et al., 2009).

2.2 NEUROTOXINAS USADAS NA INDUÇÃO DE MODELOS PARA ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS NO DESENVOLVIMENTO DE DROGAS ANTIPARKINSONIANAS.

Os mecanismos moleculares atuantes no processo degenerativo da DP ainda não estão totalmente elucidados. Ainda que a neurodegeneração ocorra devido a uma causa multifatorial (ver tópico 2.1.1), mais estudos são necessários para desvendar os detalhes da patogênese da doença buscando com isso o desenvolvimento de um fármaco eficaz (SEGURA-AGUILAR & KOSTRZEAW, 2015). Ensaio pré-clínicos, realizados em modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*, tem um grande potencial para a elucidação dos mecanismos moleculares da DP.

Compostos como 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), rotenona, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto (paraquat) têm sido utilizados como neurotoxinas indutoras da DP servindo como modelos confiáveis para os estudos pré-clínicos de desenvolvimento de fármacos (JAQMAQ et al., 2016).

A 6-OHDA foi descoberta em meados da década de 60, sendo reportada como uma neurotoxina capaz de lesionar especificamente os neurônios dopaminérgicos. Este composto, de caráter hidrofílico, não possui capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo seu uso bastante difundido em modelos *in vivo*, com aplicação através de injeção estereotáxica na SNpc. A 6-OHDA possui alta afinidade por transportadores de dopamina e o seu acúmulo no citoplasma de neurônios dopaminérgicos gera a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e quinonas por auto-oxidação (SIMOLA et al., 2007; VILLA et al., 2013).

Outra neurotoxina utilizada como indutora da doença de Parkinson é a rotenona. Esse composto foi inicialmente utilizado como inseticida e pesticida; entretanto, passou a ser proibido por causar DP nos trabalhadores que faziam seu uso nas lavouras. Atua como um forte inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons, podendo também afetar componentes do citoesqueleto e induzir a geração de ROS (VOITENKO & NIKONENKO, 2015; PANOVA et al., 2005).

Um composto muito utilizado para induzir alterações características da DP em modelos *in vivo* e *in vitro* é o MPTP. Esta substância passou a receber atenção na década de 80 quando jovens da Califórnia, viciados em heroína, passaram a desenvolver uma forma aguda da DP após consumo da droga contaminada com essa neurotoxina (RANG et al., 2012). Sabe-se hoje que o MPTP é uma pré-droga, capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e, no SNC, é convertido para a forma tóxica 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidro piridínio (MPP⁺) pela MAO-B, enzima presente nos astrócitos (SEGURA-AGUILAR & KOSTRZEAW, 2015).

O MPP⁺ possui extrema afinidade pelos transportadores de dopamina (DAT), afetando principalmente os neurônios dopaminérgicos. Ao entrar na célula, o MPP⁺ provoca a inibição do complexo I e II da cadeia respiratória mitocondrial, impedindo a produção de ATP e, conseqüente, indução de morte celular (SEGURA-AGUILAR & KOSTRZEAW, 2015).

O paraquat é um herbicida amplamente utilizado, que foi associado a casos de parkinsonismo em humanos. Porém, essa idéia é inconclusiva, pois alguns estudos epidemiológicos e clínicos estão mostrando que não há associação entre o seu uso e a doença. Por outro lado, este composto é capaz de induzir a formação dos corpos de Lewy e dano oxidativo em modelo animal, que são alterações características da DP (BLESA & PRZEDBORSKI, 2014).

Todos os modelos supracitados utilizam neurotoxinas exógenas como indutoras da DP, porém existe a necessidade de um modelo mais fisiológico, uma vez que nem sempre existe a associação entre a exposição a estes compostos e o desenvolvimento da doença em humanos. Neste aspecto, a utilização do aminocromo ou de seu precursor (dopamina) ganha evidência por se tratar de uma neurotoxina endógena produzida por neurônios dopaminérgicos da substância nigra.

2.2.1 Alterações celulares e moleculares induzidas por aminocromo

2.2.1.1 Danos oxidativos induzidos por aminocromo

A dopamina, reconhecida como neurotransmissor presente em neurônios dopaminérgicos, possui um papel ambíguo no SNC (SEGURA-AGUILAR et al., 2014a). A capacidade desta molécula de sofrer alterações estruturais em pH fisiológico permite que este composto sirva tanto como um neurotransmissor

essencial, quanto como uma substância tóxica, protagonista de processos neurodegenerativos associados à DP. Essa atuação neurotóxica endógena é inicialmente explicada pela sua capacidade em induzir a formação de ERO (espécies reativas de oxigênio) durante a sua oxidação a aminocromo e posterior redução do radical quinona do aminocromo em um elétron, gerando o radical leucoaminocromo-O-semiquinona (PARIS et al., 2001; ARRIAGADA et al., 2004).

A redução do aminocromo em um elétron é realizada por flavoenzimas citoplasmáticas que utilizam nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido ($\text{NADH}^+ + \text{H}^+$) ou nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido ($\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$) como doadores de elétrons. O radical leucoaminocromo-o-semiquinona possui a capacidade de se auto-oxidar a aminocromo na presença de oxigênio, originando assim um ciclo redox que continuará até que o oxigênio e os doadores de elétrons, $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ ou $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$, presentes na célula sejam massivamente depletados (Fig. 1) (FUENTES et al., 2007).

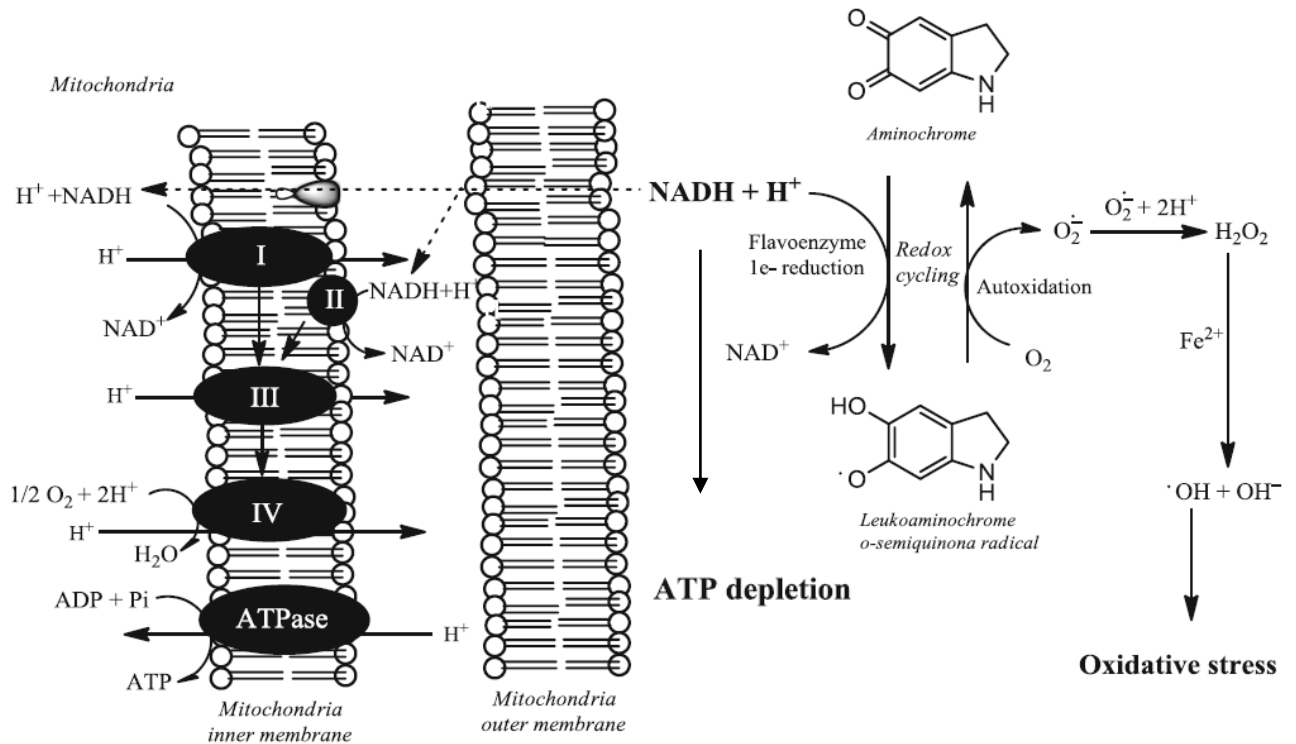
Pequenas concentrações de aminocromo podem ter um efeito devastador na depleção de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ e $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ devido a sua capacidade de gerar um ciclo redox. Além disso, mecanismos antioxidantes dependentes de $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$, como por exemplo, glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSC), serão comprometidos na presença do radical leucoaminocromo-o-semiquinona (SEGURA-AGUILAR et al., 2000; FUENTES et al., 2007; SEGURA-AGUILAR et al., 2014a; SEGURA-AGUILAR & PARIS, 2014b; SEGURA-AGUILAR & KOSTRZEWA, 2015).

Estudos *in vitro* de Fuentes et al. (2007) demonstraram que o aumento do aminocromo citosólico por inibição das proteínas transportadoras de monoamina vesicular 2 (VMAT-2) e NAD(P)H-quinona desidrogenase conhecida como DT-diaforase (EC.1.6.5.2) contribuem para a morte neuronal induzida pela dopamina. A VMAT-2 é responsável pela captação da dopamina citoplasmática, para armazenamento em vesículas com pH que inibi a oxidação da dopamina e formação do aminocromo, enquanto que a DT-diaforase é a enzima responsável por converter aminocromo à leucoaminocromo e impedir a formação do radical leucoaminocromo-o-semiquinona.

Esta flavoenzima, DT-diaforase, é composta por duas subunidades contendo duas moléculas de FAD. Esta é a única enzima capaz de catalisar a redução de dois elétrons de quinonas para hidroquinonas utilizando $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ e/ou $\text{NADPH}^+ + \text{H}^+$ como doadores de elétrons e formando a partir dessa reação o leucoaminocromo

hidroquinona. Este composto é direcionado para a formação de neuromelanina, propondo assim um papel fisiológico e neuroprotetor da DT-diaforase, que resulta na inativação do aminocromo (Fig. 2) (SEGURA-AGUILAR et al., 2014a; MUNÓZ, et al., 2012).

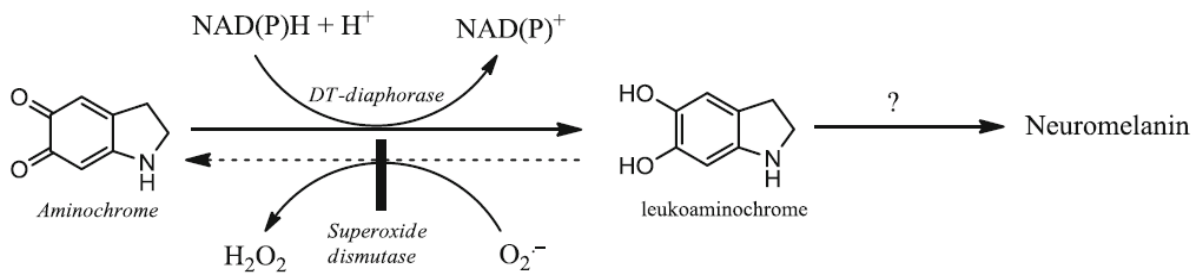
Figura 1. A conversão do aminocromo a leucoaminocromo-o-semiquinona.



