



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



RIKY DOUGLAS MELO GOMES

INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES NEUROPROTETORAS E
ANSIOLÍTICAS DA *EUTERPE OLERACEA* MART. EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON

BELÉM - PA

2017

RIKY DOUGLAS MELO GOMES

INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES NEUROPROTETORAS E
ANSIOLÍTICAS DA *EUTERPE OLERACEA* MART. EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao colegiado do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, modalidade Biologia da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau em Licenciatura Plena em Biologia.

Orientadora: Prof^F^a Dr^a Elizabeth Sumi Yamada.
Laboratório de Neuropatologia Experimental –
HUJBB – UFPA

BELÉM - PA

2017

RIKY DOUGLAS MELO GOMES

INVESTIGAÇÃO DE PROPRIEDADES NEUROPROTETORAS E
ANSIOLÍTICAS DA *Euterpe oleracea* MART. EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
colegiado do curso de Licenciatura em Ciências
Biológicas, modalidade Biologia da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau em Licenciatura Plena em
Biologia.

Orientadora: Prof^F^a Dr^a Elizabeth Sumi Yamada.
Laboratório de Neuropatologia Experimental, UFPA

Avaliador: MsC. Valdina Solimar Lopes Cardoso
Laboratório de Neuropatologia Experimental, UFPA

Avaliador: Msc. Susanne Suely Santos da Fonseca
Laboratório de Neuropatologia Experimental, UFPA

BELÉM - PA

2017

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente, com muito respeito e amor, aos meus pais que sempre me apoiaram nessa jornada.

A toda a minha família, que é cheia de irmãos e amigos.

A Yanne Alves Mendes, por todo apoio e amor.

Aos meus amigos do LaNEx, especialmente ao Anderson e a Sol. “LaNEx é 24h por dia e 7 dias por semana”

Agradeço ao Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez, por ter cedido o extrato de açai e por todas as dicas para a realização do trabalho.

Agradeço a Professora Elizabeth Yamada, por todos os ensinamentos e oportunidades a mim concedidas durante esses quase 5 anos sob sua orientação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVO	04
2.1 OBJETIVO GERAL.....	04
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	04
3. MATERIAIS E MÉTODOS	05
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	05
3.2 ANIMAIS.....	05
3.3 EXTRATO.....	06
3.4 TRATAMENTO.....	06
3.5 CIRURGIA PARA O MODELO UNILATERAL DE LESÃO.....	06
3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS	07
3.6.1 Campo aberto	08
3.6.2 Teste das barras horizontais	08
3.6.3 Teste da ambulacão sobre os bastões	09
3.6.4 Teste das barras paralelas	09
3.6.5 Teste das rotações induzidas por apomorfina	10
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	10
4. RESULTADOS	12
4.1 AVALIAÇÃO DA LESÃO.....	12
4.1.1 Rotações induzidas por apomorfina	12
4.2 AVALIAÇÃO DA MOTRICIDADE.....	13
4.2.1 Teste do campo aberto	13
4.2.2 Teste das barras horizontais	15
4.2.3 Teste das barras paralelas	15
4.2.4 Teste da ambulacão sobre os bastões	16
4.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	17

5. DISCUSSÃO	18
5.1 MODELO DE HEMIPARKINSONISMO E ANÁLISE DA LESÃO.....	18
5.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR.....	20
5.3 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO.....	21
6. CONCLUSÃO	22
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental.....	05
Figura 2. Ilustração – cirurgia e gavagem.....	07
Figura 3. Análise do campo aberto.....	08
Figura 4. Testes comportamentais.....	11
Figura 5. Análise das rotações induzidas por apomorfina.....	13
Figura 6. Análise do teste do campo aberto.....	14
Figura 7. Análise da pontuação no teste das barras horizontais.....	15
Figura 8. Análise do teste das barras paralelas.....	15
Figura 9. Análise do teste de ambulação sobre os bastões.....	16
Figura 10. Análise do peso corporal.....	17

Figura 11. Teste das rotações induzidas por agonistas dopaminérgicos.....	18
Figura 12. Resposta a apomorfina.....	19

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) pars compacta, sendo o estresse oxidativo um dos mecanismos envolvidos. Portanto, substâncias antioxidantes tem um potencial para ações neuroprotetoras frente a processos neurodegenerativos. Estudos mostram que os extratos polifenólicos de *Euterpe oleracea* protegeram células endoteliais vasculares humanas sob estresse oxidativo e inflamação, e a ingestão subcrônica de polpa de açaí melhorou a atividade oxidante em céfalos de ratos, e preveniu alterações na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). O objetivo do trabalho foi avaliar as propriedades neuroprotetoras e ansiolíticas do extrato aquoso do fruto de *E. oleracea* em modelo de hemiparkinsonismo em camundongos. Para isso foram utilizados 45 camundongos da linhagem C57BL/6 que foram divididos em 3 grupos (6-OHDA/Veículo; 6-OHDA/1g; 6-OHDA/5g) de acordo com a concentração de antioxidante contido no extrato de *E. oleracea* numa proporção de 1g e 5g de antioxidantes diários para uma pessoa de 70Kg. A administração do extrato foi feita via oral através de gavagem, e a solução feita com o extrato

foi preparada e aplicada diariamente. Foi feito um pré-tratamento durante 14 dias antes da cirurgia, e um tratamento de 28 dias após a cirurgia. A análise da lesão foi feita a partir do número de rotações induzidas por apomorfina nos dias 0 (antes da cirurgia), 7, 14, 21 e 28º dia. O comportamento foi avaliado com os testes do campo aberto, das barras horizontais, teste dos bastões e barras paralelas. Os resultados foram expressos em valores de média e erro padrão, e foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA) e teste Tukey, adotando-se níveis de significância de $P < 0,05$. Os resultados mostraram que 30% dos animais tratados apresentaram uma possível neuroproteção, aferida no teste da apomorfina. Além disso, todos os grupos tratados com extrato apresentaram aumento na atividade exploratória no campo aberto. Desta forma os resultados sugerem que o tratamento com uma única dose diária de extrato de *Euterpe oleracea* nas concentrações propostas foi capaz de produzir melhoras nos parâmetros investigados no modelo de hemiparkinsonismo por 6-OHDA.

Palavras-chave: Parkinson, 6-OHDA, *Euterpe oleracea*, antioxidante.

1. INTRODUÇÃO

A primeira descrição da Doença de Parkinson (DP) como uma condição neurológica é associada a James Parkinson há 200 anos, com seu trabalho intitulado “*An Essay on the Shaking Palsy*” (Um ensaio sobre a paralisia agitante), de 1817, a partir de paciente que apresentavam quadro motor peculiar como, tremor em repouso, bradicinesia ou acinesia, postura encurvada e marcha festinante (Przedborski, 2017). Desde então a DP é caracterizada com um distúrbio motor, sendo a principal forma clínica na maioria dos casos (Massano & Bhatia, 2012). Nos últimos dez anos surgiram evidências de que a DP é mais do que um distúrbio motor, com o paciente apresentando também diversos sintomas não motores como disfunções autonômicas, distúrbios do humor, distúrbios do sono, distúrbios sensoriais e déficits cognitivos, e que podem se perceptíveis mesmo antes dos sintomas motores se tornarem evidentes (Wolters & Braak, 2006; Siderowf & Lang, 2012).

A patologia da DP é caracterizada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNc) que emitem projeções predominantemente para o estriado. Devido à perda dos neurônios nigroestriatais ocorre uma diminuição correspondente na quantidade de dopamina (DA) tanto na SN como no estriado (Fahn & Sulzer, 2004; Tagliaferro & Burke, 2016). Os mecanismos patogênicos que induzem à neurodegeneração dessa via nigroestriatal possivelmente sejam iniciados por fatores ambientais em associação com fatores genéticos predisponentes. Dentre as vias patogênicas implicadas estão aquelas envolvendo disfunções mitocondriais, estresse oxidativo, disfunções na degradação proteica, excitotoxicidade (Dauer & Przedborski, 2003; Dexter & Jenner, 2013), disfunções nos processos celulares de autofagia dirigidos às mitocôndrias (Vives-Bauza & Przedborski, 2011) e neuroinflamação (Przedborski, 2010; Ransohoff, 2016).

As formas familiares de DP e as mutações genéticas associadas representam atualmente cerca de 10% dos casos que apresentam fenótipos clínicos e patológicos distintos. Vários estudos em casos familiares de DP esporádica sobre as mutações genéticas revelaram pistas importantes quanto aos mecanismos moleculares subjacentes ao processo da doença. Muitos desses mecanismos patogênicos descobertos na DP esporádica, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e manipulação de proteína alteradas se sobrepõem aos mecanismos de neurodegeneração da forma familiar. Esses estudos da DP familiar até agora revelaram pelo menos 17 genes autossômicos dominantes e autossômicos recessivos, mutações responsáveis por variantes da doença. Estes incluem mutações nos genes da α -sinucleína, *phosphatase and tensin homolog-inducible kinase 1* (PINK1) e *leucine-rich repeat*

kinase 2 (LRRK2), como os grupos genéticos mais comum para o início precoce e início tardio da PD, respectivamente, enquanto mutações em *glucocerebrosidase* (GBA) podem ser o fator de risco mais comum (Houlden & Singleton, 2012; Dexter & Jenner, 2013).

As evidências implicando as vias patogênicas citadas acima advêm de estudos em modelos animais, de estudos neuropatológicos pós-morte de pacientes, assim como a partir da elucidação das vias moleculares afetadas nas diversas alterações genéticas associadas ao parkinsonismo familiar. A via final que causa a morte neuronal implica uma multiplicidade de mecanismos que incluem morte celular tanto por apoptose dependente e independente de caspases, quanto por necrose (Gupta & Gollapudi., 2008).

