



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**EFEITO PROTETOR DA HESPERIDINA EM UM MODELO DA  
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-  
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Michelle da Silva Antunes**

**Itaqui, RS, Brasil.**

**2013**

**EFEITO PROTETOR DA HESPERIDINA EM UM MODELO DA  
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-  
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

**por**

**Michelle da Silva Antunes**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Bioquímica,  
da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS),  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Bioquímica.**

**Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse**

**Itaqui, RS, Brasil.**

**2013**

**Universidade Federal do Pampa**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação de Mestrado

**EFEITO PROTETOR DA HESPERIDINA EM UM MODELO DA  
DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-  
HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

Elaborada por

**Michelle da Silva Antunes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do  
Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de  
Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Dissertação defendida e aprovada em: 05 de julho de 2013.

Banca examinadora:



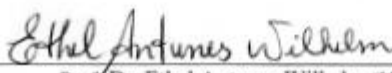
Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Orientador

(UNIPAMPA)



Prof. Dr. Francielli Weber Santos Cibin (UNIPAMPA)



Prof. Dr. Ethel Antunes Wilhelm (URI)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de chegar até aqui. Obrigada Senhor por sempre caminhar ao meu lado!

Aos meus queridos pais Vitório e Márcia, meu irmão Matheus, e meu irmão Maicon que mesmo não estando fisicamente ao meu lado é meu anjo da guarda, que junto de Deus ilumina meus caminhos. Obrigada família por todo amor, dedicação, incentivo, compreensão e apoio que me dão em todos os momentos na minha vida, muito obrigada. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse por todos os ensinamentos ao decorrer dessa jornada, por sua compreensão, apoio e confiança, Muito obrigada por tudo!

Ao meu namorado Agnos por todo apoio, incentivo e paciência. Você é muito especial pra mim, Te amo!

Aos colegas do laboratório Laftambio Pampa pela colaboração e auxílio que sempre me deram. Obrigada!

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em bioquímica que contribuíram na minha formação.

Aos membros da banca professora Francielli Weber Santos Cibin e Ethel Antunes Wilhelm.

A Universidade Federal do Pampa pela oportunidade oferecida de realizar o mestrado.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram direta e indiretamente para essa conquista. Muito obrigada!

## **PARTE I**

### **RESUMO**

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa, RS, Brasil

### **EFEITO PROTETOR DA HESPERIDINA EM UM MODELO DA DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**

Autora: Michelle da Silva Antunes

Orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 05 de Julho de 2013.

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica que tem como principal característica neuropatológica a depleção de dopamina (DA) estriatal. Essa diminuição de DA leva ao aparecimento dos sintomas motores da doença, tais como instabilidade postural, tremores em repouso, rigidez, bradicinesia, entre outros. É uma doença de causa multifatorial relacionada ao envelhecimento, fatores genéticos e ambientais. Existe um grande número de evidências correlacionando o estresse oxidativo com a DP, na qual se observa um desequilíbrio entre a geração de espécies reativas (ER) e os mecanismos de defesa celular, e é esse desequilíbrio que leva ao envelhecimento precoce, morte celular e desenvolvimento de patologias neurodegenerativas. Estudos demonstram que o consumo de uma dieta rica em flavonoides pode diminuir a incidência e sintomas de doenças neurodegenerativas. O objetivo do presente trabalho foi investigar o efeito da administração do flavonoide hesperidina sobre o comportamento em testes de memória, de depressão, e marcadores de estresse oxidativo em um modelo de DP induzida por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em camundongos com dezoito meses de idade da linhagem C57B/6J. Os animais foram

distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: (1) veículo/veículo; (2) 6-OHDA/veículo; (3) veículo/hesperidina; (4) 6-OHDA/hesperidina. A neurotoxina 6-OHDA ou o veículo salina foram infundidos por injeção intracerebroventricular (i.c.v.) em uma só concentração (4 µg/2 µL em 0.9% NaCl com 0.2 µg/µL de ácido ascórbico). Após a injeção, os camundongos tiveram um período de recuperação de sete dias até o começo do tratamento. A hesperidina ou o veículo (50mg/kg) foram administrados pela via oral (gavagem) durante 28 dias. Após este período, os camundongos foram submetidos aos testes comportamentais (locomoção, memória e depressão) e à eutanásia. Os resultados demonstraram que o tratamento oral com hesperidina na dose de 50 mg/kg foi efetivo em diminuir o déficit cognitivo, o comportamento tipo depressivo; a diminuição dos níveis de espécies reativas (RS); o aumento das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase (GPx), e catalase (CAT), além das defesas antioxidantes não enzimáticas totais (TRAP) e níveis de glutathione (GSH); na prevenção do aumento da glutathione reductase (GR). Além disso, o tratamento aumentou os níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado em relação aos camundongos que não receberam o tratamento. Em conclusão, nós sugerimos que a administração com hesperidina foi eficaz em rever os danos cognitivos e marcadores de estresse oxidativo induzidos por 6-OHDA em camundongos, podendo contribuir como terapia alternativa na redução dos sintomas da DP.

**Palavras-chave:** neurodegeneração, atividade antioxidante, estresse oxidativo, dopamina, memória, depressão.

## **ABSTRACT**

Dissertation of Master

Program of Post-Graduation in Biochemistry

Federal University of Pampa

### **PROTECTIVE EFFECT OF HESPERIDIN IN MODEL OF PARKINSON'S DISEASE 6-OHDA INDUCED IN MICE**

Author: Michelle da Silva Antunes

Advisor: Cristiano Ricardo Jesse

**Site and Date of Defence:** Uruguaiiana, July 05, 2013.

Parkinson's disease (PD) is a chronic neurodegenerative disorder which has as main characteristic neuropathological depletion of dopamine (DA) striatal. This loss of DA leads to the onset of motor symptoms, such as postural instability, resting tremor, rigidity, bradykinesia, among others. It is a multifactorial disease in age-related, genetic and environmental factors. There is a large evidences correlating oxidative stress with the DP, where there is an imbalance between the generation of reactive species (RS) and cellular defense mechanisms, and it is this imbalance that leads to premature aging, cell death and development of neurodegenerative disorders. Studies show that consumption of a diet rich in flavonoids can reduce the incidence and symptoms of neurodegenerative diseases. The objective of this study was to investigate the effect of administration of the flavonoid hesperidin on behavior in tests of memory, depression, and markers of oxidative stress in a model of PD induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in mice eighteen months old lineage C57B/6J. The animals were randomly divided into four groups: (1) vehicle / vehicle, (2) 6-OHDA/veículo, (3) vehicle / hesperidin, (4) 6-OHDA/hesperidina. The neurotoxin 6-OHDA or vehicle saline were infused intracerebroventricular (icv) in one concentration (4 mg / 2 µl in 0.9% NaCl

with 0.2 mg / uL ascorbic acid). After injection, the mice have had a recovery period of seven days until the start of treatment. The hesperidin or vehicle (50mg/kg) was administered orally (gavage) for 28 days. After this period, the mice were subjected to behavioral tests (locomotion, memory and depression) and euthanasia. The results demonstrate that oral treatment with hesperidin dose of 50 mg / kg was effective in reducing the cognitive deficits, behavior depressive-like; reduced levels of reactive species (RS), the increase of antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT), and the total non-enzymatic antioxidant defenses (TRAP) and glutathione (GSH), in the prevention an increase of glutathione reductase (GR). Furthermore, the treatment increased the levels of DA, DOPAC and HVA in striatum compared to mice that received no treatment. In conclusion, we suggest that administration with hesperidin was effective in reviewing the cognitive damage and markers of oxidative stress induced by 6-OHDA in mice, which may contribute as an alternative therapy in reducing symptoms of PD.

**Key words:** neurodegeneration, antioxidant activity, oxidative stress, dopamine, memory, depression



## LISTA DE FIGURAS

### PARTE I

**Figura 1:** Corpo estriado de paciente normal e em seguida com DP, mostrando a depleção da DA na doença.

**Figura 2:** Percurso de síntese de dopamina no metabolismo.

**Figura 3:** Comparação entre a estrutura química da toxina 6-OHDA e do neurotransmissor DA.

**Figura 4:** Neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. DAT: transportador de DA. MOA-A: monoamina oxidase A. EROs: espécies reativas de oxigênio.

**Figura 5:** Mecanismo de ação dos diferentes de neurotoxinas usadas na indução de DP.

**Figura 6:** Estrutura química da toxina MPTP e MPP+.

**Figura 7:** Estrutura química de Rotenona.

**Figura 8:** Estrutura química do Paraquat.

**Figura 9:** Estrutura nuclear de flavonóides. Flavonóides dietéticas são diversificadas e variam de acordo com o padrão de hidroxilação de conjugação, entre os anéis aromáticos, unidades glicosídicas, e grupos metoxi.

**Figura 10:** Classificação estrutural de algumas classes de flavonoides.

**Figura 11:** Estrutura química dos flavonoides cítricos. Hesperitin, Neohesperidina, Hesperidina.

## **PARTE II**

**Figura 1.** Desenho experimental do estudo.

**Figura 2.** Efeito do tratamento com hesperidina durante 28 dias e da infusão de 6-OHDA sobre o tempo de imobilidade no TST.

**Figura 3.** Efeito do tratamento com Hesperina durante 28 dias e da infusão de 6-OHDA sobre os tempos de latência e permanência no quadrante da plataforma.

## LISTA DE TABELAS

### PARTE I

**Tabela 1.** Classificação, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais fármacos utilizados no tratamento da DP.

**Tabela 2.** Diferentes modelos utilizados para DP em animais.

## PARTE II

**Tabela 1:** Efeito de hesperidina na atividade da enzima GSH e nível de RS e TRAP após a injeção de 6-OHDA no estriado de camundongos.

**Tabela 2:** Efeito de hesperidina na atividade das enzimas SOD, CAT GR, GPx e GST, no estriado de camundongos após a injeção de 6-OHDA.

**Tabela 3:** Efeito de hesperidina nos níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado de camundongos infundidos por 6-OHDA.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CAT** - catalase

**CL** - corpos de Lewy

**DA** - dopamina

**DOPAC** - 3,4-di-hidroxifenilacético

**DP** - doença de Parkinson

**ER** - espécies reativas

**EROs** - espécies reativas de oxigênio

**GBA** – glucocerebrosidase

**GPx** - glutaciona peroxidase

**GR** - glutaciona redutase

**GSH** - glutaciona oxidada

**HO<sup>•</sup>** - radical hidroxil

**HVA** - ácido homovanílico

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - peróxido de hidrogênio

**LRRK2** - leucine-rich repeat-quinase 2

**MAO** - monoamina oxidase

**MDA** - malondialdeído

**MPP+** - 1-metil-4-fenilpiridínio

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

**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** - radical superóxido

**PARK2** - parkin

**PARK7** - proteína parkinson 7

**PINK1** - PTEN-cinase induzida putativo 1

**ROO<sup>-</sup>** - radical peroxil

**SNpc** - substancia negra parte compacta

**SNC** - sistema nervoso central

**SOD** - superóxido dismutase

**TH** - tirosina hidroxilase

**UCHL1** - L1 esterase ubiquitina carboxi-terminal

**6-OHDA** - 6-hidroxidopamina

**α-sin** - alfa-sinucleína

## SUMÁRIO

### PARTE I

<b>RESUMO</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>14</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
1.1 DOENÇA DE PARKINSON .....	20
1.2 CARACTERÍSTICAS NEUROPATOLÓGICAS DA DP .....	23
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO .....	27
1.4 MODELO 6-HIDROXIDOPAMINA NA DP.....	29
1.5 OUTROS MODELOS DE DP .....	32
2.1 FLAVONOIDES .....	37
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>

### PARTE II

<b>MANUSCRITO</b> .....	<b>43</b>
<b>PROTECTIVE EFFECT OF HESERIDIN IN MODEL OF PARKINSON'S DISEASE 6-HYDROXYDOPAMINE INDUCED IN MICE</b> .....	<b>46</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>50</b>
<b>2. RESULTS</b> .....	<b>52</b>
2.1 BEHAVIOURAL ASSESSMENT.....	52
2.1.1 DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR IN THE TAIL SUSPENSION TEST .....	52
2.1.2 MORRIS WATER MAZE TASK.....	52
2.1.3 LOCOMOTOR ACTIVITY IN THE OPEN FIELD TEST .....	53
2.1.4 CYLINDER TEST.....	53
2.2 BIOMARKERS OF OXIDATIVE STRESS AND NEUROCHEMICAL ALTERATIONS .....	54



2.2.1 GLUTATHIONE SYSTEM (GSH) LEVELS.....	54
2.2.2 REACTIVE SPECIES (RS) LEVELS .....	54
2.2.3 <i>TOTAL REACTIVE ANTIOXIDANT POTENTIAL (TRAP)</i> .....	54
2.2.4 SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD) ACTIVITY .....	55
2.2.5 CATALASE (CAT) ACTIVITY .....	55
2.2.6 GLUTATHIONE REDUCTASE (GR) ACTIVITY .....	55
2.2.7 GLUTATHIONE PEROXIDASE (GPX) ACTIVITY.....	56
2.2.8 GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GST) ACTIVITY.....	56
2.2.9 DA, DOPAC AND HVA LEVELS.....	56
<b>3. DISCUSSION.....</b>	<b>57</b>
<b>4. EXPERIMENTAL PROCEDURE .....</b>	<b>62</b>
4.1 ANIMALS.....	62
4.2 EXPERIMENTAL DESIGN .....	62
4.3 STEREOTAXIC SURGERY INJECTION OF 6-OHDA.....	63
4.4 BEHAVIORAL ASSESSMENT .....	63
4.4.1 TST .....	63
4.4.2 MORRIS WATER MAZE TASK.....	64
4.4.3 OFT .....	65
2.4.4 CYLINDER TEST.....	65
4.5 TISSUE PREPARATION .....	66
4.6 BIOCHEMICAL DETERMINATIONS.....	66
4.6.1 GSH LEVELS .....	66
4.6.2 RS LEVELS .....	66
4.6.3 TRAP .....	67
4.6.4 SOD ACTIVITY .....	67
4.6.5 CAT ACTIVITY .....	68
4.6.6 GR ACTIVITY .....	68
4.6.7 GPX ACTIVITY.....	68
4.6.8 GST ACTIVITY .....	69

4.6.9 DA, DOPAC AND HVA LEVELS .....	69
4.7 PROTEIN DETERMINATION .....	70
4.8 STATISTICAL ANALYSIS .....	70
<b>5. REFERENCES .....</b>	<b>70</b>

### **PARTE III**

<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>112</b>
<b>Anexo I.....</b>	<b>113</b>

## APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem essa dissertação apresentam-se divididos em 3 partes. Na **parte I** encontram-se a **Introdução** e os **Objetivos**. A **parte II** refere-se aos resultados deste trabalho sob a forma de **Manuscrito** que abrange as seções introdução, materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas. Os itens **Discussão** e **Conclusão** encontram-se na **parte III** desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais do manuscrito contido nesse trabalho. O item **Referências** inclui somente as citações que aparecem nos itens introdução, discussão e conclusão desta dissertação. No item **Perspectivas**, estão expostos os estudos que darão continuidade a esse trabalho.

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta cerca de 1-2% da população mundial com idade superior a 60 anos (Sowell, 2009). Em 2005, o número estimado de casos de DP em todo o mundo foi de cerca de 4,4 milhões. Até o ano de 2030 é esperado para este número dobre para cerca de 9 milhões, com base na expectativa de crescimento da população com idade superior a 65 anos (Wirdefeldt et al., 2011).

Os sinais clínicos, presentes na DP, foram inicialmente descritos em 1817 por James Parkinson (médico inglês e membro do colégio real de 15 cirurgiões) na sua clássica publicação: “Ensaio sobre a paralisia agitante”. Porém, apenas em 1920, Jean-Martin Charcot reconheceu o pioneirismo de James Parkinson na descrição da paralisia agitante denominando-a com o nome de seu descobridor (Toulouse & Sullivan, 2008). Após quase dois séculos de sua descrição inicial, a DP ainda é uma doença de patogênese pouco compreendida, sendo seu tratamento basicamente sintomático (Lev et al., 2003).

O que se sabe é que a DP é o distúrbio neurodegenerativo de movimento mais frequente em todo mundo (Schapira, 2009). É uma doença causada pela morte de células neuronais dopaminérgicas na da substancia negra pars compacta (SNpc), além da perda neuronal. Esta desordem é caracterizada patologicamente pela presença de inclusões proteicas, como corpos de Lewy (CL) ou neurites de Lewy. Trata-se de uma doença progressiva e irreversível podendo durar de 10-20 anos após o diagnóstico (Gibb, 1992). Além dos sintomas neuropatológicos essa doença apresenta sintomas motores e não motores.

Entre os principais sintomas motores que acometem indivíduos com a DP estão tremor em repouso, bradicinesia, acinesia, rigidez muscular, perda de equilíbrio e instabilidade postural, que são atribuídos à diminuição significativa de dopamina (DA) no corpo estriado (**Figura 1**) (Shulman et al., 2011). Uma das principais características que afetam estes pacientes inclui uma lentidão de início do movimento voluntário, com uma redução progressiva da velocidade e amplitude de tarefas motoras sequenciais (Dickson et al., 2009). Estima-se que os sintomas motores da DP aparecem quando a perda de neurônios dopaminérgicos atinge cerca de 50% a 60%, o que corresponde a uma diminuição de 70% para 80% nos níveis de DA no estriado, se manifestando depois que a patologia atingiu um nível avançado (Nandhagopal et al., 2009). Os sintomas motores podem ser atenuados com medicamentos que agem principalmente no sistema dopaminérgico (**Tabela 1**). No entanto, a eficácia diminui à medida que a gravidade dos sintomas clínicos aumenta devido à progressão da neurodegeneração (Schapira, 2009).



**Figura 1:** Corpo estriado de paciente normal e em seguida com DP, mostrando a depleção da DA na doença. Adaptado de Aguilar Junior, 2011.

**Tabela 1.** Classificação, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais fármacos utilizados no tratamento da DP. Adaptado de Rinaldi, (2011).

<b>Classificação dos Fármacos</b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Efeitos Adversos</b>
<b>Anticolinérgicos</b> (Triexfenidil, Biperideno)	Inibem a ação da Ach	Confusão, alucinações
<b>Liberadores de Dopamina</b> (Amantadina)	Antagonistas de receptores excitatórios	Disfunção cognitiva, alucinações
<b>Precursor dopaminérgico</b> (Levodopa)	Sofre ação da dopadescarboxilase, dando origem à DA. Parte é metabolizada em DA antes de atingir o SNC	Náusea, vômito, alucinações visuais, sonolência, discinesia
<b>Inibidores periféricos da dopa-descarboxilase</b>	Impedem o metabolismo da levodopa antes de atingir o SNC	Náusea, vômito, alucinações visuais, sonolência, discinesia
<b>Agonistas dopaminérgicos</b> (bromocriptina, pergolida, pramipexol)	Não necessitam de transformação enzimática para serem ativas. Agem nos receptores de DA na SNpc	Náusea, hipotensão, alucinações, dores de cabeça, problemas no sono, fibrose pulmonar
<b>Inibidores da MAO-B</b> (selegilina, rasageline)	Agem no SNC impedindo a remoção da DA após utilizada pelo receptor	Perda de peso, vômito, problemas no equilíbrio, hipotensão
<b>Inibidores da COMT</b> (entacapone, tolcapone)	Agem tanto no SNC quanto fora dele, junto com a MAO-B. Esta enzima também inibe a transformação da levodopa em 3-Ometildopa, substância sem efeito terapêutico	Diarréia, discinesia, toxicidade no fígado

Os principais sintomas não motores incluem distúrbios olfativos e de sono, constipação, incontinência urinária, hipotensão ortostática, disfunção erétil, insuficiência autonômica, e vários sintomas neuropsiquiátricos como depressão, alucinações e demência, que podem aparecer tanto antes quanto durante os sintomas motores da DP (Chaudhuri et al., 2006; Farrer, 2006; Shulman et al., 2011).

## **1.2 Características Neuroquímicas e Neuropatológicas da DP**

Além dos sintomas motores e não motores os pacientes com a DP apresentam ainda características neuropatológicas. A principal característica neuropatológica dessa doença é a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, o que conduz à depleção de DA estriatal. Os neurônios dopaminérgicos que se degeneram formam inclusões intracitoplasmáticas proteicas conhecidas como CL ou neurites de Lewy, resultando em desequilíbrio neuroquímico em todo gânglio basal (Brotchie & Fitzer-Attas, 2009).

Embora a DP tenha sido descrita como uma perturbação nigroestriatal, é agora bem claro que os processos neuropatológicos na DP afetam outras áreas do cérebro como neocórtex, hipocampo, tálamo e cerebelo (Braak et al., 2001; Braak et al., 2002). Sendo assim, distúrbios motores representam apenas a ponta de um distúrbio complexo e multifacetado, enquanto os sintomas não motores associados à DP representam uma crescente área de pesquisa e estão recebendo cada vez mais atenção quanto ao seu papel proeminente na doença (Langston, 2006). Os CL afetam muitas áreas do sistema nervoso central (SNC), originam-se no interior do tronco cerebral menor, expandem-se para os gânglios basais, e terminam no córtex cerebral (Braak, et al., 2003). Uma proteína pré-sináptica é a principal componente dos CL, a alfa-sinucleína ( $\alpha$ -sin), uma

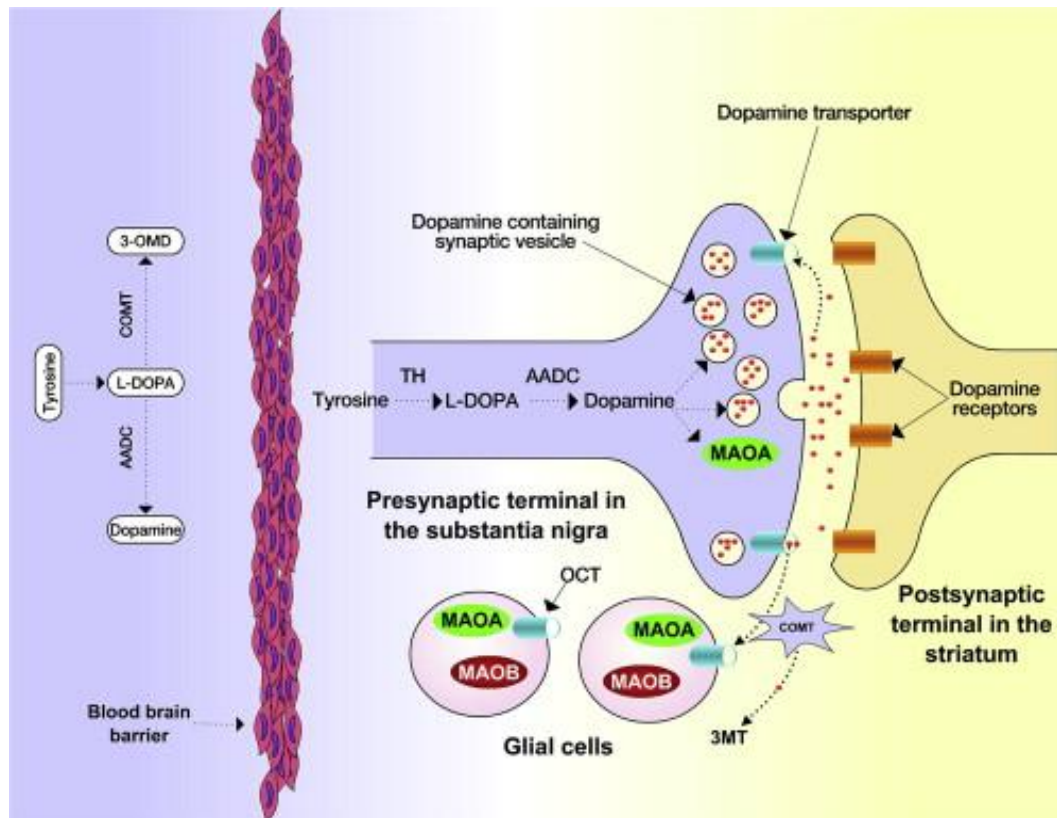
pequena proteína de 140 aminoácidos, que é predominantemente expressa no neocórtex, hipocampo, SNpc, tálamo e cerebelo. A definição patológica da DP depende da presença dos CL nos neurônios da SNpc, embora seja claro que a patologia está também presente, fora desta área (Probst et al., 2008; Schapira & Jenner, 2011).

A perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc leva à degeneração da via nigroestriatal resultando na redução marcante de DA estriatal e isto parece ser crucial para o desenvolvimento das características clínicas da doença, tais como os sintomas motores. Assim, a DA desempenha um papel principal na degeneração nigroestriatal seletiva desta área do cérebro na DP (Sulzer, 2007; Li et al., 2011; Liu et al., 2012).

Essa DA é sintetizada em condições normais a partir da tirosina pela tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante da biossíntese da DA (**Figura 2**). Após sua síntese, a DA é armazenada de forma segura em altas concentrações milimolares em vesículas sinápticas (Staal, et al., 2004). A deterioração do armazenamento vesicular da DA pode ser devido à presença de  $\alpha$ -sin, estresse oxidativo, ou compostos de base fraca tal como a metanfetamina que leva a um aumento dos níveis de DA no citoplasma (Caudle et al., 2008). A DA pode ser metabolizada pela monoamina-oxidase (MAO), uma enzima mitocondrial presente no lado citoplasmático da membrana mitocondrial externa, a aldeído desidrogenase, produzindo o 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). A MAO existe em duas isoformas, MAO-A e MAO-B, que possuem especificidade de substrato diferente (**Figura 2**). Ambas as isoformas oxidam a DA, mas no homem a DA é preferencialmente oxidado por MAO-B, enquanto que em roedores é predominantemente oxidada pela MAO-A (Shih et al., 1999). A oxidação da DA contribui para fatores adicionais envolvidos na DP, tais como a agregação de proteínas, estresse do retículo endoplasmático e disfunção lisossomal. Assim, a



combinação de disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e oxidação da DA provavelmente aumentam a vulnerabilidade de neurônios dopaminérgicos na degeneração na DP (Greenamyre, 2004).



**Figura 2:** Percurso de síntese de dopamina no metabolismo (Bainbridge et al., 2008) (nº de permissão 3138930467535).

Braak e colaboradores, (2002; 2003; 2004) realizaram estudos anatômicos neuropatológicos para caracterizar a progressão cerebral de  $\alpha$ -sin em um processo de doença contínua. Neste estudo, eles estabeleceram uma associação entre CL, patologias e os sintomas clínicos. Foram estabelecidas as fases para a DP, incluindo fases pré sintomáticas (antes dos sintomas motores) e fases sintomáticas. Na fase 1 sugeriram que os CL aparecem fora da SNpc, que as inclusões iniciais de  $\alpha$ -sin imunorreativas são encontradas dentro do sistema olfativo causando déficits autonômicos e olfativos. Na

fase 2 os CL estão mais generalizados dentro do bulbo, incluindo áreas monoaminérgicas. Durante estes primeiros estágios, os indivíduos não apresentam quaisquer sintomas motores perceptíveis (Braak et al., 2004). A fase 3 é caracterizada pela progressão da patologia para o tronco cerebral. As proteínas  $\alpha$ -sin se acumulam no mesencéfalo e proencefalo basal, se espalhando logo após para a SNpc. Na fase 4, a perda de células na SNpc é evidente, assim como a deposição de  $\alpha$ -sin no córtex cerebral. Neste momento, os doentes podem apresentar os primeiros sintomas consistentes com o parkinsonismo tais como os sintomas motores primários. Finalmente, na fase final 5 e 6, as proteínas  $\alpha$ -sin começam a invadir o neocórtex. Nessas últimas fases os sintomas motores são claramente graves e a disfunção cognitiva torna-se evidente (Braak et al. 2003; Halliday & McCann, 2010; Dunning et al., 2012).

Essa patologia é alvo de diversos estudos, mas ainda assim as causas da DP não se encontram totalmente esclarecidas (Reichmann, 2011). Pesquisas apontam que a DP pode ser decorrente da interação de um conjunto de fatores, incluindo fatores genéticos, toxinas ambientais, estresse oxidativo, anormalidades mitocondriais e envelhecimento. Atualmente considera-se como fatores etiopatogênicos mais importantes, a chamada causa multifatorial, ou seja, a combinação de predisposição genética com a presença de fatores tóxicos ambientais (Lesage & Brice, 2012).

Já foram identificados diferentes loci genéticos responsáveis pelas formas herdadas da DP o que fornece numerosos indícios para entender suas causas moleculares. Mutações na leucine-rich repeat-quinase 2 (LRRK2), PTEN-cinase induzida putativo 1 (PINK1), parkin (PARK2), PARK7, glucocerebrosidase (GBA), L1 esterase ubiquitina carboxi-terminal (UCHL1) (Singleton et al., 2003; Chartier-Harlin et al., 2004; Dodson e Guo, 2007; Nichols et al., 2009; Tan et al., 2010). Porém, em raras condições observa-se correlação entre a ocorrência da doença e mutações em genes, os

quais constituem uma forma familiar da doença que geralmente acomete os indivíduos ainda na juventude, de 5 a 10% dos casos da DP (Vila, 2004).

Além das formas herdadas por mutações genéticas, investigações epidemiológicas indicam que a exposição a pesticidas aumentam o risco da DP. Entre os fatores tóxicos ambientais cita-se o pesticida rotenona, um pesticida encontrado naturalmente nas plantas pertencentes à família das leguminosas, que também atua como um inibidor do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e conduz a uma interrupção do fornecimento de energia mitocondrial da célula. Estudos feitos por Betarbet e colaboradores (2002), mostraram que o tratamento crônico com rotenona foi suficiente para causar características típicas de DP, incluindo a perda de neurônios dopaminérgicos e aparecimento de inclusões de  $\alpha$ -sin em roedores (Betarbet et al., 2000). Outro exemplo é o paraquat, um herbicida que foi usado recentemente, e que foi proibida na União Europeia, em 2007 por também apresentar toxicidade (**Tabela 2**) (Grant et al, 1980). Tawara et al. (1996) propuseram que o envolvimento de paraquat na etiologia da DP baseia-se na atividade significativamente menor do complexo I. Defeitos graves na atividade do complexo I deprimem a síntese de ATP, induzindo a despolarização mitocondrial e desregulam a entrada de  $Ca^{2+}$  intracelular. A combinação de todos esses fatores podem causar o aparecimento precoce e rápida progressão de doenças neurológicas, tais como a DP (Greenamyre et al., 2001).

Os fatores relacionados à DP estão associados a um estado de disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, processos apoptóticos e neuroinflamação, no entanto essas mudanças não são específicas as DP, contribuírem para desordens de outras doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer e de Huntington (McGeer & McGeer, 2004).

### 1.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio redox entre a geração de radicais livres e espécies reativas (ER), e os mecanismos de defesas celulares antioxidantes (Shulman et al., 2011).

Os radicais livres são moléculas que possuem elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (Marks *et al.*, 1996) e podem ser tanto moléculas orgânicas, tais como quinonas, ou inorgânicas como o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). São altamente reativas e, portanto, com tempo de vida muito curto. São formadas durante o metabolismo celular normal e, também, quando o organismo é exposto a uma série de estímulos como radiação ionizante e biotransformação de xenobióticos (Comporti, 1989).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são compostos contendo oxigênio que incluem os radicais livres como o ânion superóxido, ( $O_2^{\cdot-}$ ), o radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) radical hidroperoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ), e os não radicais livres como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Estas espécies são altamente reativas e podem agir como sinalizadores celulares, ou ainda como causadores de dano ao DNA, ativadores pró-carcinógenos, alterar o sistema de defesa antioxidante celular, levar ao envelhecimento precoce da célula, morte celular e diversas patologias crônicas como as doenças neurodegenerativas. (Comporti, 1989; Cerutti, 1994; Liochev e Fridovich, 1999). As EROs são constantemente geradas *in vivo* como resultado do metabolismo do oxigênio, sendo que cerca de 1-5% do oxigênio consumido é convertido em EROs (Deas et al., 2009).

O cérebro consome grande quantidade de oxigênio em razão das suas características fisiológicas e anatômicas, sendo especialmente sensível a eventos geradores de estresse oxidativo. Isto se deve ao fato que o cérebro contém um nível

relativamente baixo de antioxidantes e enzimas eliminadoras de radicais livres em comparação com outros tecidos, bem como uma quantidade elevada de substâncias tais como os fosfolipídios e ácidos gordos insaturados (Barnham et al., 2004; Roberts et al., 2010).

Existe um grande número de evidências correlacionando o estresse oxidativo e a DP (Drechsel & Patel, 2008; Li & Pu, 2011). Hipóteses patogênicas refletem vários mecanismos de perda neuronal dopaminérgica na DP, especialmente a hipótese do estresse oxidativo. Esta hipótese propõe que o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ER é rompida, permitindo que os oxidantes e os intermediários reativos oxidem macromoléculas resultando na disfunção celular e, em última análise, na morte da célula (Poli et al., 2000).

Apesar de serem gerados constantemente, os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo dessas ER (Halliwell, 1994), evitando assim danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, essas defesas incluem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx) que evitam o acúmulo de ER. As defesas não-enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathione (GSH), ascorbato, albumina sérica, ácido úrico e o ácido dehidroascórbico) (Halliwell, 2001). Na DP, é observada uma inibição das enzimas antioxidantes o que leva a um aumento das ER que causam a peroxidação lipídica onde o produto final é o malondialdeído (MDA), determinando diminuição na capacidade antioxidante. Estudos mostram uma redução da atividade de GPx, SOD, CAT e o aumento dos níveis de MDA ocorrem em modelos da DP em roedores (Chen et al., 2007; Hritcu et al., 2011; Li & Pu, 2011).

O dano oxidativo aos ácidos nucleicos, às proteínas e aos lipídios bem como a diminuição dos níveis de GSH e aumento na quantidade de ferro livre foram mostrados em estudos *post-mortem* do cérebro de pacientes com a DP (Müller & Muhlack, 2011). O ferro é um elemento muito reativo e a disfunção da homeostase do ferro é concomitantemente acompanhado por processos de oxidação no organismo vivo. Uma alta concentração de ferro livre ou não ligado pode induzir ER, devido à sua interação com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através da reação de Fenton, resultando num aumento da formação de ER no cérebro (Smith et al., 2004). As ER provocam danos moleculares que podem então levar a uma falha crítica de funções biológicas, modificação de proteínas, enovelamento incorreto e, em última análise, a agregação e morte neuronal (Halliwell, 2001; Przedborski, 2004).

Evidências apontam para o aumento do estresse oxidativo como um evento precoce e causal da DP (Jenner, 2003; Zhou et al., 2008). De fato, análises de tecido *post-mortem* do cérebro de pacientes com DP e de tecidos cerebrais de modelos animais têm demonstrado que a peroxidação lipídica (Dexter et al., 1989), o dano oxidativo ao DNA (Alam et al., 1997) e a carbonilação de proteínas (Alam et al., 1997; Floor et al., 1998) induzida pelo estresse oxidativo pode representar fatores causais na DP. Por essa razão, existe um interesse crescente em analisar a utilização de agentes antioxidantes naturais apropriados para prevenir ou atenuar os danos oxidativos na DP (Chen, et al., 2007; Liu, et al., 2012).

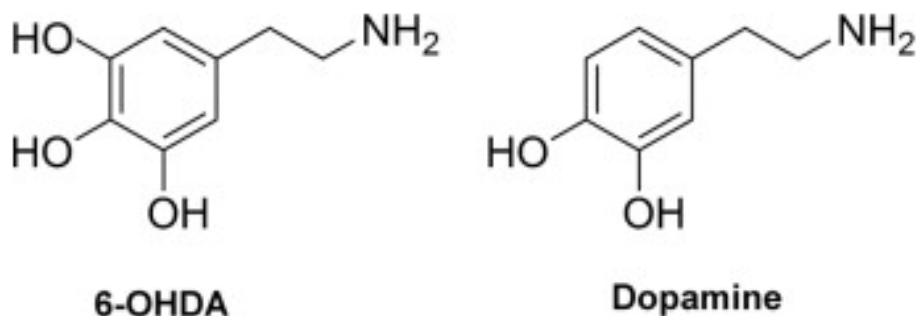
#### **1.4 O modelo 6-hidroxdopamina (6-OHDA)**

O uso de toxinas indutoras em modelos animais tem sido crucial para a elucidação da fisiopatologia da DP e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas para o tratamento de seus sintomas. Além disso, esses modelos são

empregados para lançar descobertas sobre mecanismos patogênicos envolvidos na DP associadas à morte celular neuronal, com o objetivo final de desenvolver compostos neuroprotetores para esta doença (Bové & Perier, 2012).

Entre essas toxinas esta a 6-OHDA, um modelo clássico de indução da DP em roedores. Essa neurotoxina necessita ser injetada direto na SNpc ou no corpo estriado através de cirurgia estereotáxica para produzir toxicidade no SNC, por não ter a capacidade de ultrapassar a barreira sangue-cérebro (Jackson-Lewis, 2012). Esse foi o primeiro modelo conhecido de indução de DP, proposto por Ungerstedt (1968). A 6-OHDA degenera seletivamente a via dopaminérgica nigroestriatal induzindo o estresse oxidativo, a inflamação e finalmente a morte celular. A injeção, unilateral intraestriatal de 6-OHDA induz acentuadas assimetrias de comportamento, déficits bioquímicos e alterações histológicas semelhantes à DP (Bové & Perier, 2012).

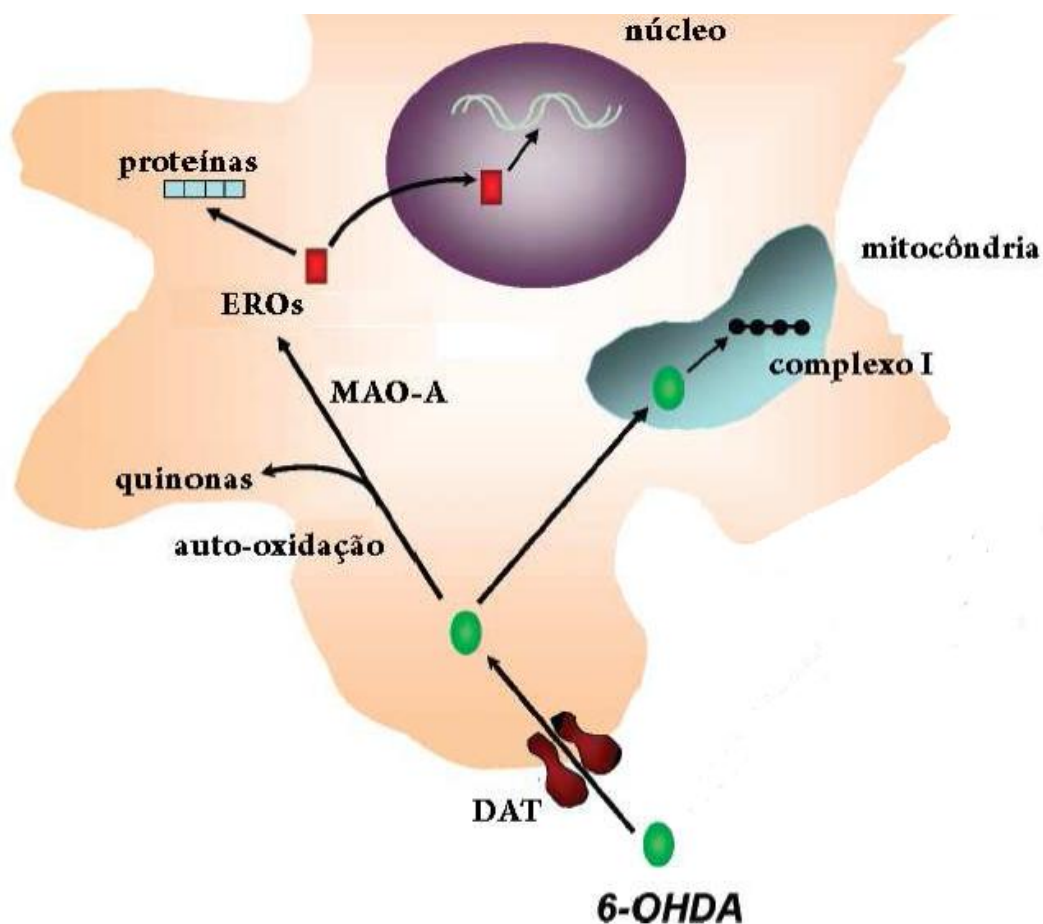
Esta toxina apresenta elevada afinidade aos transportadores de DA devido à sua semelhança química com a DA (**Figura 3**) (Luthman, et al., 1989). O armazenamento intracelular de 6-OHDA é mediado pelos transportadores de membrana de DA e noradrenalina, que reconhecem e captam a 6-OHDA (Tadaiesky, 2010; Bové & Perier, 2012).



**Figura 3:** Comparação entre a estrutura química da toxina 6-OHDA e do neurotransmissor DA.

O modelo 6-OHDA ainda é a ferramenta mais utilizada na replicação da perda de neurônios dopaminérgicos do SNpc que ocorre na DP (Tadaiesky, 2010). Os efeitos neurotóxicos da 6-OHDA ocorrem através do acúmulo da toxina nos neurônios catecolaminérgicos, seguido por alterações na homeostase celular e dano neuronal. Uma vez infundida no cérebro, a 6-OHDA produz espécies citotóxicas como as ER através de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Choi et al., 1999). Além disso, a 6-OHDA passa por um processo de auto-oxidação, gerando as ER. Os aumentos nos níveis de ER resultam em uma rápida depleção das enzimas antioxidantes, levando a uma neurotoxicidade amplificada na estrutura e metabolismo celular e resultando em dano neuronal (**Figura 4**) (Blum et al., 2001).





**Figura 4:** Neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. DAT: transportador de DA. MOA-A: monoamina oxidase A. EROs: espécies reativas de oxigênio. Modificado de Tadaiesky, 2010.

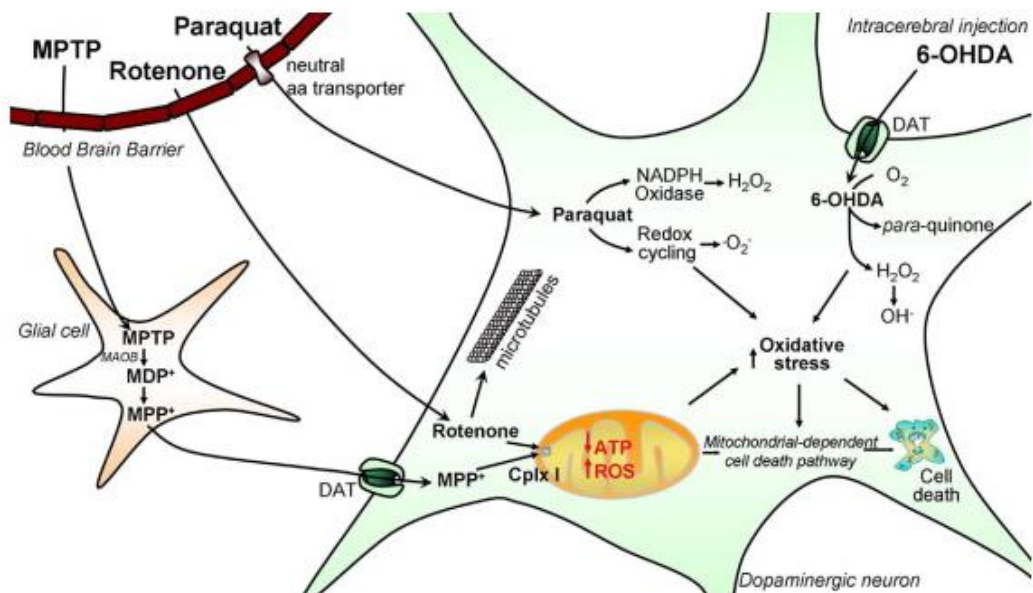
A injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de 6-OHDA é um modelo que apresenta melhores resultados quando aplicados em uma injeção unilateral, pois quando essa droga é injetada bilateralmente produz não só acinesia grave e convulsões, mas também, muitas vezes a morte do animal (Ungerstedt, 1968).

No caso da injeção no corpo estriado, a 6-OHDA produz uma degeneração retrógrada prolongada que pode levar 1-3 semanas para ser concluída, sendo que uma perda completa de DA é alcançada no estriado dentro de três semanas. (Sauer & Oertel,

1994; Przedborski et al.,1995). O modelo estriatal é principalmente utilizado para estudar a patogênese da DP e estratégias de neuroproteção (Hu et al., 2011). A 6-OHDA é uma candidata como possível toxina endógena para o início do processo neurodegenerativo da DP, uma vez que é um produto do metabolismo da DA e é o resultado de ataque de radicais hidroxilas (Graham, et al., 1974). Vale a pena enfatizar que 6-OHDA foi encontrada no núcleo caudado humano (Curtius et al., 1974) e na urina de pacientes tratados com L-dopa (Andrew et al., 1993).

### 1.5 Outros modelos da PD

Outros modelos que vem sendo amplamente utilizados para indução da DP em roedores são a administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), o paraquat e a rotenona (**Figura 5**) (**Tabela 2**) (Bové & Perier, 2012).



**Figura 5:** Mecanismo de ação dos diferentes de neurotoxinas usadas na indução de DP.

(Bové & Perier, 2012) (nº de permissão 500756675).

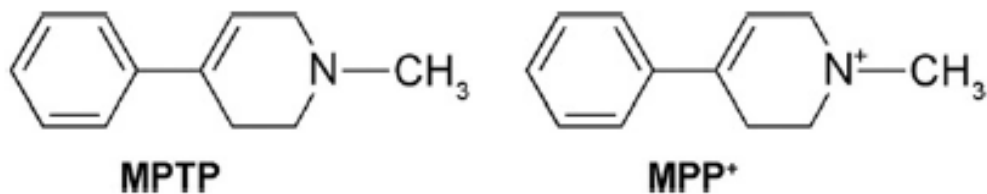
**Tabela 2.** Diferentes modelos utilizados para DP em animais.

<b>Modelo</b>	<b>Sintomas comportamentais</b>	<b>Dano nigroestriatal</b>	<b>Agregados de sinucleína/ corpo de Lewy</b>	<b>Usos do modelo</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>6-OHDA</b>	Comportamento rotatório após a injeção unilateral	Perda de inervação no local da injeção (estriado)	Sem inclusões	Terapias para melhora dos sintomas e mecanismos de morte celular	Requer a injeção diretamente no estriado
<b>MPTP</b>	Deficiência motora primária e aguda em roedores	Perda de neurônios dopaminérgicos dose-dependente (95% em doses elevadas). Diminuição dos níveis de DA no estriado	Inclusões não prevalentes	Terapias para melhora dos sintomas e mecanismos de morte celular	Morte das células não é progressivo (efeito agudo)
<b>Rotenone</b>	Diminuição da atividade motora em roedores	Perda de inervação e de neurônios dopaminérgicos no estriado	Agregados de sinucleína nos neurônios dopaminérgicos	Testar compostos neuroprotetores	Morbidade e mortalidade substancial. Trabalho e tempo intensivo
<b>Paraquat</b>	Sem danos motores claros	Diminuição da imunoreatividade da tirosina hidroxilase no estriado	Sem inclusões mas com aumento da imunoreatividade sinucleína em neurônios dopaminérgicos	Testar estratégias neuroprotetoras	Não testado extensivamente. Efeitos em outros sistemas de neurotransmissores
<b><math>\alpha</math>-sinucleína</b>	Deficit motor severo no modelo A53T e menores no modelo A30P	Não há degeneração de neurônios dopaminérgicos observada	Agregados de sinucleína encontrados em neurônios dopaminérgicos, geralmente restito ao modelo A53T	Estudar o papel de agregados de sinucleína na DP, bem como o papel normal das sinucleína	Geralmente não há morte de neurônios dopaminérgicos nesse modelo

<b>LRRK2</b>	Pouco deficit comportamental observado na mutação da <i>Drosophila</i>	Nenhum efeito sobre a manutenção ou desenvolvimento de DA em knockouts, nível mínimo de degeneração	Nada observado geralmente	Estudar a relação da mutação da LRRK2 com a DP	Sem degeneração o e formação de agregado de sinucleína
--------------	--	---	---------------------------	--	--

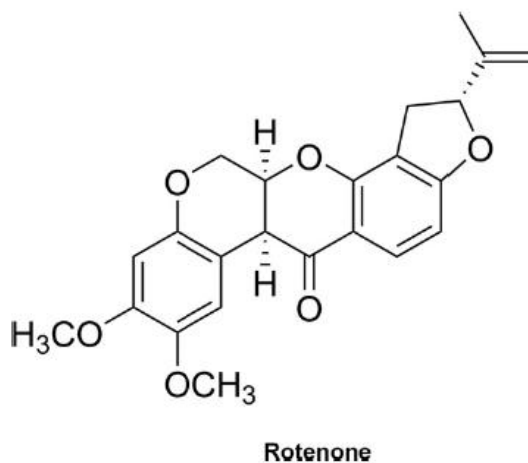
Adaptado de Blesa et al., 2012.

O MPTP (**Figura 6**) produz uma síndrome irreversível parkinsoniana em seres humanos, desencadeando todas as características principais da DP, incluindo tremor, rigidez, lentidão, instabilidade postural, e até mesmo congelação (Langston & Irwin, 1986). O MPTP é um análogo da meperidina (heroína sintética), uma neurotoxina altamente lipofílica, tem a capacidade de ultrapassar rapidamente a barreira sangue-cérebro. Ao entrar no organismo o MPTP se é oxidado a sua forma ativa 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridínio (MPP<sup>+</sup>) (Bové & Perier, 2012). A DP é uma doença progressiva que se desenvolve ao longo de anos em humanos, enquanto que na intoxicação por MPTP em humanos a fase mais ativa da neurodegeneração ocorre dentro de poucos dias após a ingestão, e é seguido por uma silenciosa progressão ao longo de várias décadas, pois este composto possui a capacidade de ultrapassar a barreira sangue-cerebro (Vingerhoets et al., 1994; Langston et al., 1999). O MPTP é usado para o modelo da DP em uma variedade de espécies que vão de primatas não humanos, ratos, camundongos a invertebrados (Kopin, 1987; Kitamura et al., 1998, Braungart, et al., 2004; Fujikawa, et al., 2005; Li & Pu, 2011, Liu, et al, 2012; Pifl, et al., 2013).



**Figura 6:** Estrutura química da toxina MPTP e MPP<sup>+</sup>.

O pesticida rotenona (**Figura 7**) é o mais potente membro da família de neurotoxinas rotenoides encontrados naturalmente em plantas tropicais (Tieu, 2011). A rotenona é um inibidor específico de complexo mitocondrial I, resultando em decréscimo na produção de ATP e aumento de ER. Além disso, é capaz de facilmente atravessar membranas biológicas, incluindo a do barreira sangue-cérebro, devido à sua natureza hidrofóbica, tendo deste modo acesso a todos os órgãos rapidamente após a exposição (Talpade et al., 2000).

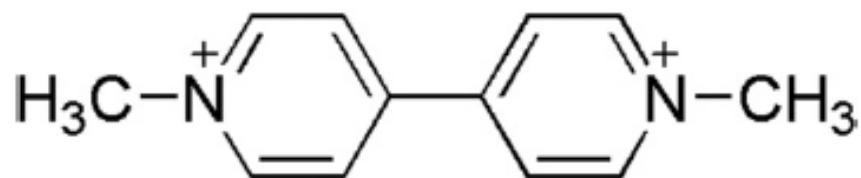


**Figura 7:** Estrutura química da Rotenona.

Após uma única injeção intravenosa, a rotenona atinge concentrações máximas no SNC dentro de 15 min e decai para cerca de metade do nível presente em menos de 2 h. A sua distribuição no cérebro é heterogênea, em paralelo com as diferenças regionais no metabolismo oxidativo (Talpade et al., 2000). A rotenona também atravessa

livremente todas as membranas celulares e pode acumular-se nas organelas subcelulares, tais como na mitocôndria. No entanto, ao contrário do MPTP, ele desencadeia uma inibição sistêmica e complexa. As primeiras tentativas de modelo DP com a administração sistêmica de rotenona não induziu uma real lesão dopaminérgica e demonstrou a alta letalidade deste composto (Ferrante et al. 1997). No entanto, quando a rotenona foi administrada em doses mais baixas (2-3 mg / kg / dia), se aproximaram da inibição do complexo I encontrada em plaquetas a partir de pacientes com a DP e a degeneração nigrostriatal altamente seletiva foi observada (Bertarbet et al. 2000).

O paraquat (N, N' =-dimetil-4, 4, 4'-bipiridínio dicloreto) (**Figura 8**) exerce os seus efeitos deletérios através do estresse oxidativo (Przedborski & Ischiropoulos, 2005). A toxicidade do paraquat é mediada pela indução da diaforase celular, tal como a óxido nítrico sintase (NOS), que dá origem à subsequente produção de ER mediando a geração de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , e  $HO^-$ , conduzindo danos aos lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Day et al., 1999; Przedborski & Ischiropoulos, 2005). (Day et al., 1999). Como o seu nome químico indica, o paraquat é uma piridínio que partilha semelhanças estruturais com outro herbicida utilizado no passado chamado cyperquat, que passa a ser o MPP<sup>+</sup> (metabólito neurotóxico do MPTP), embora os mecanismos de ação do paraquat seja bastante diferente do MPTP (Fei et al. 2008). Por ser uma molécula ionizada o paraquat não atravessar a barreira sangue-cérebro, portanto somente podendo entrar no cérebro através de um transportador de aminoácido neutro (Shimizu et al., 2001; McCormack & Di Monte, 2003).

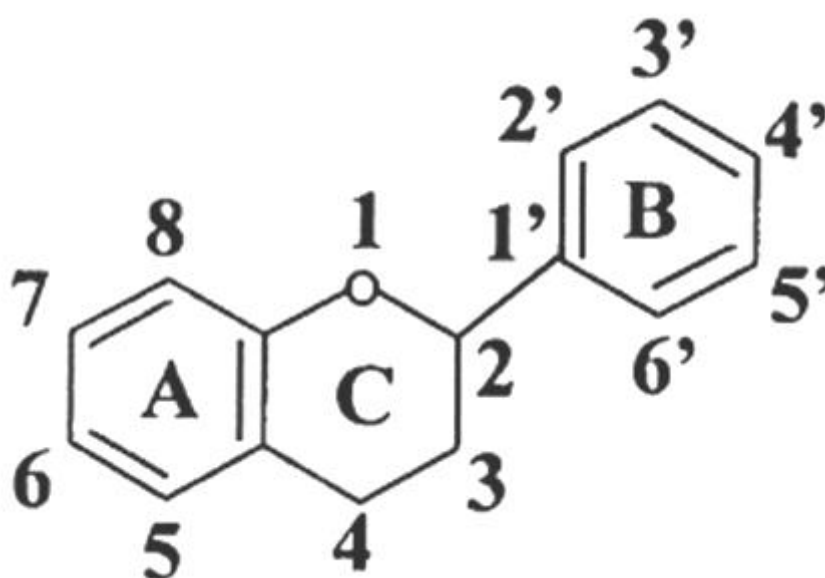


**Paraquat**

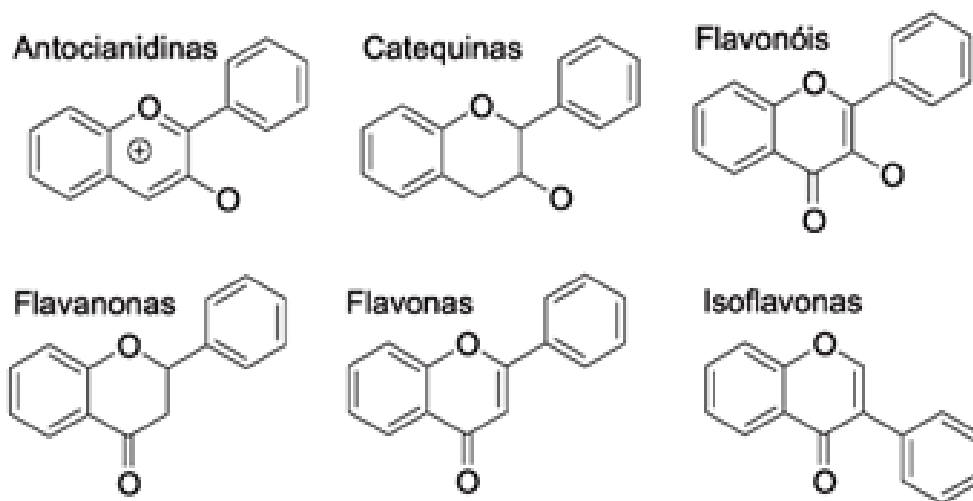
**Figura 8:** Estrutura química do Paraquat.

## 2.1 Flavonoides e DP

A principal classe de polifenóis são os flavonoides, os quais possuem estrutura química básica contendo um esqueleto heterocíclico de C6-C3-C6 (**Figura 9**). Com base na oxidação do anel heterocíclico (C3), os flavonoides podem ser definidos como flavonol, flavonas, isoflavonas, flavonoides, e flavanonas (**Figura 10**). Além destes, os flavonoides também incluem antocianinas, proantocianidinas, estilbenos (resveratróis), e lignanas. (Rice-Evans, et al., 1995; Tapieo, et al., 2002).



**Figura 9:** Estrutura nuclear de flavonóides. Flavonóides dietéticas são diversificadas e variam de acordo com o padrão de hidroxilação de conjugação, entre os anéis aromáticos, unidades glicosídicas, e grupos metoxi.



**Figura 10:** Classificação estrutural de algumas classes de flavonoides.

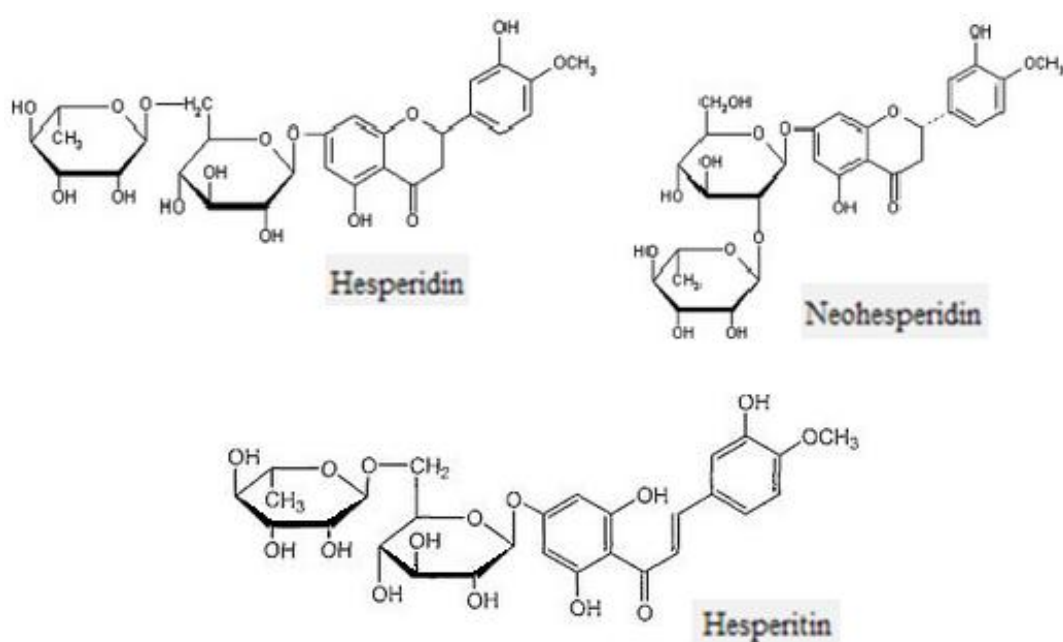
Esses polifenóis são extensivamente metabolizados em diversos tecidos tais como o do cólon, intestino delgado e no fígado e sua absorção ocorre principalmente através da barreira intestinal (Manach, et al., 2005). Alguns deles, que não são absorvidos no intestino delgado passam para o intestino grosso e sofrem biotransformação do cólon pelas enzimas da microflora do cólon (Scalbert & Williamson, 2000). Em seguida, os polifenóis estão presentes na circulação como sulfatados, glucuronado desnaturado, e como formas mistas. Além disso, uma grande parte dos polifenóis ingeridos é submetida à hidrólise e degradação pela microflora do cólon para compostos fenólicos simples.

Os flavonoides são encontrados naturalmente na dieta humana, as principais fontes alimentares são as frutas, legumes e bebidas derivadas de plantas, tais como sucos de frutas, chá, café e vinho tinto. O teor de flavonoides é alta em maçãs, couve-



flor, cenoura, tomate, soja e frutas cítricas (Rice-Evans, et al., 1996; Scalbert & Williamson, 2000).

Os flavonoides cítricos possuem ações antioxidantes, anticancerígenas, anti-inflamatórias (Manthey, et al., 2001; Yu, et al., 2009). Os principais membros dos flavonoides cítricos incluem a hesperidina, neo-hesperidina, e hesperitina (**Figura 11**). Estes compostos possuem a capacidade de ultrapassar a barreira sangue-cérebro, dessa forma, modulando as funções cerebrais em doenças neurodegenerativas (Marder, et al., 2003; Dimpfel, 2006).



**Figura 11:** Estrutura química dos flavonoides cítricos. Hesperidin, Neohesperidin, Hesperitin.

Estes flavonoides têm mostrado capacidade neuroprotetora em numerosos testes *in vitro* e em modelos animais de neurotoxicidade. O potencial dos flavonoides para atenuar danos neurológicos parece estar relacionado com a sua capacidade de interagir com moléculas intracelulares e vias neuronais de sinalização, reduzindo os danos e

perdas neuronais induzidas por várias espécies neurotóxicas e de neuroinflamação (Li & Pu, 2011; Menze et al., 2011; Nones et al., 2011; Huang, et al., 2012). Vários mecanismos neuroprotetores de ação têm sido propostos, o que sugere que polifenóis exercem as suas atividades através da redução da produção e acúmulo de ER, cuja concentração é susceptível de desempenhar um papel crucial patológica no cérebro envelhecido, reduzindo o estresse oxidativo, a inflamação e a modulação de moléculas intracelulares na transdução de sinal (Bastianetto, 2002; Choi et al., 2012).

A dificuldade no tratamento da DP e uma melhor compreensão de seu desenvolvimento e suas causas realçam a utilização de flavonoides como tratamento para a DP. Grande número de estudos epidemiológicos demonstraram que o consumo de uma dieta rica em compostos naturais como os flavonoides podem diminuir a incidência de doenças neurodegenerativas (De Rijk, et al., 1997; Li & Pu, 2011; Menze et al., 2011). Estudos relataram as propriedades dos flavonoides em vários modelos experimentais de neurodegeneração, incluindo a DP e outras doenças neurodegenerativas. Desta forma, há demonstração que os suplementos dietéticos com flavonoides podem reduzir o risco de neurodegeneração e por ser uma rica fonte de antioxidante pode estimular o sistema de defesa contra os danos oxidativos (Ahmad et al 2005; Ishrat et al 2009; Li & Pu, 2011).

A hesperidina (3',5,7-tri-hidroxi-4'-metoxi-flavanona-7-ramnoglicosídeo (**Figura 11**), um flavonoide da subclasse flavanona, é encontrada principalmente em frutos cítricos por isso é classificada como um bioflavonóide cítrico. As principais atividades exercida pela hesperidina são atividade anti-aterogênico, atividade anti-alérgica, antioxidante e anti-inflamatória (Galati et al, 1994; Ameer et al, 1996; Borradaile et al, 1999.; Wilcox et al, 2001).

Estudos realizados por Menze et al., 2011, Huang, et al., 2012 mostraram que a hesperidina foi capaz de proteger as células neuronais do estresse oxidativo, funcionando como um potente *scavenger* de radicais livres na doença de Huntington e Alzheimer (Menze et al., 2011, Huang, et al., 2012). Além disso, esse flavonoide apresenta propriedades antidepressivas como demonstrado por Filho et al., 2012 e Souza et al., 2013, através da modulação de receptores kappa opióide e 5-HT<sub>1A</sub> serotoninérgicos em camundongos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Investigar a eficácia do flavonoide hesperidina como tratamento em um modelo de DP induzida pela infusão i.c.v. de 6-OHDA em camundongos C57B/6J com 18 meses de idade.

### **Objetivo específico**

Avaliar a memória no teste do labirinto aquático de Morris.

Analisar o comportamento tipo depressivo no teste de suspensão de cauda.

Verificar os níveis de ER no estriado de camundongos.

Determinar o TRAP no estriado de camundongos.

Verificar os níveis de GSH no estriado de camundongos.

Determinar a atividade das enzimas GPx, CAT, GST, GR e SOD no estriado de camundongos.

Quantificar os níveis de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA no estriado.

## **PARTE II**

### **Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice**

Michelle S. Antunes, André T. R. Goes, Marina Prigol, Cristiano R. Jesse

**Submetido á Brain Research**

Manuscript Number:

Title: Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice

Article Type: Research Report

Section/Category: Neurobiology of Disease

Keywords: neurodegenerative disease; flavonoid; dopamine; cognitive impairment; oxidative stress; depression

Corresponding Author: Dr. Cristiano Jesse,

Corresponding Author's Institution: UNIPAMPA

First Author: Michelle Antunes

Order of Authors: Michelle Antunes ; André Goes ; Marina Prigol ; Cristiano Jesse

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

**Abstract:** Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that has a main neuropathological features depletion of striatal dopamine (DA) leading to development of motor symptoms. Surveys show that PD may be due to the interaction of a number of factors, including genetic factors, environmental toxins, oxidative stress, mitochondrial abnormalities and aging. Recent studies have shown that consumption of a diet rich in antioxidants may reduce the incidence of neurodegenerative diseases. In this study, we evaluated the role of flavonoid hesperidin in 6-hydroxydopamine (6-OHDA, hemiparkinsonian PD model) induced neurotoxicity in striatum of aged mice. Hesperidin (50 mg/kg, per oral) was administered during 28 days in aged mice after the intracerebroventricular injection of 6-OHDA. This study demonstrated that hesperidin was effective in preventing impairment in memory in the Morris water maze test and the behavior depressive-like in the tail suspension test. Hesperidin attenuated the decrease of the glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities, the non-enzymatic potential (TRAP) and the dopamine (DA) and its metabolites levels in striatum of aged mice induced by 6-OHDA. In addition, 6-OHDA increased reactive species (RS) level, glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) activities in striatum and these alterations were mitigated by chronic administration of hesperidin. In conclusion, this study showed a protection effect of hesperidin in neurotoxicity induced by 6-OHDA in aged mice, indicating that it could be useful as a therapy for the treatment of PD.

Cover Letter

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS ITAQUI

10/06/2013

Dear Editor,

We are sending you our manuscript entitled "Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice" by Michelle da Silva Antunes, André Tiago Rossito Goes, Marina Prigol and Cristiano Ricardo Jesse be considered for publication, as an article, in *Brain Research*.

The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Pampa, Brazil. The manuscript and the data reported here have not been published previously and they are not under consideration for publication elsewhere. All listed authors have contributed significantly to the manuscript and consent to their names on the manuscript. There is no conflict of interest in the conduct and reporting of research (e.g., financial interests in a test or procedure, funding by pharmaceutical companies for drug research).

I thank you in advance for your kind attention.

Sincerely,

Cristiano Ricardo Jesse

Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às  
Moléculas Bioativas – *LaftamBio* Pampa – Universidade Federal do Pampa,  
CEP 97650-000, Itaqui, R.S, Brazil.  
Phone and FAX number: 0-55-55-34331669  
Email: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

**Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice**

Michelle S. Antunes, André T. R. Goes, Marina Prigol, Cristiano R. Jesse\*

Laboratório de avaliações farmacológicas e toxicológicas aplicadas às moléculas bioativas – LaftamBio Pampa – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil

\*Correspondence should be sent to:

Cristiano R. Jesse

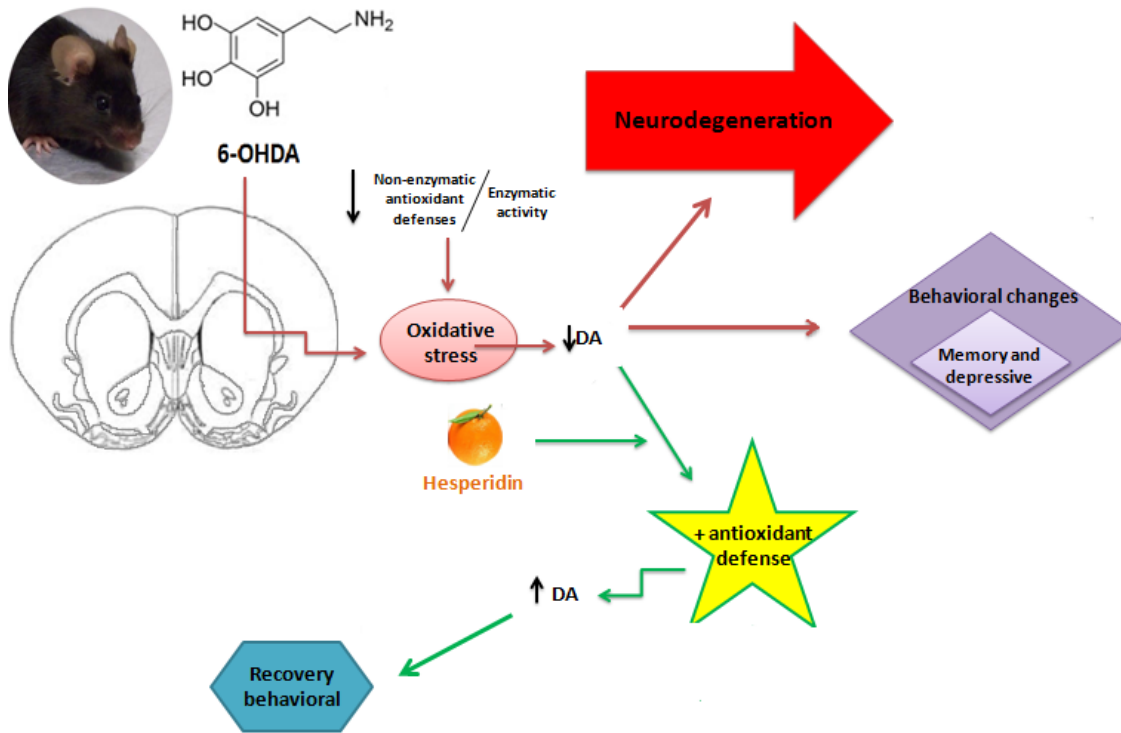
Laboratório de avaliações farmacológicas e toxicológicas aplicadas às moléculas bioativas – LaftamBio Pampa – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil.

Phone and FAX number: 0-55-55-34331669

E-mail: [cristianoricardojesse@yahoo.com.br](mailto:cristianoricardojesse@yahoo.com.br)



# Graphical Abstract



## **Highlights**

- Hesperidin treatment attenuated behavioral changes in mice in a model of PD
- Oxidative stress is a key player in Parkinson's Disease model induced by 6-hydroxydopamine
- Hesperidin prevented against inhibition of GPx and CAT activities in striatum
- Hesperidin prevented against increase of GR activities in striatum of mice
- Hesperidin protected against the decrease of DA and your metabolites in striatum

## **Abstract**

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease that has a main neuropathological feature depletion of striatal dopamine (DA) leading to development of motor symptoms. Surveys show that PD may be due to the interaction of a number of factors, including genetic factors, environmental toxins, oxidative stress, mitochondrial abnormalities and aging. Recent studies have shown that consumption of a diet rich in antioxidants may reduce the incidence of neurodegenerative diseases. In this study, we evaluated the role of flavonoid hesperidin in 6-hydroxydopamine (6-OHDA, hemiparkinsonian PD model) induced neurotoxicity in striatum of aged mice. Hesperidin (50 mg/kg, per oral) was administered during 28 days in aged mice after the intracerebroventricular injection of 6-OHDA. This study demonstrated that hesperidin was effective in preventing impairment in memory in the Morris water maze test and the behavior depressive-like in the tail suspension test. Hesperidin attenuated the decrease of the glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) activities, the non-enzymatic potential (TRAP) and the dopamine (DA) and its metabolites levels in striatum of aged mice induced by 6-OHDA. In addition, 6-OHDA increased reactive species (RS) level and glutathione reductase (GR) activity in striatum and these alterations were mitigated by chronic administration of hesperidin. In conclusion, this study showed a protection effect of hesperidin in neurotoxicity induced by 6-OHDA in aged mice, indicating that it could be useful as a therapy for the treatment of PD.

**Key words:** neurodegenerative disease; flavonoid; dopamine; cognitive impairment; oxidative stress; depression

## 1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurological disorder that is associated with depletions of dopamine (DA) in striatum and induces a gradual dysfunction of basal ganglia in the central nervous system (CNS) (Lev et al., 2013). The administration of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) into the striatum of the mice produces a well established model of PD. 6-OHDA selectively destroys the dopaminergic nigrostriatal pathway by inducing oxidative stress, which can lead to induction of inflammation and finally cell death (Ungerstedt, 1968; Kääriäinen et al., 2008; Lev et al., 2013). The unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA induces pronounced behavioral alterations and biochemical deficits similar to PD. In addition, 6-OHDA is a neurotoxin that rapidly undergoes non-enzymatic oxidation producing hydrogen peroxide, superoxide and hydroxyl radicals (Soto-Otero et al., 2000).

The glutathione (GSH) system, responsible for removing free radicals and maintaining protein thiols in their appropriate redox state, is an important protective mechanism for minimizing oxidative stress (Bharath et al., 2002). Moreover, antioxidant enzymes such as glutathione reductase (GR), glutathione-peroxidase (GPx), glutathione-s-transferase (GST), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) are also important mediators in the reduction of oxidative stress (Halliwell, 2001). The motor symptoms of PD include resting tremor, bradykinesia (slowed movements), rigidity (increased muscular tone), postural instability, and gait impairment are attributable to dopaminergic cell loss and resultant dysfunction of the basal ganglia, a cluster of deep nuclei that participate in the initiation and execution of movements (Shulman et al., 2011). Nonmotor symptoms, include memory impairments, impaired olfaction, disordered sleep and neuropsychiatric manifestations (depression, hallucinations, and dementia) become prominent, and these features are probably due to

the spread of pathology beyond the basal ganglia with involvement of oxidative stress (Chaudhuri et al., 2008; Shulman et al., 2011).

A variety of antioxidant compounds such as flavonoids derived from natural products have demonstrated neuroprotective activity in either *in vitro* or *in vivo* models of PD (Kääriäinen et al., 2008; Li & Pu, 2011; Khan et al., 2013). The bioflavonoid hesperidin is a specific flavonoid glycoside which is frequently found in oranges and lemons (Garg et al., 2001). It has been reported to possess significant anti-inflammatory, antiviral, anticancer (Gaur & Kumar, 2010) and antidepressant-like properties in mice, through modulation of kappa opioid and 5-HT<sub>1A</sub> serotonergic receptors (Filho et al., 2013; Souza et al., 2013). Several previous studies have demonstrated the antioxidant activity and radical scavenging properties of hesperidin in other diseases neurodegeneratives (Menze et al., 2011; Raza, et al., 2011; Huang, et al., 2012). Besides that, this compound has an important neuroprotective property related to diverse neuronal insults such as ischemia (Gaur & Kumar 2010), oxidative-induced damage (Chen et al., 2010), and in Alzheimer's (Huang, et al., 2012) and Huntington's diseases (Menze et al., 2011).

Based on the mentioned evidence, herein we sought to investigate the effects of hesperidin treatment (50 mg/kg, *per oral*, p.o.) during 28 days in an *in vivo* model of PD induced by injection of 6-OHDA in mice. We investigated the protective effect of hesperidin on behavior alterations (depression-like, cognitive and locomotor tests), modifications in antioxidant enzymes (CAT, GPx, GR, SOD and GST ) and levels of reactive species (RS) and GSH and the total reactive antioxidant potential (TRAP) in striatum of mice. In addition, we evaluated the protective effect of hesperidin against neurochemical alterations in DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and

homovanillic acid (HVA) induced by injection of 6-OHDA into the striatum of aged mice.

## 2. Results

### 2.1 Behavioural assessment

#### 2.1.1 Depressive-like behavior in Tail suspension test (TST)

Two-way ANOVA of depressive-like behavior in the TST revealed a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 10.86$ ;  $p = 0.002$ ) and a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 89.68$ ;  $p = 0.001$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 21.49$ ;  $p = 0.001$ ). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the 6-OHDA/vehicle group showed an increase in immobility time when compared to that of animals in sham/vehicle group, exhibiting 6-OHDA induced depressive-like behavior in the TST. Hesperidin treatment (50 mg/kg per day, p.o.) protected against increase in immobility time in the TST caused by 6-OHDA and demonstrated an antidepressant-like activity on the sham/hesperidin group (**Fig. 2**).

#### 2.1.2 Morris water maze task

The data presented in **Figure 3A-B** show that mice treated with 6-OHDA did not differ from their controls ( $F_{1,40} = 0.75$ ;  $p = 0.40$ ) in the escape latency for finding the platform in the training sessions when submitted to the spatial reference memory version of the water maze. The animals from all experimental groups were able to learn the task, since their mean escape latency improved throughout the training days.

Two-way ANOVA revealed that time quadrant was changed significantly by 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 13.17$ ;  $p = 0.001$ ) and a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 16.80$ ;  $p = 0.003$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 18.60$ ;  $p = 0.002$ ). Post hoc comparisons demonstrated that animals in the 6-OHDA/hesperidin group showed a increase in % of time in quadrant when compared to that of animals in 6-OHDA/vehicle group. Oral administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) protected against impairment in water maze test caused by 6-OHDA (**Fig. 3C**).

### *2.1.3 Locomotor activity in the open field test (OFT)*

Two-way ANOVA revealed that total distance in OFT was not changed significantly by 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 0.77$ ;  $p = 0.38$ ) and a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 2.78$ ;  $p = 0.10$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 0.14$ ;  $p = 0.70$ ) (Data not shown).

Statistical analysis of the velocity performed in OFT was not changed significantly by 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 0.25$ ;  $p = 0.61$ ) and a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 4.15$ ;  $p = 0.04$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 0.92$ ;  $p = 0.34$ ) (Data not shown).

### *2.1.4 Cylinder test*

The scores of the cylinder test in the hesperidin group were ameliorated over time at 2, 3, and 4 weeks after 6-OHDA injection (contralateral bias:  $35 \pm 5.6$ ,  $31 \pm 4$ , and  $20 \pm 3\%$ ), compared to those in the sham/vehicle group (contralateral bias:  $79 \pm 7$ ,  $65 \pm 5$ , and  $64 \pm 3\%$ ) (data not shown).

## 2.2 Biomarkers of oxidative stress and neurochemical alterations

### 2.2.1 Glutathione (GSH) levels

Two-way ANOVA revealed that GSH levels in striatum of mice was changed significantly by 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 3.22$ ;  $p = 0.04$ ) and by a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 6.65$ ;  $p = 0.02$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 11.12$ ;  $p = 0.004$ ). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly decreased the GSH levels striatum of mice. Oral administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) prevented the inhibition of GSH levels caused by 6-OHDA in striatum of mice (**Table 1**).

### 2.2.2 Reactive species (RS) levels

Two-way ANOVA of RS levels in striatum of mice demonstrated a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 5.35$ ;  $p = 0.03$ ) and by a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 6.55$ ;  $p = 0.02$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 7.47$ ;  $p = 0.01$ ). Post hoc comparisons revealed that 6-OHDA significantly increased RS levels in striatum of mice. Hesperidin treatment (50 mg/kg per day, p.o.) protected against the increase in RS levels in striatum induced by injection of 6-OHDA.

### 2.2.3 Total reactive antioxidant potential (TRAP)

Two-way ANOVA of TRAP in striatum demonstrated a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 3.45$ ;  $p = 0.04$ ). A main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 16.34$ ;  $p = 0.005$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 37.10$ ;  $p = 0.001$ ) was observed. Post hoc comparisons



revealed that 6-OHDA significantly decreased TRAP in striatum of mice. Oral administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) prevented against the decrease of TRAP in striatum of mice (**Table 1**).

#### 2.2.4 Superoxide dismutase (SOD) activity

Two-way ANOVA of SOD activity in striatum demonstrated a main effect in 6-OHDA ( $F_{1,40} = 6.39$ ;  $p = 0.02$ ). Post hoc comparisons revealed that 6-OHDA significantly increased the SOD activity in striatum of mice, but the treatment with hesperidin did not protect against the alteration on SOD activity (**Table 2**).

#### 2.2.5 Catalase (CAT) activity

Two-way ANOVA of CAT activity in striatum demonstrated a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 9,54$ ;  $p = 0.004$ ) and by a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 8.91$ ;  $p = 0.001$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 7.21$ ;  $p = 0.01$ ) (**Table 2**). Post hoc comparisons revealed that 6-OHDA significantly inhibited CAT activity in striatum of mice. Oral administration of hesperidin at the dose of 50 mg/kg per day (p.o.) prevented against the inhibition of CAT activity in striatum of mice (**Table 2**).

#### 2.2.6 Glutathione reductase (GR) activity

Two-way ANOVA of GR activity in striatum demonstrated a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 28.43$ ;  $p = 0.001$ ) and by a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 28.57$ ;  $p = 0.001$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 12.35$ ;  $p = 0.002$ ). Post hoc

comparisons revealed that 6-OHDA significantly increased the GR activity in striatum of mice and the administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) prevented against the increase of GR activity caused by 6-OHDA in striatum of mice (**Table 2**).

#### *2.2.7 Glutathione peroxidase (GPx) activity*

Two-way ANOVA demonstrated that GPx activity in striatum revealed a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 8.47$ ;  $p = 0.01$ ) and by a main effect of hesperidin ( $F_{1,40} = 13.73$ ;  $p = 0.001$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 10.08$ ;  $p = 0.005$ ) (**Table 2**). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly inhibited GPx activity in striatum of mice. Oral administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) prevented the inhibition of GPx activity caused by 6-OHDA in striatum of mice.

#### *2.2.8 Glutathione S-transferase (GST) activity*

Two-way ANOVA of GST levels in striatum of mice not demonstrated a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 0.03$ ;  $p = 0.85$ ), nor by hesperidin ( $F_{1,40} = 0.95$ ;  $p = 0.33$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 0.38$ ;  $p = 0.53$ ).

#### *2.2.9 DA, DOPAC and HVA levels*

Statistical analysis of DA levels in striatum revealed a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 6.57$ ;  $p = 0.02$ ) and a main effect of 6-OHDA ( $F_{1,40} = 84.64$ ;  $p = 0.001$ ) and hesperidin ( $F_{1,40} = 4.86$ ;  $p = 0.04$ ). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly decreased DA levels in striatum of mice. Oral

administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) prevented the decrease of DA levels caused by 6-OHDA in striatum of mice (**Table 3**).

Two-way ANOVA of DOPAC levels in striatum of mice demonstrated a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 4.15$ ;  $p = 0.04$ ) and yielded a main effect of 6-OHDA ( $F_{1,40} = 49.43$ ;  $p = 0.001$ ) (**Table 3**). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly decreased DOPAC levels in striatum of mice and administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) prevented the decrease of DOPAC levels caused by 6-OHDA in striatum of mice.

Two-way ANOVA of HVA levels in striatum of mice demonstrated a significant 6-OHDA  $\times$  hesperidin interaction ( $F_{1,40} = 3.56$ ;  $p = 0.05$ ) and yielded a main effect hesperidin ( $F_{1,40} = 5.62$ ;  $p = 0.03$ ) and 6-OHDA ( $F_{1,40} = 39.78$ ;  $p = 0.001$ ) (**Table 3**). Post hoc comparisons demonstrated that 6-OHDA significantly decreased HVA levels in striatum of mice compared of sham/vehicle group. Oral administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) prevented the decrease of HVA levels caused by 6-OHDA in striatum of mice.

### **3. Discussion**

This study demonstrated the potential protective effects of hesperidin from toxicity of the nigrostriatal dopaminergic neurons induced by 6-OHDA injection in aged mice. Injection of 6-OHDA potentiated both the cognitive and depressive deficits accompanied with oxidative damage with loss of DA and metabolites. Hesperidin treatment (50 mg/kg per day, p.o.) attenuated behavioral alterations and protected striatum of aged mice against oxidative stress and the decrease of DA, DOPAC and

HVA levels caused by 6-OHDA exposure, probably through its demonstrated a modulation of antioxidant status.

Regarding PD symptoms, an increasing number of studies have demonstrated that PD seems to be a multidimensional disease, and besides motor deficits, it is associated with a number of cognitive and depressive disturbances that result in a loss in quality of life of the individuals (Matheus et al., 2012). Depression is among the most common psychiatric conditions accompany PD. Indeed, depending on the criteria measuring, depression can affect 10–45% of PD patients (Noyce et al., 2012). Furthermore, it has been shown that depression may largely precede the onset of motor symptoms of PD (Nilsson et al., 2001; Noyce et al., 2012). The findings herein indicated that infusions of the neurotoxin 6-OHDA were able to produce depressive-like behaviors assessed through the TST, similar to what was previously reported by other groups (Branchi et al., 2008; Tadaiesky et al., 2008). Furthermore, such an alteration in TST has been found 5 weeks after the lesion, when no alteration is as yet present according to locomotor activity analysis. Although very subtle motor impairment not revealed by the latter analysis cannot be ruled out, these results suggest that the appearance of depressive-like behavior precedes that of motor symptoms. In addition, alterations in the dopaminergic system suggest, therefore, that neurotransmitter systems play an important role in depressive-like behaviors in the current model tested, further supporting the involvement of these neurotransmitter systems in PD-related depression (Santiago et al., 2012). Our results demonstrated that the 6-OHDA/hesperidin group demonstrated less immobility time than the 6-OHDA/vehicle group, showing that flavonoid had antidepressant – like effect in this model of PD induced by 6-OHDA in mice. These results represent the first evidence that hesperidin may prevent depressive-like behavior in an experimental model of PD. Interestingly, we recently demonstrated

that hesperidin treatment is also linked to the modulation of depression in mice (Filho et al., 2013; Souza et al., 2013).

In addition to emotional deficits presented in Parkinson's patients, PD seems to produce cognitive deficits as well, particularly in procedural memory. The striatum has been the main area implicated in procedural learning dysfunctions (Saint-Cyr et al., 1988; Tadaiesky et al., 2008), consistent with earlier studies reporting that PD models impair mice performance in cognitive tests (Haik et al., 2008; Luchtman et al., 2012). Therefore, we investigated putative spatial memory dysfunction in mice after 6-OHDA injection by using the Morris water maze task. Mice injected with 6-OHDA did not differ from the control group in the escape latency for finding the platform and all experimental groups were able to learn the task. Our data demonstrated that injection of 6-OHDA induced long-term memory impairment in the 6-OHDA/vehicle group revealed by the reduction of percentage of time in correct quadrant in the Morris water maze task. This effect was revealed by the reduction of the percentage of time spent in the correct quadrant in the Morris water maze task. Importantly, the percentages of striatal DA, DOPAC and HVA depletion and increase of oxidative stress observed in this study were similar to previous studies showing deficits in memory tasks (Haik et al., 2008; De Leonibus et al., 2009). As for the cognitive deficits found in this test, our findings support the hypothesis of an involvement of striatal DA, DOPAC and HVA levels and antioxidant deficits induced by 6-OHDA in memory in this model of PD. In our study, hesperidin treatment at the dose of 50 mg/kg (per day; p.o.) protected against cognitive impairment induced by 6-OHDA, preserving the spatial memory with mechanisms such as antioxidant and DA-enhancing. The antidepressant-like effect and the protection against cognitive impairment induced by 6-OHDA caused by hesperidin seem not to be associated with any motor effects when assessed in the OFT.

6-OHDA is a selective catecholamine neurotoxin and could easily undergo autoxidation to yield hydrogen peroxide and superoxide radicals which take part in a secondary metal-catalyzed Haber-Weiss reaction producing hydroxyl free radicals (Opacka-Juffry et al., 1998). In this study, 6-OHDA infusion caused an overproduction of free radicals which, in turn, caused oxidative damages to membrane lipids and protein levels, and ultimately lead to a modification in activity of antioxidant enzymes. This oxidative neuronal damage in 6-OHDA-treated rodents is consistent with previous reports (Khan et al., 2012; Li et al., 2013). As a result, the vehicle group of mice exposed to 6-OHDA had an inhibition of GPx and CAT activities and an increase in GR and SOD. In addition, our data confirms that the tested toxin initiated an oxidative cascade of events in the striatum through the formation of RS and decreased levels of GSH and the TRAP. We demonstrated that oral administration of hesperidin (50 mg / kg per day, p.o) for 4 weeks completely reverse the inhibition of GPx and GSH levels, and partially inhibition of CAT. In contrast, our study showed that the activity of GR and SOD are elevated in the striatum of mice infused 6-OHDA compared to the sham/vehicle. Increased activities of GR and SOD also suggests an adaptive mechanism to compensate for the increase in RS levels and decreased levels of GSH and the trap. This work according to results obtained by Jhoo et al., (2004) and Prediger et al., (2007) in other neurodegenerative diseases. Our protocol treatment with hesperidin for 4 weeks was efficient to prevent increase of enzymes GR activity and decrease of GPx and CAT activities in striatum before 6-OHDA injection. However, hesperidin did not shown efficacy in reversing the activity of SOD. Indeed, hesperidin has been demonstrated in different biological systems to act as an antioxidant in other neurodegenative diseases as in Alzheimer and Huntington disease that stabilizes biomembranes preventing cell membrane damage (Menze et al., 2011; Hung, et al., 2012). Thus, these results show

that hesperidin may prevent oxidative stress and maintain the integrity of the striatum of mice that received 6-OHDA in this model of PD.

The measurement of monoamine neurotransmitters in the basal ganglia serves as an important method to determine whether or not a particular drug has a therapeutic effect on dopaminergic neurons (Soto-Otero et al., 2000). The activities of dopaminergic neurons can thus be inferred by determining the levels of DA, DOPAC and HVA in the brain or in the cerebrospinal fluid (Soto-Otero et al., 2000). To this end, we performed high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC ECD) to detect monoamine neurotransmitters in the striatum of mice, and found that levels of DA, DOPAC and HVA were significantly decreased following 6-OHDA exposure, which is similar to previous reports (Li & Pu, 2011; Liu et al., 2012; Khan et al., 2013). We can infer from the above study that oral administration of hesperidin (50 mg/kg per day, p.o.) for 4 weeks may attenuate the 6-OHDA-induced catecholamine neurotoxicity and maintain the concentration of DA and its metabolites at normality or close to normality. Therefore, hesperidin appears to act, in this PD model induced by 6-OHDA, via antioxidant and DA-enhancing mechanisms that rescue the compromised cells in striatum of mice.

The present study demonstrated that treatment with hesperidin (50 mg/kg per day, p.o., for 28 days) was effective in attenuate the following impairments resulting from 6-OHDA exposure in mice: (1) depressive-like behavior in TST; (2) impairment of cognitive performance in the Morris water maze task ; (3) increased RS levels; (4) decreased GSH levels and TRAP; (5) inhibition of GPx and CAT activities and rise in the GR activity; (6) decrease in levels of DA, DOPAC and HVA. In view of our results, we provided the first preclinical data indicating that hesperidin acts as a protective agent by analyzing behavioral, neurochemical and biochemical parameters in aging mice

submitted to an experimental model of PD induced by 6-OHDA. The mechanisms involved in this study are the modulation of GPx, CAT and GR activities and GSH and RS levels in a PD model induced by 6-OHDA in mice, and hence protecting against the decrease of DA, DOPAC and HVA levels in striatum of mice. These results provide new insights in experimental models of PD, indicating that hesperidin may represent a new therapeutic tool for the treatment of PD. Conversely, further research is needed to clarify the exact molecular mechanisms involved in the protective effect induced by hesperidin in 6-OHDA model of PD.

#### **4. Experimental procedure**

##### *4.1 Animals*

Experiments were performed using aged female C57B/6J mice (25-35g, 18 months old). Animals were maintained at 22-25°C with free access to water and food, under a 12:12h light/dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. All manipulations were carried out during light phase on the day. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. The procedures of this study were conducted according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animals Resources and with the approval of Ethical Committee for Animal Use (CEUA protocol # 001/2013) of Federal University of Pampa, Brazil.

##### *4.2 Experimental design*

Mice were randomly assigned into four groups (n=10 per group): (1) Sham/vehicle; (2) Sham/6-OHDA; (3) Hesperidin/vehicle and (4) Hesperidin/6-OHDA. The



mice were subjected stereotaxic surgery injection of 6-OHDA or vehicle. Seven days after stereotaxic surgery injection, start of treatment with hesperidin (50mg/kg, per oral, p.o.), for 28 days and after day mice underwent behavioral tests, finally the striatum was removed for biochemical assays (**Figure 1**).

#### *4.3 Stereotaxic surgery injection of 6-OHDA*

Surgery was performed under anesthesia with 10 mL/kg of 1% ketamine (Bela-Pharm, Vechta, Germany) and 0.2% xylazine (Bayer HealthCare, Leverkusen, Germany). 6-OHDA (Sigma; 5 µg in 2 µL of 0.9% NaCl with 0.2 µg/IL ascorbic acid) was injected slowly (0.5 µL/min) into the right striatum (0.9 mm anterior and 1.8 mm lateral from bregma, 3.0 mm ventral from the dura). After the injection, the syringe was kept for additional 3 min in the brain, before it was slowly retracted. Controls were vehicle-injected (Carlsson et al., 2011).

#### *4.4 Behavioral assessment*

##### *4.4.1 Tail suspension test (TST)*

Antidepressant-like effect was measured using the tail suspension test (Steru et al., 1985), with minor alterations (Souza et al., 2013). Mice were suspended by their tail using adhesive tape placed approximately 1 cm from the tip of the tail and hung approximately 30 cm above the table. The animals were suspended for a period of 6 min, and the duration of immobility was scored manually during the last 4 min interval of the test (activity in the first 2 min was discarded because animals predominantly try

to escape during this period). Mice were considered immobile only when they hung passively.

#### *4.4.2 Morris water maze task*

The water maze task was performed in a circular swimming pool similar to that described by Morris et al. (1982). The pool was made of black painted fiberglass, 97cm in diameter and 60 cm in height. For the tests, the tank was filled with water maintained at  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ . The target platform ( $10\times 10\text{cm}^2$ ) was made of transparent Plexiglas and it was submerged 1-1.5cm beneath the surface of the water. Starting points for animals were marked on the outside of the pool as north (N), south (S), east (E) and west (W). Four distant visual cues ( $55\times 55\text{cm}^2$ ) were placed on the walls of the water maze room. They were all positioned with the lower edge 30cm above the upper edge of the water tank and in the standard setting, the position of each symbol marked the midpoint of the perimeter of a quadrant (circle $\frac{1}{4}$ NE quadrant, square $\frac{1}{4}$ SE quadrant, cross $\frac{1}{4}$ SW quadrant, and diamond $\frac{1}{4}$ NW quadrant). The apparatus was located in a room with in direct incandescent illumination. Mice were submitted to spatial reference memory version of the water maze using a protocol that was similar to one described previously (Prediger et al., 2007). The training session consisted of ten consecutive trials during which the animals were left in the tank facing the wall and then allowed to swim freely to the submerged platform. The platform was located in a constant position (middle of the southwest quadrant), equidistant from the center and the wall of the pool. If the animal did not find the platform during a period of 60 s, it was gently guided to it. The animal was allowed to remain on the platform for 10 s after escaping to it and was then removed from the tank for 20 s before being placed at the next starting point in the

tank. This procedure was repeated ten times, with the starting points (the axis of one imaginary quadrant) varying in a pseudo-randomized manner. The test session was carried out 24 h later and consisted of a single probe trial where the platform was removed from the pool and each mouse was allowed to swim for 60 s in the maze. The time spent in the correct quadrant (i.e. where the platform was located on the training session) was recorded and the percentage of the total time was analyzed.

#### *4.4.3 Open field test (OFT)*

The animals were submitted individually for a period of 5 minutes to an OFT (Insight model EP 154C) 24 hours after pretreatment. The parameters observed included: distance (unit: mm) and velocity (mm/s) (Prut and Belzung, 2003).

#### *2.4.4 Cylinder test*

We performed cylinder test for behavioral evaluation at 1, 2, 3 and 4 weeks after 6-OHDA injection. The cylinder test was used to assess the degree of forepaw asymmetry. Mice were placed in a transparent cylinder (diameter: 20 cm, height: 30 cm) for 3 min with the number of forepaw contacts to the cylinder wall counted (Schallert et al., 2000). The score of cylinder test in this study was calculated as a contralateral bias, that is, [(the number of contacts with the contralateral limb)–(the number of contacts with the ipsilateral limb)/ (the number of total contacts)×100] .

#### *4.5 Tissue preparation*

After behavioral tests, mice were euthanized with barbiturate overdose (pentobarbital sodium 150mg/kg; i.p. route). Striatum were removed and rapidly homogenized in 50mM Tris-Cl, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 2,400×g for 15 min at 4 °C and a low-speed supernatant fraction (S<sub>1</sub>) was used for assays.

#### *4.6 Biochemical Determinations*

##### *4.6.1 GSH levels*

**GSH Content** GSH content was determined fluorometrically using ortho-phthalaldehyde (OPA) as fluorophore (Hissin and Hilf 1976). S<sup>1</sup> (100 µl) was incubated with 100 µl of OPA (0.1 % in methanol) and 1.8 ml of 0.1 M phosphate buffer (pH 8.0) for 15 min at room temperature in dark. Fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at excitation wavelength of 350 nm and at emission wavelength of 420 nm. GSH levels were expressed as nmol/g of tissue.

##### *4.6.2 RS levels*

To determine RS levels, S<sub>1</sub> (fresh preparation) was diluted (1:10) in 50mM Tris-Hcl (pH 7.4) and incubated with 10 µl of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA; 1mM), at 37°C for 30 min. The RS levels were determined by a spectrofluorimetric method, using DCHF-DA assay, as described by Loetchutinat et al. (2005). The DCHF-DA is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases to form nonfluorescent DCFH, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in the presence of RS. DCF fluorescence intensity is proportional to the amount of RS that is formed. The DCF fluorescence intensity

emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium. The RS levels were expressed as arbitrary unit (AU).

#### 4.6.3 TRAP

The non-enzymatic antioxidant potential of the striatum was estimated by the total reactive *antioxidant* potential (TRAP) (Lissi et al., 1995). The reaction is initiated by adding luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, 4mM) – an external probe to monitoring radical production – and AAPH (2,2'-Azobis-2-methylpropionamide-dihydrochloride, 10mM) – a free radical source that produces peroxy radical at a constant rate – in glycine buffer (0.1M) pH 8.6 at room temperature, resulting in a steady luminescence emission (system counts). Chemiluminescence was read in a liquid scintillation counter (Agilent Care Elipse) as counts per minutes. Sample addition decreases the luminescence proportionately to its antioxidant potential. The luminescence emission was followed for 40 min after the addition of the sample (100g of protein) in a TRAP protocol, and the area under the curve (AUC) was quantified. In the TAR protocol results were expressed as percentage of radical production (system counts considered as 100% of radical production).

#### 4.6.4 SOD activity

SOD activity was determined in striatum according to the method described by (Misra and Fridovich, 1972). This method is based on the ability of SOD in inhibiting autoxidation of adrenaline to adrenochrome. Briefly, the supernatant fraction (20–60 µl) was added to a medium containing glycine buffer (50 mM; pH 10.5) and adrenaline (1 mM). The kinetic analysis of SOD was started after adrenaline addition, and the color

reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 30 °C, and results were expressed as Units (U)/mg of protein.

#### *4.6.5 CAT activity*

CAT activity in S<sub>1</sub> was assayed spectrophotometrically by the method proposed by Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of S<sub>1</sub> at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding S<sub>1</sub> and the substrate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 mM) in a medium containing 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required for monitoring the disappearance of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The enzymatic activity was expressed as Units (U)/mg protein (1U decomposes 1µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min at pH 7 at 25 °C).

#### *4.6.6 GR activity*

GR activity was determined spectrophotometrically as described by Calberg and Mannervick (1985). In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which was followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. An aliquot of S<sub>1</sub> was added in the system containing 0.15 M potassium phosphate buffer (Ph 7.0), 1.5 mM EDTA, 0.15 Mm NADPH. After the basal reading, the substrate (GSSG 20 mM) was added. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

#### *4.6.7 GPx activity*

GPx activity in S<sub>1</sub> was assayed spectrophotometrically by the method described by Wendel (1981), through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 340 nm. S<sub>1</sub> was added to the medium containing GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 mM). In this assay, the enzyme activity was indirectly measured by means of NADPH decay. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is reduced and generates GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase present in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

#### *4.6.8 GST activity*

GST activity was assayed through the conjugation of GSH with CDNB at 340 nm as described by Habig and Jakoby (1981). An aliquot of S<sub>1</sub> was added in a medium containing 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4). After that, 100 mM CDNB and GSH were added to the medium. CDNB was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

#### *4.6.9 DA, DOPAC and HVA levels*

Striatal tissues were homogenized with 300  $\mu$ L of 200 mM ice-cold perchloric acid containing 10 mM disodium EDTA. After centrifugation (10000 g for 10 min at 4 °C), the supernatant was filtered and then injected directly into an HPLC system (Shimadzu; Kyoto, Japan) with an electrochemical detector (ECD; Eicom, Kyoto, Japan). The appendant potential of the ECD (carbon electrode vs. Ag/AgCl reference electrode) was set at 700 mV. The analytic column was a TSKgel Super-ODS (4.6 mm I.D. 9 100 mm; Tosoh, Tokyo, Japan), and the mobile phase consisted of 0.1 M citrate-

sodium acetate buffer (pH 3.9) containing methanol (18%, v/v), disodium EDTA (4 mg/l), and sodium octanesulfonate (0.8 mM) (Ferraz et al., 2008).

#### *4.7 Protein determination*

Protein content was measured colorimetrically according to the method of Bradford (1976) and bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard.

#### *4.8 Statistical analysis*

Results were presented as means  $\pm$  S.E.M. Comparisons between experimental and control groups were performed by one-way (hesperidin or 6-OHDA = independent variable) or two-way ANOVA (6-OHDA  $\times$  hesperidin = independent variables) followed by Newman-Keuls test when appropriate. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant. All tests and plotting graphics were executed using the GraphPad prism 5 software (San Diego, CA, U.S.A.).

## **References**

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Meth. Enzymol.* 105, 121-126.
- Bharath, S., Hsu, M., Kaur, D., Rajagopalan, S., Andersen, J.K., 2002. Glutathione, iron and Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* 64, 1037-1048.



- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Branchi, I., D'Andrea, I., Armida, M., Cassano, T., Pèzzola, A., Potenza, R.L., Morgese, M.G., Popoli, P., Alleva, E., 2008. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. *J. Neurosci. Res.* 86, 2050-2061.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods. Enzymol.* 113, 484-490.
- Carlsson, T., Schindler, F.R., Höllerhage, M., Depboylu, C., Arias-Carrión, O., Schnurrbusch, S., Rösler, T.W., Wozny, W., Schwall, G.P., Groebe, K., Oertel, W.H., Brundin, P., Schrattenholz, A., Höglinger, G.U., 2011. Systemic administration of neuregulin-1 $\beta$ 1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 117, 1066-1074.
- Chaudhuri, K.R., Martinez-Martin, P., 2008. Quantitation of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* 2, 2-7.
- Chen, M., Gu, H., Ye, Y., Lin, B., Sun, L., Deng, W., Zhang, J., Liu, J., 2010. Protective effects of hesperidin against oxidative stress of tert-butyl hydroperoxide in human hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 48, 2980-2987.
- De Leonibus, E., Oliverio, A., Mele, A., 2005. A study on the role of the dorsal striatum and the nucleus accumbens in allocentric and egocentric spatial memory consolidation. *Learn. Mem.* 12, 491-503.

- Ferraz, A.C., Matheussi, F., Szawka, R.E., Rizelio, V., Delattre, A.M., Rigon, P., Hermel, E.E.S., Xavier, L.L., Achaval, M., Alselmo-Franci, J.A., 2008. Evaluation of estrogen neuroprotective effect on nigrostriatal dopaminergic neurons following 6-OHDA injection into the substantia nigra pars compacta or medial forebrain bundle. *Neurochem. Res.* 33, 1238-1246.
- Filho, C.B., Del Fabbro, L., Gomes, M.G., Goes, A.T.R., Souza, L.C., Boeira, S.P., Jesse, C.R., 2013. Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 698, 286-291.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J., Singla, A.D., 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.* 15, 655-669.
- Gaur, V., Kumar, A., 2010. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. *Pharmacol. Rep.* 62, 635-648.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77, 218-231.
- Haik, K.L., Shear, D.A., Hargrove, C., Patton, J., Mazei-Robison, M., Sandstrom, M.I., Dunbar, G.L., 2008. 7-nitroindazole attenuates 6-hydroxydopamine-induced spatial learning deficits and dopamine neuron loss in a presymptomatic animal model of Parkinson's disease. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 16, 178-189.
- Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685-716.

- Huang, S; Tsai, S; Lin, J; Wu, C; Yen, G., 2012. Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid  $\beta$ -induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 60–609.
- Jhoo, J.H., Kim, H.C., Nabeshima, T., Yamada, K., Shin, E.J., Jhoo, W.K., Kang, K.S., Jo, S.A., Woo, J.I., 2004. Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. *Behav. Brain Res.* 155, 185-196.
- Kääriäinen, T.M., Piltonen, M., Ossola, B., Kekki, H., Lehtonen, S., Nenonen, T., Lecklin, A., Raasmaja, A., Männistö, P.T., 2008. Lack of robust protective effect of quercetin in two types of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian models in rats and dopaminergic cell cultures. *Brain Res.* 1203, 149-159.
- Khan, M.M., Raza, S.S., Javed, H., Ahmad, A., Khan, A., Islam, F., Safhi, M.M., Islam, F., 2012. Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 22, 1-15.
- Lev, N., Barhum, Y., Ben-Zur, T., Melamed, E., Steiner, I., Offen, D., 2013. Knocking Out DJ-1 Attenuates Astrocytes Neuroprotection Against 6-Hydroxydopamine Toxicity. *J. Mol. Neurosci.* doi: 10.1007/s12031-013-9984-9.
- Li, S., Pu, X., 2011. Neuroprotective Effect of Kaempferol against a 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1291-1297.
- Li, R., Zheng, N., Liang, T., He, Q., Xu, L., 2013. Puerarin attenuates neuronal degeneration and blocks oxidative stress to elicit a neuroprotective effect on

substantia nigra injury in 6-OHDA-lesioned rats. *Brain Res.* doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.013.

Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, Del Castillo MD., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 153-161.

Liu, S; Li, X; Huo, Y., 2012. Protective effect of extract of *Acanthopanax senticosus* harms on dopaminergic neurons in Parkinson's disease mice. *Phytomedicine* 19, 631–638.

Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J., Mankhetkorn, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Rad. Phys. Chem.* 72, 323-331.

Luchtman, D.W., Meng, Q., Song, C. 2012. Ethyl-eicosapentaenoate (E-EPA) attenuates motor impairments and inflammation in the MPTP-probenecid mouse model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 226, 386-396.

Matheus, F.C., Aguiar, A.S., Jr., Castro, A.A., Villarinho, J.G., Ferreira, J., Figueiredo, C.P., Walz, R., Santos, A.R., Tasca, C.I., Prediger, R.D., 2012. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Behav. Brain Res.* 235, 263-272.

Menze, E.T., Tadros, M.G., Abdel-Tawab, A.M., Khalifa, A.E., 2012. Potential neuroprotective effects of hesperidin on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neurotoxicology* 33, 1265-1275.

- Misra, HP, Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681-683.
- Nilsson, F.M., Kessing, L.V., Bolwig, T.G., 2001. Increased risk of developing Parkinson's disease for patients with major affective disorder: a register study. *Acta Psychiatr. Scand.* 104, 380-386.
- Noyce, A.J., Bestwick, J.P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C.H., Giovannoni, G., Lees, A.J., Schrag, A., 2012. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 72, 893-901.
- Prediger, RD., Franco, JL., Pandolfo, P., Medeiros, R., Duarte, F.S., Di Giunta, G., Figueiredo, C.P., Farina, M., Calixto, J.B., Takahashi, R.N., Dafre, A.L., 2007. Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behav. Brain Res.* 177, 205-218.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 3-33.
- Raza, S.S., Khan, M.M., Ahmad, A., Ashafaq, M., Khuwaja, G., Tabassum, R., Javed, H., Siddiqui, M.S., Safhi, M.M., Islam, F., 2011. Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Res.* 1420, 93-105.

- Saint-Cyr, J.A., Taylor, A.E., Lang, A.E., 1988. Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. *Brain* 111, 941-959.
- Santiago, R.M., Barbieiro, J., Lima, M.M., Dombrowski, P.A., Andreatini, R., Vital, M.A., 2010. 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. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 1104-1118.
- Soto-Otero, R., Méndez-Alvarez, E., Hermida-Ameijeiras, A., Muñoz-Patiño, A.M., Labandeira-Garcia, J.L., 2000. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 74, 1605-1617.
- Souza, L.C., Gomes, M.G., Goes, A.T.R., Del Fabro, L., Filho, C.B., Boeira, S.P., Jesse, C.R., 2013. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry* 40, 103-109.
- Shuman, J.M., De Jager, P.L., Feany, M.B., 2011. Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 193-222.
- Schallert, T., Fleming, S.M., Leasure, J.L., Tillerson, J.L., Bland, S.T., 2000. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 39, 777-787.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., Simon, P., 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367-370.

Tadaiesky, M.T., Dombrowski, P.A., Da Cunha, C., Takahashi, R.N. 2010. Effects of SR141716A on Cognitive and Depression-Related Behavior in an Animal Model of Premotor Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 238491, 26-32.

Ungerstedt, U., 1968. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 5, 107-117.

Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 177, 325-333.

### **Legends of figures**

**Fig. 1.** Schematic representation of the experimental protocol with the treatment period with 6-OHDA and hesperidin.

**Fig.2.** Effect of hesperidin treatment (50 mg/kg, per day, p.o.) and stereotax surgery injection 6-OHDA on TST in aged mice. Values are mean  $\pm$  S.E.M. (n=10 per group). <sup>a</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/vehicle with sham/vehicle. <sup>c</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/Hesperidin with 6-OHDA/ Vehicle (two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).

**Fig.3.** Effect of hesperidin treatment (50 mg/kg, per day, p.o.) on the spatial learning and memory of mice evaluated in the Morris water maze task. Values are mean  $\pm$

S.E.M. (n=10 per group). Latency, in seconds, for escape to a submerged platform (3A), area under curve (AUC) of the latency (3B) and % time in the correct quadrant (3C). The probe test session to evaluate the % time in the correct quadrant was performed 24 h after the training trials. <sup>a</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/vehicle with sham/vehicle. <sup>c</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/Hesperidin with 6-OHDA/ Vehicle (two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test).



**Figure 1**

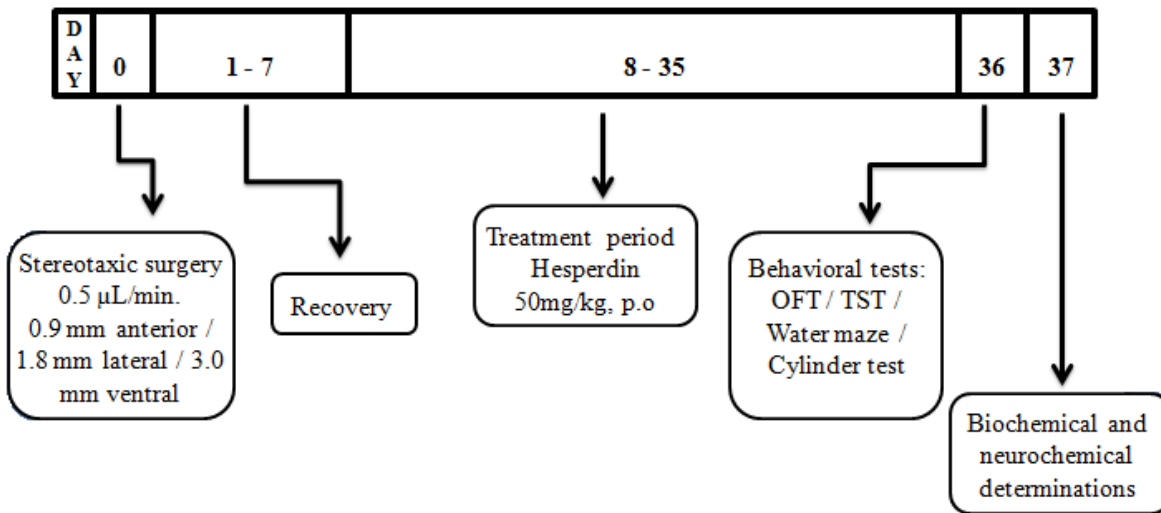
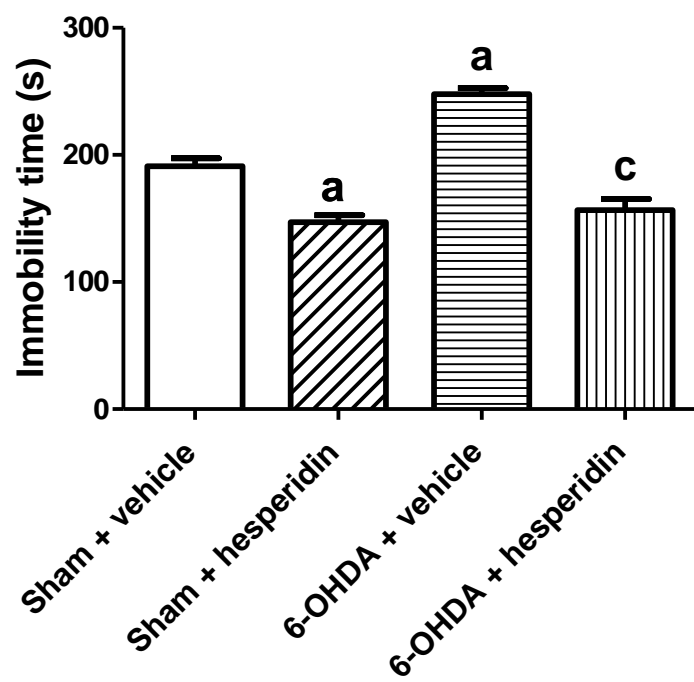
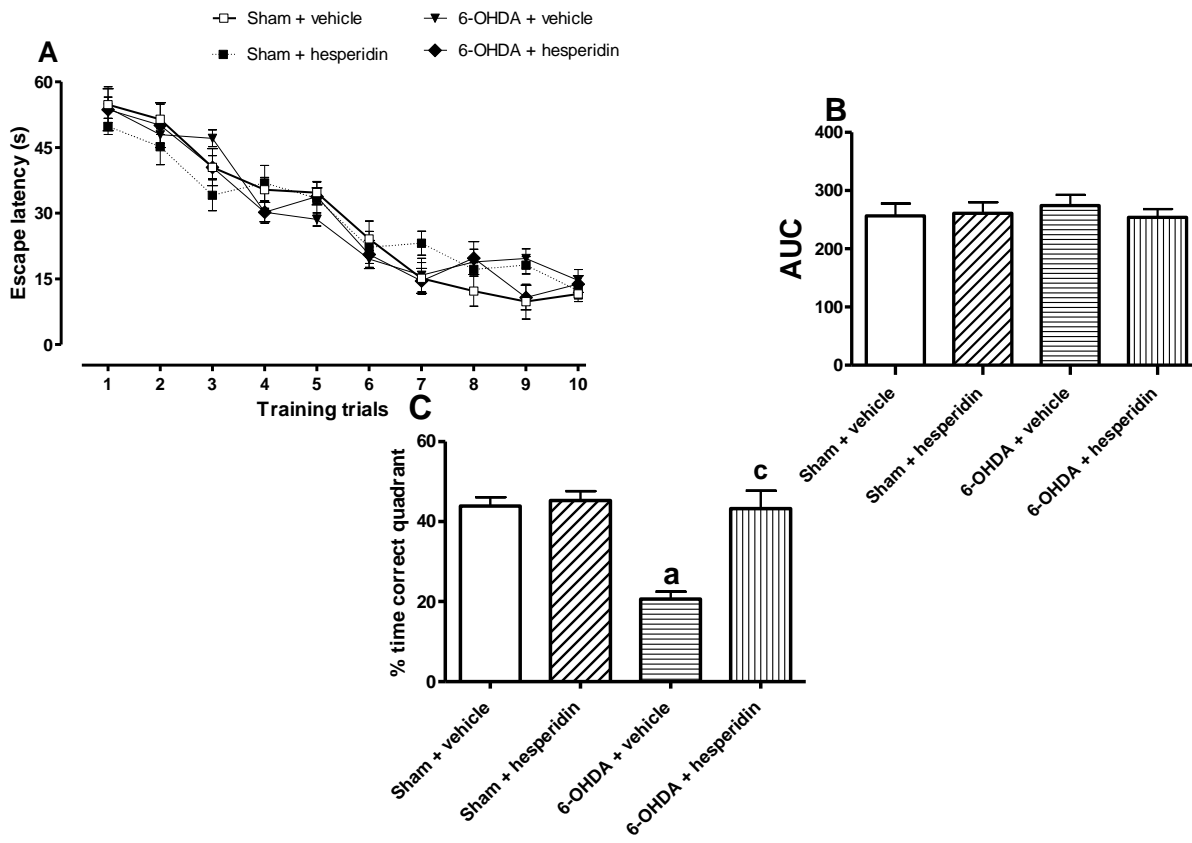


Figure 2



**Figure 3**



**Table 1.** Effect of hesperidin on GSH and RS levels and TRAP in striatum of mice injected with 6-OHDA

<b>Groups</b>	<b>GSH<sup>1</sup></b>	<b>RS<sup>2</sup></b>	<b>TRAP<sup>3</sup></b>
Sham/Vehicle	6.2 ± 0.6	12.8 ± 1.3	99.6 ± 2.9
Sham/Hesperidin	6.7 ± 0.8	9.0 ± 1.1	108.8 ± 6.0
6-OHDA/Vehicle	3.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	39.2 ± 5.7 <sup>a</sup>	62.4 ± 4.9 <sup>a</sup>
6-OHDA/Hesperidin	5.8 ± 0.6 <sup>c</sup>	19.6 ± 3.2 <sup>b</sup>	91.2 ± 3.7 <sup>c</sup>

The values were analyzed by two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test, each value is expressed as the mean ± SD (n = 10 mice/group). <sup>a</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/vehicle with sham/vehicle. <sup>b</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/Hesperidin with 6-OHDA/ Vehicle and sham/vehicle. <sup>c</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/Hesperidin with 6-OHDA/Vehicle. <sup>1</sup> GSH levels were expressed as mol/g of tissue. <sup>2</sup>The RS levels were expressed as arbitrary unit (AU). <sup>3</sup>Results were expressed as percentage of radical production.

**Table 2.** Effect of hesperidin on SOD, CAT, GR, GPx and GST activities in striatum of mice injected with 6-OHDA

Groups	SOD <sup>1</sup>	CAT <sup>2</sup>	GR <sup>3</sup>	GPx <sup>4</sup>	GST <sup>5</sup>
Sham/Vehicle	6.0 ± 0.4	0.25 ± 0.04	47.7 ± 2.78	44.9 ± 2.1	21.6 ± 4.7
Sham/Hesperidin	7.5 ± 0.6	0.27 ± 0.02	54.4 ± 2.26	47.5 ± 3.8	19.6 ± 1.5
6-OHDA/Vehicle	9.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>	76.6 ± 2.31 <sup>a</sup>	25.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	23.6 ± 1.6
6-OHDA/Hesperidin	10.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.22 ± 0.02 <sup>b</sup>	43.9 ± 2.55 <sup>c</sup>	46.9 ± 4.3 <sup>c</sup>	20.7 ± 1.2

The values were analyzed by two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test, each value is expressed as the mean ± SD (n = 10 mice/group). <sup>a</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/vehicle with sham/vehicle. <sup>b</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/Hesperidin with 6-OHDA/ Vehicle and sham/vehicle. <sup>c</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/Hesperidin with 6-OHDA/ Vehicle. <sup>1</sup> SOD activity are expressed as (U)/mg protein; <sup>2</sup> CAT activity are expressed as (U)/mg protein; <sup>3</sup> GR activity are expressed as nmol NADPH/min/mg protein; <sup>4</sup> GPx activity are expressed as nmol NADPH/min/mg protein; <sup>5</sup> GST activity are expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

**Table 3.** Effect of hesperidin on DA, DOPAC and HVA levels in striatum of mice injected with 6-OHDA

<b>Groups</b>	<b>DA<sup>1</sup></b>	<b>DOPAC<sup>2</sup></b>	<b>HVA<sup>3</sup></b>
Sham/Vehicle	726.6 ± 17.5	40.6 ± 2.1	71.0 ± 3.9
Sham/Hesperidin	715.5 ± 36.5	39.9 ± 1.2	72.8 ± 3.3
6-OHDA/Vehicle	360.0 ± 24.2 <sup>a</sup>	22.2 ± 1.9 <sup>a</sup>	40.6 ± 4.4 <sup>a</sup>
6-OHDA/Hesperidin	508.6 ± 40.7 <sup>b</sup>	29.8 ± 2.4 <sup>b</sup>	56.4 ± 2.8 <sup>b</sup>

The values were analyzed by two-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison test, each value is expressed as the mean ± SD (n = 10 mice/group). <sup>a</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/vehicle with sham/vehicle. <sup>b</sup> P<0.05 when compared 6-OHDA/Hesperidin with 6-OHDA/ Vehicle and sham/vehicle. <sup>1,2</sup> and <sup>3</sup> levels are expressed as ng/g wet weight of striatum.

### Parte III

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que a administração de 6-OHDA na dose de (4 µg em 2 µL de 0.9% NaCl com 0.2 µg/µL ácido ascórbico) pela via i.c.v provocou alterações nas enzimas antioxidantes, aumento do dano oxidativo e, conseqüentemente, uma diminuição nos níveis de DA estriatal e de seus metabolitos, DOPAC e HVA. Além disso, foram observadas alterações na memória e comportamento tipo depressivo nos camundongos submetidos à infusão da neurotoxina. Após a administração do flavonoide hesperidina (50mg/kg) *per oral* (p.o), durante 28 dias foi observado uma reversão dos danos oxidativos e enzimáticos causados pela 6-OHDA. Dessa forma, o tratamento com o flavonoide diminui o dano oxidativo, aumento os níveis de DA e seus metabolitos e reverte o prejuízo cognitivo e comportamento tipo depressivo causados pela injeção de 6-OHDA.

Os déficits na aprendizagem e na memória são características conhecidas na DP, pois os pacientes com esta doença são prejudicados na aquisição de vários tipos de memória processual que estão relacionado a alterações do corpo estriado (Packard e Knowlton, 2002). Considerando isto, a memória dos camundongos foi avaliada através do teste do labirinto aquático de Morris. O estudo demonstrou prejuízo na memória nos camundongos submetidos à infusão da neurotoxina em relação ao grupo sham/veículo. Essa diminuição da memória é evidenciada no teste pela diminuição no tempo no quadrante correto e aumento da latência para chegar ao local da plataforma, e esta se relaciona diretamente com a depleção da DA estriatal. Em conformidade com esse trabalho estudos feitos por Bonito-Oliva et al., 2013 através do teste de reconhecimento de objeto, também demonstraram que há alterações na memória causadas pela

diminuição da DA após infusão de 6-OHDA. O protocolo de tratamento com a hesperidina diminuiu os danos cognitivos causados pela 6-OHDA, mostrando que a hesperidina tem a capacidade de preservar as funções cognitivas nesse modelo de DP.

Alem do teste de memória foi realizado o teste de suspensão de cauda (TSC) para avaliar a ação da hesperidina em outro sintoma não motor da DP que é a depressão, levando em consideração que esta afeta 30-45% dos pacientes (Noyce et al., 2012). O TSC é utilizado para avaliar a eficácia de drogas antidepressivas, no qual o comportamento de imobilidade e conformidade diante da situação de estar suspenso através da cauda é interpretado como comportamento depressivo (Steru et al., 1985). Os resultados indicaram que a infusão da neurotoxina 6-OHDA foi capaz de produzir comportamento tipo depressivo como avaliado no TSC, onde se observou um aumento da imobilidade do grupo infundido pela neurotoxina em relação aos demais grupos, como já foi demonstrado por Tadaieski et al. (2008). A administração de hesperidina se mostrou eficaz em reverter esse dano, demonstrando ação tipo antidepressiva. Esses resultados sugerem que a depressão causada neste modelo de DP é atenuada pela administração de hesperidina. Estes resultados corroboram com os dados mostrados anteriormente por Souza et al., (2013) e Filho et al., (2013) que mostram o efeito antidepressivo da hesperidina em camundongos. A depressão é um sintoma relacionado com a diminuição do neurotransmissor DA causada pelo aumento do estresse oxidativo no estriado. Esse neurotransmissor é responsável pelas sensações de alegria e prazer e se encontra em baixos níveis na DP. Esse efeito antidepressivo proporcionado pela hesperidina é provavelmente modulado pelo aumento da DA e diminuição das ER conduzidos pela administração de hesperidina.

O teste de campo aberto (OFT) foi utilizado para verificar a atividade motora dos camundongos, porém não demonstrou nenhuma alteração significativa. Diante



disto, verificou-se que a hesperidina ou a 6-OHDA não provocam efeito sedativo/excitatório nos animais. Desta forma, os resultados anteriormente citados em testes de memória e de depressão não são influenciados pela atividade locomotora alterada.

Há cada vez mais evidências indicando que o estresse oxidativo pode contribuir para diversas patologias do SNCpc incluindo a DP (Halliwell, 2001, Lotharius e Brundin, 2002; Jenner, 2003). As espécies reativas (ER) são normalmente produzidas no cérebro, mas o aumento dessa produção, devido a algum desequilíbrio pode conduzir a extensos danos celulares com o aumento dos radicais nocivos ao organismo e uma diminuição da capacidade antioxidante, tendo como consequência a morte celular.