Ciclo redox da conversão de aminocromo a radical leucoaminocromo-*o*-semiquinona e seus efeitos como: depleção de NADH + H⁺ e a formação de espécies reativas de oxigênio (direita). À esquerda temos o NADH + H⁺ seguindo para a produção de ATP na mitocôndria.

Fonte: Adaptado de SEGURA-AGUILAR et al. 2014b.

Figura 2. Reação de redução do aminocromo catalisada pela DT - diaforase.



Conversão do aminocromo a leucoaminocromo pela DT-diaforase e posterior conversão a neuromelanina por mecanismos ainda não conhecidos. Ação da enzima superóxido dismutase removendo radicais superóxidos evitando que o leucoaminocromo seja convertido novamente a aminocromo.

Fonte: SEGURA-AGUILAR et al. 2014b.

2.2.1.2 Atuação do aminocromo na disfunção mitocondrial e indução de morte celular por apoptose

De maneira geral, a disfunção mitocondrial tem um papel importante na DP, estando envolvida na morte neuronal imediata de neurônios dopaminérgicos da SNpc (HENCHCLIFFE & BEAL, 2008; SCHAPIRA, 2008b; VILA et al., 2008). Esta idéia nasceu acidentalmente por uma descoberta feita em 1985, quando se observou que contaminação com a pré-droga (MPTP) de um inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, causava sintomas similares aos da enfermidade (LANGSTON et al., 1985). Além disso, em amostras post-mortem da SNpc de pacientes com DP, já foi evidenciada diminuição da atividade do complexo I mitocondrial e déficit na cadeia de transporte de elétrons (MANN et al., 1994; KEENEY et al., 2006).

A causa para a disfunção do complexo I mitocondrial é uma questão de investigação na DP. Exposição a toxinas exógenas como a rotenona, paraquat, 6-OHDA e o próprio MPTP possuem papel relevante nessa disfunção (SCHAPIRA et al., 2010). Entretanto, produtos de oxidação da dopamina têm revelado causar um efeito substancial na função desta organela (AGUIRRE et al., 2012). Em trabalho realizado por Khan et al. (2005), utilizando mitocôndrias extraídas de cérebros de ratos, foi observado que a dopamina causa inibição na atividade dos complexos I e VI e que, na presença da tirosinase, enzima que catalisa a conversão da dopamina para dopamina-*O*-quinona com posterior ciclização para aminocromo, há uma potencialização na inibição destes complexos mitocondriais.

Outro estudo realizado por Aguirre et al. (2012) demonstrou que o aminocromo é capaz de inibir a atividade do complexo I mitocondrial, tanto em sistema celular quanto em sistema de mitocôndrias isoladas, com subsequente decréscimo nos níveis de ATP.

2.2.1.3 Formação de adutos com proteínas

O citoesqueleto de maneira geral é composto por: microfilamentos, que possuem polímeros de actina em sua composição, sendo um componente importante e essencial para esculpir e manter a citoarquitetura. Os microtúbulos

contendo as subunidades alfa-tubulina e beta-tubulina sob a forma de dímeros, que estão em equilíbrio dinâmico constante podendo juntamente com os filamentos de actina polimerizar e despolimerizar adicionando e removendo subunidades nas terminações dos polímeros; e por último os filamentos intermediários que irão proporcionar rigidez e elasticidade celular (KUEH & MITCHISON, 2009).

Alterações precoces no citoesqueleto podem afetar inúmeros mecanismos celulares, podendo ser os eventos iniciais do desenvolvimento de algumas doenças neurodegenerativas (CARTELLI et al., 2013).

Os efeitos neurotóxicos do aminocromo podem ser observados em linhagem de células dos tipos SH-SY5Y oriundas de neuroblastoma humano e RCNS-3 derivadas da SN de ratos adultos. Notavelmente, é possível verificar que além do estresse oxidativo e do dano mitocondrial, as células expostas ao aminocromo sofrem uma intensa alteração morfológica. Esta alteração traz uma perspectiva sobre o efeito dessa substância nos componentes do citoesqueleto neuronal. A redução de um elétron do radical O-quinona do aminocromo perturba a organização dos filamentos de actina e da rede de filamento alfa e beta-tubulina, que são fundamentais para manter a estrutura da célula. Na presença do aminocromo esses dois componentes do citoesqueleto parecem se agregar em torno da membrana celular fazendo com que a célula adquira uma forma esférica (PARIS et al., 2010).

Avaliando os efeitos do aminocromo sobre o citoesqueleto neuronal, Briceño et al. (2015) verificaram que a neurotoxicidade do aminocromo pode ser mediada pela ruptura precoce da rede de microtúbulos, havendo a formação de adutos entre o aminocromo e a tubulina. Este evento pode ser responsável pela inibição da montagem da rede de microtúbulos e perda de estabilidade do citoesqueleto. O estudo revela ainda que a capacidade do aminocromo em formar adutos com a tubulina gerando uma redução na concentração dos dímeros de tubulina, que são necessários para a formação dos microtúbulos. Isto dispara um aumento na expressão da tubulina como forma de mecanismo compensatório.

Além de inibir a atividade do complexo I e IV mitocondrial, conforme relatado no tópico 2.2.1.2., o aminocromo também é capaz de se conjugar com o complexo III mitocondrial e a enzima isocitrato desidrogenase (VAN LAAR et al., 2009), podendo este evento ser o responsável pela inativação destas proteínas.

Outro alvo do aminocromo para a formação de adutos é a PARK2, levando ao aumento da insolubilidade e conseqüente inativação da sua função ubiquitina

ligase E3, contribuindo para uma disfunção no sistema proteossômico da célula (LAVOIE, et al., 2005).

A presença dos corpúsculos de Lewy na substância nigra foi o primeiro achado histopatológico da DP. Sabe-se hoje que a α -sinucleína é o principal componente dessas estruturas e o aminocromo é capaz de formar adutos com esta proteína contribuindo para sua estabilização e toxicidade (MUNOZ et al., 2015).

2.3 FLAVONOIDES

A busca de produtos naturais no uso medicinal, em especial os provenientes de plantas, é paralela a própria história da humanidade. Segundo Franco (2005), o uso popular de plantas medicinais é uma arte que acompanha o ser humano desde os primórdios da civilização, sendo fundamentada no acúmulo de informações repassadas oralmente. Assim, diferentes sociedades humanas formaram seu conhecimento empírico próprio no uso medicinal ou tóxico das plantas.

Historicamente, o interesse nos metabólitos secundários de plantas foi direcionados por metas bem definidas, a exemplo da medicina tradicional chinesa, em que uma densa quantidade de conhecimento das propriedades curativas das plantas vem sendo acumulado e é aproveitada pela farmacologia moderna (McCHESNEY et al., 2007).

Embora, atualmente a química combinatória venha desenvolvendo um papel importante na criação de novos fármacos, é notável que a utilização de moléculas de origem natural continua a ser um campo muito explorado, seja utilizando composto natural com a sua estrutura preservada ou realizando modificações estruturais para otimização do efeito farmacológico (NEWMAN & CRAGG, 2007). Neste aspecto, a indústria farmacêutica tem pesquisado e prospectado, a partir dos chamados metabólitos secundários vegetais, moléculas que apresente reconhecida ou possível correlação de atividade biológica sobre alguma patologia, de forma a ter ação direta contra microrganismos ou ação moduladora dos nociceptores, ou do sistema imune com função anti-inflamatória.

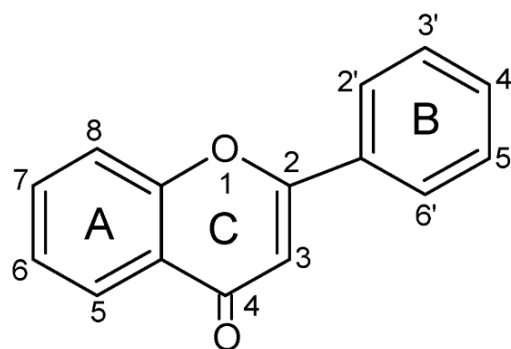
Os flavonoides são metabólitos secundários produzidos por plantas em resposta a estímulos de origem biótica ou abiótica. Atualmente é aceito que os metabólitos secundários de maneira geral contribuem para a defesa química de organismos que não possuem sistema imunológico (HADACEK et al., 2011).

Estes compostos fenólicos possuem uma estrutura química básica, caracterizada pela presença de um sistema de anel difenilpropano (C6-C3-C6) com um esqueleto benzeno- γ -pirona (Fig.3) (VILLIERS et al., 2016).

Os flavonoides possuem uma ampla diversidade estrutural e são divididos em oito grupos (Fig. 4). A classificação de cada grupo é atribuída através de critérios, como modificações na estereoquímica de suas moléculas e disposição dos radicais na sua estrutura básica (VILLIERS et al., 2016).

Muitos estudos epidemiológicos, clínicos e pré-clínicos têm sustentado fortemente os efeitos benéficos dos polifenóis, em especial a classe dos flavonoides, para a saúde humana (COLOMER et al., 2016). Fazendo uma análise primária da capacidade protetora dessa classe de compostos naturais baseando-se na presença de alguns radicais, pode-se perceber que: a presença de uma ligação dupla entre C2 e C3 no anel C influencia nas propriedades antioxidantes; o grupo carbonila na posição C4 ainda em C permite eliminar radicais hidroxila; os grupos hidroxilas no anel C inibem a peroxidação lipídica; no anel A a presença de grupos hidroxilas em C5 e C7 também inibe a peroxidação lipídica, e o mesmo ocorre no anel B nos carbonos C3 e C4 e no anel C em C3; e por fim, a presença de hidroxilas no anel B aumenta a capacidade em sequestrar radicais hidroxilo (STOJKO et al., 2015) (Fig.3).

Figura 3: Estrutura básica dos flavonoides



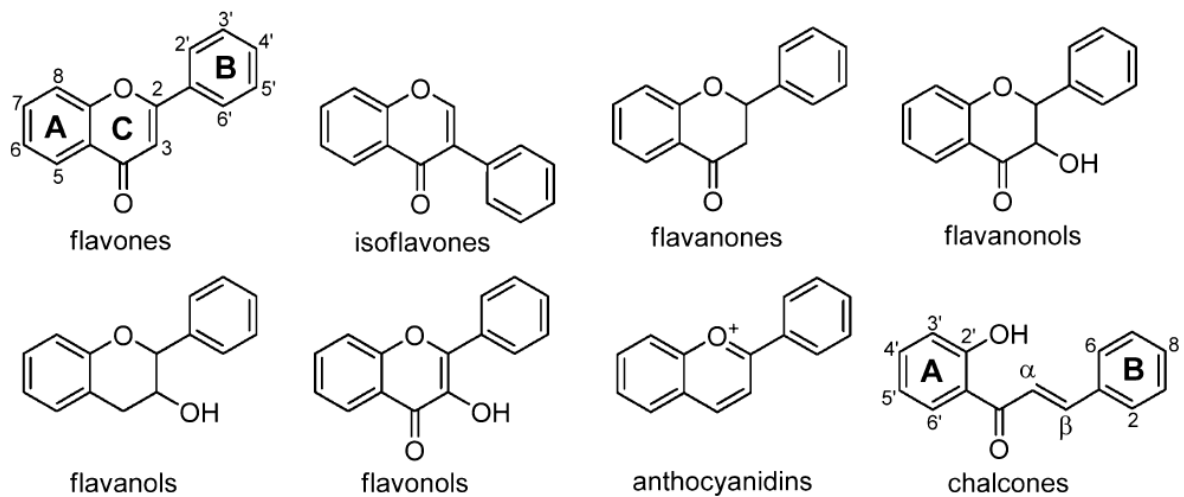
Estrutura básica do flavonóide: A e B, anéis aromáticos; C, anel heterociclo oxigenado.