Atualmente, a maior parte do arsenal terapêutico disponível para o tratamento da DP baseia-se em estratégias para reposição do neurotransmissor dopamina, cuja produção encontra-se limitada. Nesse arsenal, encontram-se tratamentos medicamentosos e cirúrgicos que, em geral, são efetivos no controle dos principais sintomas nos primeiros anos da doença. Entretanto, com a evolução da doença, invariavelmente, surgem complicações decorrentes do tratamento, tais como as discinesias e alterações neuropsiquiátricas, além de outras alterações mais diretamente associadas com a neurodegeneração. Nesse estágio mais avançado da doença não há terapias satisfatórias. Portanto, nos últimos anos tem aumentado a busca por alternativas que visem retardar, interromper, ou mesmo reverter à progressão da neurodegeneração, estratégias essas que são denominadas de terapias neuroprotetoras, neuro-restaurativas, ou ainda, terapias modificadoras da doença (Olanow et al, 2008; Olanow & Kordower, 2009; Stocchi et al, 2015).

Com base nos mecanismos patogênicos que antecedem as vias de morte celular na DP, várias terapias tem sido testadas tanto em modelos experimentais de DP como em ensaios clínicos, para avaliação do seu potencial neuroprotetor, tais como: i) inibidores da enzima monoaminoxidase B (MAO-B); ii) agonistas dopaminérgicos; iii) drogas que auxiliem na produção de energia (coenzima Q10, creatina, inibidores da GAPDH); iv) antagonistas de canais de cálcio; v) anti-inflamatórios; vi) antioxidantes (Hirsch & Hunot, 2009; Schapira, 2009). Vários modelos de estudo da DP visam reproduzir um modelo ideal que devem conter características patológicas e clínicas da doença. Existem hoje alguns modelos, divididos em genéticos e neurotóxicos, que apesar de certas limitações, esses modelos animais contribuem significativamente para uma melhor compreensão dos processos da doença e possíveis alvos terapêuticos na DP atualmente (Tieu, 2011; Przedborski, 2017).

Os estudos em busca de alimentos ou partes de alimentos que forneçam benefícios

médicos ou de saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, tem sido intensamente buscada. Como, terapias que podem restaurar a função neuronal reduzindo ou até mesmo eliminando o fator estressor. Os flavonoides estão sendo amplamente estudados para o desenvolver de uma nova geração de agentes terapêuticos que podem ser clinicamente eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas (Whatson & Preedy, 2014; Solanki, 2015). Os flavonoides são um grande grupo de metabólitos secundários da classe dos polifenóis, componentes de baixo peso molecular encontrados em diversas espécies vegetais. O consumo de alimentos ricos em flavonoides na dieta regular tem sido associado a um menor risco para várias doenças, incluindo a doença de Parkinson (Gao et al, 2012; Shah, 2015; Pandareesh et al, 2015). Além das suas propriedades antioxidantes, os compostos polifenólicos poderiam apresentar propriedades neuroprotetoras, através da modulação de vias de sinalização celular atuando em condições normais e patológicas (Kumar & Pandey, 2013; Solanki et al, 2015).

A região amazônica possui uma rica diversidade da flora, e nos últimos anos vem aumentando o número de estudos visando identificar nessa flora compostos com potencial terapêutico farmacológico em diferentes estruturas, como, folha, flor, fruto, raiz, óleos. Dentre esses estudos da flora se destaca nos últimos anos a espécie *Euterpe oleracea* Mart., da família das arecaceas, que é uma palmeira generalizada das várzeas na Amazônia. Seu fruto, conhecido popularmente como açaí do Pará (Pessoa & Texeira, 2012), inclui-se na classe das "superfrutas" por ser especialmente rico em antioxidantes, como compostos fenólicos e tocoferóis. As antocianinas são os seus principais compostos fenólicos, cianidina-3-glicosídeo e cianidina estão em concentrações maiores (Rogez et al, 2011), seguido de flavonoides como orientin e homoorientin-3-rutinoside (Pacheco-Palencia & Talcott, 2010). Outros flavonoides pertencentes às famílias flavona, flavonol, flavonol, e di-hidroflavonol também estão presentes, bem como os ácidos fenólicos (Mulabagal & Calderón, 2012). Esses compostos são bioativos em *Euterpe oleracea* e mostram propriedades antioxidante e antiinflamatória (Kang et al., 2012).

Observou-se em estudos que os extratos polifenólicos de açaí protegeram células endoteliais vasculares humanas sobre o stress oxidativo e inflamação (Noratto et al., 2011). Noratto et al. (2011) descreveram que extratos do açaí inibiram a produção de ROS induzida por condições de hiperglicemia. Machado F. (2016) demonstra que a ingestão subcrônica da polpa de açaí melhora a atividade oxidante em encéfalos de ratos, prevenindo alterações na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Assim o

açaí possui determinadas propriedades bioquímicas e farmacológicas com um potencial neuroprotetor frente às doenças neurodegenerativas.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar as propriedades neuroprotetoras do extrato aquoso do fruto de *Euterpe oleracea* Mart. em modelo de hemiparkinsonismo em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar os efeitos do tratamento com o extrato de *E. oleracea* (Açaí) sobre as alterações do comportamento motor de camundongos com indução experimental de doença de Parkinson.

- Investigar o efeito do tratamento com o extrato de *E. oleracea* (Açaí) sobre o comportamento rotacional induzido por apomorfina no modelo experimental proposto.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todo os testes propostos foram realizados num período de 7 semanas. O tratamento com extrato foi feito durante 2 semanas de pré-tratamento e 4 semanas de tratamento. Sendo realizado dentro do período de pré-tratamento um teste de Campo aberto e um teste de apomorfina, e dentro do período de tratamento foi realizado testes de apomorfina de 7 em 7 dias. A última semana (pós-tratamento) realizou-se os testes de avaliação motora.

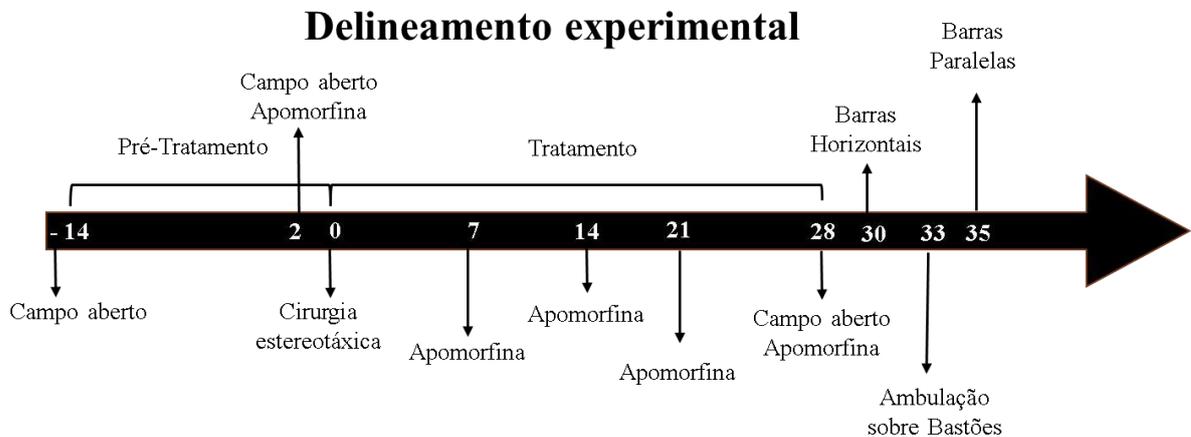


Figura 1. Delineamento experimental.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 45 camundongos Black da linhagem C57BL/6 provenientes do Instituto Evandro Chagas (Levilândia, Pará), pesando em média 25g e idade de 10 semanas. Os animais foram separados em grupos de 5 animais por caixa e mantidos em cabines para biotério (Insight[®]) com temperatura e umidade controladas ($24 \pm 2^\circ\text{C}$; 60%), em um ciclo de claro/escuro de 12/12h natural. A alimentação e água ficaram disponível *Ad libitum* e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação (CEPAE-UFGA) sob o parecer N°. 674170716013 (ANEXO).

3.3 EXTRATO

O extrato purificado de *Euterpe oleracea* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez, sócio da empresa Amazon Dreams S.A., localizada em Belém – PA, incubada na UFPA.

O processo de obtenção do extrato de açaí como um todo, foi patenteado em regime de co-titularidade pela UFPA e a empresa Amazon Dreams sob o nome “Processo de extração, fracionamento e purificação parcial de compostos bioativos hidrofílicos e lipofílicos de frutos de palmeiras do gênero *Euterpe*.” (PI0906328-7 de 10/09/2009) e não podendo ser detalhado por motivos de propriedade intelectual (Pompeu, 2009). A empresa garante que os extrato liofilizado cedido contem 30% de polifenóis totais de pureza.

O fruto foi coletado em plantações de planícies de inundação da região amazônica oriental (Estado do Para', Brasil), nos municípios de Abaetetuba e Acará. Frutos de árvores com 6 anos de idade foram escolhidos conforme o estágio de maturidade e transportados até a empresa, onde foram selecionados e lavados com água corrente para remoção de poeira e material estranho, e lavagem na presença de 50 ppm de cloro. Os frutos foram então submetidos a um processo de extração hidráulica das camadas mais externas dos frutos utilizando máquinas convencionais para despulpamento do fruto. Seguida, de uma etapa de filtração e outra de microfiltração, onde foi separada a borra e minimizados alguns compostos indesejáveis como fibras, lipídios e proteínas. O filtrado foi encaminhado para um processo de purificação parcial. O extrato aquoso purificado foi congelado a -40 °C por uma noite e liofilizado por 48 horas até secagem quase completa (<2% de umidade residual) e acondicionamento em saco plástico sob vácuo. A liofilização foi feita para minimizar a degradação dos compostos fenólicos até seu uso no experimento (Rogez et al., 2011).