Desta forma quantidades excessivas de ER estão envolvidas nos danos neuronais no SNC nas doenças neurodegenerativas. As ER diminuem a sobrevivência neuronal pela sua capacidade de propagar o ataque inicial sobre as membranas ricas em lípidos do cérebro e causar a peroxidação lipídica. Esse dano oxidativo é maior nos neurônios porque estas estruturas possuem baixos níveis de defesas antioxidantes quando comparado a tecidos periféricos como o hepático e o renal (Dringen, 2000).

No presente estudo, os resultados demonstram que após trinta e sete dias da infusão da 6-OHDA, os níveis de ER estavam significativamente aumentados no estriado, evidenciado pelo aumento dos níveis de RS e da diminuição do TRAP. Inúmeros estudos reportam que a 6-OHDA aumenta os níveis de ER, e que este é um mecanismo de neurotoxicidade (Bové & Perier, 2012; Tobón-Velasco et al., 2013; Wei et al., 2013). O tratamento com hesperidina por 28 dias diminuiu os níveis de ER em relação ao grupo 6-OHDA/veículo, o que esta de acordo com outros estudos que utilizaram esse flavonoide em diferentes modelos de neurodegeneração (Huang et al., 2012; Menze et al., 2012). Dessa forma, o tratamento com o flavonoide hesperidina

atuou como defesa antioxidante diminuindo os danos oxidativos neste modelo de DP, o que corrobora a participação do flavonoide hesperidina em diminuir a oxidação de macromoléculas no SNCpc preservando dos danos causados pela doença.

Os níveis de GSH são uma medida que demonstra o estado oxidativo da célula. Por exemplo, uma redução nos níveis de GSH caracteriza um possível aumento do estresse oxidativo, indicando que possivelmente há um aumento de ER (Maciel et al., 2001). A GSH é o principal antioxidante tiol não-protéico em células de mamíferos, sendo considerado o principal tampão redox intracelular (Schafer & Buettner, 2001). A homeostase do estado redox cerebral é mantida principalmente pela função *scavenger* de radicais livres da GSH, sendo a primeira linha de defesa contra os radicais livres,  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$  produzidos nas células (Zhang et al., 2012). Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com Ridet et al., (2006) e Khan et al., (2012) que reportaram que a 6-OHDA causa depleção nos níveis de GSH estriatal. Demonstrando que hesperidina pode restaurar os níveis de GSH no estriado de camundongos infundidos por essa toxina. Assim, o tratamento com a hesperidina mantém os níveis de GSH elevados, o que contribui para a diminuição dos danos oxidativos causados pelas ER.

Os resultados desse trabalho demonstram que o tratamento com hesperidina aumentou a atividade das enzimas GPx e CAT em relação a inibição causada pela infusão de 6-OHDA no estriado de camundongos. A enzima GPx desempenha um papel predominante na remoção de excesso de ER e é um sistema de defesa importante contra o estresse oxidativo no cérebro, essa enzima tem afinidade principalmente pelo  $H_2O_2$  (Imam & Ali, 2000). A CAT é uma enzima que também age no  $H_2O_2$ , mas com menor afinidade quando comparado com a GPx (Sies, 1986). Os resultados demonstraram que a administração oral de hesperidina (50 mg/kg/dia, p.o.) durante 4 semanas reverteu completamente a inibição da atividade da GPx e parcialmente a atividade de CAT. A

GPx é a principal enzima protetora envolvida nos danos oxidativos causados pela 6-OHDA (Bensadoun et al., 1998). A recuperação da atividade dessas enzimas confere uma maior ação antioxidante, resultando assim na diminuição das ER e seus radicais nocivos. A restauração da atividade das enzimas antioxidantes reduzem o estresse oxidativo e a consequente morte celular, uma vez que o estresse oxidativo é um fator intimamente relacionado com a DP.

Em contraste, nosso estudo demonstrou que a atividade da GR e SOD encontram-se aumentadas no estriado de camundongos infundidos por 6-OHDA em comparação ao grupo sham/veículo. A atividade da GR é essencial na manutenção da GSH na sua forma reduzida, e a inibição dessa enzima cria um desequilíbrio na taxa GSH/GSSG (Meister & Anderson, 1983; Stamler, 1994). Essa enzima tem atividade elevada no grupo 6-OHDA quando comparada ao grupo sham/veículo.

A enzima SOD é a primeira defesa celular responsável por converter  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ . É responsável pela detoxificação do  $O_2^{\bullet-}$  através de reação de dismutação, sendo encontrada principalmente em duas isoformas: mitocondrial (MnSOD) e citosólica (CuZnSOD) (Halliwell e Gutteridge, 1999). E devido ao dano oxidativo causado pela 6-OHDA, a enzima SOD possui atividade elevada quando comparado ao sham/veículo.

O aumento da atividade das enzimas GR e SOD podem estar relacionadas com mecanismo de defesa devido ao alto estresse oxidativo gerado neste modelo de DP, o que já foi demonstrado por Prediger et al. (2007) em outra doença neurodegenerativa, onde o sistema dessas enzimas podem ser ativados em resposta ao estresse oxidativo no cérebro. Sugerimos que este é provavelmente é o mesmo mecanismo que ocorre nesse estudo. O aumento das atividades de SOD e GR sugere um mecanismo adaptativo para compensar o aumento dos níveis das ER e da diminuição dos níveis de GSH.

Nosso protocolo de tratamento com hesperidina durante 4 semanas preveniu o aumento da atividade da enzima GR. Dessa maneira pode-se concluir que ocorreu uma diminuição das ER no estriado do grupo tratado com hesperidina, uma vez que o aumento da atividade dessas enzimas no grupo 6-OHDA/veículo em relação ao grupo sham/veículo sugere um mecanismo compensatório visando o grande aumento de ER. Porém, a hesperidina não mostrou eficácia em reverter o aumento da atividade da SOD, indicando que esta enzima não participa do efeito protetor evidenciado neste estudo.

Além das defesas enzimáticas, existem também as defesas não enzimáticas que incluem tocoferol, ascorbato,  $\beta$  caroteno, entre outros. Neste trabalho, houve a mensuração da capacidade antioxidante não enzimática, dada pelo TRAP, onde o tratamento com a hesperidina demonstrou ação antioxidante aumentando nos níveis de TRAP no grupo tratado em relação ao grupo 6-OHDA. Esses resultados vão ao encontro ao estudo feito anteriormente por Lopes et al., (2012) que mediu o TRAP na DP induzida por 6-OHDA tratada com diferentes organoselênios em um modelo *in vitro*. O tratamento com a hesperidina demonstrou capacidade de restauração do TRAP, o que proporciona uma redução dos danos oxidativos causados pelas ER. Dessa forma, sugerimos que a hesperidina possui propriedades protetoras na DP induzida por 6-OHDA por modular a capacidade antioxidante do estriado cerebral.

A DP é caracterizada principalmente pela depleção de DA estriatal (Srivastava et al., 2011). Nosso trabalho mostrou que a infusão da 6-OHDA no estriado de camundongos diminui os níveis de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA, conforme Khan et al., (2012). O tratamento com a hesperidina restaurou os níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado de camundongos. Os níveis aumentados de DA, após tratamento com a hesperidina é provavelmente devido ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes e à diminuição do ER, sugerindo uma diminuição da oxidação de DA

estriatal. A atividade enzimática interfere na preservação da DA e esta relaciona-se diretamente com os efeitos cognitivos e comportamentais. Assim o tratamento com a hesperidina se mostra eficaz contra a diminuição da DA estriatal. Esses resultados corroboram com outros estudos que utilizaram flavonoides para reverter danos causados por diferentes modelos de indução de DP, sendo esses efeitos atribuídos ao potencial antiinflamatório e antioxidante desses compostos (De Rijk, et al., 1997; Li & Pu 2011; Khan et al., 2013). Os flavonoides demonstraram em estudos *in vivo* ações prevesntivas frente a depleção de DA no estriado em modelos animais, bem como na perda de neurônios dopaminérgicos da substância negra induzida por neurotoxinas indutoras da doença (Levites, et al., 2001; Testai et al., 2013). O efeito protetor da hesperidina também foi confirmado em testes comportamentais de memória e de depressão, mostrando que os grupos tratados com hesperidina tiveram melhor desempenho nesses testes em relação ao grupo não tratado. Assim, a diminuição da DA está diretamente relacionada com as alterações cognitivas, e que a manutenção desta depende intimamente do equilíbrio oxidativo entre atividade antioxidante e as ER. Os resultados desse estudo estão de acordo com os relatos anteriores em que a diminuição dos níveis de DA e os prejuízos na memória e na depressão em modelos da DP induzida em roedores foram atenuados pela suplementação com flavonoides (Li & Pu, 2001; Khan et al., 2013).

De acordo com estudos recentes, a ação da hesperidina nas doenças neurodegenerativas deve-se ao envolvimento do mecanismo do óxido nítrico como proposto por Kumar & Kumar, 2010 em um modelo animal de doença de Huntington. Eles demonstram que o pré-tratamento com L-arginina com uma dose menor que a de hesperidina não permitiu o efeito protetor desse flavonoide, enquanto que o pré-tratamento com L-NAME em uma dose menor que a de hesperidina potencializou

significativamente os efeitos protetores da hesperidina. Estes experimentos sugerem o envolvimento do óxido nítrico no efeito protetor da hesperidina (Gaur & Kumar, 2010;. Menze et al, 2012). Assim, um mecanismo a ser estudado em nosso laboratório é o envolvimento do oxido nítrico nas propriedades farmacológicas da hesperidina.

Os resultados sugerem que a hesperidina diminuiu as ER por modular a atividade das enzimas antioxidantes GPx, CAT e GR e aumentar os níveis de GSH e TRAP. Vale lembrar que a restauração das defesas antioxidantes conduz a preservação da DA estriatal e esta se relaciona diretamente com os sintomas motores e não motores da DP. Assim a administração de hesperidina por vinte e oito dias protegeu o estriado contra o estresse oxidativo induzido por 6-OHDA em camundongos. Além disso, o tratamento com hesperidina demonstrou capacidade de restaurar os níveis de DA e seus metabólitos DOPAC e HVA no estriado e proteger contra alterações na memória e comportamento tipo depressivo. Dessa forma, hesperidina poderia ser usado como terapia estratégica no tratamento da DP.

## CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento com hesperidina (50mg/kg) *per oral*, durante 28 dias foi efetivo em atenuar os seguintes danos provocados pela infusão i.c.v. da neurotoxina 6-OHDA em camundongos com dezoito meses da linhagem C57B/6J:

- Prejuízo na cognição demonstrado pelo teste do labirinto aquático de Morris.
- O comportamento tipo depressivo demonstrado pelo teste de suspensão de cauda.
- Aumento dos níveis de RS no estriado.
- Diminuição do TRAP e GSH no estriado.
- Inibição da atividade da GPx e CAT e o aumento da atividade da GR no estriado.
- Diminuição dos níveis de DA, DOPAC e HVA no estriado.

Os resultados sugerem que o tratamento com hesperidina pode atenuar o declínio cognitivo, o estresse oxidativo e os níveis de DA e seus metabólitos no estriado, induzidos pela 6-OHDA em camundongos.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR JUNIOR, A.S. (2011) O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discenesias induzidas por L-DOPA: evidencia obtida em modelos experimentais/ Aderbal Silva Aguir Junior; orientador, Rui Daniel Schöder Prediger. UFSC, tese doutorado – Florianópolis, SC.
- AHMAD, M.; SALEEM, S.; AHMAD, A.S; YOUSUF, S; ANSARI, M.A; KHAN, M.B; ISHRAT, T; CHATURVEDI, R.K; AGRAWAL, A.K; ISLAM, F. (2005) Ginkgo biloba affords dose-dependent protection against 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats: neurobehavioural, neurochemical and immunohistochemical evidences. **J. Neurochem.**, 93: 94–104.
- ALAM, Z.I; DANIEL, S.E; LEES, A.J; MARSDEN, D.C; JENNER, P; HALLIWELL, B. (1997) A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. **J. Neurochem.**, 69: 1326-1329.
- AMEER, B; WEINTRAUB, R.A; JOHNSON, J.V; YOST, R.A; ROUSEFF, R.L. (1996) Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. **Clin. Pharmacol. Ther.**, 60: 34-40
- ANDREW, R; WATSON, D.G; BEST, S.A; MIDGLE, J.M; WENLONG, H; PETTY, R.K. (1993) The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls. **Neurochem. Res.**, 18: 1175–1177.
- BAINBRIDGE, J.L; PAGE, R.L; RUSCIN, J.M. (2008) Elucidating the mechanism of action and potential interactions of MAO-B inhibitors. **Neurol. Clin.**, 26:85-96.
- BARNHAM, K.J; MASTERS, C.L; BUSH, A.I. (2004) Neurodegenerative diseases and oxidatives stress. **Nat. Rev. Drug Discov.**, 3: 205–214.



BASTIANETTO, S. (2002) Red wine consumption and brain aging. **Nutrition**, 18: 432–433.

BENSADOUM, J.C; MIROCHNITCHENKO, O; INOUYE, M; AEBISCHER, P; ZURN, A.D. (1998) Attenuation of 6-OHDA-induced neurotoxicity in glutathione peroxidase transgenic mice. **Eur. J. Neurosci.**, 10: 3231-3237.

BETARBET, R; SHERER, T.B; MACKENZIE, G; GARCIA-OSUNA, M; PANOV, A.V; GREENAMYRE, J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nat. Neurosci.**, 3: 1301–1306.

BONITO-OLIVA, A; PIGNATELLI, M; SPIGOLON, G; YOSHITAKE, T; SEILER, S; LONGO, F; PICCININ, S; KEHR, J; MERCURI, N.B; NISTICO, R; FISONE, G. (2013) Cognitive Impairment and Dentate Gyrus Synaptic Dysfunction in Experimental Parkinsonism. **Biol. Psychiatry**, doi: 10.1016/j.biopsych.2013.02.015.

BOVÉ, J; PERIER, C. (2012) Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 211: 51-76.

BORRADAILE, N.M; CARROLL, K.K; KUROWSKA, E.M. (1999) Regulation of HepG2 cell apolipoprotein B metabolism by the citrus flavanones hesperedin and naringenin. **Lipids**, 34: 591-598.

BLESA, J; PHANI, S.; JACKSON-LEWIS, V; PRZEDBORSKI, S. (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. **J. Biome and Biotech**, 2012:845618. doi: 10.1155/2012/845618.

BLUM, D; TORCH, S; LAMBENG, N; NISSOU, M; BENABID, A.L; SADOUL, R; VERNA, J.M. (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease, **Prog. Neurobiol.**, 65: 135–172.

BRAAK, E; SANDMANN-KEIL, D; RÜB, U; DEL TREDICI, K; DE VOS, R. A. (2001) Alpha-Synuclein immunopositive Parkinson's disease-related inclusion bodies in lower brain stem nuclei. **Acta. Neuropathol.**, 101: 195–201.

BRAAK, H; DEL, T.K; BRATZKE, H; HAMM-CLEMENT, J; SANDMANN-KEIL, D; RÜB, U. (2002) Staging of the intracerebral inclusion body pathology associated with idiopathic Parkinson's disease (preclinical and clinical stages). **J. Neurol.**, 249: III/1-III/5.

BRAAK, H; DEL, T.K.; RUB, U; DE VOS, R.A; JANSEN STEUR, E.N; BRAAK, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiol. Aging**, 24: 197–211.

BRAAK, H; GHEBREMEDHIN, E; RUB, U; BRATZKE, H; DEL, T.K. (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res.**, 318: 121–134.

BRAUNGART, E; GERLACH, M; RIEDER, P; BAUMEISTER, R; HOENER, M.C. (2004) Caenorhabditis elegans MPP<sup>+</sup> Model of Parkinson's Disease for High-Throughput Drug Screenings. **Neurodegenerative Dis.**, 1: 175–183.

BROTCHIE, J; FITZER-ATTAS, C. (2009) Mechanisms compensating for dopamine loss in early Parkinson disease. **Neurology**, 72: 32-38.

CAUDLE, W.M; COLEBROOKE, R.E; EMSON, P.C; MILLER, G.W. (2008) Altered vesicular dopamine storage in Parkinson's disease: a premature demise. **Trends Neurosci.**, 31: 303–308.

CERUTTI, P.A. (1994). Oxy-radicals and cancer. **Lancet**. 334: 862–865.

COMPORTI, M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. **Chem. Biol. Interact.**, 72: 51-6.

COTELLE, N; BERNIER, J.L; CATTEAU, J.P; POMMERY, J; WALLER, J.C; GAYDOU, E.M. (1996) Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radic. Biol. Med.**, 20: 35–43.

CURTIUS, H.C; WOLFENSBERGER, M; STEINMANN, B; REDWEIK, U; SIEGFRIED, J. (1974) Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus. **J. Chromatogr.**, 99: 529–540.

CHAUDHURI, K.R; HEALY, D.G; SCHAPIRA, A.H. (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet. Neurol.**, 5: 235–245.

CHARTIER-HARLIN, M.C. et al. (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. **Lancet.**, 364: 1167–1169.

CHOI, W.S; YOON, S.Y; OH, T.H; CHOI, E.J; O'MALLEY, K.L; OH, Y.J. (1999) Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine-and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. **J. Neurosci. Res.**, 57: 86-94.

CHOI, D.U; LEE, Y.J; HONG, J.T; LEE, H.J. (2012) Antioxidant properties of natural polyphenols and their therapeutic potentials for Alzheimer's disease. **Brain Res. Bull.**, 87: 144–153.

CHEN, C; YIN, M; HSU, C; LIU, T. (2007) Antioxidative and anti-inflammatory effects of four cysteine-containing agents in striatum of MPTP-treated mice. **Nutrition**, 23: 589–597.

DAJAS, F; ANDRES, A.C; FLORENCIA, A; CAROLINA, E; FELICIA, R.M. (2013) Neuroprotective actions of flavones and flavonols: mechanisms and relationship to flavonoid structural features. **Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.**, 13: 30-35.

DAY, B.J; PATEL, M; CALAVETTA, L; CHANG, L.Y; STAMLER, J.S. (1999) A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, 96:12760-12765.

DEAS, E; PLUN-FAUREAU, H; WOOD, N.W. (2009) PINK1 function in health and disease. **EMBO Mol. Med.**, 1: 152–165.

DE RIJK, M.C; BRETELER, M.M.B; DEN BREEIJEN, J.H. et al. (1997) Dietary antioxidants and Parkinson disease: the Rotterdam Study. **Arch. Neurol.**, 54: 762–765

DEXTER, D.T; CARTER, C.J; WELLS, F.R; JAVOY-AGID, Y; LEES, A; JENNER, P. MARSDEN, C.D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, 52:381–389.

DICKSON, D.W; BRAAK, H; DUDA, J.E; DUYCKAERTS, C; GASSER, T; HALLIDAY, G.M. HARDY, J; LEVERENZ, J.B; DEL TREDICI, K; WSZOLEK, Z.K; LITVAN, I. (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. **Lancet. Neurol.**, 8: 1150–1157.

DIMPFEL, W. (2006) Different anticonvulsive effects of hesperidin and its aglycone hesperetin on electrical activity in the rat hippocampus in-vitro. **J. Pharm. Pharmacol.**, 58: 375– 379.

DODSON, M.W; GUO, M. (2007) Pink1, Parkin, DJ-1 and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Curr. Opin. Neurobiol.**, 17: 331–337.

DUNNING, C.J; REYES, J.F; STEINER, J.A; BRUNDIN, P. (2012) Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? **Prog. Neurobiol.**, 97: 205–219.

DRECHSEL, D.A; PATEL, M. (2008) Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents 3 implicated in Parkinson's disease. **Free Radic. Biol. Med.**, 44: 1873-1886.

DRINGEN, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. **Prog. Neurobiol.**, 62:649–671.

FEI, Q; McCORMACK, A.L; DiMONTE, D.A; ETHELL, D.W. (2008) Paraquat neurotoxicity is mediated by a Bak-dependent mechanism. **J. Biol. Chem.**, 283: 3357–3364.

FARRER, M.J. (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. **Nat. Rev. Genet.**, 7: 306–318.

FERRANTE, R.J; SCHULZ, J.B; KOWALL, N.W; BEAL, M.F. (1997) Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. **Brain Res.**, 753: 157–162.

FILHO, C.B; DEL FABBRO, L; GOMES, M.G; GOES, A.T.R; SOUZA, L.C; BOEIRA, S.P; JESSE, C.R. (2013) Kappa-opioid receptors mediate the antidepressant-like activity of hesperidin in the mouse forced swimming test. **Eur. J. Pharmacol.**, 698: 286–291.

FLOOR, E; WETZEL, M.G. (1998) Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. **J. Neurochem.**, 70: 268–275.

FUJIKAWA, T; MIGUCHI, S; KANADA, N; NAKAI, N; OGATA, M; SUZUKI, I; NAKASHIMA, K. (2005) *Acanthopanax senticosus* Harms as a prophylactic for MPTP-induced Parkinson's disease in rats. **J. Ethnopharmacol.**, 97: 375–381.

GALATI, E.M; MONFORTE, M.T; KIRJAVAINEN, S; FORESTIERI, A.M; TROVATO, A; TRIPODO, M.M. (1994) Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid (Note I), anti-inflammatory and analgesic activity. **Farmaco**, 40: 709-12.

- GAUR, V; KUMAR, A. (2010) Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. **Pharmacol. Rep.**, 62: 635-648.
- GIBB, W.R. (1992) Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. **Neurol. Clin.**, 10: 361-437.
- GRAHAM, J.D; LEWIS, M.J; WILLIAMS, J. (1974) Proceedings: The effect of delta-1-tetrahydrocannabinol on the noradrenaline and dopamine content of the brain and heart of the rat. **Br. J. Pharmacol.** 52: 446p.
- GRANT, H; LANTOS, P.L; PARKINSON, C. (1980) Cerebral damage in paraquat poisoning. **Histopathology**, 4: 185–195.
- GREENAMYRE, J.T; SHERER, T.B; BETARBET, R; PANOV, A.V. (2001) Complexo I and Parkinson's disease. **IUBMB Life**, 52:135–141.
- GREENAMYRE, J.T; HASTINGS, T.G. (2004) Parkinson's—divergent causes, convergent mechanisms. **Science**, 304: 1120–1122.
- HALLER, C., HIZOH, I. (2004) The cytotoxicity of iodinated radio contrast agents on renal cells in vitro. **Invest Radiol.**, 39:149–154.
- HALLYDAY, G.M; McCANN, H. (2010) The progression of pathology in Parkinson's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1184: 188–195.
- HALLIWELL, B. (1994) Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutr. Rev.**, 52: 253-265.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. (1999). Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press*. 3<sup>a</sup>. Ed.
- HALLIWELL, B. (2001) Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, 18: 685–716.

HRITCU, L; FOYET, H.S; STEFAN, M; MIHASAN, M; ASONGALEM, A.E; KAMTCHOUING, P. (2011) Neuroprotective effect of the methanolic extract of *Hibiscus asper* leaves in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **J. Ethnopharmacol.**, 137: 585–591.

HU, X; WENG, Z; CHU, C.T; ZHANG, L; CAO, G; GAO, Y; SIGNORE, A; ZHU, J; HASTINGS, T; GREENAMYRE, J. T; CHEN, J. (2011) Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade. **J. Neurosci.**, 3: 247–261.

HUANG, S; TSAI, S; LIN, J; WU, C; YEN, G. (2012) Cytoprotective effects of hesperetin and hesperidin against amyloid  $\beta$ -induced impairment of glucose transport through downregulation of neuronal autophagy. **Mol. Nutr. Food Res.**, 56: 601–609.

HWANG, S.L; YEN, G.C. (2008) Neuroprotective effects of the citrus Flavanones against  $H_2O_2$ -induced cytotoxicity in PC12 cells. **J. Agric. Food Chem.**, 56: 859–864.

IMAM, S.Z; ALI, S. F. (2000) Selenium, an antioxidant, attenuates methamphetamine-induced dopaminergic toxicity and peroxynitrite generation. **Brain Res.**, 855:186–191.

ISHRAT, T; PARVEEN, K; KHAN, M.M; KHUWAJ, G; KHAN, M.B. YOUSUF, S; AHMAD, A; SHIVASTAV, P; ISLAM, F. (2009) Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Brain Res.**, 1281:117–127.

JACKSON-LEWIS, V; BLESA, J; PRZEDBORSKI, S. (2012) Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, 18: 183-188.

JENNER, P. (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. **Ann. Neurol.**, 53: S26–S36.

JHOO, J.H; KIM, H.C; NABESHIMA, T; YAMADA, K; SHIN, E,J; JHOO, W.K; KANG, K.S; JO, S.A; WOO, J.I. (2004) Beta-amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. **Behav. Brain Res.**, 155: 185-196.

KHAN, M.M; RAZA, S.S; JAVED, H; AHMAD, A; KHAN, A; ISLAM, F; SAFHI, M.M; ISLAM, F. (2012) Rutin protects dopaminergic neurons from oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurotox. Res.**, 22:1-15.

KITAMURA, Y; KAKIMURA, J; TANIGUCHI, T. (1998) Protective effect of talipexole on MPTP-treated planarian, a unique parkinsonian worm model. **Jpn J. Pharmacol.**, 78: 23–29.

KOPIN, I.J. (1987) MPTP: an industrial chemical and contaminant of illicit narcotics stimulates a new era in research on Parkinson's disease. **Environ Health Perspect.**, 75: 45–51.

LANGSTON, J.W; IRWIN, I. (1986) MPTP: current concepts and controversies. **Clin. Neuropharmacol.**, 9: 485–507.

LANGSTON, J.W; FORNO, L.S; TETRUD, J; REEVES, A.G; KAPLAN, J.A; KARLUK, D. (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Ann. Neurol.**, 46: 598–605.

LANGSTON, J. W. (2006) The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Ann. Neurol.**, 59: 591–596.

LESAGE, S; BRICE, A. (2012) Role of Mendelian genes in “sporadic” Parkinson’s disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, 18: 66–70.

LEV, N; MELAMED, E; OFFEN, D. (2003) Apoptosis and Parkinson’s disease. **Prog. Neuropsychopharmacol.**, 27: 245-250.



- LEVITES, Y; WEINREB, O; MAOR, G.J; YODIM, M.B; MANDEL, S. (2001) Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. **Neurochem.**, 78: 1073–1082.
- LI, S; PU, X. (2011) Neuroprotective Effect of Kaempferol against a 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. **Biol. Pharm. Bull.**, 34: 1291-1297.
- LIOCHEV, S.I; FRIDOVICH, I. (1999). Superoxide and iron: partners in crime. **IUBMB Life.** 48: 157–161.
- LIU, S; LI, X; HUO, Y. (2012) Protective effect of extract of *Acanthopanax senticosus* harms on dopaminergic neurons in Parkinson's disease mice. **Phytomedicine**, 19: 631–638.
- LOPES, F.M; LONDERO, G.F; DE MEDEIROS, L.M; DA MOTTA, L.L; BEHR, G.A; DE OLIVEIRA PORCIÚNCULA, L; DA ROCHA, J.B; KLAMT, F. (2012) Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. **Neurotox. Res.**, 22:138-149.
- LOTHARIUS, J; BRUNDIN, P. (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nat. Rev. Neurosci.**, 3: 932–942.
- LUTHMAN, J; FREDRIKSSON, A; SUNDSTRÖM, E; JONSSON, G; ARCHER, T. (1989) Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. **Behav. Brain Res.**, 33: 267–277.

MACIEL, E.N; VERCESI, A.E; CASTILHO, R.F. (2001) Oxidative stress in Ca<sup>2+</sup>-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. **J. Neurochem.**, 79: 1237–1245.

MANACH, C; WILLIAMSON, G; MORAND, C; SCALBERT, A; RÉMÉSY, C. (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, 81: 230–242.

MANTHEY, J.A; GUTHRIE, N; GROHMANN, K. (2001) Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr. Med. Chem.**, 8: 135–153.

MARDER, M; VIOLA, H; WASOWSKI, C; FERNÁNDEZ, S; MEDINA, J.; PALADINI, A.C. (2003) 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 75: 537– 545.

MARKS, D.B; MARKS, A.D; SMITH, C.M. (1996). Oxygen metabolism and toxicity. In: Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach. Baltimore: Williams and Wilkins. 327–367.

MEISTER, A; ANDERSON, M.E. (1983) Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.** 52: 711–771.

MENZE, E.T; TADROS, M.G; ABDEL-TAWAB, A.M; KHALIFA, A.E. (2012) Potential neuroprotective effects of hesperidin on 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity in rats. **NeuroToxicology**, 33: 1265–1275.

MÜLLER, T; MUHLACK, S. (2011) Cysteinyl-glycine reduction as marker for levodopa-induced oxidative stress in Parkinson's disease patients. **Mov. Disord.**, 26: 543–546.

MCCORMACK, A.L; THIRUCHELVAM, M; MANNING-BOG, A.B; THIFFAUL, C; LANGSTON, J.W; CORY-SLECHTA, D.A; DI MONTE, D.A. (2002) Environmental

risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. **Neurobiol. Dis.**, 10: 119–127.

McGEER, P.L; McGEER, E.G. (2004) Inflammation and the degenerative diseases of aging. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1035: 104–120.

NANDHAGOPAL, R; KURAMOTO, L; SCHULZER, M; MAK, E; CRAGG, J; LEE, C.S; McKENZIE, J; McCORMICK, S; SAMII, A; TROIANO, A; RUTH, T.J; SOSSI, V; DE LA FUENTE-FERNANDEZ, R; CALNE, D.B; STOESSL, A.J. (2009) Longitudinal progression of sporadic Parkinson's disease: a multi-tracer positron emission tomography study. **Brain**, 132: 2970–2979.

NICHOLS, W. C; PANKRATZ, N; MAREK, B.S; PAUCIULO, M.W; ELSAESSER, V.E; HALTER, C.A; RUDOLPH, A; WOJCIESZEK, J; PFEIFFER, R.F; FOROUD, T. (2009) Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. **Neurology**, 72: 310–316.

NONES, J; SPOHR, T.C.L.S; GOMES, F.C.A. (2011) Hesperidin, a Flavone Glycoside, as Mediator of Neuronal Survival. **Neurochem. Res.**, 36: 1776-1784.

NOYCE, A.J.; BESTWICK, J.P.; SILVEIRA-MORIYAMA, L.; HAWKES, C.H.; GIOVANNONI, G.; LEES, A.J.; SCHRAG, A. (2012) Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. **Ann. Neurol.**, 72: 893-901.

PACKARD, M.G; KNOWLTON, B.J. (2002) Learning and memory functions of the basal ganglia. **Annu. Rev. Neurosci.**, 25: 563–593.

PIFL, C; HORNYKIEWICZ, BLESÁ, O; ADÁNEZ, R; CAVADA, C; OBESA, J. (2013) Reduced noradrenaline, but not dopamine and serotonin in motor thalamus of the MPTP primate: relation to severity of Parkinsonism. **J. Neurochem.**, Jan 20. doi: 10.1111/jnc.12162.

POLI, G; PACKER, L; CADENAS, E. (2000) **Free radicals in brain pathophysiology**. Dekker: Boca Raton, Florida. 555p.

PREDIGER, R.D.S; FRANCO, J.L; PANDOLFO, P; MEDEIROS, R; DUARTE, F.S; DI GIUNTA, G; FIGUEIREDO, C.P; FARINA, M; CALIXTO, J.B; TAKAHASHI, R.N; DAFRE, A.L. (2007) Differential susceptibility following  $\beta$ -amyloid peptide-(1–40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. **Behav. Brain Res.**, 177: 205-213.

PROBST, A; BLOCH, A; TOLNAY, M. (2008) New insights into the pathology of Parkinson's disease: does the peripheral autonomic system become central? **Eur. J. Neurol.**, 15: 1–4.

PRZEDBORSKI, S; LEVIVIER, M; JIANG, H; FERREIRA, M; JACKSON-LEWIS, V; DONALDSON, D; TOGASAKI, D.M. (1995) Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, 67: 631–647.

PRZEDBORSKI, S; ISCHIROPOULOS, H. (2005). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal.**, 7: 685–693.

REICHMANN, H. (2011) View point: etiology in Parkinson's disease. Dual hit or spreading intoxication. **J. Neurol. Sci.**, 310: 9–11.

RICE-EVANS, C.A; MILLER, N.J; BOLWELL, P.G; BRAMLEY, P.M; PRIDHAM, J.B. (1995) The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radic. Res.**, 22: 375– 383.

RIDET, J.L; BENSADOUN, J.C; DÉGLON, N; AEBISCHER, P; ZURN, A.D. (2006) Lentivirus-mediated expression of glutathione peroxidase: neuroprotection in murine models of Parkinson's disease. **Neurobiol. Dis.**, 21: 29-34.

RINALDI, N.M. (2011) Efeito de dica auditiva na marcha livre e adaptativa em pacientes com doença de Parkinson / Natalia Madalena Rinaldi; orientadora, Lilian Teresa Bucken Gobbi. UNESP – Rio Claro, dissertação mestrado – Rio Claro, SP.

ROBERTS, R.A; SMITH, R.A; SAFE, S; SZABO, C; TJALKENS, R.B; ROBERTSON, F.M. (2010) Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. **Toxicology**, 276: 85–94.

SINGLETON, A. B. FARRER, M; JOHNSON, J. SINGLETON, A; HAGUE, S; KACHERGUS, J; HULIHAN, M; PEURALINNA, T; DUTRA, A; NUSSBAUM, R; LINCOLN, S; CRAWLEY, A; HANSON, M; MARAGANORE, D; ADLER, C; COOKSON, M.R; MUENTER, M; BAPTISTA, M; MILLER, D; BLANCATO, J; HARDY, J; GWINN-HARDY, K. (2003) Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. **Science**, 302: 841.

SAUER, H; OERTEL, W.H. (1994) Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**, 59: 401–415.

SIES, H. (1986) Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, 25:1058-1071.

SOUZA, L.C; GOMES. M.G; GOES, A.T.R; DEL FABRO, L; FILHO, C.B; BOEIRA, S.P; JESSE, C.R. (2013) Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the antidepressant-like effect caused by hesperidin in mice. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.**, 40: 103–109.

- SOWELL, R. A; OWEN, J.B; BUTTERFIELD, D.A. (2009) Proteomics in animal models of Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Ageing Res. Rev.**, 8: 1-17.
- SULZER, D. (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, 30: 244–250.
- SCALBERT, A; WILLIAMSON, G. (2000) Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.**, 130: 2073–2085.
- SCHAFFER, F.Q; BUETTNER, G.R. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, 30: 1191-1212.
- SCHAPIRA, A.H. (2009) Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, 30: 41–47.
- SCHAPIRA, A.H; JENNER, P. (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Mov. Disord.**, 26: 1049–1154.
- SCHWARTING, R.K; BONATZ, A.E; CAREY, R.J; HUSTON, J.P (1991) Relationships between indices of behavioral asymmetries and neurochemical changes following mesencephalic 6-hydroxydopamine injections. **Brain Res.**, 554: 46-55.
- SHIH, J.C; CHEN, K; RIDD, M.J. (1999) Monoamine oxidase: from genes to behavior. **Annu. Rev. Neurosci.**, 22: 197–217.
- SMITH, S.R; COOPERMAN, S; LAVAUTE, T; TRESSER, N; GHOSH, M; MEYRON-HOLTZ, E; LAND, W; OLLIVIERRE, H; JORTNER, B; SWITZER, R; MESSING, A; ROUAULT, T.A. (2004) Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1012: 65–83.
- SHIMIZU, K; OHTAKI, K; MATSUBARA, K; AOYAMA, K; UEZONO, T; SAITO, O; SUNO, M; OGAWA, K; HAYASE, N; KIMURA, K; SHIONO, H. (2001) Carrier-

mediated processes in blood-brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Res.**, 906: 135–142.

SHULMAN, J.M; DE JAGER, P.L; FEANY, M.B. (2011) Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. **Annu. Rev. Pathol.**, 6: 193–222.

SRIVASTAVA, A; DIXIT, A; PRAKASH, O; SINGH, M.P. (2011) Tiny non-coding RNAs in Parkinson's disease: implications, expectations and hypes. **Neurochem. Int.**, 59: 759–769.

STAAL, R.G; MOSHAROV, E.V; SULZER, D. (2004) Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. **Nat. Neurosci.**, 7: 341–346.

STAMLER, J.S. (1994) Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell.** 78: 931–937.

STERU, L. CHERMAT, R. THIERRY, B. SIMON, P. (1985) The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, 85: 367–370.

TADAEISKY, M.T; DOMBROWSKI, P.A; FIGUEIREDO, C.P; CARNIN-FERREIRA, E; DA CUNHA, C; TAKAHASHI, R.N. (2008) Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 156:830-840.

TADAEISKY, MT. (2010) A lesão dopaminérgica como modelo de estágio pré-motor da doença de Parkinson: efeitos do antagonismo do receptor CB1 / Meigy Tavares Tadaiesky ; orientador, Reinaldo Naoto Takahashi. UFSC, tese doutorado - Florianópolis, SC.

TALPADE. D.J; GREENE, J.G; HIGGINS, D.S; GREENAMYRE, J.T. (2000) In vivo labeling of mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) in rat brain using [(3)H]dihydrorotenone. **J. Neurochem.**, 75: 2611–2621.

TAN, E.K; LU, C.S; PENG, R; TEO, Y.Y; WU-CHOU, Y.H; CHEN, R.S; WENG, Y.H; CHEN, C.M; FUNG, H.C; TAN, L.C; ZHANG, Z.J; NA, X.K; LEE-CHEN, G.J; LEE, M.C; FOOK-CHONG, S; BURGUNDER, J.M; WU, R.M; WU, Y.R. (2010) Analysis of the UCHL1 genetic variant in Parkinson's disease among Chinese. **Neurobiol. Aging**, 31: 2194-2196.

TAPIO, H; TEW, K.D; BA, G.N; MATHE, G. (2002) Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomed. Pharmacother.**, 56:200-207.

TAWARA, T; FUKUSHIMA, T; HOJO, N; ISOBE, A; SHIWAKU, K; SETOGAWA, T. YAMANE, Y. (1996) Effects of paraquat on mitochondrial electron transport system and catecholamine contents in rat brain. **Arch. Toxicol.**, 70: 585-589.

TESTAI, L. MARTELLI, A; MARINO, A; D'ANTONGIOVANNI, V; CIREGIA, F; GIUSTI, L; LUCACCHINI, A; CHERICONI, S; BRESCHI, M.C; CALDERONE, V. (2013) The activation of mitochondrial BK potassium channels contributes to the protective effects of naringenin against myocardial ischemia/reperfusion injury. **Biochem. Pharmacol.**, 85:1634-1643.

TIEU, K. (2011) A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, Sep;1(1):a009316. doi: 10.1101/cshperspect.a009316.

TOBÓN-VELASCO, J.C; PALAFOX-SÁNCHEZ, V; MENDIETA, L; GARCÍA, E; SANTAMARÍA, A; CHAMORRO-CEVALLOS, G; LIMÓN, I.D. (2013) Antioxidant effect of Spirulina (Arthrospira) maxima in a neurotoxic model caused by 6-OHDA in the rat striatum. **J. Neural. Transm.**, Feb 21. Doi: 10.1007/s00702-013-0976.

TOULOUSE, A; SULLIVAN, A.M. (2008) Progress in Parkinson's disease-Where do we stand? **Prog. Neurobiol.**, 85: 376-468.

UNGERSTEDT, U. (1968) 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, 5: 107-117.



VILA, M; PRZEDBORSKI, S. (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Nat. Med.**, 10: 58-62.

VINGERHOETS, F.J; SNOW, B.J; TETRUD, J.W; LANGSTON, J.W; SCHULZER, M; CALNE, D.B. (1994) Positron emission tomographic evidence for progression of human MPTP-induced dopaminergic lesions. **Ann. Neurol.**, 36: 765–770.

ZHANG, C; RODRIGUEZ, C; SPAULDING, J; AW, T.Y; FENG, J. (2012) Age-dependent and tissue-related glutathione redox status in a mouse model of Alzheimer's disease. **J. Alzheimers Dis.**, 28: 655-666.

ZHOU, C; HUANG, Y; PRZEDBORSKI, S. (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 1147: 93–104.

YOUDIM, K.A; DOBBIE, KUHNL, G; PROTEGGENTE, A.R; ABBOTT, N.J; RICE-EVANS, C. (2003) Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. **J. Neurochem.**, 85: 180–192.

YU, J; WANG, L; WALZEN, R.L; MILLER, E.G; PIKE, L.M; PATIL, B.S (2005) Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. **J. Agric. Food Chem.**, 53: 2009-2023.

WEI, L; SUN, C; LEI, M; LI, G; YI, L; LUO, F; LI, Y; DING, L; LIU, Z; LI, S; XU, P. (2013) Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway by exogenous Wnt1 protects SH-SY5Y cells against 6 hydroxydopamine toxicity. **J. Mol. Neurosci.**, 49: 105-120.

WILCOX, L; BORRADAILE, N.M; DE DREU, L.E; HUFF, M.W. (2001) Secretion of hepatocyte apoB is inhibited by the flavonoids, naringenin and hesperedin, via reduced activity and expression of ACAT2 and MTP. **J. Lipid. Res.**, 42: 725-759.

WIRDEFELDT, K; ADAMI, H.O; COLE, P; TRICHOLPOULOS, D; MANDEL, J.  
(2011) Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence.  
**Eur. J. Epidemiol.**, 26: 1-58.

## PERSPECTIVAS

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação da hesperidina na DP, esse trabalho terá continuidade no doutorado. Nesse sentido, outros parâmetros precisam ser investigados. Para isso um novo protocolo de indução da doença será utilizado, no qual a 6-OHDA será substituída pelo MPTP. Além dos parâmetros estudados no presente estudo, pretende-se investigar os níveis de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e os níveis da proteína caspase-3 e caspase-9 no estriado. Além disso, a atividade da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), gama glutamil transferase (GGT), lactato desidrogenase (LDH) e os níveis de uréia e creatinina no plasma sanguíneo serão mensurados a fim de verificar parâmetros toxicológicos hepáticos e renais que o tratamento crônico com a hesperidina possa causar.