Fonte: STOJKO et al., 2015.

Segundo revisado por Simões (2004), diversas atividades biológicas são atribuídas a essa classe de polifenóis, tais como atividade antitumoral (VIDAK et al., 2015; COELHO et al., 2016), antioxidante (SROKA et al., 2015), antiviral (LANI et al.,

2015) e anti-inflamatória (STOCLET & SCHINI-KERTH, 2011), dentre outras, o que lhe confere significativa importância farmacológica. Segundo Newman (2016), dentre os cinquenta e um fármacos anti-inflamatórios aprovados entre 1981 e 2014, quatorze foram derivados ou baseados em compostos de origem natural. A atividade anti-inflamatória dos flavonoides, segundo López Posadas (2008), está relacionada à modulação de células envolvidas na inflamação, como, por exemplo, inibindo a proliferação dos linfócitos T, bem como, a produção de TNF, IL-1 e IL-17 (citocinas pró-inflamatórias) ou mesmo modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico.

Figura 4: Grupos dos flavonoides



Classificação dos flavonoides através de critérios como modificações na estereoquímica de suas moléculas e disposição dos radicais na sua estrutura básica em flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavanonóis, flavanóis, flavonóis, antocianidinas e chalconas.

Fonte: VILLIERS , 2016

2.3.1 Efeitos neuroprotetores de flavonoides em modelos de estudo da doença de Parkinson.

As publicações relacionadas aos efeitos neuroprotetores dos flavonoides têm crescido exponencialmente nos últimos anos. Junto a isso, há um grande empenho na busca não somente “a causa e efeito” dos polifenóis, mas também por um contínuo trabalho em decifrar os mecanismos de ação relacionados à neuroproteção (EBRAHIMI & SCHUESENER, 2012).

Múltiplos mecanismos de neurotoxicidade são reconhecidos como autores ou co-autores na DP, envolvendo tanto os neurônios dopaminérgicos quanto as células gliais (KITA et al., 2014). Dentre estes mecanismos, a neuroinflamação possui um papel importante no desenvolvimento dessa doença (BLANDINI, 2013). Uma abordagem terapêutica com grande potencial para melhorar o processo neuroinflamatório nesta enfermidade é através da utilização de flavonoides (SOLANKI et al., 2015).

Vários flavonoides revelaram uma capacidade em diminuir a expressão ou transcrição de citocinas pró-inflamatórias na DP, como a IL-1 β , TNF e IL-6, e aumentar a expressão de citocinas regulatórias como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-10 (IL-10). Além das citocinas, outras enzimas com papel pró-inflamatório atuante no SNC como a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintetase (iNOS), além de marcadores de astrogliose e microgliose, como proteína acídica fibrilar glial (GFAP) e Iba-1 (marcador de microglia), encontram-se reduzidos na presença de flavonoides. Associada a esta modulação em geral, pode ser observada diminuição na morte de neurônios dopaminérgicos (REGLODI et al., 2015).

2.3.2 Efeitos neuroprotetores da apigenina

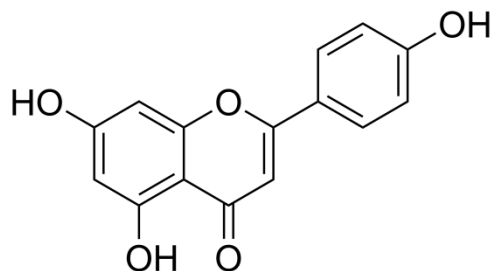
A apigenina, um flavonoide pertencente à classe das flavonas, é encontrada em abundância nas frutas e vegetais, como salsa, cebola, laranja, chá, camomila, trigo, brotos e alguns temperos. Classificado pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) como 4',5,7-trihidroxiflavona, esta flavona possui baixo peso molecular (270,24 kD) e contém solubilidade eficaz em dimetilsulfóxido (DMSO) (PATEL et al., 2007).

Seus benefícios à saúde são relatados por apresentar atividades biológicas antioxidantes (ZHAO, *et al.*, 2013), antitumorais (BAO *et al.*, 2013), anti-inflamatórias (ZEDETH *et al.*, 2008) e por ser potente inibidor de proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), em especial a MAPK de sinalização para o fator de transcrição do fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) (KUMAR *et al.*, 2014; SHUKLA & GUPTA, 2010). Segundo Zedeth *et al.* (2008), a apigenina possui capacidade para inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias geradas por monócitos, macrófagos e, em especial, microglia, tornado este composto um imunomodulador muito versátil nas doenças neurodegenerativas, nas quais é encontrada ativação microglial crônica.

Segundo Magalingan *et al.* (2015), a apigenina também é capaz de exercer seus mecanismos de proteção através da modulação das vias de sinalização MAPK, protegendo as células neuronais por meio da supressão da fosforilação da MAPK cinase-4 (MKK4), c-Jun N-terminal (JNK) e p38, diminuindo a expressão de caspase 9 e 3. Também via MAPK, este flavonoide é capaz de inibir a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa\beta$. Outro ponto relatado é a capacidade da apigenina em reduzir a produção de óxido nítrico (ON) via inibição da enzima iNOS, e a produção de prostaglandinas, via inibição da COX-2.

A apigenina também é capaz de estimular a produção de fatores neurotróficos. Segundo KIM (2015), a apigenina pode induzir a produção de fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) no sistema nigroestriatal dopaminérgicos *in vivo*.

Figura 5: Estrutura da apigenina



Estrutura da apigenina, uma flavona com distribuição de hidroxilas no carbono 7 e 5 do anel A e no carbono 4 do anel B.

Fonte: Google Imagens

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral caracterizar um novo modelo de estudo para neuroinflamação associada à DP avaliando os efeitos do aminocromo em culturas organotípicas mesencefálicas e a ação neuroprotetora da apigenina.

E como objetivos específicos:

1. Caracterizar a morte induzida pelo aminocromo em neurônios dopaminérgicos e avaliar a atividade neuroprotetora da apigenina em cultura organotípica.
2. Caracterizar a resposta microglial induzida pelo aminocromo e investigar a resposta anti-inflamatória da apigenina em cultura organotípica.
3. Caracterizar alterações no perfil de fatores neurotróficos e analisar a atividade moduladora de neurotrofinas pela apigenina frente à danos induzidos por aminocromo em cultura organotípica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE MESENCÉFALO

Neste estudo, culturas organotípicas do mesencéfalo de ratos Wistar com idade pós-natal de 8 ou 9 dias foram utilizadas como modelo biológico de danos induzidos por neurotoxinas. Os animais utilizados para as culturas foram obtidos do Biotério do Laboratório de Neurociência do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA), e sofreram procedimentos segundo protocolo já bem estabelecidos no Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular da UFBA, aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do ICS/UFBA (CEUA-ICS, Protocolo nº 0272012).

As culturas organotípicas foram preparadas de acordo com método de Stoppini *et al.*, 1991 modificado. A região do mesencéfalo foi selecionada de acordo com as imagens do Atlas de Estereotaxia (Paxinos & Watson, 2007), objetivando-se aquisição de fatias com a presença da substância SNpc, principal região com presença dos neurônios dopaminérgicos afetados na DP.

Os animais foram decapitados e tiveram seus encéfalos expostos e removidos assepticamente. As fatias coronais de mesencéfalo com espessura de 450µm foram adquiridas utilizando o aparelho Tissue Chopper McIlwain preparadas em condição estéril e transferidas três fatias para cada membrana de microporos (Millicell[®] – CM, Millipore, Bedford, MA, USA) acomodada em uma placa de poliestireno de seis poços e cultivadas em meio DMEM/F12 (Cultilab SP, Brasil) suplementado com 0,5 mg/ml de penicilina/estreptomicina e 2,5 µg/ml de fungizona, L-glutamina 2 mM, 3,6g/L de HEPES, 12 mL/L de glicose 50% e 10% de soro fetal bovino (Cultilab SP, Brasil).

As culturas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante cinco dias. A cada 48 h, o meio de cultura foi trocado e após três dias, tempo necessário para a estabilização da cultura, foram realizados os tratamentos com as neurotoxinas e o flavonoide por períodos de 24 ou 48 h.

4.2 EXPOSIÇÃO ÀS NEUROTOXINAS

4.2.1 Exposição das culturas ao aminocromo

O aminocromo foi preparado e purificado de acordo com protocolo descrito por Paris et al. (2010). A síntese de aminocromo foi realizada a partir da oxidação de dopamina em solução à 5mM (Sigma Chemical Co. St Louis, USA), catalisada com solução de tirosinase 1mg/ml (Sigma Chemical Co. St Louis, USA) em tampão MES (fosfato monobásico mais fosfato dibásico) 25 mM pH 6,0 durante 10 minutos à temperatura ambiente. A coluna de resina CM-sephadex (Sigma Chemical Co. St Louis, USA) previamente hidratada com MES 25 mM (pH 6,0) por 24 h foi preparada para a purificação do aminocromo, em uma coluna cromatográfica de 10 mL. O aminocromo foi recolhido a partir da coluna CM-Sephadex e foram realizadas alíquotas de 1mL e estocadas a -70°C. No dia da modulação, a concentração de aminocromo foi determinada usando análise do pico de absorbância para espectros de 478 nm e coeficiente de extinção molar de 3058 M⁻¹cm⁻¹. As células foram tratadas com aminocromo em concentrações que variaram entre 0,01µM e 25µM e analisadas após 24 ou 48h.

4.2.2 Exposição das culturas ao MPTP

Para os ensaios que visavam padronizar a morte celular induzida pelo aminocromo, utilizamos como controle positivo a exposição das fatias ao composto neurotóxico indutor de modelo clássico de estudo para a DP, o MPTP. Este foi adquirido do fabricante (Sigma Chemical Co. St Louis, USA), sendo pesado e dissolvido em água ultra-pura a uma concentração de 20mM para a formação de solução de mãe. No momento dos experimentos e a partir da solução de estoque foram realizadas diluições para a concentração de 800µM. As fatias foram analisadas após o período de 48 h de exposição ao MPTP.

4.2.3 Exposição das culturas ao LPS

Para os ensaios que visavam avaliar a neuroinflamação induzida pelo aminocromo, utilizamos como controle positivo o Lipopolisacarídeo de *Escherichia*

coli (LPS) adquirido do fabricante (Sigma Chemical Co L2630). Este composto é amplamente conhecido por causar uma neuroinflamação orquestrada pela microglia. No momento dos experimentos, o LPS foi diluído em meio de cultura para obtenção de solução na concentração de 1µg/ml a partir de uma solução estoque (diluída em meio de cultura) na concentração de 15µg/ml. As fatias foram analisadas após o período de 24 h de exposição.

4.3 TRATAMENTO COM A APIGENINA

O flavonoide apigenina foi obtido da Sigma-Aldrich (97% de pureza A3145). Este flavonoide foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) até uma concentração de estoque a 100mM mantida no escuro em temperatura de 4°C. A concentração de 10 µM foi adotada para uso nos experimentos com as fatias baseado em estudos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (LabNq) (SOUZA et al., 2015).