3.4 TRATAMENTO

Foram divididos em 3 grupos (6-OHDA/veículo; 6-OHDA/ 1g; 6-OHDA/5g) de acordo com a concentração de antioxidante contido no extrato de *E. oleracea* numa proporção de 1g e 5g de antioxidantes diários para uma pessoa de 70Kg. Essas doses foram baseadas nos requisitos de vitaminas e minerais na nutrição humana da Organização Mundial da Saúde (OMS 2002) e trabalhos com ingestão de polifenóis na dieta (Middleton 1984; Scalbert 2000,

2005). A administração de 0,5ml da solução do extrato diluído em água natural foi feita via oral através do método de gavagem, e a solução foi preparada e aplicada uma vez por dia e nos mesmos horários (Figura. 1B). Foi feito um pré-tratamento durante 14 dias antes da cirurgia, e um tratamento de 28 dias após a cirurgia. Durante o tratamento os animais tiveram livre acesso a comida e água, e foram pesados de 3 em 3 dias.

3.5 CIRURGIA PARA O MODELO UNILATERAL DE LESÃO

A anestesia para a cirurgia foi feita com uma mistura com cloridrato de cetamina (Dopalen) na dose de 100 mg/kg e cloridrato de xilazina (Dopaser) na dose de 10mg/kg, e aplicada intraperitonealmente. Após certificação da profunda anestesia, o animal teve sua cabeça fixada em aparelho estereotaxico (Insight). As cirurgias estereotaxicas foram realizadas no estriado dorsal esquerdo com injeção de 5 μ g de 6-OHDA (Sigma-Aldrich). As coordenadas estereotaxicas foram como referenda ao bregma: Antero posterior (AP) + 0,8; médio lateral (ML) + 2,0; ventro medial (VM) -3,0 (Figura. 1A). Utilizou-se uma seringa Hamilton de 10 μ l para a injeção, o volume injetado foi de 2 μ l (2,5 μ g/ μ l de 6-OHDA). A velocidade de injeção foi de 0,5 μ l/min, permanecendo a agulha fixada no local por 5 minutos após a injeção, e retirada lentamente para evitar o refluxo (Figura. 1A). A dose de 5 μ g de 6-ohda e a região do estriado foram baseados nos trabalhos de Alvarez-Fischer et al (2008), Heuer (2012) e Stott & Barker (2014)

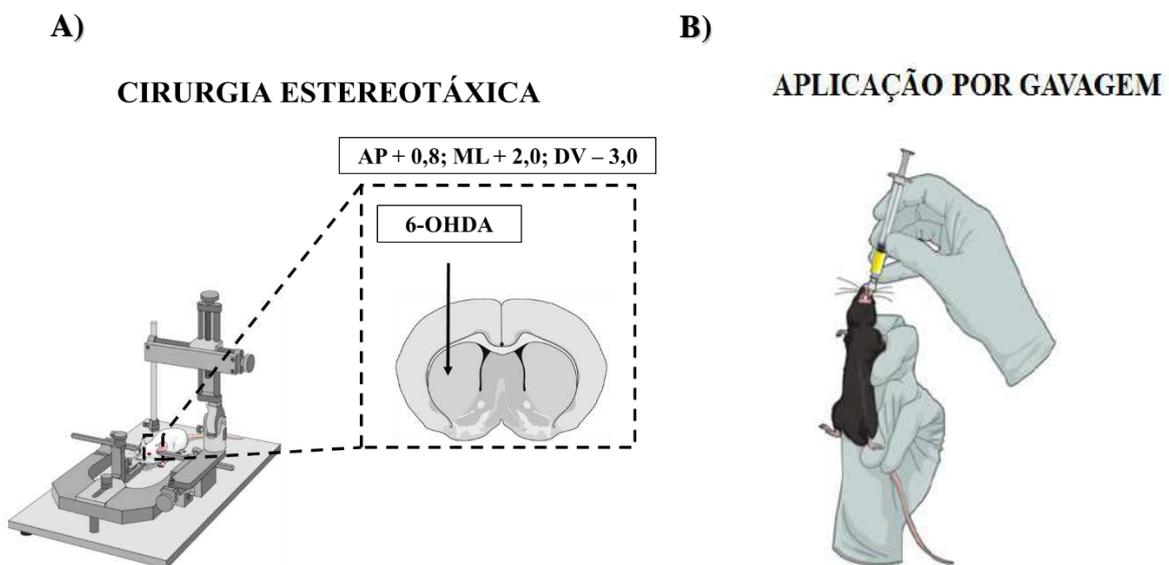


Figura 2. Ilustração. A) Cirurgia estereotóxica. B) Aplicação por gavagem.

Fonte: Mind the Graph. <https://mindthegraph.com>

3.6 TESTES COMPORTAMENTAIS

Utilizou-se testes comportamentais para avaliação da motricidade e dimensão da lesão gerada pela 6-OHDA. A motricidade foi avaliada pelo teste do campo aberto, teste das barras horizontais, da ambulação sobre bastões e barras paralelas; a dimensão da lesão cerebral foi avaliada pelo teste de rotações induzidas por apomorfina. Todos os testes foram filmados e analisados posteriormente.

3.6.1 Teste do Campo Aberto

Para a avaliação da motricidade foi realizado 3 testes de campo aberto, o primeiro antes do pré-tratamento de 14 dias, o segundo antes da cirurgia (dia 0) e o terceiro no fim do tratamento, no 28º dia. O aparato de 30x30x30 cm dividido em áreas, centro e periferia. O teste teve a duração de cinco minutos. O aparato foi previamente higienizado com álcool etílico a 10% e seco. A análise foi feita observando-se fatores, como distância total percorrida, velocidade média, velocidade máxima e tempo imóvel. Na área do centro e na periferia, distância e tempo em cada área (Figura. 3).

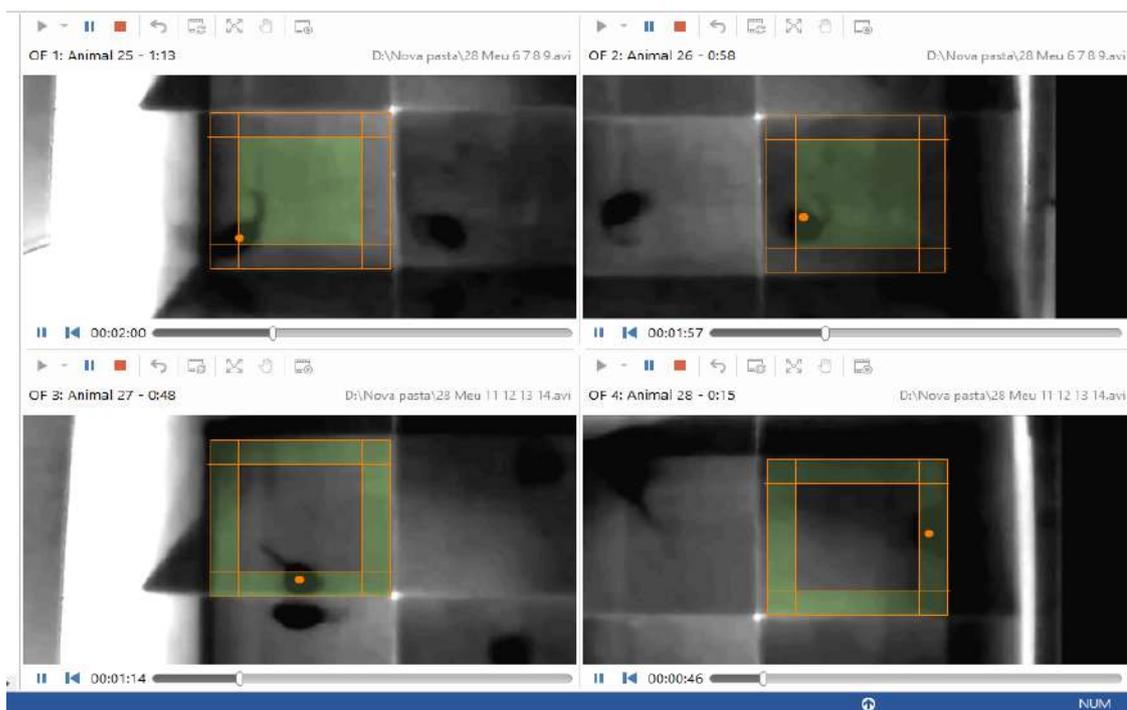


Figura 3. Análise do campo aberto. Software ANY-maze Video Tracking System, versão

3.6.2 Teste das Barras Horizontais

Foram utilizadas 3 barras de ferro com 45 cm de comprimento e espessuras diferentes (2; 3 e 6,2mm), que foram fixadas em duas colunas de ferro nas extremidades na altura de 60 cm (Figura. 4A). No teste é avaliado a força do camundongo onde ele é colocado na barra em um ponto central, segura-se pela cauda e coloca-se somente as patas dianteiras para que ele possa segurar na barra com firmeza. O teste tem duração de 30 segundos ou quando o animal atinge uma das extremidades da estrutura que suporta as barras, ou quando cai, e caso ele caia com menos de 5 s repete-se o teste. O aparato foi previamente higienizado com álcool etílico a 10% e seco. Houve uma pontuação para o tempo em que cada animal permaneceu na barra, quanto mais alta, melhor o desempenho motor. Os animais tiveram até 3 testes, onde a média dos 2 melhores tempos gerou a pontuação para a análise estatística. O teste foi adaptado de Deacon (2013).