4.4 TESTES PARA AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA TECIDUAL, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DOS GRUPOS CONTROLES E TRATADOS

4.4.1 Avaliação da morfologia das fatias por microscopia óptica

A integridade das bordas das fatias e presença de células mortas foram avaliadas por microscopia óptica usando microscópio invertido (LABOMET TCM400) após 48h de exposição ao aminocromo em concentrações que variaram entre 0,01 à 25µM, ou em condição controle negativo (meio de cultura livre de toxinas) ou em condição controle positivo com exposição ao MPTP a 800 µM.

4.4.2 Avaliação de dano neuronal por *Western Blot*

Após exposição das fatias por 24 e 48h aos agentes citotóxicos e/ou ao flavonoide, os níveis de expressão de proteínas marcadoras de neurônios dopaminérgicos foram investigados através de Western Blot e imunodeteção de antígeno. Para tanto, após tratamento das células, as proteínas foram extraídas com tampão de extração (ureia 4M, SDS 2%, 2mM EGTA, 62,5mM Tris – HCl pH 6,8, 2mM EDTA 0,5% Triton X-100) contendo 1µL/mL de um coquetel inibidor de

proteases (P8340). A concentração de proteínas foi determinada usando o Kit BCA (BIO-RAD).

Dez microgramas (10µg) de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamina em condições desnaturantes a 10 ou 12% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilidene). E de maneira específica, bandas de proteínas foram detectadas com anticorpo primário de coelho para Tirosina hidroxilase (marcador metabólico de neurônios dopaminérgicos) (1:1000 Millipore AB152). O anticorpo foi diluído em solução de bloqueio (3% de leite desnatado em TBS-T) e mantido em câmara úmida a 4°C *overnight* e revelado com anticorpo secundário anti-rabbit 1:10.000, conjugado com peroxidase extraída de rábano e seu substrato, através de quimioluminescência e revelação em filme de raio X.

Após a revelação, os filmes de raio X foram escaneados para análise densitométrica das bandas imunorreativas pelo software ImageJ (WAYNW RASBAND; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, USA). Os resultados foram expressos em percentual de Unidades Densitométricas Arbitrárias em relação ao controle não tratado. Como controle de carregamento utilizamos detecção com anticorpo de coelho específico para GAPDH (1:1000) na mesma membrana após procedimento com solução Stripping, revelado também por uso de anticorpo secundário conjugado com peroxidase e quimioluminescência.

4.4.3 Avaliação de resposta microglial por imunohistoquímica

Após exposição aos agentes citotóxicos e/ou aos flavonoides, as fatias foram fixadas com paraformaldeído a 4% (PFA 4%) por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, o PAF 4% foi retirado e as fatias foram lavadas com PBS a 4°C, por 10 minutos. Em seguida, foi adicionada solução de metanol a 20% em PBS e incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente. Para permeabilização utilizamos Triton-X-100 0,5% em PBS e incubamos por 12 horas a 4°C. Em seguida bloqueamos as fatias utilizando BSA (Albumina Sérica Bovina) 20% em PBS *overnight* a 4°C.

Para a marcação das fatias com os anticorpos, cortamos a membrana de microporos (Millicell^R – CM, Millipore, Beldford, MA, USA), onde as mesmas encontravam-se depositada e as mesmas foram transferidas para uma placa de 24

poços contendo PBS. Lavamos 3X com 250 μ L de PBS, por 10 minutos cada lavagem, e iniciamos as marcações utilizando os anticorpos primários anti-IBA1 (marcador de microglia) de coelho (DAKO 1:300). Decorrido o tempo de incubação no anticorpo primário, as fatias foram lavadas três vezes com PBS, incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho Alexa Fluor 546 (1:200 Sigma) diluído em PBS, sob agitação lenta, por 2 h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram contra-corados com o agente fluorescente intercalante de DNA 4',6-diamidino-2-phenilindol diidroclorido (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR) na concentração de 5 μ g/mL durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas 3X com PBS, analisadas por microscópio confocal Leica (DMI6000 B).

4.4.4 Extração de RNA e qRT-PCR

As três fatias de cada grupo foram destinadas à extração de RNA utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, Life Technologies), de acordo com as especificações do fabricante. A integridade e concentração de RNA total foram avaliados utilizando o auxílio do Nano Espectro KASVI (cat# K23-0002), e a síntese do cDNA foi realizada utilizando SuperScript® VILO™ Master Mix (Invitrogen, Life Technologies™) seguindo as instruções do fabricante. A PCR em tempo real foi realizado utilizando ensaios de expressão gênica *Taqman*® (Applied Biosystems, CA, USA) que contêm dois iniciadores para amplificar a sequência de interesse e a sonda específica *Taqman*® MGB, marcada com o fluoróforo FAM e com o TaqMan® Universal Master Mix II (Invitrogen, Life Technologies™). As identificações dos ensaios para os genes quantificados neste estudo foram: Interleucina 1 beta (IL1 β), Fator de necrose tumoral (TNF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico dopamina cerebral (CDNF), fator de crescimento do nervo (NGF) e fator neurotrófico derivado de glia (GDNF). A PCR em tempo real foi realizada utilizando o instrumento QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (*Applied Biosystems*, CA, USA). As condições de termociclagem foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. A β -actina e HPRT1 foram utilizados como genes de referência (controles endógenos) para normalização dos dados de expressão gênica.

4.4.5 Análise estatística

Para cada análise, foram realizados três experimentos independentes, cada um com amostragem em triplicata. Os resultados foram analisados pelo programa estatístico Graph Pad Prism 5.10 (California, EUA) e registrados como média \pm desvio padrão ou mediana \pm desvio padrão dos parâmetros avaliados. Para determinar a diferença estatística entre os grupos, foi realizada uma análise de variância através do teste One Way ANOVA seguida pelo pós-teste Student-Newmann-Keuls. Apenas para a quantificação de células Iba1+ em imunohistoquímica foram realizados os testes não-paramétricos Kruskal-Walis e pós test Dunns. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

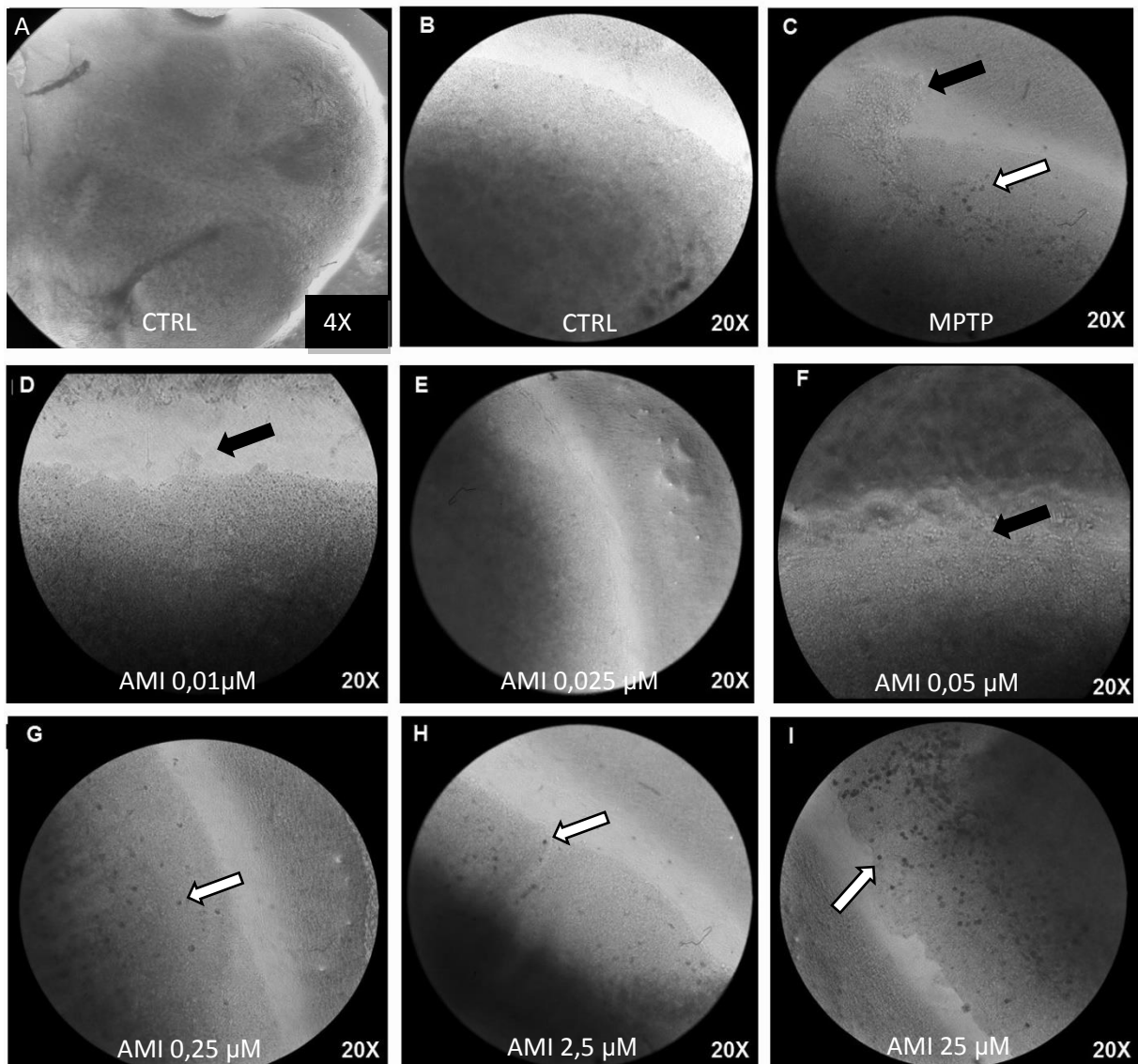
5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA MORTE CELULAR INDUZIDA PELO AMINOCROMO EM MODELO DE CULTURA ORGANOTÍPICA MESENCEFÁLICA E NEUROPROTEÇÃO INDUZIDA PELA APIGENINA

Os primeiros ensaios de caracterização do dano citotóxico induzido pelo aminocromo foram realizados através de fotomicroscopia de culturas organotípicas mesencefálicas 48h após exposição à neurotoxina endógena, em condições comparativas com culturas expostas ao MPTP (controle positivo) e culturas não tratadas com neurotoxinas (controle negativo). Observamos inicialmente que nas condições do controle negativo (Fig. 6 B) as fatias mesencefálicas apresentaram bordas íntegras, enquanto que fatias sob exposição do aminocromo (0,01 μ M à 25 μ M), sofreram desalinhamento das bordas (Fig. 6 D e F setas pretas) e apresentaram células escuras, sugestivas de morte celular (Fig. 6 G, H e I setas brancas). Foi possível também notar que em condições controle positivo para danos celulares induzidos pela neurotoxina MPTP (800 μ M) houve alterações semelhantes às das fatias tratadas com aminocromo (Fig. 6 C setas brancas e pretas).

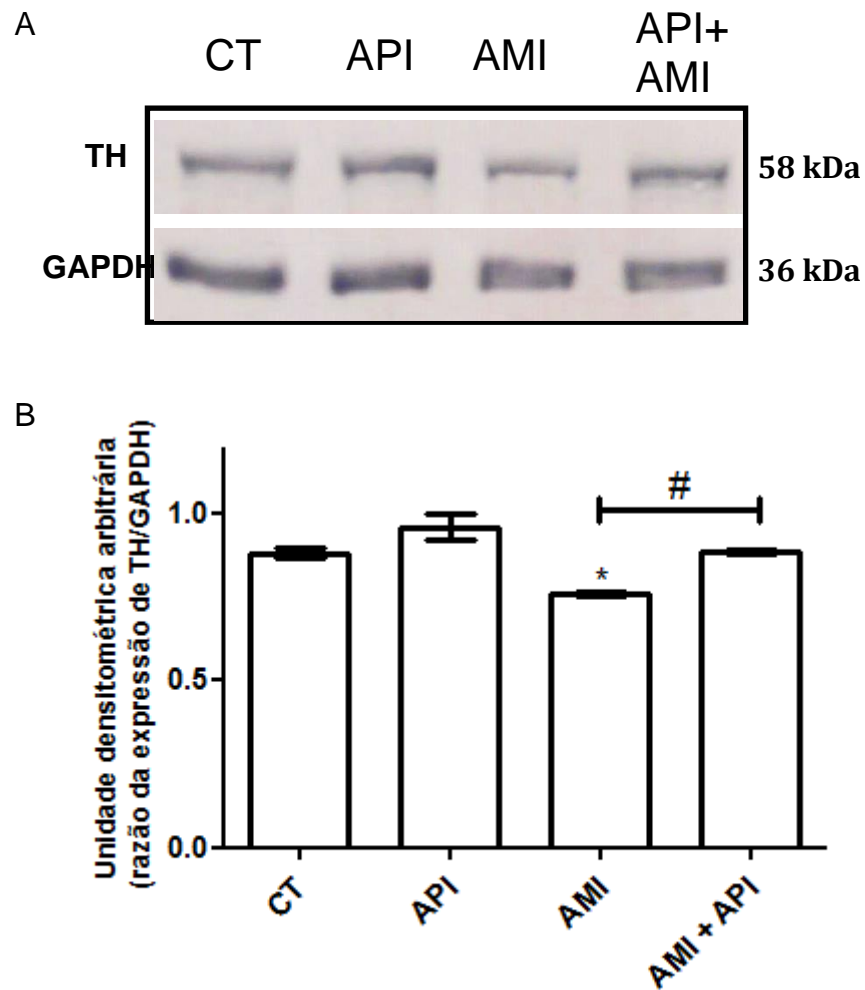
A avaliação por Western Blot da expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH), marcador de neurônios dopaminérgicos, demonstrou que o tratamento das culturas com aminocromo a 25 μ M, induziu 48h após o tratamento uma diminuição de 13,4% na expressão da proteína que representou uma redução de 0,12 unidades densitométricas arbitrárias da razão entre a expressão de TH e a expressão de GAPDH (controle de carregamento). Esta análise também demonstrou que tratamento com apigenina a 10 μ M, inibiu a redução da expressão de TH induzida pelo aminocromo após 48 h de tratamento, mantendo níveis de expressão semelhantes à de culturas sob condições controle negativo (DMSO 0,1%) (Fig.7).

Figura 6. Fotomicroscopia das fatias mesencefálicas expostas ao aminocromo e MPTP



Cultura organotípicas de mesencéfalo após 5 dias de cultivo e 48 horas de exposição ao aminocromo, ou à condição controle positivo para dano celular, exposição ao MPTP, ou à condição controle negativo, livre de toxinas no meio. Em **A)** Fatias em condições controle negativo (Obj. 4X), demonstrando a presença de substância nigra em porção mais escura. **B)** Fatias em condições controle negativo (Obj. 20X). **C)** Fatias em condições controle positivo expostas à concentração de 800 μ M da neurotoxina exógena, MPTP (Obj. 20X). **D - I)** Fatias expostas ao aminocromo (AM) em diferentes concentrações **D)** AMI 0,01 μ M; **E)** AMI 0,025 μ M; **F)** AMI 0,05 μ M; **G)** AMI 0,25 μ M; **H)** AMI 2,5 μ M; **I)** AMI 25 μ M. Seta preta indica desalinhamento das bordas e setas brancas indicam a presença de células escuras.

Figura 7. Análise da proteína Tirosina Hidroxilase por Western Blot



Análise da proteína Tirosina Hidroxilase por Western Blot. Em A, bandas de proteínas com 58KDa imunorreativas para Tirosina Hidroxilase e bandas de proteínas com 36KDa imunorreativas para GAPDH. Em B, gráfico representativo da densitometria, com resultados expressos em médias \pm desvio padrão de unidade densitométrica arbitrária. (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. (#) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo AMI+API. (*) ou (#) com valor de $p < 0,05$.

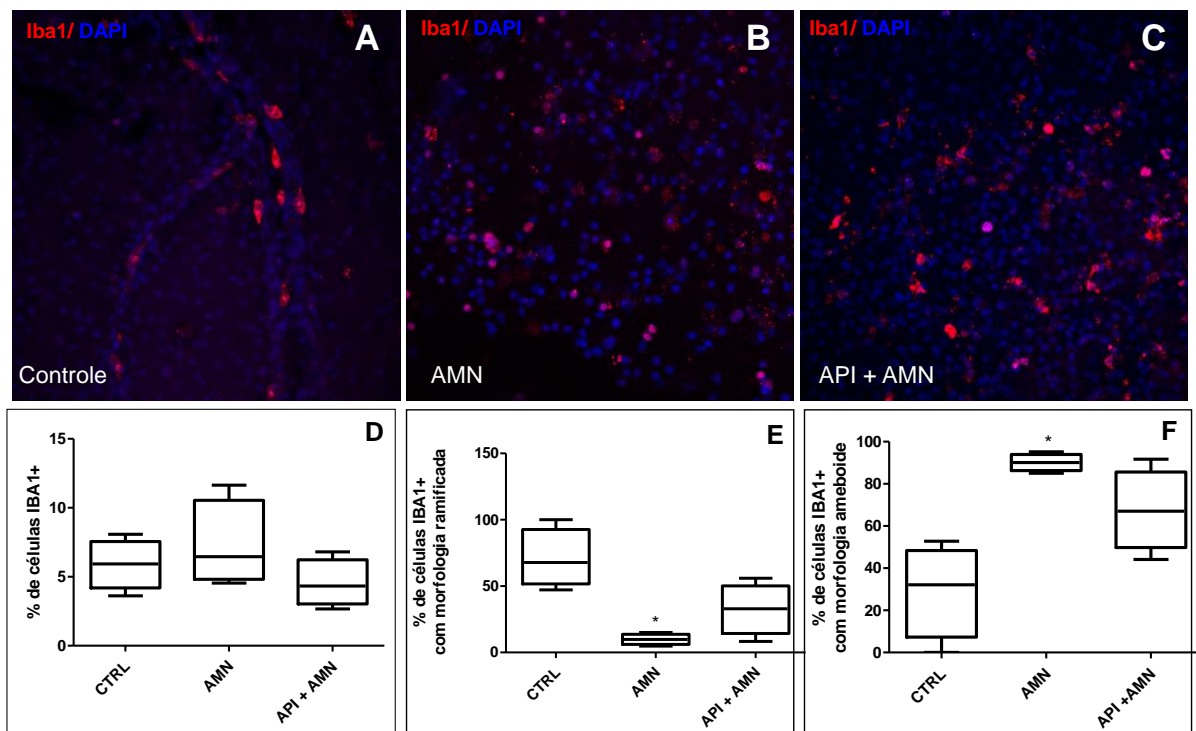
5.2 ANÁLISE DA NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDA PELO AMINOCROMO E EFEITO IMUNOMODULATÓRIO DA APIGENINA

A análise imunohistoquímica para proteína microglial Iba1 em culturas sob condições controle revelou uma mediana de 5,93% de células Iba1⁺ (Iba1 positivas) (Fig. 8D), sendo que destas 67,9% apresentaram morfologia ramificada (Fig. 8E), enquanto 32,1% apresentaram morfologia ameboide (Fig. 8F). Exposição das culturas a 25µM de aminocromo após 24 h reduziu a proporção de células Iba1⁺ com morfologia ramificada para 9,82% (Fig. 8E) e aumentou células com morfologia ameboide para 90,17% (Fig. 8F).

Ainda, ao analisarmos a expressão do mRNA da citocina pró-inflamatória TNF por RTq-PCR, observamos que após 24 h de tratamento das fatias com aminocromo e o controle positivo (LPS 1µg/ml) houve um aumento na expressão relativa de 5 vezes e 920 vezes, respectivamente, quando comparados com culturas sob condição controle (Fig. 9A). Estes valores apresentaram-se reduzidos em culturas tratadas concomitantemente com o aminocromo e apigenina e culturas tratadas com o LPS e apigenina, que apresentaram valores médios de 2 e 4,2 vezes maior que apresentados por culturas sob condições controle negativo, respectivamente (Fig. 9A).

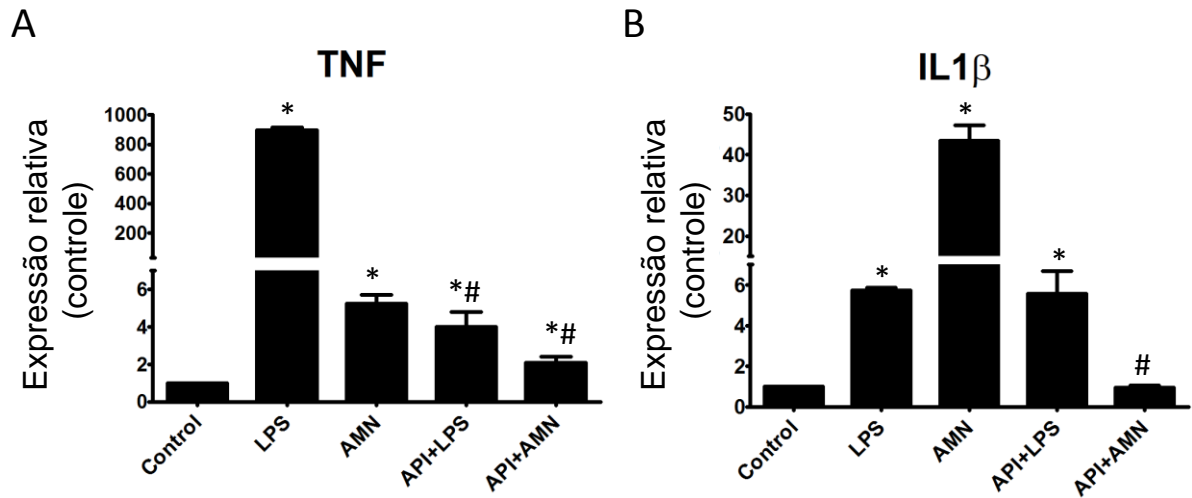
Já a avaliação da expressão do mRNA da citocina pró-inflamatória IL1β também por RTq-PCR revelou um aumento na expressão dessa citocina nas fatias tratadas com LPS ou aminocromo de 6 vezes e 45 vezes, respectivamente (Fig. 9B). Também, foi observado que culturas tratadas concomitantemente com LPS e apigenina apresentaram expressão de IL-1β semelhante à de culturas tratadas apenas com LPS. Por outro lado, enquanto que culturas tratadas concomitantemente com aminocromo e apigenina apresentaram expressão reduzida desta citocina, quando comparada com expressão em culturas tratadas apenas com o aminocromo, chegando a alcançar níveis semelhantes à de culturas sob condição controle negativo (Fig. 9B).