Tempo de queda entre 1-5 sec = 1

Tempo de queda entre 6-10 sec = 2

Tempo de queda entre 11-20 sec = 3

Tempo de queda entre 21-30 sec = 4

Tempo de queda a partir de 30 sec = 5

Alcançar umas das extremidades até 30 sec = 5

3.6.3 Teste da Ambulação sobre Bastões

Nesse teste é avaliado a capacidade ambulatória dos animais sob bastões de diferentes diâmetros. Foram utilizados 3 bastões de madeira de 70 cm de comprimento e com espessuras diferentes (3,5; 2,2 e 1,0 cm) que foram fixados paralelamente em uma bancada (Figura. 4B). Os animais tiveram 3 dias de teste, sendo os 2 primeiros como treino no aparato e o 3º teste como oficial para análise quantitativa. Os animais foram colocados nas extremidades dos bastões virados para o lado oposto da bancada. Cada camundongo teve o tempo de 120 s para se orientarem e percorrerem o bastão até ultrapassar a marca de 60 cm delimitada nos bastões (10 cm antes da bancada). Foi medido o tempo de orientação 180º graus e de percurso de volta a bancada (tempo em que o animal demorou a ultrapassar a marca ou o tempo que ele ficou no bastão caso caia). Se ele caiu com menos de 5 s repetiu-se

o teste e quando atingiu o tempo máximo de 120s o animal foi retirado do bastão, e o teste e finalizado. O aparato foi previamente higienizado com álcool etílico a 10% e seco. O teste foi adaptado de Deacon (2013).

3.6.4 **Teste das Barras Paralelas**

O aparato contém duas barras de metal paralelas de 1 m de comprimento, 0,5 cm de diâmetro, sendo fixadas separadas a 2,2cm por colunas de suporte de metal nas suas extremidades, e ficando a 60 cm acima do chão (Figura. 4C). Nesse teste é avaliado a capacidade ambulatoria dos animais, onde foram colocados no centro das duas barras com o seu eixo longitudinal perpendicular ao das barras, de modo que as patas dianteiras ficassem em uma barra e as traseiras na outra barra. A análise é semelhante a dos Bastões. Onde é medido: o tempo em que o animal leva até que se oriente 90° graus e o tempo de deslocamento para uma das extremidade. Se ele caiu com menos de 5 s repetiu-se o teste e quando atingiu o tempo máximo de 120s o animal foi retirado, e o teste finalizado. O aparato foi previamente higienizado com álcool etílico a 10% e seco. O teste foi adaptado de Deacon (2013).

3.6.5 **Teste de Rotações Induzidas por Apomorfina**

Para a avaliação da lesão todos os animais foram submetidos ao teste de rotação induzida por apomorfina para a avaliação da lesão, 2 dias antes da cirurgia e nos dias 7, 14, 21, 28 do período de tratamento. A apomorfina (Sigma-Aldrich), na dose de 0,6 mg/Kg (dissolvida em salina a 0,9%), foi injetada na região subcutânea dos animais e, imediatamente após a aplicação, eles foram colocados em um aparato circular com 12 cm de diâmetro e 9 cm de altura (Figura. 4D). O aparato foi previamente higienizado com álcool etílico a 10% e seco. O comportamento dos animais foi gravado durante 20 minutos. Depois, o vídeo foi analisado contando o número de rotações que cada animal realizou em torno de seu próprio eixo.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi feita através do programa GraphPad Prism 5, adotando um nível de significância $p \leq 0,05$. Os testes para a avaliação da motricidade e da lesão foram representados em valores de média \pm erro padrão. As comparações dos testes comportamentais entre os dias de teste foram analisadas através da análise de variância (ANOVA) 2 critérios, seguido de pos-test de Bonferroni. Na análise entre os grupos foi

através da análise de variância (ANOVA) 1 critério, seguido de pos-test de Tukey.

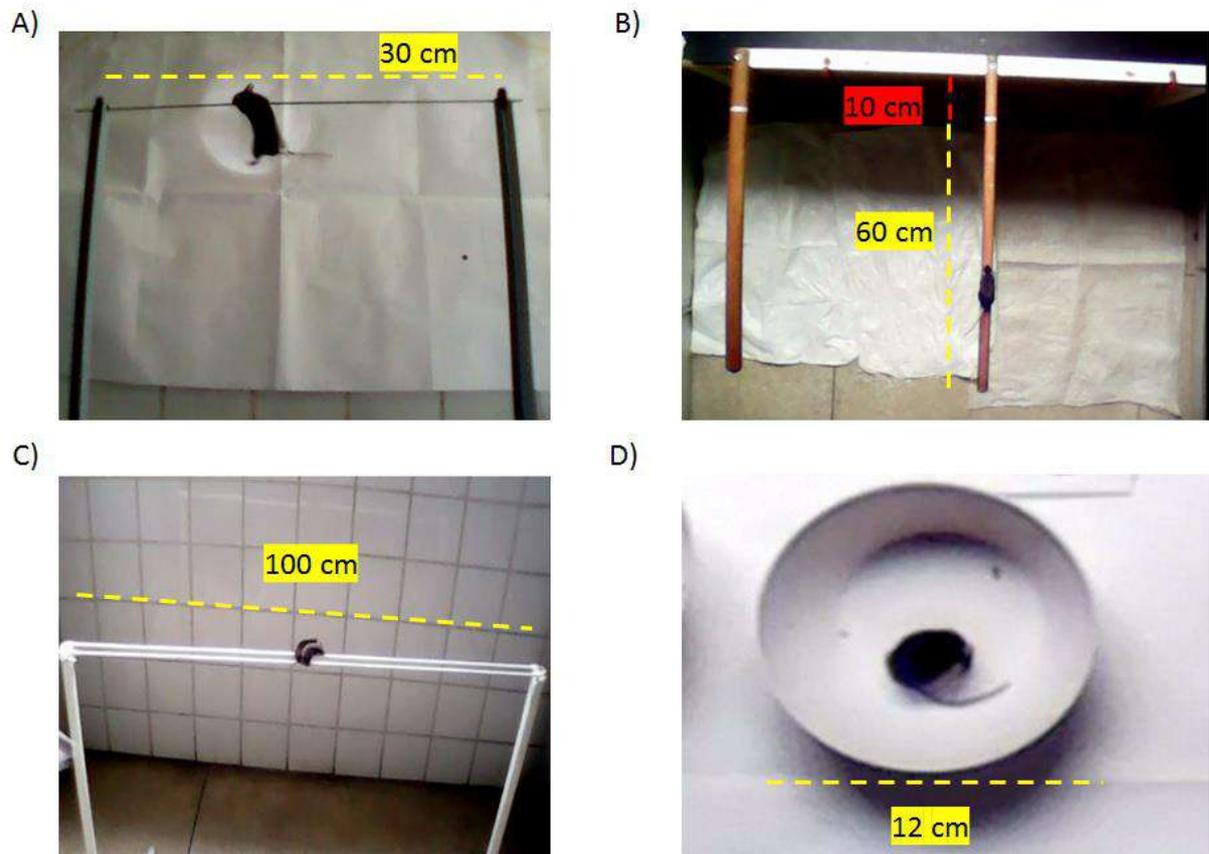


Figura 4. Testes comportamentais. A) Teste das barras horizontais. B) Teste da ambulação sobre os bastões. C) Teste das barras paralelas. D) Teste da rotação induzida por apomorfina.

4. RESULTADOS

As análises dos dados aqui mostrados são representativas de 30 animais, todos infundidos com 6-OHDA no estriado. Nas análises preliminares, observou-se que nos grupos tratados com extratos, mas não no grupo Veículo, havia animais que apresentaram baixa taxa de rotações no teste da apomorfina. Assim, os grupos tratados foram subdivididos em: 1g α (n=7) e 5 g α (n=3) incluindo somente animais que rodaram acima de 5 rotações/min; e 1 g β (n= 7) e 5 g β (n=3) incluindo animais que rodaram abaixo de 5 rotações/min. Esses 4 subgrupos foram comparados com o grupo Veículo (n=10). Dos 45 animais iniciados no experimento, 26,7% foram excluídos por não estarem bem fisicamente, e apenas 6,6 % dos animais operados morreram devido a cirurgia.

4.1 AVALIAÇÃO DA LESÃO

4.1.1 Rotações induzidas por apomorfina

Como esperado, no teste realizado antes da cirurgia nenhum animal mostrou comportamento característico de rotação. Após a cirurgia para injeção de 6-OHDA, o número de rotações aumentou da primeira para a segunda semana em todos os grupos, mantendo-se relativamente constante nas outras semanas. Na primeira semana após a cirurgia, o grupo Veículo apresentou média de 5,6 rotações/min contralaterais, o subgrupo 1g α obteve 6,3 rotações/min contralaterais e o subgrupo 5g α , 5,9 rotações/min contralaterais (Figura. 5A). Já os subgrupos 1g β e 5g β apresentaram <1 rotação/min ipsilateral após uma semana. Nas semanas subsequentes, o subgrupo 1g β apresentou rotações contralaterais, porém em menor número do que o grupo veículo, enquanto que de 5g β aumentou o número de rotações ipsilaterais (Figura. 5B).

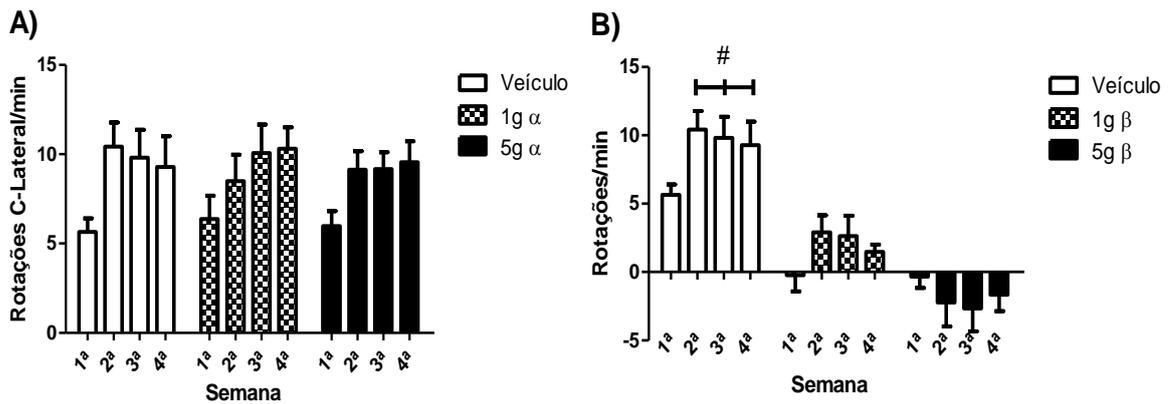


Figura 5. Análise das Rotações induzidas por Apomorfina. A) Sem diferença significativa entre os grupos B) O grupo Veículo teve maior número de rotações que os grupo 1g β (# $P < 0,05$) e 5g β (# $P < 0,001$) na 2ª, 3ª e 4ª semana.