Figura 8. Análise da ativação microglial por imunohistoquímica



Análise da ativação microglial por imunohistoquímica para Iba1. Em A, fotomicroscopia de fluorescência de cultura organotípica sob condições controle negativo mostrando células Iba1+ com morfologia ramificada em vermelho, e núcleos marcados com DAPI em azul. Em B, células Iba1+ com morfologia ameboide em culturas organotípicas expostas por 24h ao aminocromo (25 μ M). Em C, culturas organotípicas tratadas concomitantemente com apigenina (API) e aminocromo (AMN), mostrando redução na população de células Iba1+ com morfologia ameboide. * representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, com valor de $p < 0,05$.

Figura 9. Análises da expressão das citocinas pró-inflamatórias por RTq-PCR



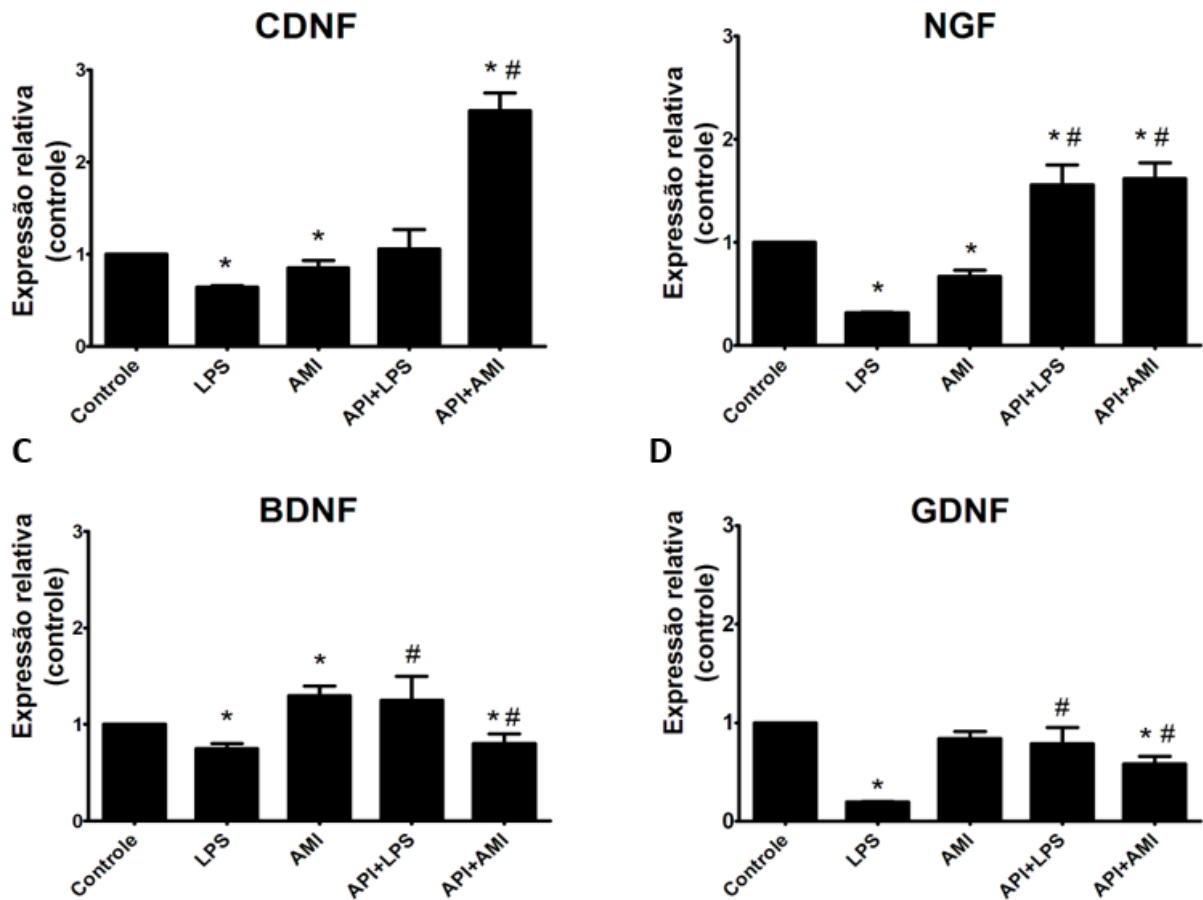
Análises da expressão das citocinas pró-inflamatórias por RTq-PCR. Em A, análise da expressão de TNF em culturas organotípicas de mesencéfalo tratadas por 24h com 1 μ g/ml de LPS, 25 μ M de aminocromo (AMN) ou tratamento concomitante com apigenina e LPS (API+LPS) ou com apigenina e aminocromo (API + AMN). Em B, análise da expressão de IL1 β em culturas organotípicas de mesencéfalo submetidas às mesmas condições de tratamento das culturas citadas para o gráfico A. (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (control). (#) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo, sem tratamento concomitante com a apigenina. (*) ou (#) com valor de $p < 0,05$.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS FATORES NEUROTÓFICOS INDUZIDA PELO AMINOCROMO E EFEITO MODULATÓRIO DA APIGENINA

Na análise da expressão do mRNA para fatores neurotróficos em culturas sob condição controle positivo observamos que o LPS (1µg/ml) foi capaz de induzir redução em 1,36; 1,69; 1,20; 1,81 vezes na expressão relativa do CDNF, NGF, BDNF e GDNF, respectivamente em relação ao controle negativo. Tratamentos com apigenina inibiram os efeitos do LPS e ainda aumentaram os níveis de NGF em 1,55 vezes quando comparado à condição controle negativo (Fig. 10)

Ainda, verificamos que o aminocromo foi capaz de induzir redução na expressão de CDNF e NGF em 1,15 e 1,33 vezes, respectivamente, em relação ao controle negativo e aumento na expressão de BDNF em 1,30 vezes, mas não interferiu nos níveis de GDNF. Tratamentos com apigenina aumentaram a expressão de CDNF e NGF em 2,56 e 1,62 vezes, respectivamente, e reduziram expressão de BDNF e GDNF em 1,50 vezes e 1,42 vezes, respectivamente, em relação ao controle negativo (Fig. 10).

Figura 10. Avaliação da expressão dos fatores neurotróficos por RTq-PCR.



Análises da expressão de fatores neurotróficos por RTq-PCR. Em A, análise da expressão de CDFN em culturas organotípicas de mesencéfalo tratadas por 24h com 1µg/ml de LPS, 25 µM de aminocromo (AMN) ou tratamento concomitante com apigenina e LPS (API+LPS) ou com apigenina e aminocromo (API + AMN). Em B, C e D análise da expressão de NGF, BDNF, GDNF, respectivamente, em culturas organotípicas de mesencéfalo submetidas às mesmas condições de tratamento das culturas citadas para o gráfico A. (*) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (control). (#) representa diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo grupo, sem tratamento concomitante com a apigenina. (*) ou (#) com valor de $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas as culturas organotípicas foram uma ferramenta encontrada como um importante passo na simulação de situações *in vivo*. O modelo deste trabalho utiliza fatias de tecido que podem variar de 300-450µm, permitindo a preservação de toda a citoarquitetura celular original e o contato célula-célula que já existia no tecido no qual deu origem a fatia (HUMPEL, 2015).

Neurotoxinas exógenas, como MPTP, 6-hidroxidopamina, paraquat e rotenona, servem como modelo para o estudo da DP e são utilizadas em culturas organotípicas. Neste modelo é possível selecionar fatias mesencefálicas contendo a SNpc (DAVIAUD et al., 2013; KEARNS, et al., 2006; ORAWARA, et al., 2007; TESTA et al., 2005; CAVALIERE et al., 2010). No entanto, não há relatos na literatura referindo o uso da cultura organotípica utilizando o aminocromo como neurotoxina indutora de um modelo da DP

Neste trabalho pioneiro foi possível identificar morte celular na borda da fatia na presença do aminocromo, o que corrobora com estudos desenvolvidos em linhagens de células SHSY-5Y e RCSN-3 onde é observado citotoxicidade induzida por esta toxina (FUNTES et al., 2007; MUNOZ et al., 2015). Esta substância neurotóxica é reconhecida por causar danos oxidativos, disfunção mitocondrial, desestabilização do citoesqueleto, disfunção proteossomal e adutos com a α -sinucleína (FUNTES et al., 2007; AGUIRRE, et al., 2012; BRICENO, et al., 2015, VAN LAAR et al., 2009; LAVOIE et al., 2005; MUNOZ et al., 2015) em linhagem de células.

Foi possível observar também por redução de expressão de marcador de neurônios dopaminérgicos a toxicidade do aminocromo e a ação neuroprotetora da apigenina. A apigenina é reconhecida como um flavonoide neuroprotetor atuando em vias anti-inflamatórias, com a redução dos níveis de citocinas e proteínas (iNOS) pró-inflamatórias e é um flavonoide com potencial anti-apoptótico evitando a fosforilação de MAPKs (ZEDETH et al., 2008; KUMAR et al., 2014; SHUKLA & GUPTA, 2010; MAGALINGAN et al., 2015; KIM, 2015).

A maioria das alterações celulares e moleculares presentes na doença de Parkinson já foram atribuídas como efeitos deletérios induzidos pelo aminocromo (MUÑOZ et al. 2015; NORRIS et al. 2005; AGUIRRE et al. 2012; ARRIAGADA et al. 2004; BRICEÑO et al. 2015; CUERVAS et al. 2015; HUENCHUGUALA et al. 2014;

MUÑOZ et al. 2012a; MUÑOZ et al. 2012b; PARIS et al. 2011; SEGURA-AGUILAR AND KOSTRZEWA, 2015; XIONG et al. 2014; ZAFAR et al. 2006). No entanto, pouco se sabe sobre seu potencial neuroinflamatório no SNC. Nossos achados revelam a primeira evidência de que o aminocromo induz ativação de células microgлияis, marcada por uma alteração fenotípica intensa, e a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF e principalmente IL-1 β .

Evidências em pacientes sugerem que a resposta microglial associada à produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β) possam contribuir para a progressão da neurodegeneração na DP (CZŁONKOWSKA et al. 2002; HIRSCH & HUNOT, 2009; MCGEER et al. 1988), o que alimenta a hipótese de que o uso de agentes anti-inflamatórios possa inibir a progressão desta enfermidade (PETERSON & FLOOD, 2012). Neste sentido, a apigenina tem merecido destaque dentro do grupo de compostos polifenólicos derivados de plantas por apresentar a habilidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias geradas por monócitos, macrófagos e microglia, em particular, apresentando-se como um composto promissor para doenças imunomodulatórias neurodegenerativas (REZAI-ZADEH et al. 2008). Nossos achados reafirmam o potencial imunomodulador da apigenina, evidenciados por efeito inibitório em alterações morfológicas e expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias induzidas por aminocromo ou LPS.

Até então desconhecido, CDFN, foi descrito pela primeira vez em 2007 por Lindholm *et al.* como uma proteína expressa em diversos tecidos de camundongo e humanos, incluindo em cérebro embrionário e pós-natal de camundongos, que previne por injeção intraestriatal a degeneração de neurônios dopaminérgicos e sinais motores em ratos. Mais tarde, foi revelado que injeção crônica no cérebro de ratos normalizou gradualmente a rotação induzida por anfetamina e inibiu a perda de neurônios TH+ na SNpc e estriado em ratos com injeção intraestriatal de 6-OHDA, enquanto outros fatores como GDNF e fator neurotrófico derivado de astrócito mesencefálico (MANF) não apresentaram efeito significativo (VOUTILAINEN et al., 2011).

Já o NGF é bastante conhecido por sua associação com a sobrevivência e crescimento de neurônios colinérgicos (COLLIER et al., 1999). Entretanto sua relação com a DP tem sido alvo de poucos estudos. Lorigados-Pedre & Bergado-Rosado (2004) expõem algumas evidências de que danos primários em neurônios dopaminérgicos afetam a síntese de NGF. Dentre estas, dados de Nishio et al.

(1998) que indicam reatividade do receptor TrKA na SNpc, o que sugere uma regulação autócrina deste fator. Ainda, dados de Mogi et al. (1998), que demonstram que lesão em estriado de animais induzidas por MPTP estão associadas à diminuição em níveis de NGF, juntamente com a elevação da IL-1 β e morte neuronal. Outros estudos demonstraram que NGF estabiliza microtúbulos e protege neurônios dopaminérgicos em cultura embrionária de ratos contra toxicidade induzida pela rotenona (JIANG et al., 2006). Nossos resultados vêm contribuir para a elucidação da relação entre CDNF e NGF com o sistema dopaminérgico, uma vez que evidenciamos que ambas neurotoxinas testadas, LPS e aminocromo, reduziram expressão de RNAm destes fatores, em associação a aumentos dos níveis de RNAm do IL-1 β . E ainda, revela uma ação modulatória neurotrófica e protetora da apigenina por restaurar ou elevar a altos níveis a expressão de RNAm do CDNF e NGF na presença das neurotoxinas.

Neurônios podem secretar o BDNF e este agir como fator autócrino para sobrevivência, diferenciação e proliferação em diferentes tipos neuronais, incluindo neurônios dopaminérgicos (ACHESON et al., 1995; HYMAN et al., 1991). Estudos em humanos têm demonstrado que níveis de mRNA e expressão da proteína BDNF apresentam-se reduzidos na substância nigra de pacientes com DP e também no soro de pacientes diagnosticados precocemente (MOGI et al., 1999; PARAIN et al., 1999; SCALZO et al., 2010; ZIEBELL et al., 2012). Por outro lado, são detectados níveis aumentados em soro de pacientes com estágio avançado da enfermidade (SCALZO et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que níveis de RNAm em culturas organotípicas foram reduzidos após a exposição ao LPS e que a apigenina inibiu este efeito, mantendo níveis próximos ao das culturas em condição controle. Estes achados reafirmam efeito neurotrófico e neuroprotetor da apigenina, conforme descrito por Patil et al. (2014). Aumento nos níveis de BDNF representa um importante alvo para neuroproteção em sistema dopaminérgico, uma vez que este fator é capaz de reduzir perda de células TH+ em modelos de estudo induzidos por MPTP e 6-OHDA (FRIM et al., 1994; LEVIVIER et al., 1995; SUN et al., 2005; TSUKAHARA et al., 1995; WANG et al., 2014).

O GDNF foi originalmente isolado do sobrenadante de linhagem de glioma de ratos e lhe foram atribuídos pronunciados efeitos neuroprotetores seletivos para neurônios dopaminérgicos em culturas de embriões, dentre eles: aumentar o número de neurônios e diferenciação morfológica de neurônios TH+ e ainda, aumentar a

captação de dopamina (LIN et al., 1993). Nossos estudos revelaram que a expressão deste fator apresentou-se reduzida em culturas expostas ao LPS, e que a apigenina foi capaz reverter esta redução, tornando a expressão das culturas sob tratamento concomitante com o LPS com níveis próximos daqueles encontrados em condição controle. Estes resultados estão de acordo com alguns achados da literatura que descrevem níveis reduzidos de GDNF em associação inversa à resposta neuroinflamatória envolvendo altos níveis de TNF e degeneração dopaminérgica (PATIL et al., 2014). E sugerem um efeito neuroprotetor da apigenina, uma vez que o GDNF e uma associação de GDNF e BDNF demonstraram efeito positivo na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos em culturas organotípicas expostas a 6-OHDA (STAHL et al., 2011).

Nossos resultados apontam que os níveis do RNAm do BDNF no grupo tratado com aminocromo apresentaram-se aumentados em relação ao controle e o RNAm do GDNF não apresentou redução no grupo tratado também com aminocromo, além disso vimos também um aumento expressivo do RNAm da citocina IL-1 β , demonstrando um possível papel modulatório dessa citocina na elevação da expressão do BDNF e mantendo os níveis de GDNF. Saavedra et al. (2006a) mostrou que a lesão por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e L-DOPA aumentou a expressão de GDNF em co-culturas de neurônio-glia. Em outro trabalho da mesma autora, realizado em 2006 (b) conclui-se que os neurônios danificados pela DP estimulam a produção de IL-1 β pelos astrócitos. Uma vez liberada, a IL1 β pode interagir com seus receptores presentes tanto em neurônios quanto em astrócitos, aumentando a expressão de GDNF. A infusão intracranial de IL-1 β possui a capacidade de ativação astrocitária e concomitante proteção contra a toxicidade da 6-OHDA (SAURA et al., 2003). Os resultados do BDNF deste trabalho também corroboram com os resultados de Song et al. (2013), onde a administração por injeção estereotáxica de IL-1 β em cérebros de ratos mostrou que o RNAm para BDNF estava elevado em relação ao controle. A redução na expressão do RNAm do BDNF e GDNF nos grupos tratados com aminocromo associado à apigenina foi acompanhado pela redução do RNAm da IL-1 β , sugerindo que a diminuição dos dois fatores neurotróficos nesta condição podem estar associados à regulação da interleucina.

7. CONCLUSÃO

Com base no conjunto de resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Culturas organotípicas de mesencéfalo de ratos de 8 dias expostas ao aminocromo constituem bons modelos de estudo *in vitro* para neuroinflamação associada à DP.
- A neuroinflamação, marcada principalmente por resposta microglial e produção de citocina IL-1 β , assim como a modulação de fatores neurotróficos (CDNF, NGF e BDNF) podem estar envolvidos na neurodegeneração induzida pelo aminocromo.
- A apigenina constitui um agente com potencial neuroprotetor e imunomodulador frente à disfunções induzidas pelo aminocromo.

REFERÊNCIAS

ACHESON, A. *et al.* A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. **Nature**. Vol.374, 1995.

AGUIRRE, P. *et al.* The dopamine metabolite aminochrome inhibits mitochondrial complex I and modifies the expression of iron transporters DMT1 and FPN1. **Biometals**. Vol.25, 2012.

ANTONINI A, TOLOSA E, MIZUNO Y, YAMAMOTO M, POEWE W. A reassessment of risks and benefits of dopamine agonists in Parkinson's disease. **Lancet Neurol** 8:929-937, 2009.

ARRIAGADA, C. On the neurotoxicity mechanism of leucoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. **Neurobiology of Disease**. Vol.16, 2004.

BAO, Y.Y. Anticancer mechanism of apigenina and the implications of GLUT-1 expression in head and neck cancers. **Future Oncology**. Vol.9, N°9, 2013.

BLANDINI, F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neuroimmune Pharmacol**. Vol. 8, 2013.

BLESA, J & PRZEBDORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Front Neuroanat**. Vol.8, 2014.

BRAAK H, GHEBREMEDHIN E, RÜB U, BRATZKE H, TREDICI KD. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121-134, 2004.

BRICENO, A. *et al.* Aminochrome toxicity is mediated by inhibition of microtubules polymerization through the formation of adducts with tubulina. **Neurotox**, Vol. 15, 2015.

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

CARTELLI, D. *et al.* Microtubule alterations occur early in experimental parkinsonism and the microtubule stabilizer epothilone. D is neuroprotective. **Sci Rep.** Vol. 3, 2013.

CAUDLE, W.M.AND ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. **Experimental Neurology**, 220(2): 230-3, 2009.

CAVALIERE, F. *et al.* An organotypic culture model to study nigro-striatal degeneration. **Journal of Neuroscience Methods.** Vol.188, 2010.

COELHO, P.L.C. Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. **Rev. Brasileira de Farmacognosia.** Vol. 26, 2016.

COLLIER TJ, SORTWELL CE. Therapeutic potential of nerve growth factors in Parkinson's disease. **Drugs Aging** 1999; 14: 261-87.

COLOMER, R. *et al.* Natural polyphenols and their synthetic analogs as emerging anticancer agents. **Curr Droug Targets.** Vol.17, 2016.

CUERVAS, C. *et al.* Glutathione transferase M2-2 secretad from glioblastoma cell protects SH-SY5Y cell from aminochrome neurotoxicity. **Neurotox res.**Vol.228, 2015.

CZŁONKOWSKA A, KURKOWSKA-JASTRZEBSKA I, CZŁONKOWSKI A, PETER D, STEFANO GB. Immune processes in the pathogenesis of Parkinson's disease - a potential role for microglia and nitric oxide. **Med Sci Monit.** V^o. 8, n. 8, 165 – 177, 2002.

DAS, N.R & SHARMA, S.S. Cognitive impairment associated with Parkinson's disease: Role of mitochondrial. **Curr Neuropharmacol.** Vol. 14, 2016.

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

DAVIAUD, N. *et al.* Modeling nigrostriatal degenerationin organotypic cultures, a new ex vivo model of parkinson's disease. **Neuroscience.** Vol. 3, 2014

DAWSON, TM., DAWSON, VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. 819-822, 2003.

DORSEY, E. R., et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**. 68, 384-386, 2007.

EBRAHIMI, A. & SCHUESENER, H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. **Ageing research reviews**. Vol. 11, Nº2, 2012.

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

FRIM DM, UHLER TA, GALPERN WR, Y COLS. Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain derived neurotrophic factors prevent 1-methyl-4-phenyl pyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. **Proc. Natl.Acad. Sci. USA** 91: 5104-5108, 1994.

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

FUENTES, P., PARIS, I., NASSIF, M., CAVIEDES, P., AND SEGURA-AGUILAR, J. Inhibition of VMAT-2 and DT-diaphorase induce cell death in a substantia nigra-derived cell line-an experimental cell model for dopamine toxicity studies. **Chem. Res. Toxicol**. 20, 776783, 2007.

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

GOLDMAN, J.G. & POSTUMA, R. Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease. **Curr Opin Neurol**. Vol.4, 2014.

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

HADACEK, F. *et al.* Hormesis and a chemical raison D'Être for secondary plant metabolites. **Dose-Response**. Vol.9, 2011.

HENCHCLIFFE, C. and BEAL, M. F. Mitochondrial biology and oxidative stress in Parkinson disease pathogenesis. **Nat Clin Pract Neurol**. Vol. 4, N°11, p.600-609, nov. 2008.

HIRSCH, E.C & HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurol**, Vol.8, 2009.

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

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

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

HUMPEL, C. Organotypic brain slice cultures: A review. **Neuroscience**. Vol.305, 2015.

HYMAN C. *et al.* BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. **Nature**. Vol.350, 1991.

JAQMAQ, S.A. *et al.* Evaluation of models of Parkinson's disease. **Front Neurosci**. Vol. 9, 2016.

JELLINGER, K.A. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. **Mov Disord**. Vol 27, N°2, 2012.

JIANG, Q. *et al.* Neurotrophic Factors Stabilize Microtubules and Protect against Rotenone Toxicity on Dopaminergic Neurons. **JBC**. 2006.

KEARNS, S.M. *et al.* A method for a more complete in vitro Parkinson's model: Slice culture bioassay for modeling maintenance and repair of the nigrostriatal circuit. **Vol. 53**, 2006.

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

KHAN, F.H. *et al.* Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended *in vitro* incubation: implications for Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta.** 1741 (1-2); 65-74, 2005.