4.2 A AVALIAÇÃO DA MOTRICIDADE

4.2.1 Teste do Campo Aberto

Realizamos três testes de campo aberto, antes do pré-tratamento (LB, linha de base), antes da cirurgia (Dia 0) e no final do tratamento (Dia 28). De uma forma geral, os grupos tratados com extrato de EO apresentaram aumento percentual significativo na exploração do aparato após 2 semanas de tratamento em relação ao grupo veículo e em relação à linha de base.

Em relação à distância total percorrida, os subgrupos tratados com extrato de EO apresentaram um grande aumento na atividade exploratória nos dias 0 e 28º, em comparação à linha de base, e em relação ao grupo Veículo nesses dias (Fig. 6A e B). Apenas o subgrupo 1g β retornou à linha de base no 28º. dia (Fig. 6B). Padrão muito semelhante se observou em relação à velocidade média (Fig. 6C e D).

Em relação à velocidade máxima no aparato, apenas os subgrupos 5g (α e β) apresentaram diferenças estatisticamente significativas após o tratamento. O subgrupo 5g α apresentou aumento percentual na velocidade máxima no dia 0 (ou seja, após 2 semanas de tratamento) em relação aos grupos Veículo e o 1g α (Figura 6E). O subgrupo 5g β apresentou aumento da velocidade máxima no 28º dia em relação ao grupo Veículo (Figura. 6F).

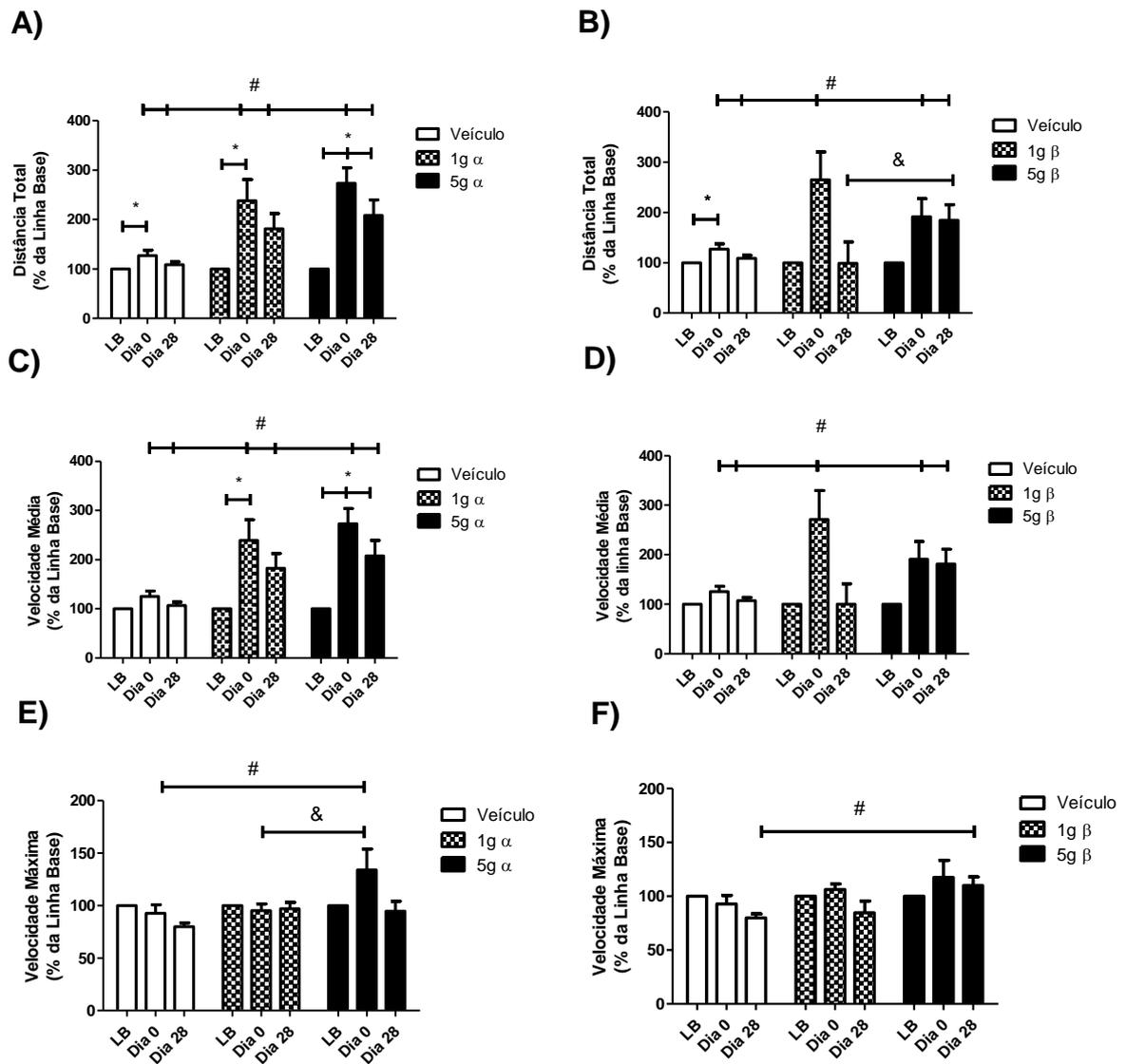


Figura 6. Análise do Teste do Campo Aberto. A) Distância total percorrida: houve aumento no grupo Veículo no dia 0 em relação à LB (* $P < 0,05$); os grupos 1g α e 5g α tiveram um maior deslocamento nos dias 0 e 28 em relação ao grupo Veículo nesses dias (# $P < 0,05$) e em relação as suas LB (* $P < 0,05$). B) Distância percorrida: os subgrupos 1g β e 5g β também tiveram maior deslocamento no dia 0 em relação ao grupo Veículo (# $P < 0,05$), e o subgrupo 5g β com Veículo e 1g β no dia 28. C) Velocidade média: os grupos 1g α e 5g α tiveram uma maior velocidade média nos dias 0 e 28 em relação ao grupo Veículo nesses dias (# $P < 0,05$) e em relação as suas LB (* $P < 0,05$). D) Velocidade média: os subgrupos 1g β e 5g β também tiveram uma maior velocidade média no dia 0 em relação ao grupo Veículo (# $P < 0,05$). E) Velocidade Máxima: o grupo 5g α teve a maior velocidade máxima no dia 0 em relação ao Veículo (# $P < 0,001$) e ao grupo 1g α (& $P < 0,01$). F) Velocidade Máxima: o grupo 5g β teve a maior velocidade máxima no dia 28 em relação ao Veículo (# $P < 0,001$)

4.2.2 Teste das barras horizontais

Na análise do teste das barras horizontais apenas na barra de 6,2 mm o grupo tratado com 5g obteve um melhor desempenho com relação ao grupo Veículo. Quando comparamos o grupo Veículo com os subgrupos não observamos diferença.

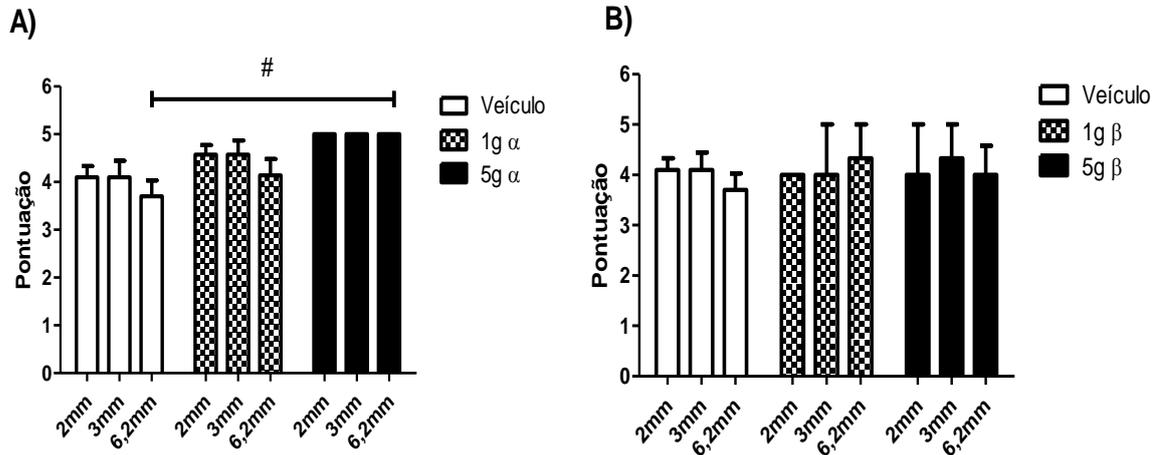


Figura 7. Análise da pontuação no teste das Barras Horizontais. A) Veículo vs 5g α na barra de 6,2 (# P < 0,01). B) Sem diferença entre os subgrupos.

4.2.3 Teste das barras paralelas

No teste os grupos não apresentaram diferença significativa na orientação 90°, e no deslocamento para um dos lados do aparato também não houve diferença entre os grupos.