KIM, S.R. Inhibition of microglial activation and induction of neurotrophic factors by flavonoids: a potential therapeutic strategy against Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research.** Vol.10, 2015.

KITA, T. *et al.* Protective effects of phytochemical antioxidants against neurotoxin – induced degeneration of dopaminergic neurons. **J Pharmacol Sci.** Vol.124, 2014.

KUEH, H.Y., MITCHISON, T.J. Structural plasticity in actin and tubulin polymer dynamics. **Science.** 325:960, 2009.

KUMAR, K.K. *et al.* Pharmacokinetic drug interactions between apigenina, rutin and paclitaxel mediated by P-glycoprotein in rats. **Eur J Metab Pharmacokinet.** Vol.14, 2014.

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

LANGSTON, JW. MPTP neurotoxicity: an overview and characterization of phases of toxicity. **Life Sci.** Vol.36, 1985.

LANI, R. *et al.* Antiviral activity of silymarin against chikungunya virus. **Sci Rep.** Vol.5, 2015.

LAVOIE, M.J. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. **Nature Medicine.** Vol.11, 2005.

LEVIVIER, M. *et al.* Intrastratial implantation of fibroblasts generically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. **J. Neurosci.** Vol. 15, 1995.

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

LIN, L. F., DOHERTY, D. H., LILE, J. D., BEKTESH, S., & COLLINS, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science.** 21, 1130–1132, 1993.

LIU J. *et al.* A new flavonoid from *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring. **Chem Pharm Bull (Tokyo)** 58:549-551, 2010.

LÓPEZ-POSADAS, R. *et al.* Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure – activity relationship study. **Biochem Pharmacol.** Vol. 76, N^o4, p.495-506, aug. 2008.

LORIGADOS, L.P. & BERGADO-ROSADO, J. El factor crecimiento nervioso en la neurodegeneración y el tratamiento neurorestaurador. **Neuol.** Vol.38, 2004.

MAGALINGAM, K.B. Protective mechanisms of flavonoids in Parkinson's disease. **Oxidative medicine and cellular longevity.** 2015.

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

McCHESNEY J.D. *et al.* Plant natural products: Back to the future or intro extinction? **Phytochemistry.** Vol.68, 2007.

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

MOGI M, TOGARI A, OGAWA M, IKEGUCHI K, SHIZUMA N, FAN D, et al. Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine

(MPTP) to mice on interleukin-1 beta and nerve growth factor in the striatum. **Neurosci Lett**; 250: 25-8. 1998

MUNOZ, P. *et al.* DT-diaphorase prevents aminochrome-induced alpha-synuclein oligomer formation and neurotoxicity. **Society Toxicology**. Vol. 145, 2015.

MUNOZ, P. *et al.* Overexpression of VMAT-2 and DT-diaphorase protects substantia nigra-derived cells against aminochrome neurotoxicity. **Biochim Biophys Acta**. Vol.7, 2012.

NEWMAN, J.D. & CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal Natural Products**. Vol. 70, N°3, 2007.

NISHIO T, FURUKAWA S, AKIGUCHI I, SUNOHARA N. Medial nigral dopamine neurons have rich neurotrophin support in humans. **Neuroreport**. 1998; 9: 2847-51.

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

ORAWARA, M. *et al.* Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. **Biochemical Pharmacology**. Vol.73, 2007

PANOV, A. *et al.*, Rotenone model of Parkinson's disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol. 280, 2005.

PARAIN, K. *et al.* Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. **Neuroreport**. Vol. 10. 1999.

PARIS, I. *et al.* Aminochrome induces disruption of actin, alpha- and beta-tubulin cytoskeleton networks in substantia-nigra-derived cell line. **Neurotox Res**. Vol.18, 2010.

PARIS, I. *et al.* Autophagy protects against aminochrome induced cell death in substantia nigra derived cell line. **Toxicological sciences**, Vol.121, 2011.

PARIS, I. *et al.* Copper neurotoxicity is dependent on dopamine – mediated copper uptake and one-electron reduction of aminochrome in a rat substantia nigra neuronal cell line. **Journal of Neurochemistry**. Vol.77, 2001.

PATEL D, SHUKLA S, GUPTA S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise. *Int J Oncol*;30:233–245, 2007.

PATIL, P.S. Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. **Neuropharmacology**. Vol.86, 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat brain: in Stereotaxic Coordinates. 6. ed. Elsevier, 2007.

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

RANG, P.H *et al.* **Farmacologia**. Ed.7^a, Elsevier, 2012.

REGLODI, D. *et al.* Novel tactics for neuroprotection in Parkinson's disease: Role of antibiotics, polyphenols and neuropeptides. **Progress in neurobiology**. 2015.

REZAI-ZEDEH, K.R. *et al.* Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT-1 induced CD40 expression. **Jornal of Neuroinflammation**. Vol.5, 2008.

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

SAAVEDRA, A. *et al.* Interleukin-1 β mediates GDNF up-regulation upon dopaminergic injury in ventral midbrain cell cultures. **Neurobiology of Diseases**. Vol. 25, 2006.

SAAVEDRA, A. *et al.* Selective injury to dopaminergic neurons up-regulates GDNF in substantia nigra postnatal cell cultures: role neuron-glia crosstalk. **Neurobiol**. Vol.23, 2006b.

SAURA, J. Intranigral infusion of interleukin-1 β activates astrocytes and protects from subsequent 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **Journal of neurochemistry**. Vol.85, 2003.

SCALZO, P. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. **J. Neurol**. Vol.257, 2010.

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

SCHAPIRA, A.H. *et al*. Complex I: inhibitors, inhibition and neurodegeneration. **Exp. Neurol**.224(2):331-335, 2010.

SCHAPIRA A. Present and future drug treatment for Parkinson's disease. **J Neuro INeurosurg Psychiatry** 76:1472-1478, 2005.

SCHLACHETZKI, J.C. Studying neurodegenerative disease in culture models. **Bras Psiquiatr**. Vol.35, 2013.

SEGURA-AGUILAR, J *et al*. Mechanisms of dopamine oxidation and Parkinson's disease. **Handbook of Neurotoxicity**, Ed. R.M.Kostrzewa, New York, 2014b.

SEGURA-AGUILAR, J. & KOSTRZEWA, M.R. Neurotoxin mechanisms and processes relevant to Parkinson's disease: An update. **Neurotox Res**. Vol. 27, 2015.

SEGURA-AGUILAR, J. *et al*. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. **Journal Neurochemistry**, Vol 129, 2014a.

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

SEGURA-AGUILAR, J. The possible role of one-electron reduction of aminochrome in the neurodegenerative process of the dopaminergic system, **Neurotoxicity Research**. Vol.3, 2000.

SHUKLA, S. & GUPTA, S. Apigenin: a promising molecular for cancer prevention. **Vol.6**, 2010.

SIMÕES, CMO.; SCHENKEL, EP.; GOSMANN, G.; MELLO, JCP.; MENTZ, LA.; PETROVICK, PR. **Farmacognosia – da Planta ao Medicamento**, 5^a ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

SIMOLA, N. *et al.* The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotox Res.** Vol. 11, 2007.

SMITH Y, WICHMANN T, FACTOR S, DELONG M. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. **Neuropsychopharmacology** 37:213-246, 2011.

SOLANKI, I. *et al.* Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. **Adv. Nutrition.** Vol.6, 2015.

SONG, C. Acute and subacute IL-1 β administrations differentially modulate neuroimmune and neurotrophic systems: possible implications for neuroprotection and neurodegeneration. **Journal of neuroinflammation.** Vol.10, 2013.

SOUZA, C.S.*et al.* Commitment of human pluripotent stem cells to a neural lineage is induced by the pro-estrogenic flavonoid apigenin. **Regenerative Biology.** 2015.

SROKA, Z. *et al.* The antiradical activity of some selected flavones and flavonols. Experimental and quantum mechanical study. **J. Mol. Model.** Vol. 12, 2015.

STAHL, K. *et al.* Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. **Brain Res.** Vol.1278, 2011.

STOCLET, V. & SCHINI-KERTH, V. Dietary flavonoids and human health. **Ann Pharm.** Vol.69, 2011.

STOJKO, R.A. *et al.*, Polyphenols from bee pollen: structure, absorption metabolism and biological activity. **Molecules.** Vol.20, 2015.

SUN, M., KONG, L., WANG, X., LU, X. G., GAO, Q., & GELLER, A. I. Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model

- TESTA, M.C. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. **Molecular Brain Research**. Vol. 134, 2005.
- TSUKAHARA T, TAKEDA M, SHIMOHAMA S, OHARA O, HASHIMOTO N. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. **Neurosurgery**; Vol.37, 733-739, 1995.
- VAN LAAR, V.S. *et al.* Proteomic identification of dopamina – conjugated proteins from isolated rat brain mitochondrial and SH-SY5Y cells. **Neurobiology of Disease**. Vol.34, 2009.
- VIDAK, M. *et al.* Effects of flavonoides from food and dietary supplements on glial and glioblastoma multiforme cells. **Molecules**. Vol 20, 2015.
- VILA, M., RAMONET, D. AND PERIER, C. Mitochondrial alterations in Parkinson's disease: new clues. **J Neurochem**. 107, 317-328, 2008.
- VILLA, M. *et al.*, One-electron reduction of 6-hydroxydopamine quinone is essential in 6-hydroxydopamine neurotoxicity. **Neurotox. Res**. Vol.101, 2013.
- VILLIERS, de A. *et al.* Recent advances and trends in the liquid-chromatography – mass spectrometry analysis of flavonoids. **J. Chromatogr**. Vol.1430, 2016.
- VOITENKO, L.P. & NIKONENKO, A.G. Modification of experimental rotenone model of Parkinson's disease. **Fizio zh**. Vol. 61, 2015.
- VOUTILAINEN, M.H. *et al.* Chronic infusion of CDFN prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**. Vol.228, 2011.
- WANG, S.J. *et. al.* Electroacupuncture-regulated neurotrophic factor mRNA expression in the substantia nigra of Parkinson's disease rats. **Neural regeneration research**. Vol.8, 2013.
- WANG, T. & HAY, J.C. Alpha-synuclein toxicity in the early secretory pathway: How it drives neurodegeneration in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**. Vol.9, 2015.

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

XIONG, R. *et al.* Quinone-induced protein handling changes: implications for major protein handling systems in quinone-mediated toxicity. **Toxicol. Appl. Pharma.** Vol.280, 2014.

YOON, JH.; BAEK, SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti – inflammatory properties. **J. Yonsei Med.** Vol.46, N^o5, p.585-596, oct, 2005.

ZAFAR, K. S.; SIEGEL, D.; ROSS, D. A potential role for cyclized quinones derived from dopamine, DOPA, and 3,4- dihydroxyphenylacetic acid in proteasomal inhibition. **Mol. Pharmacol.**70, 1079–1086, 2006.

ZHANG, C.W. *et al.* Parkin regulation and neurodegenerative disorders. **Frontiers in Aging Neuroscience.** Vol. 7, 2016.

ZHAO, L. *et al.* Neuroprotective, anti,amyloidogenic and neurotrophic effects of apigenina in na Alzheimer' disease mouser model. **Molecules.** Vol.18, N^o8, 2013.

ZIEBELL, M. *et al.* Striatal dopamine transporter binding correlates with serum BDNF levels in patients with striatal dopaminergic neurodegeneration, **Neurobiol.** Vol.33, 2012.