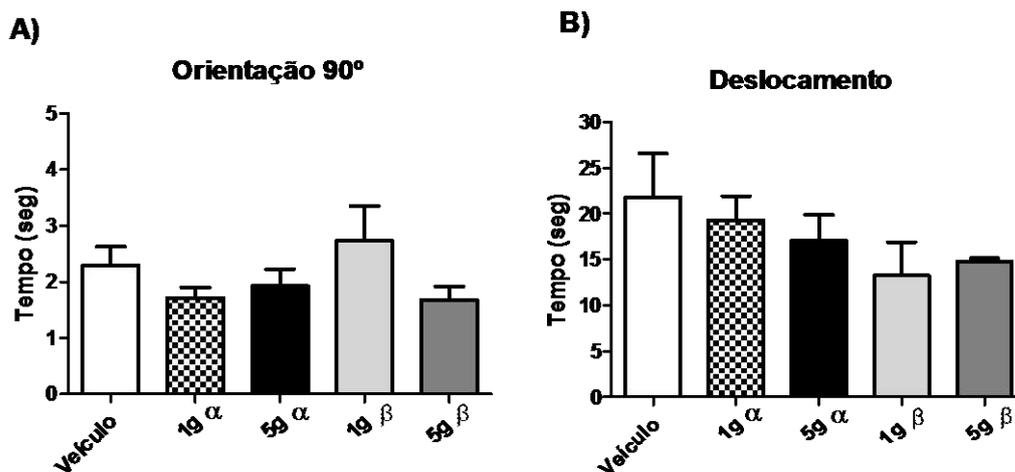


Figura 8. Análise do teste das Barras Paralelas. A) Sem diferença na orientação 90°. B) Sem diferença no deslocamento.

4.2.4 Teste da Ambulação sobre os Bastões

Na análise de orientação 180° nos diferentes bastões não observamos diferença significativa. Na análise do deslocamento de volta a bancada observamos melhor desempenho (menor tempo) do grupo 1g α em relação ao grupo Veículo e ao grupo 5g α na barra de 2,2 e 1,0 cm (Fig. 9C).

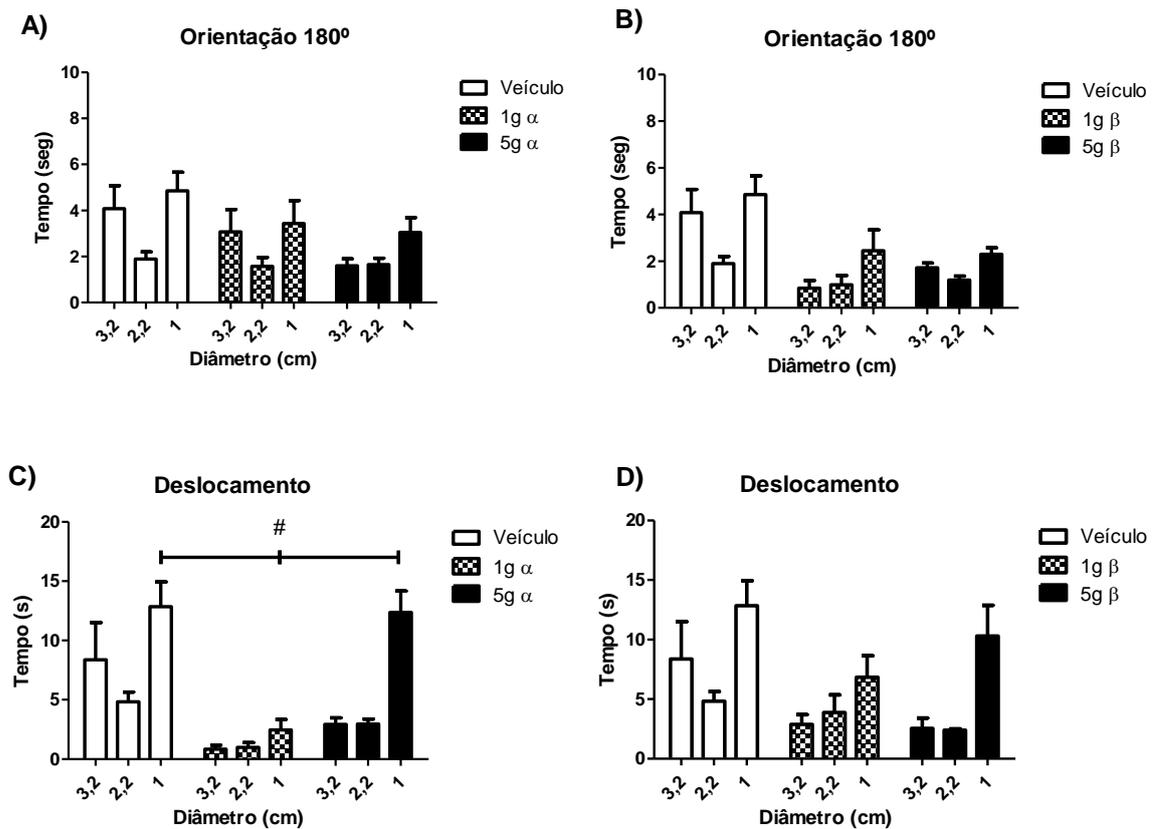


Figura 9. Análise do teste de Ambulação sobre os Bastões. A) Sem diferença significativa na orientação 180°. B) Sem diferença significativa na orientação 180°. C) Tempo de deslocamento: o grupo 1g α teve o menor tempo na barra de 1cm em relação aos grupos Veículo e 5g α (# P < 0,05). D) Sem diferença significativa no deslocamento.

4.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Na avaliação do peso corporal dos animais, os grupos não apresentaram diferença significativa na primeira pesagem, mostrando apenas uma queda na média na primeira semana após a cirurgia e uma melhora a partir da segunda, o que já era esperado. É observada uma diferença significativa entre o grupo Veículo e o grupo 5g α na 1ª e 4ª semanas de tratamento pós-cirurgia, com o segundo apresentando menor massa corporal. Na relação do grupo Veículo com os subgrupos β , apenas o subgrupo 1g β mostrou menor massa corporal na pesagem da 1ª e 2ª semana de pré-tratamento, e 1ª e 4ª semana de pós-tratamento (Fig. 10A). Na comparação entre os subgrupos 1g β e 5g β , o primeiro apresentou menor massa apenas na 1ª semana pós cirurgia e na 2ª semana pós tratamento (Fig. 10B).

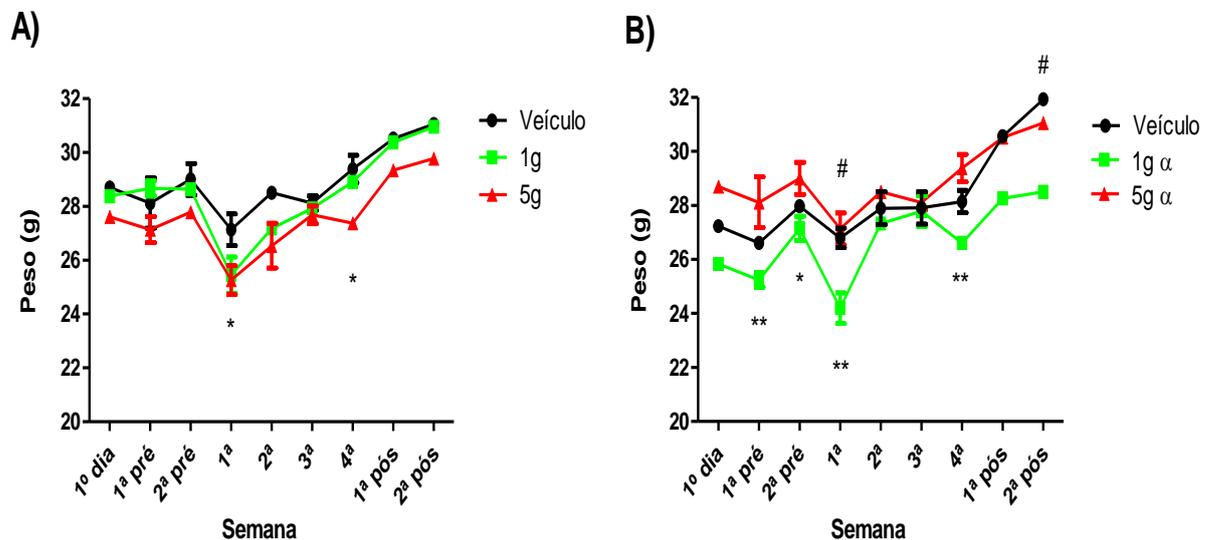


Figura 10. Análise do peso corporal. A) Veículo vs 5g, 1ª semana (* $P < 0,05$) e 4ª semana (* $P < 0,05$). B) Veículo vs 1g α , 1ª pré (* $P < 0,01$), 2ª pré (* $p < 0,05$), 1ª semana (** $P < 0,01$) e 4ª semana (** $P < 0,01$). 1g vs 5g, 1ª semana (# $P < 0,05$) e 2ª pós (# $P < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

5.1 MODELO DE HEMIPARKINSONISMO E ANÁLISE DA LESÃO

O modelo de doença de Parkinson unilateral com infusão intraestriatal de 6-OHDA é comumente utilizado em trabalhos como um modelo pré-clínico para avaliar os efeitos antiparkinsonianos e de neuroproteção para novas terapias farmacológicas (Tieu, 2011). A 6-OHDA causa uma degeneração retrógrada dos terminais dopaminérgicos do estriado em direção aos corpos celulares na substância negra *pars compacta* devido ao estresse oxidativo desencadeado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) depois de entrar no neurônio através do transportador de dopamina. Hipotetiza-se que a auto-oxidação pode explicar a geração de ROS, uma vez que em condições fisiológicas a 6-OHDA é submetida a uma rápida auto-oxidação não enzimática que gera espécies tóxicas como quinonas, peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e radicais hidroxila (Tieu, 2011; Bové & Perier, 2012). Esse efeito tem duração de pelo menos 4 semanas, dando assim uma janela temporal para um tratamento de intervenção. Além disso, como provoca um desequilíbrio no nível de dopamina entre os hemisférios, pode-se usar o lado não lesionado como controle no próprio animal, possibilitando avaliar a lesão a partir de comportamento rotacional induzido por fármacos, como apomorfina e anfetamina (Ungerstedt, 1976; Schwarting & Huston, 1996; Heuer, 2012; Stott & Barker, 2014).



Figura 11. Teste das rotações induzidas por agonistas dopaminérgicos. A lesão unilateral com 6-OHDA provoca um desequilíbrio na atividade dopaminérgica entre os dois estriados e causa a assimetria no comportamento motor dos animais.

Fonte: Silvestrin 2008.

Os animais do grupo Veículo (lesados com 6-OHDA e tratados com veículo) tiveram em média 5,6 rotações contralateral por minuto na primeira semana e nas outras semanas tiveram a média maior que 9 rotações, sendo que nenhum animal apresentou rotações ipsilaterais ou menos de 4 rotações/min. Esse comportamento é característico no modelo unilateral com 6-OHDA e é correlacionado com lesões graves (80-100%) e intermediárias (60-79%) dos terminais dopaminérgicos pré-sinápticos no estriado, levando a uma elevada queda do nível de dopamina e a uma alta sensibilização dos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos (Schwartzing & Huston, 1996; Grealish et al, 2010). Nos grupos tratados com 1 g e 5 g de extrato foi observado que 3 animais de cada grupo tiveram o nº de rotações contralateral menor que 4 e/ou tiveram rotações ipsilaterais, e foram agrupados em subgrupos de tratamento. Esse comportamento correlaciona-se a um percentual menor de lesão dos terminais dopaminérgicos pré-sinápticos no estriado exposto à toxina (cerca de < 60%), sem grande redução nos níveis de dopamina em relação ao lado não lesionado, e conseqüentemente, sem o desenvolvimento da sensibilização dos terminais pós-sinápticos (Schwartzing & Huston, 1996; Da Cunha, 2008; Grealish et al, 2010).

Segundo Stott & Banker (2014), os processos apoptóticos na SNc começam 6-9 dias após a cirurgia, mas no estriado as fibras axonais já apresentam uma grande degeneração nesse período. Sugerindo que a janela de oportunidade para intervenção terapêutica neste modelo é de aproximadamente até 1-2 semanas após a cirurgia. Nesse trabalho foi feito um pré-tratamento e um pós-tratamento justamente para tentar aumentar a proteção dos neurônios na SNc e das fibras axonais no estriado. Na análise do teste com a apomorfina podemos interpretar que houve uma degeneração das fibras no estriado mas não podendo confirmar se houve degeneração na SNc.

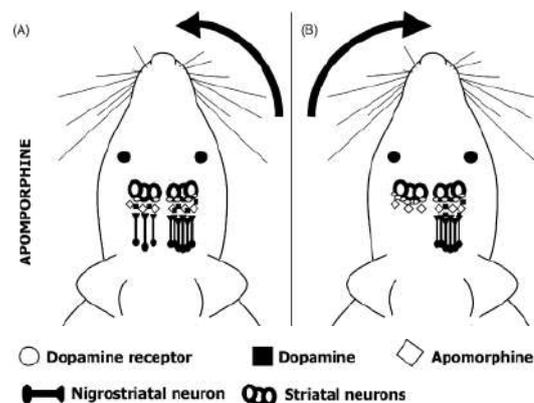


Figura 12. Resposta à apomorfina.

Fonte: Da Cunha (2008)

5.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR

Alguns testes comportamentais foram propostos e testados na literatura para avaliar a atividade motora, dentre eles o teste de atividade exploratória no campo aberto, que através da quantificação da frequência de locomoção pode-se inferir sobre a capacidade motora dos animais (Santiago et al., 2010; Carvalho et al., 2013). Além do campo aberto, foram adaptados novos testes propostos por Deacon (2013) para avaliar a atividade motora. Nos resultados obtidos não se observou uma alteração motora significativa entre os grupos estudados. A atividade locomotora em campo aberto depende das habilidades motoras, mas também da motivação para explorar um novo ambiente. Por isso, testes de campo aberto também são utilizados para avaliar comportamentos não motores (Carvalho et al., 2013).

O comprometimento comportamental é largamente dependente de três fatores, o local da injeção, o grau da lesão gerada e o teste de eficácia utilizado (Kirik et al, 1998). Alguns testes são mais sensíveis à depleção de dopamina do estriado dorsolateral, como, por exemplo, os testes de rotação induzidos por fármacos, outros são mais sensíveis à depleção de dopamina ventromedial como a atividade locomotora (Heuer et al, 2012; Deumens, 2002). Alguns trabalhos, como de Francardo et al (2011) e Vandeputte et al (2010), obtiveram mais de 70% de desnervação das fibras dopaminérgicas estriatais injetando 6-OHDA na região do estriado e no feixe prosencefálico medial, porém os grupos não apresentaram diferença nos testes de atividade motora, como no campo aberto e na preferência por apoio em uma pata.

Os dados mostraram que o grupo infundido com 6-OHDA no estriado e tratado com veículo, não apresentou diferença na atividade exploratória ao longo do curso temporal do experimento. Por outro lado, a análise no teste do campo aberto demonstrou que os grupos tratados com extrato de EO aumentaram significativamente a atividade exploratória depois que iniciaram o tratamento com o extrato, sendo este efeito até maior no subgrupo α , que supostamente teve menor efeito do extrato sobre a lesão estriatal. Ou seja, apesar de não terem melhorado no teste da apomorfina, os animais dos subgrupos α apresentaram essa modificação comportamental importante na atividade exploratória no campo aberto. O significado desse efeito ainda precisa ser esclarecido.

5.3 A AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO

Em função do teor de matéria seca da polpa de açaí comumente comercializada é classificado de tal forma: fino (até 11%), médio (11% a 14%) e o grosso (acima de 14%). A polpa com teor de sólidos entre 8 e 12% responde cerca a 90% do mercado (Pessoa & Teixeira, 2012). Levando-se em consideração uma pessoa de porte médio possuir massa de 70 Kg, as concentrações utilizadas foram de 1 g e 5 g de polifenóis diários, equivalentes cerca de 50 mg/kg e 240 mg/kg de extrato (1 g e 5 g de polifenóis que equivaleria também a cerca de 300ml e 1,5 L de açaí médio).

Segundo de Sousa et al (2010), uma dieta suplementada com polpa de açaí pode aumentar o peso dos ratos sem alterar na quantidade de ingestão de alimento em animais normais, e reduzir a ingestão de alimentos em animais com dieta hipercolesterolêmica. Sugerindo como em outros trabalhos, que polifenóis também desempenham um papel na modulação do apetite. Sendo a redução da motivação na busca por alimento uma das causas da mortalidade no modelo com 6-OHDA (Ferro et al., 2005), a ingestão insuficiente de ração e/ou água tem um efeito importante na perda de massa corporal, como observamos na média do peso na 1ª semana após a cirurgia (Figura. 11). Nesse experimento não se observou uma clara relação de ganho ou perda de massa corporal entre os grupos durante os períodos de tratamento.

Machado A. et al. (2016) descreveu em estudo *in vitro* importantes efeitos protetores do açaí em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expostas à toxina rotenona, que causa disfunção dopaminérgica mitocondrial. O açaí apresentou conferiu proteção que envolveu uma reversão da disfunção mitocondrial no complexo I e diminui o estresse oxidativo causado pela rotenona. Sugerindo que a composição química encontrada no fruto do açaí poderia ser um potencial candidato para melhorar a função do complexo mitocondrial I. Outro trabalho, agora com a ingestão da polpa de açaí, apresentou dados que sugerem uma melhora na atividade oxidante em encéfalos de ratos, ajudando a prevenir alterações na atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (Machado E. et al, 2016).

A degeneração neuronal na doença de Parkinson é progressiva e leva anos, ou mesmo décadas, para apresentar uma lesão significativa que apresente sintomas. No modelo utilizando a 6-OHDA, a degeneração dos corpos celulares na SN é estabelecida em 4

semanas, sendo que no estriado os terminais degeneram na 1ª semana e pode ocorrer uma perda de até 70% no nível de dopamina ainda nesse período, apresentando assim um período muito curto para a intervenção terapêutica. Isso pode ter contribuído para a baixa efetividade (30% dos animais apresentaram baixa lesão) do extrato no modelo para avaliar a lesão nessa região.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com uma dose diária de extrato de *E. oleracea* no modelo de hemiparkinsonismo diminuiu o número de rotações induzidas por apomorfina em 30% dos animais tratados com as duas concentrações empregadas e aumentou a atividade exploratória no campo aberto de todos os subgrupos tratados sugerindo que o extrato tem um potencial neuroprotetor a ser explorado, sendo necessário estender a investigação para demonstrar sua real eficiência.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ-FISCHER, Daniel et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and α -synuclein-deleted mice. **Experimental neurology**, v. 210, n. 1, p. 182-193, 2008.
- BOVE, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, 2012.
- CARVALHO, Miguel M. et al. Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 14, 2013.
- DA CUNHA, Claudio et al. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioural brain research**, v. 189, n. 2, p. 364-372, 2008.
- DAUER, William; PRZEDBORSKI, Serge. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.
- DEUMENS, Ronald; BLOKLAND, Arjan; PRICKAERTS, Jos. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental neurology**, v. 175, n. 2, p. 303-317, 2002.
- DEACON, Robert MJ. Measuring motor coordination in mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 75, p. e2609-e2609, 2013.
- DE SOUZA, Melina Oliveira et al. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, v. 26, n. 7, p. 804-810, 2010.

DEXTER, David T.; JENNER, Peter. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132-144, 2013.

FAHN, Stanley; SULZER, David. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 139-154, 2004.

FRANCARDO, Veronica et al. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 42, n. 3, p. 327-340, 2011.

FERRO, Marcelo Machado et al. Comparison of bilaterally 6-OHDA-and MPTP-lesioned rats as models of the early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. **Journal of neuroscience methods**, v. 148, n. 1, p. 78-87, 2005.

GAO, X. et al. Habitual intake of dietary flavonoids and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 78, n. 15, p. 1138-1145, 2012.

GREALISH, Shane et al. Characterisation of behavioural and neurodegenerative changes induced by intranigral 6- hydroxydopamine lesions in a mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 12, p. 2266-2278, 2010.

GUPTA, Sudhir; GOLLAPUDI, Sastry. CD95-mediated apoptosis in naive, central and effector memory subsets of CD4+ and CD8+ T cells in aged humans. **Experimental gerontology**, v. 43, n. 4, p. 266-274, 2008.

HEUER, Andreas et al. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 1, p. 30-43, 2012.

HIRSCH, E.H; HUNOT S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **The lancet neurology**. v. 8, p. 382–397, 2009.

HOULDEN, Henry; SINGLETON, Andrew B. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. **Acta neuropathologica**, v. 124, n. 3, p. 325-338, 2012.

KANG, Jie et al. Bioactivities of açai (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 671-677, 2012.

KIRIK, Deniz; ROSENBLAD, Carl; BJÖRKLUND, Anders. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Experimental neurology**, v. 152, n. 2, p. 259-277, 1998.

KUMAR, SHASHANK; PANDEY, ABHAY K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

MACHADO, Alencar Kolinski et al. Neuroprotective Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) against Rotenone In Vitro Exposure. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

MACHADO, F. S.; KUO, J.; WOHLLENBERG, M. F.; FRUSCIANTE, M. R.; FREITAS, M.; OLIVEIRA, A. S.; ANDRADE, R. B.; WANNMACHER, C. M. D.; DANI, C.; FUNCHAL, C. Subchronic treatment with acai frozen pulp prevents the brain oxidative damage in rats with acute liver failure. **Metabolic Brain Disease**. 2016.

MASSANO, João; BHATIA, Kailash P. Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 6, p. a008870, 2012.

MULABAGAL, V.; CALDERÓN, A. I. Liquid chromatography/mass spectrometry based fingerprinting analysis and mass profiling of *Euterpe oleracea* (açai) dietary supplement raw materials. **Food Chemistry**. v. 134, p. 1156–1164, 2012.

NORATTO, G. D.; ANGEL-MORALES, G.; TALCOTT, S. T.; MERTENS-TALCOTT, S. U. Polyphenolics from Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and Red Muscadine Grape (*Vitis*

rotundifolia) Protect Human Umbilical Vascular Endothelial Cells (HUVEC) from Glucose- and Lipopolysaccharide (LPS) - Induced Inflammation and Target MicroRNA-126. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7999–8012, 2011.

OLANOW, C. Warren; KORDOWER, Jeffrey H. Modeling Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 66, n. 4, p. 432-436, 2009.

OLANOW, C. Warren; KIEBURTZ, Karl; SCHAPIRA, Anthony HV. Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease?. **Annals of neurology**, v. 64, n. S2, 2008.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; TALCOTT, S. T. Chemical stability of açai fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) anthocyanins as influenced by naturally occurring and externally added polyphenolic cofactors in model systems. **Food Chemistry**. v. 118, p. 17-25, 2010.

PANDAREESH, M. D.; MYTHRI, R. B.; BHARATH, MM Srinivas. Bioavailability of dietary polyphenols: Factors contributing to their clinical application in CNS diseases. **Neurochemistry international**, v. 89, p. 198-208, 2015.

PESSOA, José Dalton Cruz; TEIXEIRA, GH de A. Tecnologias para inovação nas cadeias euterpe. **Brasília: Embrapa**, 2012.

POMPEU, D. R.; SILVA, E. M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using Response Surface Methodology. **Bioresource technology**, v. 100, n. 23, p. 6076-6082, 2009.

PRZEDBORSKI, Serge. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 251-259, 2017

PRZEDBORSKI, Serge. Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis. **Movement Disorders**, v. 25, n. S1, p. S55-S57, 2010.

RANSOHOFF, Richard M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777-783, 2016.

ROGEZ, H.; POMPEU, D.R.; AKWIE, S.N.T.; LARONDELLE, Y. Sigmoidal kinetics of anthocyanin accumulation during fruit ripening: A comparison between açai fruits (*Euterpe oleracea*) and other anthocyanin-rich fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 24, p. 796-800, 2011.

SANTIAGO, Ronise M. et al. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 6, p. 1104-1114, 2010.

SIDEROWF, Andrew; LANG, Anthony E. Premotor Parkinson's disease: concepts and definitions. **Movement Disorders**, v. 27, n. 5, p. 608-616, 2012.

SCHAPIRA A. H. Neuroprotection in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. Review. p.41-43, 2009.

SCHWARTING, R. K. W.; HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 2, p. 275-331, 1996.

SHAH S.P.; DUDA J.E. Dietary modifications in Parkinson's disease: A neuroprotective intervention? **Med Hypotheses** (2015).

SOLANKI, Isha et al. Flavonoid-based therapies in the early management of neurodegenerative diseases. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 6, n. 1, p. 64-72, 2015.

STOCCHI, Fabrizio; VACCA, Laura; RADICATI, Fabiana G. How to optimize the treatment of early stage Parkinson's disease. **Translational neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 4, 2015.

STOTT, Simon RW; BARKER, Roger A. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 6, p. 1042-1056, 2014.

TAGLIAFERRO, P.; BURKE, R. E. Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease. **Journal of Parkinson's Disease**. v. 6, p. 1-15, 2016. DOI 10.3233/JPD-150769.

TIEU, Kim. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 1, n. 1, p. a009316, 2011.

UNGERSTEDT, Urban. 6-Hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. **Pharmacology & Therapeutics. Part B: General and Systematic Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1976.

VANDEPUTTE, Caroline et al. Automated quantitative gait analysis in animal models of movement disorders. **BMC neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 92, 2010.

VIVES-BAUZA, Cristofol; PRZEDBORSKI, Serge. Mitophagy: the latest problem for Parkinson's disease. **Trends in molecular medicine**, v. 17, n. 3, p. 158-165, 2011.

WATSON, Ronald Ross; PREEDY, Victor R. (Ed.). **Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease: Prevention and Therapy**. Academic Press, 2014.

WOLTERS, E. Ch; BRAAK, H. Parkinson's disease: premotor clinico-pathological correlations. In: **Parkinson's Disease and Related Disorders**. Springer Vienna, 2006. p. 309-319.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS AMAZÔNICAS COM POTENCIAL NEUROMODULADOR EM MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON", protocolado sob o CEUA nº 6743170716, sob a responsabilidade de Elizabeth Sumi Yamada e equipe; Anderson Valente Amaral; Arnaldo Jorge Martins Filho; Dielly Catrina Favacho Lopes; Edmar Tavares Da Costa; Milton Nascimento Silva; Riky Douglas Melo Gomes; Váldina Solimar Cardoso Lopes; Wallace Gomes Leal - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 28/07/2016.

We certify that the proposal "BIOPROSPECTING FROM AMAZON PLANTS WITH NEUROMODULATOR POTENTIALS IN EXPERIMENTAL MODELS OF PARKINSON'S DISEASE", utilizing 240 Heterogenics mice (240 males), protocol number CEUA 6743170716, under the responsibility of Elizabeth Sumi Yamada and team; Anderson Valente Amaral; Arnaldo Jorge Martins Filho; Dielly Catrina Favacho Lopes; Edmar Tavares Da Costa; Milton Nascimento Silva; Riky Douglas Melo Gomes; Váldina Solimar Cardoso Lopes; Wallace Gomes Leal - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 07/28/2016.

Vigência da Proposta: de 01/2014 a 06/2017

Área: Departamento De Fisiologia

Procedência: Biotério do Laboratório de neuropatologia experimental

Espécie:	Camundongos heterogênicos	Gênero:	Machos	idade:	10 a 12 semanas	N:	120
Linhagem:	Mus musculus/C57Bl6			Peso:	30 a 45 g		

Procedência: Biotério do Laboratório de neuropatologia experimental

Espécie:	Camundongos heterogênicos	Gênero:	Machos	idade:	10 a 12 semanas	N:	120
Linhagem:	Mus musculus/Swiss			Peso:	30 a 45 g		

Resumo: O bioma Amazônia representa uma das maiores fontes de biodiversidade do planeta. A preservação e o uso sustentável desta riqueza requer a aquisição e o domínio de conhecimento científico nas mais diversas áreas. Em 2010, o período entre 2011-2020 foi proclamado como "a década da biodiversidade" pela Assembleia Geral da ONU, numa tentativa de estimular ações futuras mais concretas mediante o fracasso dos países em atingir as metas traçadas em 2002 visando diminuir a perda da biodiversidade global. Além das consequências negativas para o meio ambiente ? desde alterações climáticas até o comprometimento das fontes de água potável ? a diminuição da biodiversidade implica na perda de potenciais fontes de novos fármacos. Entretanto, a preservação da biodiversidade de nada adiantará se não soubermos como usá-la de modo correto e em prol da sociedade, não havendo outro caminho senão o investimento maciço de recursos financeiros para fomentar a busca desse conhecimento. A presente proposta visa contribuir em uma dentre as inúmeras áreas do conhecimento necessárias para se explorar os potenciais benéficos da biodiversidade amazônica: a descoberta de novos fármacos. Estudos prévios resultantes da parceria entre o Laboratório de Neuropatologia Experimental (LaNEx) e o Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Performance (LaNEx/LabCrol) da Universidade Federal do Pará indicaram propriedades neuroprotetoras no extrato de folhas de Swietenia macrophylla em modelo in vivo de doença de Parkinson. Portanto, valendo-se da experiência do grupo em estudos na área de neurodegeneração, pretende-se rastrear propriedades neuromoduladoras em extratos adicionais de plantas da flora amazônica, assim como aprofundar a investigação dos efeitos neuroprotetores da Swietenia macrophylla. Para tanto, serão utilizados modelos experimentais in vitro e in vivo da doença de Parkinson, a mais comum das desordens motoras, e ainda sem terapias que interrompam sua progressão. A proposta pretende contribuir com a produção de conhecimento científico de qualidade assim como com a formação de recursos humanos na região, que possam contribuir para incrementar o uso sustentável da biodiversidade amazônica.

Belém do Pará, 01 de agosto de 2016



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará