

**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI-URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR - PPBM**

**EFEITOS NEUROPROTETORES DA FRAÇÃO
PROTEICA DE *Spirulina platensis* EM MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON
(DISSERTAÇÃO DE MESTRADO)**

MARIA JANICE PEREIRA LOPES

CRATO – CE

2020

MARIA JANICE PEREIRA LOPES

**EFEITOS NEUROPROTETORES DA FRAÇÃO PROTEICA DE *Spirulina platensis*
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada à Universidade Regional do Cariri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, na área de Bioprospecção de Produtos Naturais, para a obtenção do título de Mestre.

Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Glauce Socorro de Barros Viana

Coorientadora

CRATO – CE

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva de Sousa CRB: 3/1000

Lopes, Maria Janice Pereira.
L864e Efeitos neuroprotetores da fração proteica de *Spirulina platensis*
em modelo experimental de doença de parkinson/ Maria Janice Pereira
Lopes. – Crato-CE, 2020.
91p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA
Orientadora: Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf
Coorientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

1. Doença de Parkinson, 2. *Spirulina platensis* 3.
Neuroinflamação, 4. Suplementação protéica; I. Título.

CDD: 616.833

MARIA JANICE PEREIRA LOPES

**EFEITOS NEUROPROTETORES DA FRAÇÃO PROTEICA DE *Spirulina platensis*
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação apresentada à Universidade Regional do Cariri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, na área de Bioprospecção de Produtos Naturais, para a obtenção do título de Mestre.

Dissertação aprovada em: 22 / 09/ 2020



Prof^ª. Dr^ª. Marta Regina Kerntopf (Orientadora)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof^ª. Dr^ª. Glauce Socorro de Barros Viana (Coorientadora)
Universidade Federal do Ceara – UFC



Prof^ª. Dr^ª. Roseli Barbosa (Membro Interno)
Universidade Regional do Cariri – URCA



Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe (Membro Externo)
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

CRATO – CE

2020

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia.

Aos meus pais, irmãos, meu esposo Francisco de Assis Lopes Feitosa, minha filha Maria Julia, meu filho Antonio Heitor e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, primeiramente, pela vida, por ser minha rocha e fortaleza nas dificuldades e tribulações, por ter me dado forças para prosseguir e, hoje, me conceder a graça de estar concluindo mais essa etapa da minha vida, meu Mestrado. Toda honra e toda glória a ti Senhor.

Ao meu esposo, **Francisco de Assis Lopes Feitosa**, por seu amor, dedicação e companheirismo em todos os momentos, e aos nossos filhos, que são nossas maiores bênçãos: **Maria Julia Pereira Lopes** e **Antônio Heitor Lopes**. Muito obrigada!!!

À minha orientadora **Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf**, pelo apoio e confiança a mim depositada e pelos conselhos e ensinamentos, os quais ajudaram muito no meu crescimento. Minha eterna e sincera Admiração e Gratidão!!!

A minha Co-orientadora, **Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana**, a qual me falta até palavras que expressem tamanha gratidão. Agradeço Dra, por todos os ensinamentos e incentivo ao longo dos anos de convivência. Sou imensamente grata também por sua efetiva participação neste trabalho. Minha eterna e sincera Admiração. Obrigada por tudo!!!

A todos que fazem parte do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, em especial a **Gyllyandeson, Daniel, Norma, Enaide, Giovana, Alex e Maysa** pela amizade e companheirismo a mim dedicado. Agradeço por ter todos vocês em minha vida e pelo apoio de sempre!

Ào **Prof. Dr. Luiz Marivando Barros** pela atenção, auxílio e a gentileza em participar da Banca de Qualificação, e se protificar a ser suplente de defesa, Agradeço demais por sua contribuição.

À **Profª Dr.ª Roseli Barbosa**, por sua disponibilidade, carinho, sabedoria e simpatia, e pela gentileza de participar da minha banca de qualificação e Defesa. Gratidão!

À **Profª Iana Bantim**, agradeço por seu carinho, amizade e ensinamentos.

A todos os professores do **Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular**, por todo o conhecimento que foi repassado durante o mestrado (PPBM).

À **secretaria do Mestrado**, por estar sempre à disposição para atender e ajudar aos alunos.

À **Universidade Regional do Cariri – URCA**, que me acolheu, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Aos alunos do curso de Medicina da Estácio/FMJ que me auxiliaram nos testes, **Bruno, Alexia, Carol, Leticia e Pablo**, bem como aos alunos do curso de Farmácia, **Filipe, Hannah, Morgana**, meus sinceros agradecimentos a todos!

A meus amigos da UFC, **Pedro e Ludmila**, que sempre me ajudaram em todo o mestrado, meu muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira** e a doutoranda **Andrea Costa** do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, por ajudarem na parte metodológica (isolando a Fração Proteica utilizada no estudo), muito grata pela contribuição de vocês!

Aos professores da Estácio, **Dra. Samya Neves** e **Dr. Giovany Cruz**, por todo apoio e contribuição a mim dedicados neste meu mestrado, Meu muito obrigada!

Agradeço ao **Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe** da UFPB, por toda sua contribuição ao longo de todo o mestrado, pelos ensinamentos, pelo apoio, por acreditar em mim, e pela disponibilidade em aceitar o convite para participar da banca de defesa, Gratidão Professor!!!

Ao **Prof. Dr. Irisandro Pampolha** da UFCA, por toda sua disponibilidade em me ajudar, pelo apoio e ensinamentos, Agradeço de coração por tudo!!!

A **Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte**, minha segunda casa, na qual adquiri muitos conhecimentos, os quais levarei por toda minha vida, sou muito grata a essa Instituição. Meu muito Obrigada!!!

E as instituições de fomento, **CAPES, CNPq e FUNCAP**, meus agradecimentos.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas, siglas e símbolos	X
Lista de figuras.....	XII
Lista de quadros.....	XV
Resumo	XVI
Abstract	XVII
1 Introdução	18
2 Revisão de Literatura.....	20
2.1 Aspectos gerais da doença de Parkinson	20
2.2 Estresse oxidativo e disfunção mitocondrial na DP	23
2.3 Neuroinflamação na doença de Parkinson	27
2.4 Tratamento da doença de Parkinson.....	29
2.5 Modelos de doença de Parkinson <i>in vivo</i>	32
2.6 <i>Spirulina platensis</i>	34
2.7 Fração Proteica da <i>Spirulina platensis</i>	38
3 Materiais e Métodos	40
3.1 Animais.....	40
3.2 Drogas e reagentes.....	40
3.3 Cultivo de <i>Spirulina platensis</i> (Sp).....	40
3.4 Teor total de proteínas do extrato aquoso de <i>S. platensis</i>	41
3.5 Extração da Fração Proteica de <i>Spirulina platensis</i>	41
3.6 Protocolo experimental da doença de Parkinson	41
3.7 Cirurgia estereotáxica: Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA.....	43
3.8 Testes Comportamentais.....	44
3.8.1 Teste do campo aberto	44
3.8.2 Teste do nado forçado.....	44
3.8.3 Teste rotacional induzido por apomorfina.....	45
3.9 Dissecção das áreas cerebrais	45
3.10 Testes Neuroquímicos	46
3.10.1 Determinação do conteúdo de nitrito	46

3.10.2	Determinação da concentração de TBARS	46
3.10.3	Determinação das concentrações de Dopamina e DOPAC	47
3.11	Análises Imunohistoquímica	47
3.11.1	Imunohistoquímica contra Tirosina Hidroxilase (TH)	48
3.11.2	Imunohistoquímica contra Transportador de Dopamina (DAT)	48
3.11.3	Imunohistoquímica para COX-2 e iNOS.....	49
3.12	Análises Estatísticas	49
4.	Resultados e Discussão.....	50
4.1	Estudos Comportamentais.....	50
4.1.1	Teste do campo aberto	50
4.1.2	Teste do nado forçado	53
4.1.3	Teste rotacional induzido por apomorfina	54
4.2	Avaliação Neuroquímica	56
4.2.1	Concentração de Nitrito/Nitrato (NO ₂ /NO ₃) em tecidos cerebrais (Córtex Pré-Frontal e Hipocampo) de ratos parkinsonianos.....	56
4.2.2	Concentração de TBARS em tecidos cerebrais (Córtex Pré-Frontal e Hipocampo) de ratos parkinsonianos	59
4.2.2	Avaliação dos níveis estriatais de DA e seu metabolito DOPAC	61
4.3	Ensaio de Imunohistoquímicos.....	63
4.3.1	Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) em Estriado Direito de ratos parkinsonianos	63
4.3.2	Imunohistoquímica para o Transportador de Dopamina (DAT)	65
4.3.3	Imunohistoquímica para COX-2 nas áreas hipocâmpais Giro Denteado, CA1 e CA3, no córtex temporal de ratos parkinsonianos.....	67
4.3.4	Imunohistoquímica para iNOS nas áreas hipocâmpais Giro Denteado, CA1 e CA3, e no córtex temporal de ratos parkinsonianos	73
5.	Conclusão.....	80
	Referências	81
	Anexo A – Declaração de Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais	91
	Anexo B - Submissão do Artigo	92

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

6-OHDA	6- Hidroxidopamina
AP	Anteroposterior
C3a	Componente 3a do Complemento
C4a	Componente 4a do Complemento
CE	Corpo Estriado
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COMT	Catecol-O-metil transferase
COX-2	Ciclooxigenase- 2
CPF	Córtex Pré-Frontal
CT	Córtex Total
DA	Dopamina
DDCIs	Inibidores da Dopa-Descarboxilase
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DV	Dorso-Ventral
EO	Estresse Oxidativo
EPM	Erro Padrão da Média
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FO	Falso Operado
FPS	Fração Proteica de <i>Spirulina platensis</i>
GD	Giro Denteado
GPe	Globo Pálido Externo
GPi	Globo Pálido Interno
GPx	Glutaciona Peroxidase
GR	Glutaciona Redutase
GSH	Glutaciona Reduzida
GSSG	Glutaciona Oxidada
HP	Hipocampo
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>

IFN- γ	Interferon- gama
IL-1 β	interleucina-1 beta
IL-6	interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	isoforma Oxido Nitrico Sintase
L-DOPA	Levodopa
LL	Latero-Lateral
LPO	Peroxidação Lipídica
LPS	Lipopolissacarídeos
MAC	Componente de ataque a Membrana
MAO B	Monoaminoxidase-B
MDA	Malonildialdeído
MMP	Metaloproteína da matriz
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina
NB	Núcleos de Base
NEED	N-naftil-etilenodiamina
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO	Óxido Nítrico
PGE	Prostaglandina
PIM- α	Proteína Inflamatória de Macrófagos α
PQM-1 α	Proteína Quimiotática Monocítica-1 α
PRX	Peroxirredoxinas;
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	<i>Substância nigra pars compacta</i>
SOD	Superóxido dismutase
STN	Núcleo sub-talâmico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TH	Tirosina Hidroxilase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- alfa
TRX	Tiorredoxina

TRXR Tiorredoxina redutase
 α - sin α - sinucleína

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos da Doença de Parkinson sobre as vias dopaminérgicas	22
Figura 2 - Fisiopatologia da Doença de Parkinson	23
Figura 3 - Esquema das reações e enzimas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e sistemas antioxidantes.....	25
Figura 4 - O metabolismo da Dopamina na progressão da Doença de Parkinson.....	26
Figura 5 - Mediadores da Neuroinflamação na Doença de Parkinson	29
Figura 6 - Fármacos utilizados no Tratamento da Doença de Parkinson.....	31
Figura 7 - Modelos Experimentais da Doença de Parkinson	33
Figura 8 - Composição Nutricional da <i>Spirulina</i>	34
Figura 9 - Representação do protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito da FPS na Doença de Parkinson.....	42
Figura 10 - Efeitos da FPS sobre o Número de Cruzamentos em ratos parkinsonianos	51
Figura 11 - Efeitos da FPS sobre o Numero de <i>Rearing</i> (exploração vertical) em ratos parkinsonianos.....	52
Figura 12 - Efeitos da FPS sobre a atividade antidepressiva-símile em ratos parkinsonianos	53
Figura 13 - Efeito da inibição da FPS sobre comportamento rotacional induzido pela apomorfina em ratos Parkinsonianos	55
Figura 14 - Efeito da FPS sobre os níveis de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) em Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos parkinsonianos	56
Figura 15 - Efeito da FPS sobre os níveis de nitrito/nitrato (NO ₂ /NO ₃) em Hipocampo de ratos parkinsonianos	57
Figura 16 - Efeito da FPS sobre os níveis de concentração de TBARS em Córtex Pré - Frontal de ratos parkinsonianos.....	59
Figura 17 - Efeito da FPS sobre os níveis de concentração de TBARS em Hipocampo (HP) de ratos parkinsonianos.....	60
Figura 18 - Níveis de DA (ng/g de tecido) no estriado direito de animais parkinsonianos	61
Figura 19 - Níveis de DOPAC (ng/g de tecido) no Estriado Direito de animais parkinsonianos	62
Figura 20 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para TH em estriado direito de ratos parkinsonianos.....	63

Figura 21 - Densidade ótica de imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) em estriado direito de ratos parkinsonianos.....	64
Figura 22 - Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para DAT no corpo estriado direito de ratos parkinsonianos	65
Figura 23 - Densidade ótica de imunohistoquímica para DAT no estriado direito de ratos parkinsonianos.....	66
Figura 24 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área do Giro Denteado de ratos parkinsonianos	68
Figura 25 - Densidade ótica de imunomarcção para COX-2 em Giro Denteado de ratos parkinsonianos.....	68
Figura 26 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA1 do hipocampo de ratos parkinsonianos.....	69
Figura 27 - Densidade ótica de imunomarcção para COX-2 em CA1 de ratos parkinsonianos	69
Figura 28 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA3 do hipocampo de ratos parkinsonianos.....	70
Figura 29 - Densidade ótica de imunomarcção para COX-2 em CA3 de ratos parkinsonianos	70
Figura 30 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área do Córtex de ratos parkinsonianos.....	71
Figura 31 - Densidade ótica da imunomarcção para COX-2 em Córtex de ratos parkinsonianos.....	71
Figura 32 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área do Giro Denteado de ratos parkinsonianos	73
Figura 33 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em hipocampo área Giro Denteado de ratos parkinsonianos	74
Figura 34 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área CA1 do hipocampo de ratos parkinsonianos	74
Figura 35 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em hipocampo área CA1 de ratos parkinsonianos.....	75
Figura 36 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área CA3 do HP de ratos parkinsonianos.....	75

Figura 37 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em hipocampo área CA3 de ratos parkinsonianos.....	76
Figura 38 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS em córtex cerebral de ratos parkinsonianos.....	76
Figura 39 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em hipocampo área CA3 de ratos parkinsonianos.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolo de tratamento experimental na Doença de Parkinson.....	42
Quadro 2. Eixos ortogonais para localização do corpo estriado direito em ratos	43

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a Doença de Alzheimer, afetando cerca de 2% da população global na faixa etária de 65 anos, caracterizada pela depleção dopaminérgica na via nigroestriatal. A neuroinflamação e o estresse oxidativo (EO) estão envolvidos na fisiopatologia da DP sendo alvos importantes para tratamento, já que o tratamento farmacológico existente é meramente paliativo e apresenta diversas reações adversas. Tendo em vista a importância do aporte protéico no envelhecimento e em doenças neurodegenerativas e sabendo que a *Spirulina platensis* é uma cianobactéria multicelular filamentosa que pode conter até 74% de proteínas e apresenta ações anti-inflamatórias e antioxidantes, avaliamos os possíveis efeitos neuroprotetores da Fração Proteica da *Spirulina platensis* (FPS) em um modelo de Doença de Parkinson induzido por 6-Hidroxidopamina (6-OHDA). Foram utilizados ratos machos Wistar (250-300 g) distribuídos em 4 grupos: FO (não lesionado); 6-OHDA (lesionado por 6-OHDA por cirurgia estereotáxica no corpo estriado direito); lesionados por 6-OHDA e tratados com FPS (5 e 10 mg/kg, v.o.) durante 14 dias. Após esse período, os animais foram submetidos a testes comportamentais (Teste do Campo Aberto, Nado Forçado e Rotacional induzido por apomorfina) em seguida eutanaziados para retirada das áreas cerebrais (Corpo Estriado, Hipocampo e Córtex) e realização das análises neuroquímicas, bioquímicas e perfusão para os ensaios em imuno-histoquímica. Os dados que apresentaram uma distribuição paramétrica foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) e os não paramétricos pelo teste de Kruskal-Wallis, considerando estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. No teste do Campo Aberto, o tratamento com a FPS (5 e 10 mg/kg) não apresentou diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados (número de cruzamento e número de rearing), em relação ao 6-OHDA. No teste de nado forçado, os animais tratados com a FPS reduziram parcialmente o tempo de imobilidade e no teste rotacional induzido pela apomorfina, os animais lesionados e tratados com a FPS apresentaram redução no número de rotações contralaterais, possivelmente devido ao aumento parcial no conteúdo de DA no estriado, seguido do acréscimo na imunohistoquímica para Tirosina hidroxilase e DAT. Além disso, foi observado que o tratamento com a FPS apresentou efeito antioxidante e antiinflamatório ao diminuir consequentemente as concentrações de nitrito e TBARS no Hipocampo e Córtex e a marcação tecidual para os marcadores de inflamação, COX-2 e iNOS, nas áreas do córtex, e regiões CA1, CA3 e Giro parahipocampal do hipocampo, indicando um mecanismo de neuroproteção. A Fração Proteica da *Spirulina* representa, portanto uma opção viável e eficiente de neuroproteção, apresentando resultados promissores para estudos clínicos como uma nova estratégia terapêutica adicional, com potencial para inibir a progressão da Doença de Parkinson.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; *Spirulina platensis*; neuroinflamação; suplementação protéica.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease, affecting about 2% of the global population in the age group of 65 years. It is characterized by dopaminergic depletion in the nigrostriatal pathway. Neuroinflammation and oxidative stress (OE) are also involved in the pathophysiology of PD and are important treatment targets, since the existing pharmacological treatment is merely palliative and has several side effects. In view of the importance of protein input on aging and on neurodegenerative diseases and also knowing that *Spirulina platensis* is a filamentous multicellular cyanobacterium that may contain up to 74% of proteins and has previously shown anti-inflammatory and antioxidant activities, we evaluated the potential neuroprotective effects of *Spirulina platensis* Protein Fraction (SPF) in a Parkinson's Disease model induced by 6-Hydroxidopamine (6-OHDA) using male Wistar rats (250-300 g). In order to perform this evaluation the rats were distributed in 4 groups: FO (uninjured); 6-OHDA (injured by 6-OHDA using stereotaxic surgery on the right striatum); injured by 6-OHDA and treated with SPF (5 and 10 mg / kg, v.o.) for 14 days. After this period, the animals were subjected to behavioural tests (Open Field Test, Forced Swimming and Rotational induced by apomorphine). Then, the animals were euthanized and its brain areas were removed (Striatum, Hippocampus and Cortex) in order to perform neurochemical, biochemical and perfusion analyses for immunohistochemistry assays. The data that presented a parametric distribution were analyzed by the Analysis of Variance test (ANOVA) and the non-parametric data by the Kruskal-Wallis test, considering statistically significant values of $p < 0.05$. In the Open Field test, the treatment with the SPF (5 and 10 mg / kg) did not present significant difference in any of the evaluated parameters (number of crossing and number of rearing), in relation to the 6-OHDA, in the forced swimming test, animals treated with SPF partially reduced immobility time and in the rotational test induced by apomorphine, animals injured and treated with SPF showed a reduction in the number of contralateral rotations. possibly due to the partial increase in the content of DA in the striatum, followed by the increase in immunohistochemistry for Tyrosine hydroxylase and DAT. In addition, it was observed that the treatment with SPF had an antioxidant and anti-inflammatory effect, consequently decreasing the concentrations of nitrite and TBARS in the Hippocampus and Cortex and the tissue marking for inflammation markers, COX-2 and iNOS, in the areas of the cortex, and regions CA1, CA3 and parahippocampal gyrus of the hippocampus, indicating a neuroprotection mechanism. The *Spirulina* Protein Fraction represents, therefore, a viable and efficient neuroprotection option, presenting promising results for clinical studies as a new additional therapeutic strategy, with the potential to inhibit the progression of Parkinson's Disease.

Keywords: Parkinson's disease; *Spirulina platensis*; neuroinflammation; protein supplementation.

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional vem acontecendo de forma acelerada e com isso tem-se uma maior prevalência de doenças cujo principal fator de risco é a idade, como é o caso das doenças neurodegenerativas, Doença de Alzheimer e de Parkinson. (SILVA; CARVALHO, 2019) A Doença de Parkinson (DP), como muitos outros distúrbios neurodegenerativos, raramente acomete pessoas antes dos 50 anos, no entanto, a prevalência aumenta constantemente para 2% na população global com 65 anos, chegando a 5% em indivíduos com 80 anos (TYSNES; STORSTEIN, 2017).

A DP é caracterizada por alterações funcionais dos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico, que desencadeiam sintomas motores como, bradicinesia, tremor postural e/ou de repouso, hipocinesia, rigidez e instabilidade postural (WERNECK, 2010), e não motores, como depressão, déficits cognitivos, problemas gastrointestinais, distúrbios do sono (MUÑOZ *et al.*, 2016).

A etiologia da doença é delimitada como idiopática, mas estudos sugerem que a DP pode ser decorrente de um conjunto de fatores, sejam eles genéticos, toxinas ambientais, estresse oxidativo, disfunções mitocondriais e/ou alterações do envelhecimento e excitotoxicidade (SOUZA *et al.*, 2011), Além de mecanismos neuro-inflamatórios que contribuem para a cascata de eventos que conduzem à degeneração neuronal na DP (BASSANI; VITAL; RAUH, 2015).

Apesar de extensas pesquisas, ainda não há nenhum tratamento definitivo para a DP levando cada vez mais pesquisadores em todo o mundo a buscarem novas terapias capazes de retardar ou, idealmente, parar a degeneração de neurônios dopaminérgicos, já que os tratamentos atuais são apenas sintomáticos. Embora a descoberta da levodopa tenha revolucionado o tratamento da DP, foi observado que, após alguns anos de tratamento, a maioria dos portadores desenvolvem movimentos involuntários, que são difíceis de controlar e prejudicam significativamente sua vida, tornando evidente a necessidade de mais estudos sobre a levodopa, e sobre novas opções terapêuticas que venham a refinar ou mesmo

substituir a terapia atual, e proporcionar uma melhor qualidade de vida para estas pessoas que sofrem com as consequências da doença e com os efeitos adversos das terapias existentes.

Tendo em vista as opções terapêuticas limitadas para o tratamento da DP, drogas que apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante são candidatas a terapia de neuroproteção. Estudos apontam que a *Spirulina platensis* vem sendo bastante utilizada como suplemento nutricional, devido seu alto teor proteico e também por conta de suas ações anti-inflamatórias e antioxidante. Portanto, o composto oferece potenciais alvos terapêuticos no desenvolvimento de tratamentos futuros. Porém, estudos adicionais são necessários para se determinar os mecanismos neuroprotetores envolvidos o que justifica a importância deste estudo.

Para tanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos neuroprotetores da Fração Proteica de *Spirulina platensis* (FPS) em modelo de Doença de Parkinson, induzida por 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) em ratos. Nesse sentido foram realizados testes comportamentais (campo aberto, nado forçado, rotacional), testes neuroquímicos em corpo estriado (determinação das concentrações de Dopamina e Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC)), avaliação do estresse oxidativo por meio das concentrações de nitrito e peroxidação lipídica, em áreas do hipocampo e córtex, além de ensaios imunohistoquímicos para os mediadores de inflamação, ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no córtex e hipocampo, e de células imunopositivas para a enzima tirosina hidroxilase (TH) e para o transportador de dopamina (DAT) no estriado direito.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da doença de Parkinson

Os relatos sobre a doença de Parkinson datam de tempos remotos, período em que o homem não compreendia ao certo a relação entre ciência e religião. Alguns estudiosos da época, como, Galeno, Leonardo Da Vinci, autores egípcios e indianos faziam descrições sobre a doença, relacionando-a uma possível alteração do sistema nervoso ou punições daqueles que pecavam (PAIXÃO *et al.*, 2013).

Foi em 1871 que James Parkinson, médico inglês, descreveu pela primeira vez, a doença no ensaio intitulado “*An Essay on the Shaking Palsy*”, que vem a ser a primeira descrição mundial bem definida da Doença de Parkinson. A enfermidade, intitulada como "paralisia agitante", foi caracterizada pela presença de movimentos involuntários tremulantes com diminuição da força muscular, e tendência de inclinação do tronco para frente, bem como alteração da marcha (festinação), tendo os sentidos e o intelecto não afetados (TEIVE, 1998).

Após a descrição de Parkinson, a contribuição do neurologista francês Jean-Martin Charcot foi fundamental. Charcot sugeriu o nome "Doença de Parkinson" para a enfermidade "paralisia agitante", definiu a presença dos chamados sinais cardinais da doença (tremor, lentidão do movimento, rigidez e dificuldades do equilíbrio), apresentou critérios para o diagnóstico diferencial e sugeriu o uso de hioscinamida, uma substância com propriedades anticolinérgicas como primeiro tratamento para a enfermidade (TEIVE *et al.*, 2001).

Atualmente, a Doença de Parkinson é caracterizada como o segundo transtorno neurodegenerativo mais comum após a Doença de Alzheimer (WILLIAMS-GRAY; WORTH, 2016).

A fisiopatologia da DP consiste em perda de 70-90% de neurónios dopaminérgicos na região da Substancia Negra Pars Compacta (SNpc), que resultam na diminuição de células pigmentadas secretoras de dopamina e conseqüentemente perda de dopamina (principal neurotransmissor que transmite sinais neuronais do cérebro para outros centros motores). A falta desse neurotransmissor nos pacientes com DP perturba o controle dos movimentos,

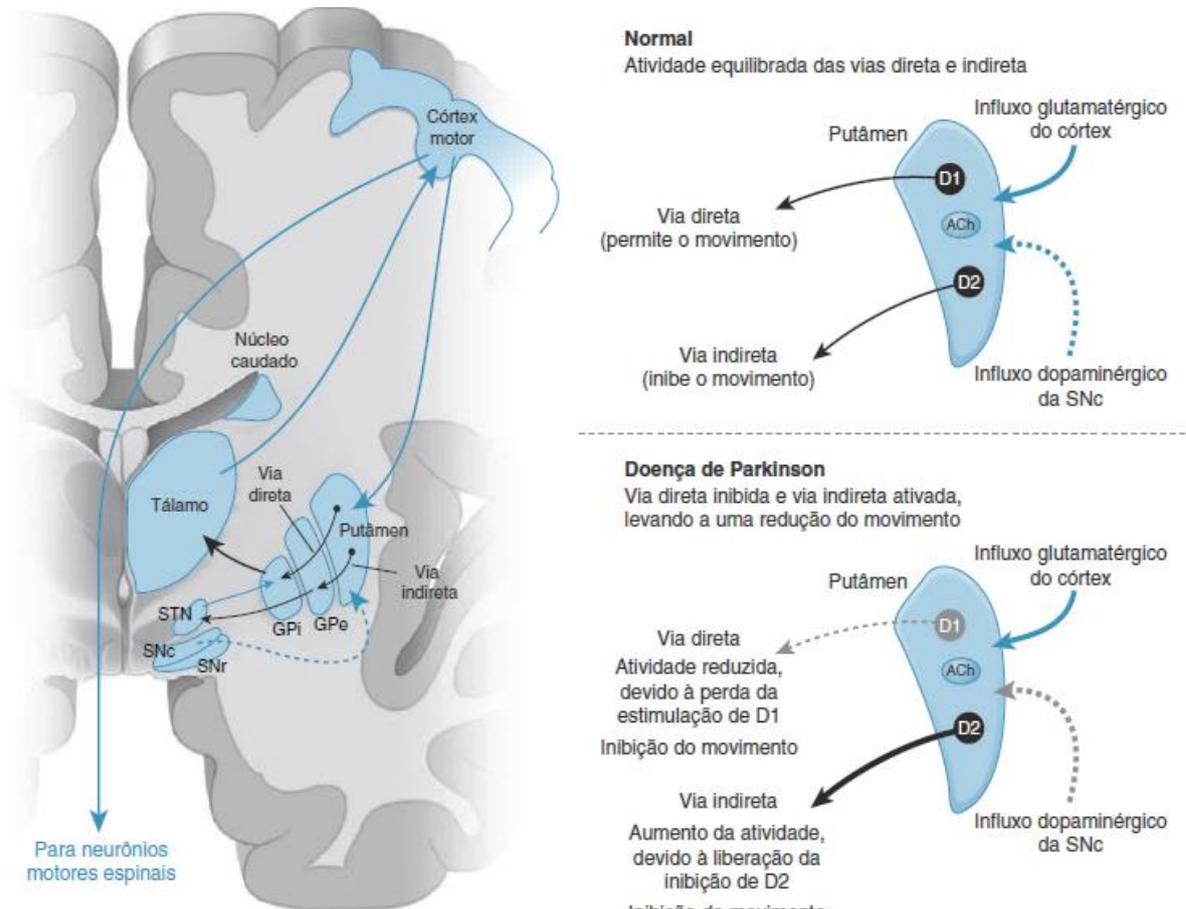
surgindo, portanto os sintomas motores (CHUNG; DAWSON; DAWSON, 2003; THOMAS, 2009; JAGADEESAN *et al.*, 2017).

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos reduz os níveis de dopamina no estriado e em outros núcleos da base. Os Núcleos de Base (NB) são estruturas cerebrais constituídos pelo estriado (caudado e putâmen), globo pálido (interno e externo), núcleo subtalâmico e substância negra e são responsáveis por controlar a atividade motora por meio da regulação de impulsos neuromotores (GOBBI *et al.*, 2006)

Para Standaert e Calanter (2010), há duas vias principais nos núcleos da base que regulam o movimento: a via indireta que inibe o movimento, e a via direta que permite a realização de movimento. A dopamina inibe a via indireta e estimula a via direta através da ativação de receptores das classes D2 (inibitórios) e D1 (excitatórios), respectivamente, resultando em uma tendenciosidade efetiva no que se refere ao movimento voluntário. A figura 1 mostra as vias excitatórias em azul, e as vias inibitórias, em preto. A via direta emite sinais do hipotálamo para o Globo Pálido interno (GPi), o tálamo e o córtex, enquanto a via indireta emite sinais do putâmen para o Globo Pálido externo (GPe), o núcleo subtalâmico (STN), o GPi, o tálamo e o córtex.

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos na substância negra resulta em estimulação deficiente da via direta (que permite o movimento) e inibição insuficiente da via indireta (que inibe o movimento). O resultado final consiste em escassez de movimento. A seta cinza pontilhada indica uma atividade diminuída causada pela estimulação deficiente, enquanto a seta preta espessa indica aumento de atividade produzido pela inibição insuficiente, como mostra a figura 1 (STANDAERT; CALANTER, 2010).

Figura 1 - Efeitos da Doença de Parkinson sobre as vias dopaminérgicas



Fonte: Adaptado de Standaert e Calanter (2010).

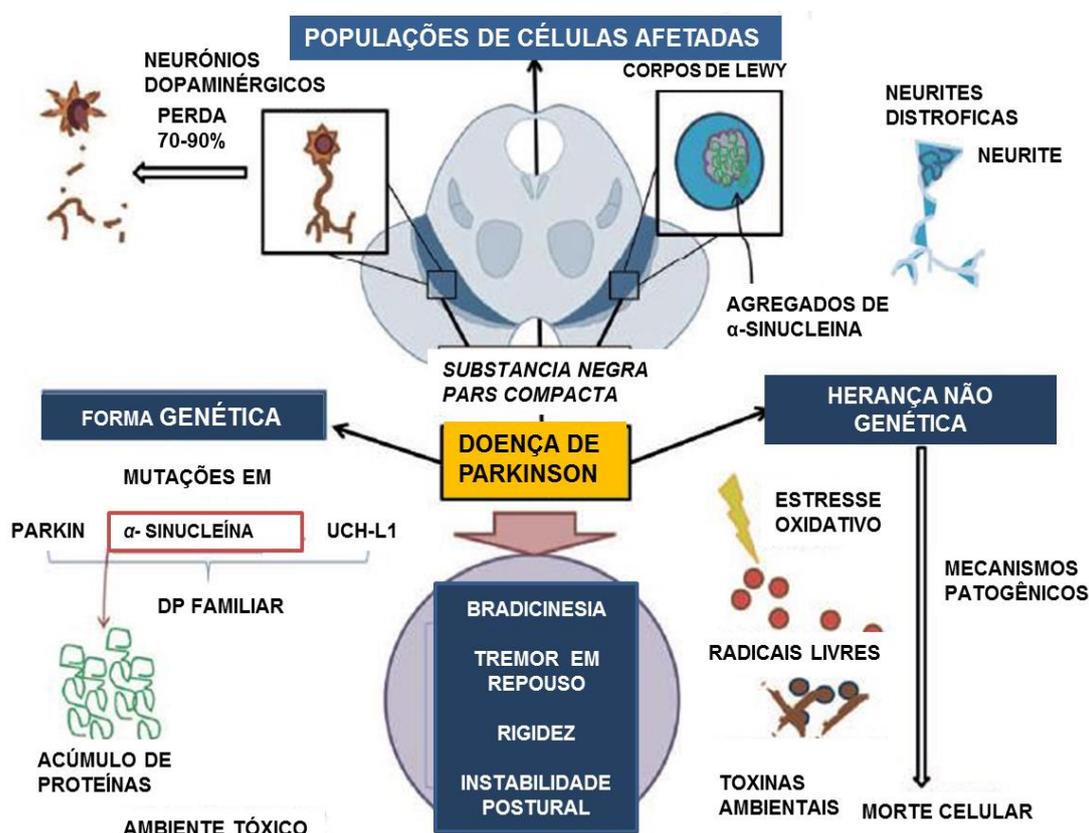
STN: núcleo subtalâmico ; SNc: Substância Negra *compacta*; SNr: Substância Negra *reticulata*; GPi: Globo pálido interno; GPe: Globo pálido externo

Além da depleção dopaminérgica, a DP se caracteriza pela presença de inclusões esféricas citoplasmáticas denominadas corpos de Lewy (BENGOA-VERGNIORY *et al.*, 2017). No interior dos corpos de Lewy encontra-se a proteína alfa-sinucleína, além de outras que contribuem para o processo de degeneração dos neurônios dopaminérgicos do encéfalo. O acúmulo de alfa-sinucleína nos neurônios dopaminérgicos desencadeia uma cascata de eventos importantes na patogênese da DP, com bloqueio do sistema ubiquitina- proteossoma, e prejuízo da função da mitocôndria, que culmina na morte neuronal (DAWSON; DAWSON, 2010).

O sistema proteossomal-ubiquitina tem função de degradar as proteínas anormais/danificadas. Sua falta representa o mecanismo primário de agregação patológica das proteínas na Substância Negra *pars compacta*, caracterizando o chamado estresse proteolítico,

fazendo parte do processo neurodegenerativo da DP (FERRAZ, 2005). Outros mecanismos como toxinas ambientais, neuroinflamação, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial também podem está envolvidos na patogênese da DP como mostra a figura 2 (ORTIZ et al.,2017).

Figura 2 - Fisiopatologia da Doença de Parkinson



Fonte: Adaptado de Ortiz *et al.* (2017).

2.2 Estresse Oxidativo e Disfunção Mitocondrial na DP

O estresse oxidativo ocorre devido um desequilíbrio entre espécies pró e antioxidantes, que resulta em danos moleculares e celulares, contribuindo significativamente no desenvolvimento de doenças relacionadas à idade e vários distúrbios neurológicos (TAN *et al.*, 2018)

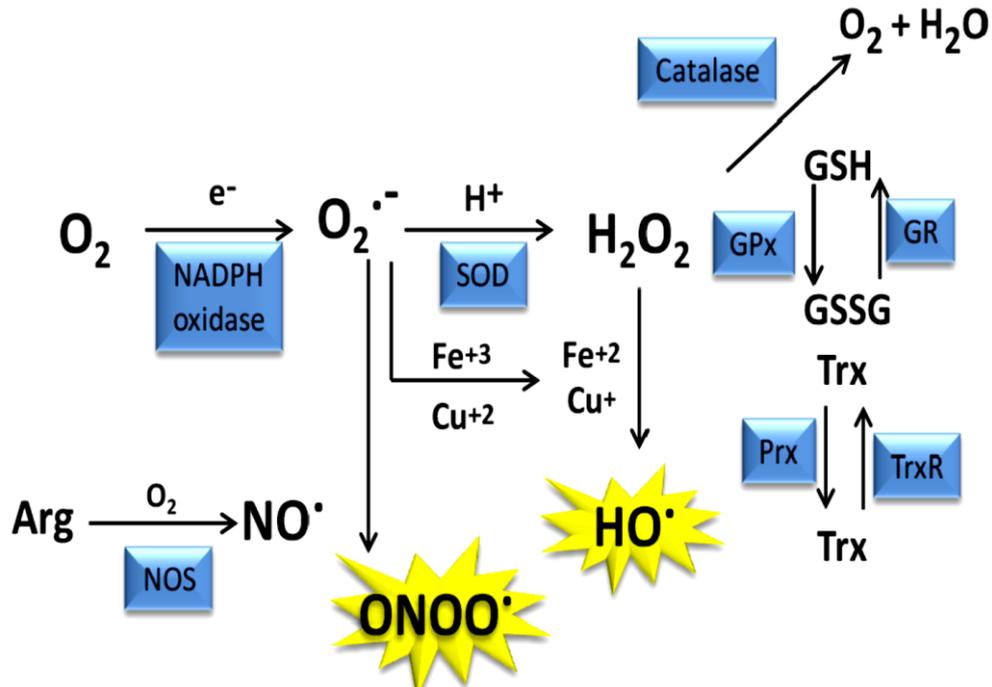
As espécies pro oxidantes incluem, as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs) que são produzidos por processos endógenos ou exógenos e causam modificações oxidativas em macromoléculas celulares. As EROS

envolvidas na neurodegeneração incluem peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-), e o radical hidroxila (HO^\cdot). O óxido nítrico (NO) é o principal representante das espécies reativas de nitrogênio (ERNS) que apresenta efeitos deletérios sobre os neurônios. Embora todos os tecidos possam ser prejudicados com o estresse oxidativo, o cérebro devido às suas altas demandas de oxigênio parece ser particularmente mais suscetível (LI *et al.*, 2013; TAN *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2019).

O óxido nítrico (NO) é encontrado em grandes quantidades nas células, e no espaço extracelular em torno dos neurônios dopaminérgicos. Ele age inibindo várias enzimas do complexo I e IV da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, resultando em níveis elevados de EROs. Além disso, dificulta a função das proteínas ao formar S-nitrosotióis, medeia a peroxidação lipídica, causando um efeito de deterioração nos cérebros de pacientes com DP. Estudos imuno-histoquímicos em tecido cerebral *post mortem* estabeleceram o papel do NO na Doença de Parkinson, ao mostrar níveis elevados de iNOS e nNOS em estruturas dos gânglios da base (SING *et al.*, 2019).

A Figura 3 mostra a formação do radical NO^\cdot , o qual é formado pelas enzimas Óxido Nítrico sintases (NOS). Em excesso, o NO^\cdot pode inibir a citocromo oxidase, induzindo ao aumento de vazamento de elétrons e formação de superóxido, pode também reagir com $O_2^\cdot-$ formando peroxinitrito ($ONOO^-$), a geração de peroxinitrito *in vivo* pode levar à oxidação e nitração de lipídios, DNA e proteínas. Por outro lado o H_2O_2 é eliminado pelas enzimas catalase, glutathiona peroxidase e peroxirredoxinas, as quais atuam em conjunto com as SODs, a catalase dismuta H_2O_2 a água e oxigênio. A glutathiona peroxidase (GPx) remove H_2O_2 pela oxidação de glutathiona (GSH) ao dímero GSSG. Este processo é complementado pela enzima glutathiona redutase (GR), a qual recicla GSSG a GSH. Já as peroxirredoxinas (Prx) utilizam a proteína tioredoxina (Trx) (a qual contém dois grupos tióis) como substrato. A tioredoxina redutase (TrxR), converte a tioredoxina oxidada de volta a sua forma reduzida (BARBOSA; DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2006).

Figura 3 - Esquema das reações e enzimas envolvidas na formação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e sistemas antioxidantes.

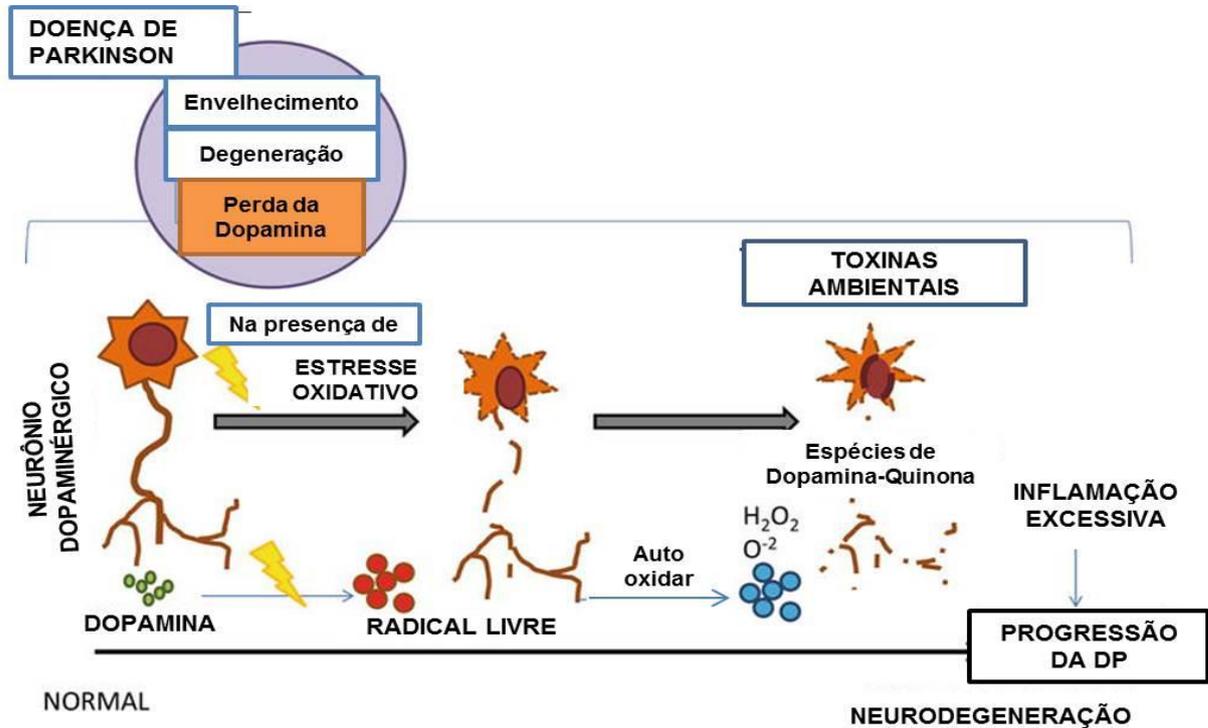


Fonte: Adaptado de Barbosa; De Medeiros; Augusto (2006).

NOS: NO sintetase; SOD: superóxido dismutase; GPx: glutathione peroxidase; Prx: peroxirredoxinas; GR: glutathione reductase; TrxR: tioredoxina reductase; Trx: tioredoxina; GSH: glutathione reduzida; GSSG: glutathione oxidada (dímero).

Os neurônios dopaminérgicos são particularmente expostos ao estresse oxidativo através do metabolismo da dopamina ao originar um número de moléculas potencialmente tóxicas, que se não forem removidas adequadamente, formam espécies tóxicas de dopamina-Quinona, radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio. Esse ambiente tóxico juntamente com a inflamação podem levar à neurodegeneração e progressão da doença. Outra forma que expõe os neurônios dopaminérgicos ao estresse oxidativo é a desaminação da dopamina pela monoamina oxidase (MAO) no metabolito não tóxico 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) e peróxido de hidrogênio (ORTIZ *et al.*, 2017). Portanto, o metabolismo da dopamina pode ativar cascatas que culminam na morte neuronal, como mostra a Figura 4.

Figura 4 - O metabolismo da Dopamina na progressão da Doença de Parkinson



Fonte: Adaptado de Ortiz *et al.* (2017).

Outras evidências que dão suporte ao envolvimento de estresse oxidativo na patogênese da DP são as alterações na quantidade de ferro presentes no cérebro. O ferro é um elemento importante para quase todos os tipos de células, incluindo células cerebrais, mas seu excesso depositado no cérebro e alterações no seu metabolismo contribuem para o desenvolvimento de muitas doenças. O íon ferro na forma de ferro férrico (Fe^{3+}) e ferro ferroso (Fe^{2+}) podem reagir com superóxido e peróxido de hidrogênio respectivamente, em uma reação em cadeia e gerar o radical livre hidroxila altamente reativo, que junto com a oxidação da dopamina pode desencadear neurotoxicidade. No envelhecimento e em processos degenerativos, como a DP, há uma deposição progressiva anormal de ferro e aumento da sua concentração na forma livre na SNpc (DIAS; JUNN; MOURADIAN, 2013)

Investigações *post-mortem* em pacientes com DP foram observados níveis aumentados de ferro e cálcio, níveis reduzidos de glutathiona reduzida (GSH) e função mitocondrial prejudicada (JENNER, 1998; VERMA; NEHRU, 2009).

Para tentar combater esses efeitos deletérios, as células possuem um sistema de defesa antioxidante, que através de vários mecanismos, removem os radicais livres e reduz o grau de lesão. Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: A classe de antioxidante com atividade enzimática e as não enzimáticos. Os enzimáticos são os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, estimular as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), são as principais desta classe. Por outro lado, as moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação, são as não-enzimáticos, nesta classe estão, as vitaminas A, C e E, o ferro e o cobre (WU; FANG; YANG, 2002; LI *et al.*, 2013; GASCHLER; STOCKWELL, 2017).

A disfunção mitocondrial também tem sido sugerida na patogênese da DP há muito tempo. Vários grupos de investigação citam uma diminuição da atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial na *substancia nigra* de pacientes com a doença de Parkinson. (PERFEITO; REGO, 2012)

A disfunção mitocondrial é caracterizada principalmente pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminuição da atividade da enzima do complexo mitocondrial I, liberação do citocromo-c, depleção de ATP e ativação da apoptose. A deficiência do complexo mitocondrial provoca insuficiência respiratória mitocondrial que contribui para a lesão neuronal e consequente morte neuronal progressiva na DP (WERNECK, 2010; MOON; PAEK, 2015).

2.3 Neuroinflamação na Doença de Parkinson

Várias linhas de evidência apoiam um papel da neuroinflamação na fisiopatologia da DP (BASSANI; VITAL; RAUH, 2015). Neuroinflamação refere-se aos processos inflamatórios que ocorrem no Sistema Nervoso Central (SNC), e envolvem o sistema imunológico inato e adaptativo, que podem induzir efeitos benéficos ou nocivos. Na doença de Parkinson, a neuroinflamação e a ativação da micróglia (microglíose) são consideradas

características neuropatológicas, porém seu papel preciso em relação à progressão da doença ainda não é claro (GELDERS; BAEKELANDT; VAN DER PERREN, 2018).

Microglia são as células imunes do Sistema Nervoso Central, responsáveis pela homeostase cerebral. Na ausência de qualquer estímulo, a micróglia encontra-se em seu estado de repouso, mas ao ocorrer algum dano cerebral, elas sofrem alterações morfológicas e funcionais e tornam-se ativas. Micróglia ativadas cronicamente secretam altos níveis de mediadores pró-inflamatórios que danificam os neurônios, ativando-as ainda mais, promovendo mais inflamação e neurodegeneração (COLLINS *et al.*, 2012; RANSOHOFF, 2016; JOERS *et al.*, 2016; GELDERS; BAEKELANDT; VAN DER PERREN, 2018) Vários estímulos podem ativar a microglia na doença de Parkinson, são eles, agregado α - sinucleína, toxinas tais como MPTP, 6 - OHDA, LPS, rotenona, paraquat, pesticidas, entre outros (ORTIZ *et al.*, 2017).

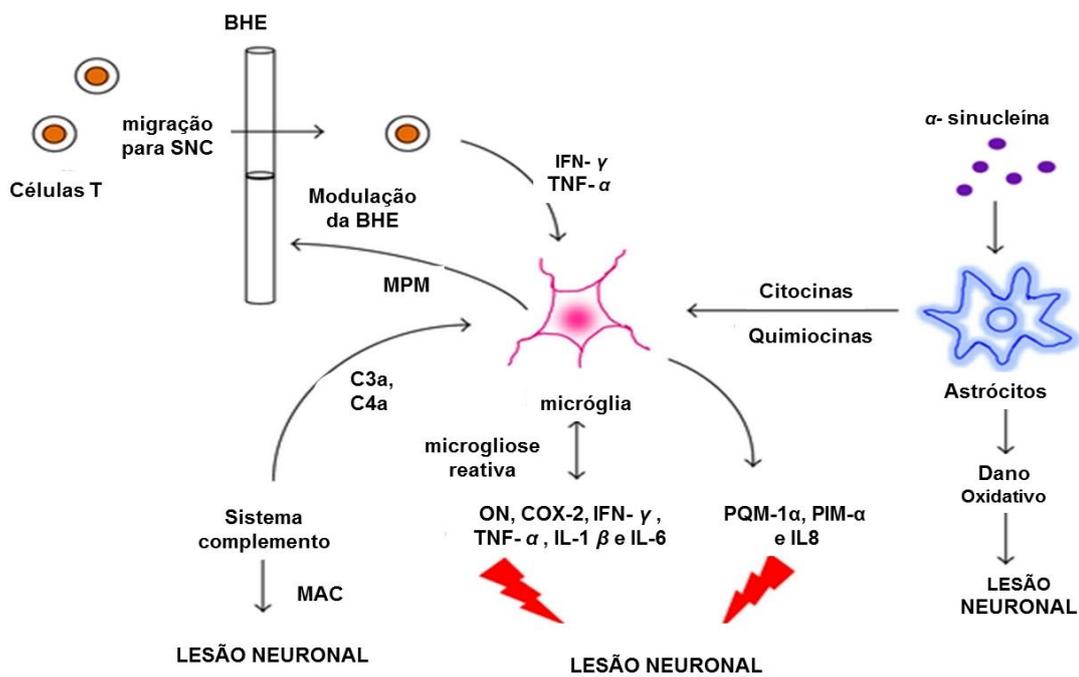
Ensaios imuno-histoquímicos realizados em tecido cerebral *post mortem* de pacientes com DP, evidenciaram a presença de micróglia ativada expressando citocinas inflamatórias (interleucinas) e enzimas associadas à inflamação, como a isoforma induzível de óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (KNOTT; STERN; WILKIN, 2000).

Além da micróglia, também foi constatado que os astrócitos participam da neuropatologia da DP (DAMIEN, *et al.*, 1993). Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no SNC e sua função é fornecer suporte estrutural e metabólico aos neurônios, além de exercer um papel crucial na produção de antioxidantes e na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS / RNS). Porém, a presença do estresse e da inflamação celulares induzem astrogliose reativa, com produção de ERO / RNS astrocítica que levam ao estresse oxidativo / nitrosativo e conseqüentemente a patogênese da DP. (RIZOR *et al.*, 2019)

As células microgliais e astrogliais são ativadas durante a patogênese da doença de Parkinson, sob a influência de vários estímulos pró-inflamatórios, incluindo α - sinucleína, o sistema complemento e citocinas liberadas pelas células T infiltradas. Ao serem ativadas as células microgliais e astrogliais liberam ainda mais mediadores neuroinflamatórios, incluindo

Oxido Nítrico, ciclooxigenase -2 (COX-2), Interferon - gama (IFN- γ), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1-beta (IL-1 β) e Interleucina -6 (IL-6), quimiocinas incluindo Proteína Quimiotática-Monócito-1alfa (PQM-1 α), proteína inflamatória de micrófagos alfa (PIM- α) e Membrana do Complexo de Ataque (MAC), que têm efeito deletério na sobrevivência neuronal, como ilustra a figura 5 (MORE *et al.*, 2013).

Figura 5 - Mediadores da neuroinflamação na Doença de Parkinson



Fonte: Adaptada de More *et al.*, 2013.

ON: óxido nítrico, COX-2: ciclooxigenase -2, INF- γ : interferon- γ , TNF- α : fator de necrose tumoral alfa , IL-1 β : interleucina-1 beta , IL-6: interleucina-6, PQM-1 α : proteína quimiotática-monócito-1, PIM- α : proteína inflamatória de micrófagos, IL-8: interleucina-8, MAC: membrana do complexo de ataque, α - sin: α - sinucleína, MPM: metaloproteína da matriz, BHE: barreira Hemato Encefálica, C3a: componente complemento 3a e C4a: componente complemento 4a.

2.4 Tratamento da Doença de Parkinson

A introdução do conceito de terapia de reposição da dopamina para o tratamento da DP já existe há mais de cinquenta anos, mas a doença continua sendo um distúrbio

neuroológico incurável (SCHLOSSMACHER, *et al.*, 2017). As opções farmacológicas atuais não são capazes de interromper o curso da doença nem evitá-la, consiste basicamente na reposição de dopamina, inibição de sua degradação ou no uso de agonistas dopaminérgico que tem a finalidade controlar os sintomas, mantendo o portador com autonomia, independência funcional e equilíbrio psicológico (GONÇALVES; ALVAREZ; ARRUDA, 2007).

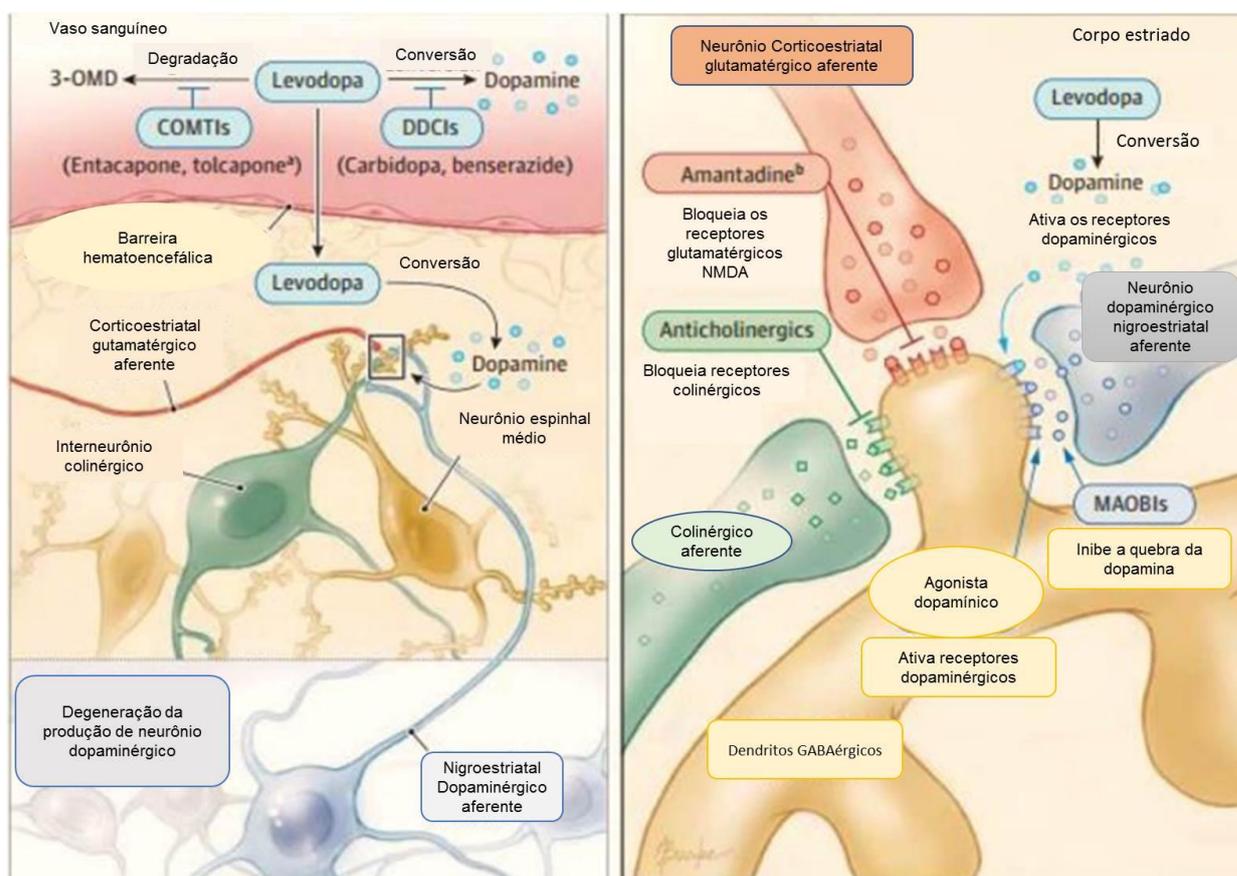
A levodopa, um pró-fármaco da dopamina, foi introduzida na prática clínica no tratamento da DP na década de 1960. A levodopa é convertida em dopamina e corrige, teoricamente, o defeito bioquímico da DP. Ela é absorvida no trato gastrointestinal e distribuída para outros tecidos (AZEVEDO; CARDOSO, 2009).

A levodopa é utilizada em combinação com a carbidopa, um inibidor periférico da dopa descarboxilase. Essa associação tem a finalidade de aumentar a biodisponibilidade da levodopa, reduzindo assim a necessidade de aumentar a dosagem. Esta combinação é eficaz no controle dos sintomas motores nos estágios iniciais da DP, mas à medida que a doença progride a levodopa, causa em 10% dos pacientes complicações motoras como discinesias e flutuações motoras, estas últimas conhecidas com fenômeno on-off ou “liga/desliga” (PAIXÃO *et al.*, 2013; DEMAAGD; PHILIP, 2015).

A levodopa é transportada na circulação periférica atravessando a barreira hematoencefálica onde é posteriormente convertida em dopamina. Os inibidores da dopa-decarboxilase (DDCIs) e os inibidores da catecol-orto-metil-transferase (COMTIs) previnem a degradação da levodopa a nível periférico. Agonistas dopaminérgicos e inibidores da monoaminoxidase B (MAOBIs) promovem efeitos dopaminérgicos. Os anticolinérgicos irão atuar em receptores de outros neurotransmissores no estriado como mostra a figura 6 (CONNOLLY; LANG, 2014).

Além da levodopa, drogas que são prescritas atualmente no tratamento da DP incluem agonistas dos receptores de DA, tais como, selegilina (inibidor de MAO-B), amantadina (anti-viral com influência na síntese da DA), inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT) e anticolinérgicos (NAGATSU; SAWADA, 2009).

Figura 6 - Fármacos utilizados no Tratamento da Doença de Parkinson



Fonte: Adaptado de Connolly e Lang,(2014)

COMTIs: Inibidores da Catecol-Orto-Metil-Transferase; DDCIs: Inibidores da Dopa-DesCarboxilase; MAOBI: Inibidores da MonoAminOxidase B

Somado ao tratamento farmacológico, faz-se necessário o acompanhamento de profissionais, como fisioterapeutas, psicólogos, fonoaudiólogos, nutricionistas, e o permanente acompanhamento de um neurologista, constituindo um tratamento multidisciplinar, que ajudará os portadores a manterem uma melhor qualidade de vida (STEIDL; ZIEGLER; FERREIRA, 2007).

Os tratamentos disponíveis atualmente para DP não alteram a progressão nem o processo neurodegenerativo. Portanto, faz-se necessária a descoberta de estratégias neuroprotetoras para diminuir ou parar a progressão da doença.

2.5 Modelos de Doença de Parkinson *in vivo*

Ao longo dos anos, diversos modelos experimentais de DP foram desenvolvidos e aplicados em várias espécies, e, dentre os "clássicos", destacam-se o por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) e por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina – MPTP (SCHOBER, 2004).

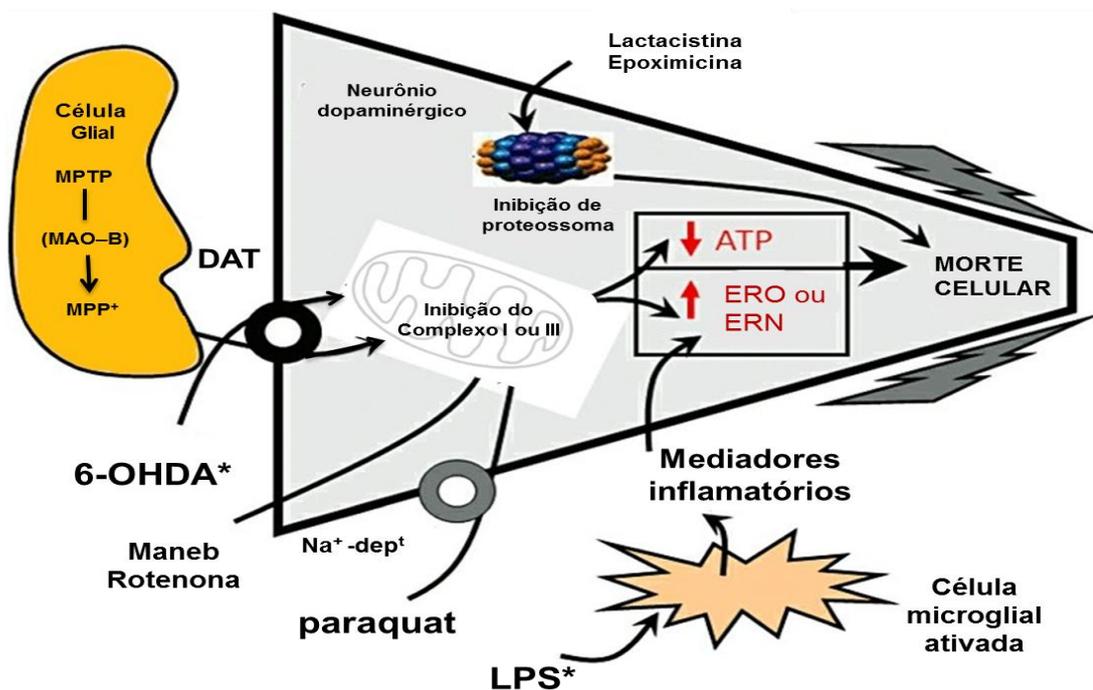
A 6-OHDA, é um análogo hidrolizado da dopamina, que não atravessa a barreira hematoencefálica, por isso ela é injetada diretamente no Sistema Nervoso Central, especificamente no estriado. O resultado de sua captação pelos transportadores noradrenérgicos e dopaminérgicos é a destruição de forma seletiva dos sistemas catecolaminérgicos e perda de neurônios dopaminérgicos, parecida com a da DP, que se inicia logo após a injeção, tornando-se estável após duas semanas. A 6-OHDA é um composto muito instável, que é facilmente oxidado para produzir espécies reativas de oxigênio, que poderão causar a morte dos neurônios dopaminérgicos por apoptose (PERFEITO; REGO, 2012).

No interior dos neurônios a 6OHDA sofre degradação enzimática pela Monoanina-oxidase A e auto-oxidação, gerando diversas espécies reativas citotóxicas que levam a injúria neuronal ao danificar proteínas e ácidos nucleicos, podendo ainda causar neurotoxicidade através da disfunção do complexo mitocondrial I (SIMOLA *et al.*, 2007). O modelo experimental induzido pela 6-OHDA é o modelo animal que mais se assemelha à doença humana, já que gera uma lenta evolução dos sintomas e parece ser mais adequado para estudos que foquem estratégias terapêuticas (TORRÃO *et al.*, 2012)

O modelo de Doença de Parkinson induzido por MPTP tem contribuído para o estudo da morte celular presente na DP. Quando administrado em animais, o MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e é convertido, principalmente nas células da glia, na sua forma efetiva, o 1- metil-4fenilpiridínio (MPP+), pela ação da MAO-B (CHIBA; TREVOR; CASTAGNOLI JUNIOR, 1984). Após a receptação, o MPP+ acumula-se nas células dopaminérgicas e inibe a atividade da organela, reduzindo os níveis celulares de ATP e consequentemente a morte celular.

A Figura 7 representa de forma esquemática os modelos experimentais usados para induzir a DP e os mecanismos de ação das principais neurotoxinas utilizadas, MPTP, 6-OHDA, manebe e rotenona. MPTP é convertido em MPP⁺, após o qual entra o neurônio dopaminérgico pelo transportador de dopamina (DAT), mesmo transportador utilizado pela 6-OHDA. Paraquat entra o neurônio por um transportador dependente de Sódio (transportador Na-dep) e rotenona e manebe atravessam a membrana celular por difusão. Uma vez dentro da célula, todas as neurotoxinas inibem o complexo mitocondrial I ou III, prejudicando a respiração mitocondrial. Eventualmente isso leva a uma diminuição do ATP e a um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ERO), resultando finalmente na morte celular dopaminérgica (DOUNA *et al.*, 2012). O LPS ativa células microgliais para estimular a liberação de mediadores inflamatórios, que por sua vez produzem espécies reativas de nitrogênio (ERN) e a inibição da atividade do proteossoma permite a formação de proteínas danificadas que, por danos no DNA (não demonstradas por clareza), e outros processos podem levar à morte celular (DUTY; JENNER, 2011)

Figura 7 – Modelos Experimentais da Doença de Parkinson



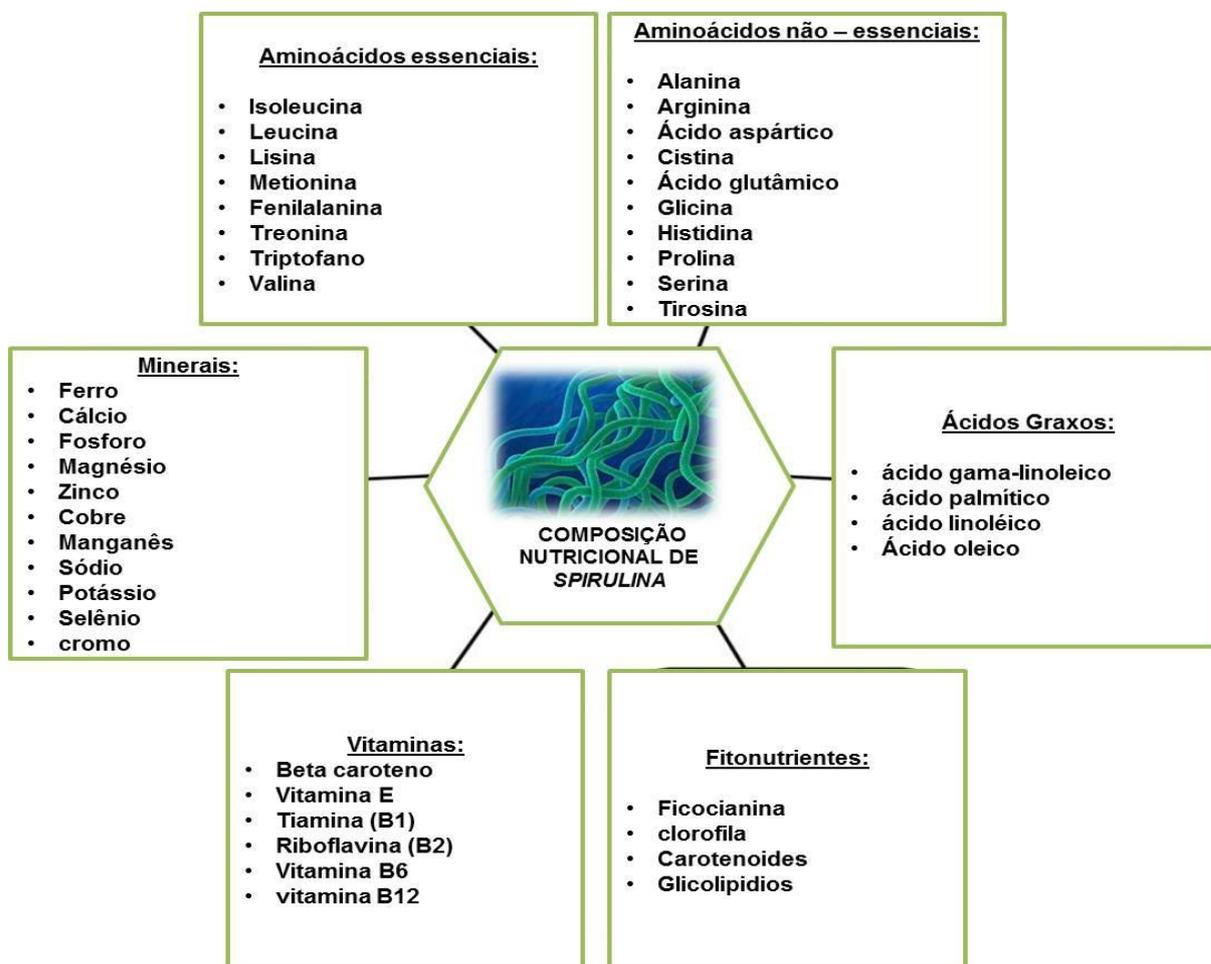
Fonte: Adaptado de Duty e Jenner (2011)

6-OHDA: 6 -hidroxi-dopamina; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina; LPS: Lipopolissacarídeo
 .* Indica os agentes que são administrados diretamente no cérebro; todos os outros agentes são de uso sistêmico. Com exceção da manebe, todas as toxinas mitocondriais inibem principalmente o complexo I.

2.6 *Spirulina platensis*

A microalga *Spirulina*, também chamada de *Arthrospira*, pertence ao reino Bactéria, divisão Cianobactéria, classe Cyanophyceae, ordem Oscillatoriaceae e família Phormidiaceae. Há um grande número de espécies desta microalga, porém três se destacam. São elas: *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*), *Spirulina máxima* (*Arthrospira maxima*) e *Spirulina fusiformis* (*Arthrospira fusiforme*), por ser comestíveis e apresentar altos valores nutricionais e potenciais terapêuticos. (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004). A figura 8 representa a composição nutricional da *Spirulina*.

Figura 8 - Composição Nutricional da *Spirulina*



Fonte: Adaptado de Sinha *et al.*, (2018)

A *Spirulina* vem sendo utilizada na alimentação há muitos anos, devido seu alto conteúdo proteico, alta digestibilidade e sua composição de aminoácidos essenciais. Refeições contendo *Spirulina* ocorrem há séculos, índios como Kanembous e Astecas preparavam misturas com esta microalga, consumindo habitualmente. Os Kanembous e os astecas colhiam quando as mesmas se aglomeravam nas margens dos lagos, e as secavam-nas ao sol e, moldavam-nas em pequenos tabletes. (PIÑERO ESTRADA; BERMEJO BESCÓS; VILLAR DEL FRESNO, 2001).

A OMS classificou a *Spirulina* como um superalimento, devido ao seu alto teor nutritivo, principalmente proteico. A NASA a considera um excelente alimento para viagens espaciais, pois basta uma pequena quantidade para fornecer uma variedade de nutrientes. É considerada um alimento nutracêutico com efeitos benéficos à saúde, atuando na prevenção ou controle da hipercolesterolemia, certas doenças inflamatórias, alergias, câncer, toxicidade ambiental e toxicidade induzida por drogas, infecções virais, doenças cardiovasculares, diabetes dentre outras (KARKOS *et al.*, 2008; KHAN, BHADOURIA, BISEN, 2005; KULSHRESHTHA *et al.*, 2008).

A *Spirulina* é legalmente autorizada como complemento alimentar, nos USA pelo FDA na Europa e no Japão. No Brasil, a ANVISA permite sua comercialização, desde que os componentes do produto final estejam devidamente registrados. A *Spirulina platensis* é considerada uma das fontes naturais mais ricas e completas para a nutrição orgânica (LUPATINI *et al.*, 2016).

O estresse oxidativo, alterações no sistema imune, e inflamação crônica estão causalmente ligadas à patogênese de várias doenças, tais como, as doenças metabólicas induzidas pela obesidade, como a resistência à insulina, diabetes tipo 2, doença cardiovascular e doenças ligadas ao envelhecimento. Assim, os efeitos antioxidantes, imunomoduladores e anti-inflamatórios da *Spirulina* enfatizam sua importância na dieta humana (WU *et al.*, 2016).

Deng e Chow (2010) descreveram alguns benefícios terapêuticos da *Spirulina* em uma variedade de doenças, como, hipercolesterolemia, hiperglicerolemia, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, câncer e infecções virais. Estudos pré-clínicos com

vários modelos demonstraram consistentemente a atividade hipolipidêmica da *Spirulina*, com redução do colesterol sérico total, LDL e VLDL, outros estudos demonstraram os efeitos benéficos no perfil lipídico, como aumento do HDL e redução nos níveis de triglicerídeos.

Em estudos clínicos realizado com 36 voluntários saudáveis de ambos os sexos, e idades variando entre 18 e 65 anos, ingerindo 4.5 g de *Spirulina* por dia, durante seis semanas, mostraram que a *Spirulina* apresentou efeito hipolipemiante, ao reduzir os níveis de colesterol total e triglicerídios em 10 e 28%, respectivamente, e aumento no colesterol HDL em 15% e redução significativa do colesterol LDL. Paralelamente a esses parâmetros houve redução da pressão arterial (sistólica e diastólica) (TORRES-DURAN, FERREIRA-HERMOSILLO, JUAREZ-OROPEZA, 2007).

Efeitos hipolipemiante e hipoglicemiante foram também demonstrados em estudos clínicos com vinte e cinco pacientes com DM2. Os pacientes receberam uma dose de 2 g/dia de *Spirulina*, durante dois meses, e o grupo controle não recebeu nenhuma intervenção. No final do estudo, pacientes que consumiram a *Spirulina* apresentaram redução nos níveis de colesterol total sérico e na fração LDL; o HDL manteve-se ligeiramente aumentado. Houve também uma redução significativa nos níveis de triglicérides e de glicemia (em jejum e pós-prandial). Os níveis de apolipoproteína B mostram queda significativa com concomitante aumento do nível de apolipoproteína A1, no grupo controle. Os autores concluíram que, em pacientes com DM2, a *Spirulina* parece exercer efeitos hipolipidêmico e hipoglicemiante (PARIKH; MANI; IYER, 2001).

O envelhecimento é outro fator que predispõe ao aumento nos níveis de colesterol total e LDL. Assim sendo, foram realizados alguns estudos clínicos para investigar os efeitos terapêuticos da *Spirulina* na população idosa. Os dados obtidos nesses ensaios corroboram entre si que o suplemento de *Spirulina* é benéfico para o gerenciamento de alterações induzidas pelo envelhecimento no perfil lipídico na população idosa. (DENG; CHOW, 2010)

Os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da *Spirulina* são atribuídos principalmente à presença de, ficocianina, β -caroteno, tocoferol, ácido γ -linolênico e compostos fenólicos. A ficocianina tem a capacidade de eliminar os radicais livres, incluindo

os radicais alcoxil, hidroxil e peroxil. Diminui a produção de nitrito, inibe a peroxidação lipídica e suprime a expressão indutível de óxido nítrico sintase (iNOS) (DENG; CHOW, 2010).

Evidências indicam que polissacarídeos obtidos de *S. platensis* exercem efeito neuroprotetor contra morte neuronal, induzida por MPTP em neurônios dopaminérgicos, e provavelmente esse efeito se deve as suas propriedades antioxidantes. (ZHANG *et al.*, 2015). Garbuzova-Davis e Bickford (2010) mostraram que a suplementação nutricional com *Spirulina* tem papel neuroprotetor em neurônios motores, avaliada em modelo de esclerose lateral amiotrófica, em camundongos. O efeito neuroprotetor de *S. máxima*, outra espécie de *Spirulina*, foi mostrado em modelo neurotóxico causado pela 6-OHDA, em corpo estriado de ratos e, segundo os autores, essa neuroproteção está associada ao efeito antioxidante da droga (TOBÓN-VELASCO *et al.*, 2013). A neuroproteção da *S. platensis* também foi demonstrada, contra a morte neuronal induzida por ácido cáínico sendo mais uma vez, associada à propriedade antioxidante da *Spirulina* (PÉREZ-JUAREZ *et al.*, 2016).

Recentemente foi realizado um trabalho utilizando o extrato aquoso de *Spirulina platensis* em modelo de doença de Parkinson, induzida pela 6-OHDA (LIMA *et al.*, 2017), e foi demonstrado que o extrato apresentou efeito neuroprotetor ao reduzir o comportamento rotacional induzido pela apomorfina, aumentar nos níveis de DA e metabólitos; diminuir o estresse oxidativo; aumentar as imunomarcações para o transportador de DA e Tirosina Hidroxilase e diminuir a neuroinflamação evidenciada pela imunomarcação para iNOS, tais efeitos foram relacionados à suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante da *Spirulina platensis*.

2.7 Fração Proteica da *Spirulina platensis*

Do ponto de vista nutricional, é importante uma dieta com composição proteica balanceada e presença de lipídios, minerais e vitaminas. A *Spirulina* é rica em proteínas, vitaminas, minerais e muitos produtos biológicos de alta qualidade. O elevado teor proteico da *Spirulina* e rápido crescimento em ambientes minerais têm atraído a atenção de pesquisadores e empresários no mundo todo (DEMIR; TÜKEL, 2010).

A maior parte das proteínas consumidas pelos seres humanos é de origem animal e vegetal, sendo o restante destacadas como fontes proteicas não convencionais, as quais podem ser obtidas de microrganismos cultivados em meios de cultivo variados. As proteínas desempenham diversas funções biológicas, e isso não seria possível sem a complexidade de sua composição e suas diferentes formas estruturais tridimensionais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A utilização de proteínas é determinada pela digestibilidade, isto é, pelo valor do NPU (*net protein utilization*). O NPU corresponde à relação entre os aminoácidos convertidos em proteínas e os aminoácidos totais. Diferentemente de outros microrganismos considerados como fontes de proteína, a *Spirulina* não possui celulose em sua parede celular, mas apenas um frágil “envelope” de mureína. Isto explica a alta digestibilidade das proteínas da *Spirulina* (83-90%) e favorece o maior aproveitamento dos nutrientes (HABIB *et al.*, 2008)

As proteínas são constituintes importantes dos alimentos podendo perfazer até 40 a 50% de sua composição, considerada em base seca. Sua importância nos alimentos está na composição, propriedades nutritivas, físico-químicas, tecnológicas, funcionais e fisiológicas. O consumo dessas proteínas tanto nas formas de concentrados como isolados proteicos evidenciam propriedades muito favoráveis à saúde no sentido de diminuir o risco de doenças infecciosas e crônicas e/ou degenerativas (SGARBIERI, 1996; SGARBIERI, 2004)

As recentes descobertas nas áreas da bioquímica nutricional e biomédica contribuíram para desvendar as complexas relações existentes entre a nutrição e a incidência de várias doenças, indicando que proteínas contidas nos alimentos e peptídios delas derivados podem

desempenhar funções importantes na prevenção ou no controle de algumas condições patológicas. Alguns dos agentes funcionais derivados destes nutrientes são importantes na melhoria da saúde, na promoção do bem estar e no aumento da longevidade (SGARBIERI *et al.*, 2000).

A deficiência de proteínas na nutrição humana é uma grande preocupação para países em desenvolvimento; portanto, é necessário diversificar as fontes de proteínas e desenvolver novas fontes não convencionais. O alto teor de proteína de várias espécies de microalgas é uma das principais razões para considerá-las uma fonte não convencional no fornecimento desse nutriente e a *Spirulina platensis* se destaca por ser uma das fontes mais ricas em proteínas de origem microbiana, com níveis de proteína semelhantes ao encontrado na carne e na soja (LUPATINI *et al.*, 2017)

Dentre essas proteínas encontram-se as biliproteínas, que são complexos formados entre as proteínas e corantes, como a aloficocianina e em especial a c-ficocianina, pigmento azul solúvel em água que pode chegar a mais de 20% da fração proteica.

A ficocianina é um tipo de proteína assistente fotossintética que pode capturar com eficiência a energia luminosa, pertence à família das ficobiliproteínas e é caracterizada por uma cor azul profunda e intensa, apresenta grande importância como corante natural e há estudos que relatam que ela apresenta propriedades terapêuticas, com potencial de atuar como medicamento em uma ampla gama de aplicações clínicas, tais como, anti-câncer, anti-oxidação, citotoxicidade fotoinduzida, e estimulando o sistema imunológico (JIANG *et al.*, 2017) Há estudos que relatam que ela possui 20 vezes mais atividade antioxidante que o ácido ascórbico, sendo aplicada como anti-inflamatória e hepatoprotetora (SANTIAGO-SANTOS, 2004).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, com peso variando entre 250-300g, mantidos em caixa de polipropileno com no máximo seis animais, à temperatura média de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclos de alternância claro/escuro de doze horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*. Sendo utilizados cerca de 14 animais por grupo.

No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos de experimentação animal. O protocolo experimental foi encaminhado ao Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte, e os experimentos realizados de acordo com as normas internacionais de uso de animais em experimentação, sob o número 2018.01.12.

3.2 Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas foram: 6-hidrodopamina (Sigma-Aldrich, USA), apomorfina (Sigma-Aldrich, USA), cloridrato de ketamina (Vetanarcol®, Laboratório König S/A), cloridrato de xilazina (Kensol®, Laboratório König S/A), Os demais reagentes foram de grau analítico.

3.3 Cultivo de *Spirulina platensis* (Sp)

O *inóculo* veio da Antenna Technologies Foundation (Genève, Suíça), onde foi identificada anteriormente. Recebido como presente do Dr. Denis von der Weid, foi cultivado em laboratório, utilizando a mídia Zarrouk, e arejado com uma iluminação de 3000 lx por um período de 12 horas. Parâmetros físicos, químicos e microbiológicos foram sempre determinados, com um procedimento com o objetivo de controlar a intensidade da luz e diminuir a taxa de evaporação. Após a filtração, o material foi pesado para determinação da biomassa úmida e submetido à dessecação por 5 h. O material seco foi pesado novamente para medir a biomassa seca e, em seguida, mantido a -20°C até o uso (LIMA *et al.*,2017).

3.4 Teor total de proteínas do extrato aquoso de *S. platensis*

A quantificação das proteínas totais foi determinada por ensaio colorimétrico usando um kit de determinação de proteínas DC da Bio Rad (Califórnia, EUA). As amostras (5 µL de extrato de *S. platensis*) foram transferidas para uma placa de 96 poços, seguida pela adição de 25 µL de reagente A (tartarato de cobre alcalino) e 200 µL de reagente B (Folin) a cada poço, protegidos da luz.). Após 15 minutos em repouso à temperatura ambiente (25 °C) no escuro, a proteína total foi quantificada espectrofotometricamente a 750 nm em um leitor de microplacas. A curva de calibração para a determinação de proteínas foi preparada utilizando albumina sérica bovina (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0 mg / mL). Os resultados mostraram 455 mg / g (45,5%) de proteína total na solução aquosa do extrato de *S. platensis*. (LIMA *et al.*,2017).

3.5 Extração da Fração Proteica de *Spirulina platensis*

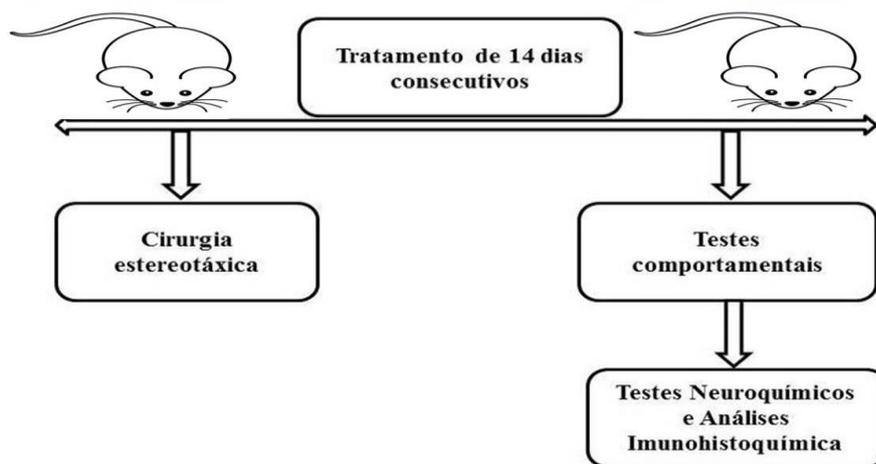
A extração de proteínas de *Arthrospira platensis* (sinonímia: *Spirulina platensis*) foi realizada em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 à 4 °C. Para isso, uma amostra seca da cianobactéria foi ressuspensa na proporção 1:10 (p/v) e submetida à sonicação (60Hz, 55 W) por 30 minutos em temperatura ambiente. O material sonicado foi centrifugado por 30 minutos a 4 °C, 10.000 *x g*. Em seguida, o sobrenadante contendo proteínas solúveis foi coletado e dialisado contra água destilada (cut off 12 kDa) e, então, considerado extrato proteico bruto de *Spirulina platensis* (do inglês: SpCE). A quantificação de proteínas de SpCE dialisado foi estimada por espectrofotometria pelo método de Bradford (1976) utilizando a albumina sérica bovina como padrão. Após a extração e diálise, SpCE foi liofilizado e armazenado a -20°C até os testes experimentais. A solução foi preparada misturando o liofilizado da FPS em água destilada.

3.6 Protocolo experimental da Doença de Parkinson

Utilizou-se a Fração Proteica da Spirulina nas doses de 5 e 10 mg/kg por via oral durante 14 dias após a injeção estereotáxica de 6-OHDA. Os grupos e protocolos experimentais podem ser vistos na Figura 9 e Quadro 1, respectivamente. O protocolo de

tratamento foi definido a partir de testes que avaliaram a atividade anti-inflamatória a nível periférico (edema de pata e formalina), nas doses de 5,10 e 25 mg/Kg e estudos realizados anteriormente com o extrato da *Spirulina platensis* nas doses de 25 e 50mg/Kg.

Figura 9 - Representação do protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito da FPS na Doença de Parkinson



Fonte: LOPES (2020).

Quadro 1. Protocolo de tratamento experimental

Grupos	Tratamentos
1.Falso Operado (FO)	Salina 2 µL, intraestriatal + veiculo v.o 14 dias
2.Controle (6-OHDA)	6-OHDA 12µg/2µL intraestriatal + veiculo v.o 14 dias
3.6-OHDA + Fração Proteica de <i>Spirulina platensis</i> (FPS5)	6-OHDA 12µg/2µL intraestriatal + FPSp 5 mg/Kg v.o 14 dias
4.6-OHDA + Fração Proteica de <i>Spirulina platensis</i> (FPS10)	6-OHDA 12µg/2µL intraestriatal + FPSp 10 mg/Kg v.o 14 dias

3.7 Cirurgia Estereotáxica: Injeção estereotáxica unilateral com 6-OHDA

Os animais foram anestesiados com ketamina na dose de 100 mg/kg (i.p.), em associação com o cloridrato de xilazina à 2% na dose de 9 mg/kg (i.p.), submetidos à tricotomia da porção superior da cabeça e imobilizados no aparelho de estereotaxia pelas barras auriculares, introduzidas no conduto auditivo externo. Uma incisão longitudinal e mediana na pele do crânio foi realizada com uma tesoura pequena, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o Bregma (junção entre as suturas saginal e coronal), de acordo com o atlas (PAXINOS; WATSON, 1986).

Foi calculado o ponto de implante a partir do *Bregma*, seguindo as coordenadas dos eixos ortogonais: Anteroposterior (AP), Latero-Lateral (LL) e Dorso-Ventral (DV). Os pontos foram obtidos através das seguintes coordenadas:

Quadro 2. Eixos ortogonais para localização do corpo estriado direito em ratos.

	AP	LL	DV
Ponto 1	+ 0,5	- 2,5	- 5,0
Ponto 2	- 0,5	- 3,7	- 6,5

Fonte: Paxinos e Watson (1986)

Ao encontrar os pontos desejados, foi realizado um orifício com o auxílio de uma broca de dentista em cada local de referência. A seguir, com uma microseringa Hamilton, com capacidade de 5 μ L, foi injetado 1 μ L da solução de 6-OHDA na concentração de 12 μ g/2 μ L, sendo 6 μ g/1 μ L em cada ponto de infusão. Para assegurar que o seu conteúdo fosse injetado corretamente, a microseringa permaneceu nos locais da aplicação por cinco minutos e depois foi cuidadosamente retirada. Os animais Falso-Operado (FO) receberam a injeção de 1 μ L de salina em cada local. Após as injeções, os animais foram suturados com fio cirúrgico de nylon 3.0 com pontos simples e devolvidos as gaiolas, para recuperação cirúrgica, com livre acesso à água e comida (CALOU *et al.*, 2014).

3.8 Testes Comportamentais

3.8.1 Teste do Campo Aberto (TCA)

O teste do campo aberto permite avaliar a atividade exploratória e locomotora do animal, e consiste de uma arena quadrada de madeira, confeccionada artesanalmente medindo 50 x50 cm, tendo o piso dividido em quatro quadrantes iguais. Durante o teste os animais foram colocados na arena e deixados para explorar o ambiente por 5 (cinco) minutos, foram registrados o número de cruzamentos, com as quatro patas (atividade locomotora espontânea) e o número de vezes que o animal se levantou para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras, caracterizando o comportamento exploratório vertical (*rearing*). A arena era limpa com álcool a 70% após cada animal ser retirado, e secado com papel toalhas, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferisse no teste. O ambiente foi iluminado com luz vermelha. (BROADHURST, 1957)

3.8.2 Teste do Nado Forçado (TNF)

Esse teste é um dos modelos comportamentais mais utilizados para detectar a efetividade de agentes antidepressivos, por meio do aumento da atividade natatória do animal (PORSOLT *et al.*, 1978).

Os animais foram colocados em um cilindro de acrílico (60 cm de altura e 23 cm de diâmetro), contendo 25 cm de água por 6 (seis) minutos, com o primeiro minuto de adaptação e registrado o tempo de imobilização nos 5 (cinco) minutos posteriores, sendo considerado “imobilidade” quando o animal realiza apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água.

3.8.3 Teste Rotacional Induzido por Apomorfina (TRIA)

A gravidade da depleção de dopamina foi avaliada pelo comportamento rotacional induzido po apomorfina. Este é um teste sensível para lesões estriatais com extensões maiores que 80%. (DEUMENS *et al.*, 2002).

Esta avaliação foi realizada duas semanas após a lesão com 6-OHDA, por meio do monitoramento do número de rotações completas em volta do próprio eixo, em sentido contralateral a lesão, induzidos pela apomorfina (3 mg/kg i.p.), sendo, observado durante 60 minutos (KIM *et al.*, 1998).

Após os testes comportamentais os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação em guilhotina para os estudos neuroquímicos (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*), determinação da produção de nitrito e TBARS e imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH), Transportador de Dopamina (DAT), Cicloxigenase -2 (COX-2) e Óxido nítrico sintase induzível (iNOS).

3.9 Dissecção das áreas cerebrais (Corpo Estriado, Córtex Pré-Frontal e Hipocampo)

Para a realização dos testes neuroquímicos (estresse oxidativo, dosagem de monoaminas e seus metabólitos) foram dissecadas as áreas cerebrais: córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado direito (CED). Os animais foram decapitados com guilhotina (Harvard, USA), em seguida os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em uma placa de gelo. Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com uma pinça reta de microdissecação que divulsionou o córtex delicadamente, expondo as áreas cerebrais de interesse do estudo (Cortex Pre Frontal, Hipocampo). Após pesadas, as áreas foram guardadas em eppendorf a -20°C ou depositados em formol tamponado e, posteriormente, álcool a 70% para o estudo histológico. Para análise imunohistoquímica foi realizado um corte coronal no nível de hipocampo Giro Denteado (GD), Corno de Ammon 1 e 3 (CA1 e CA3) e Córtex Temporal(CT) (CALOU,2013).

3.10 Testes Neuroquímicos

3.10.1 Determinação do conteúdo de Nitrito

Nesse ensaio o reagente de Griess (sulfanilamida 1 %, em H₃PO₄ 1 %, /N-(1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 % / H₃PO₄ 1 % / diluído em água (1:1:1:1)) revela a presença de nitrito em uma amostra. Em condições ácidas, o nitrito reage com a sulfonilamida formando um composto intermediário, o sal diazônico. Em seguida este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NEED) formando um azo estável de coloração púrpura.

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (v/v), em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (4000 rpm/10 min), os sobrenadantes são coletados e a produção de NO determinada pela reação de Griess. Uma alíquota de 100 µl do sobrenadante com 100 µl do reagente de Griess são mantidos à temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida no leitor de Elisa a 570nm. A curva padrão foi obtida pesando 7mg de nitrito de sódio (NaNO₂) e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM). Foram feitas as diluições em série (10 e 20x), ficando 1 mM, 100 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,312 µM. A concentração de nitrito (µM) foi determinada, a partir da curva padrão de NaNO₂ (GREEN *et al.*, 1982).

3.9.2 Determinação da Concentração de TBARS

A peroxidação lipídica é uma importante expressão orgânica de estresse oxidativo induzida pela reatividade de radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para determinação do malonildialdeído (MDA) em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesta reação duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA formando uma solução de cor rosa conforme o método de Draper e Hadely (1990).

Os homogenatos das áreas cerebrais (CPF, HP,) foram preparados a 10% em solução de Cloreto de Potássio (KCl) 1,15%. Uma alíquota de 50 µL do homogenato foi misturada a 200 µL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,6% e 200 µL da solução de ácido tricloroacético

10%. Após a agitação, essa mistura foi mantida no banho- Maria (95-100°C) durante 15 minutos. Em seguida foi resfriada em banho de gelo até voltar à temperatura ambiente, posteriormente centrifugada (4000 rpm/5 min) e colocados 100 µL em pocinhos para leitura em Elisa com comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em µmol de MDA/g de tecido. A curva foi obtida mediante leitura de várias concentrações de MDA padrão (0,6; 1,2; 2,4; 4,08; 8,16; 16,32 µmol).

3.10.3 Determinação das concentração de Dopamina e DOPAC

Os tecidos cerebrais (corpo estriado direito e esquerdo) foram homogeneizados a 10% em ácido perclórico (HClO₄), centrifugados por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 14.000 rpm, e filtrados com o auxílio de uma membrana de esteres gs diam. 47 mm e poro 0,22 µm, branca e lisa (milipore), após uma alíquota de 20 µL foi, então, injetada no equipamento de HPLC para a análise química. Para a análise de DA e metabólitos, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, espessura de 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 µm da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS) e Cloreto de Sódio (NaCl), juntamente com acetonitrila 4% v/v e tetrahydrofurano 1,7% v/v. DA e metabólitos foram eletronicamente identificados através de um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V, relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl. Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng/mL de DA e metabólitos (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa Microsoft Excel® em um computador e os resultados obtidos foram transferidos e analisados no programa *Prisma*®, expressos em ng/g de tecido. (CALOU, 2014)

3.11 Análise Imunohistoquímica

Para a realização dos procedimentos imunohistoquímicos os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA), Os cérebros foram removidos por inteiro, depois divididos em dois por um corte coronal com uma lâmina. A porção do cérebro,

contendo o Corpo Estriado, Hipocampo e Cortex Total foram preparadas para os testes. Essas amostras foram acondicionadas em formol tamponado 4% para fixação do material e, após 24h, esta solução foi substituída por álcool a 70%.

Os dados das fotomicrografias foram quantificados em densidade óptica (DO) relativa pelo software ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, USA). Foi realizada uma análise semi-quantitativa de densidade óptica das imagens digitalizadas dos cortes histológicos imunomarcados.

3.11.1 Imunohistoquímica contra Tirosina Hidroxilase (TH)

A Tirosina Hidroxilase é uma enzima limitante no processo de síntese de DA, que catalisa a hidroxilação de L-tirosina para DOPA, por isso, é um importante marcador molecular de neurônios dopaminérgicos. A detecção imunohistoquímica foi realizada no corpo estriado. Para examinar a extensão da desnervação presente na substância negra, a imunorreatividade, a TH foi avaliada sobre os lados lesionado Corpo Estriado Direito (CED). Os cortes foram lavados três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4), por 5 minutos; o bloqueio da peroxidase endógena foi feita com peróxido de hidrogênio 0,3% (H₂O₂), durante 10 min, e depois lavados com PBS. Em seguida, os cortes foram incubados com o anticorpo primário (1:200, anti-TH; “*antibody produced in mouse*”, Santa Cruz) e deixados *overnight* a 4°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas 3 (três) vezes em PBS, por 5 min e, em seguida, os cortes incubados com o anticorpo secundário (1:200, *goat anti-mouse* IgG, Santa Cruz). A revelação foi feita com DAB (diaminobenzidina 0,05%, em 0.03% H₂O₂) por 5–10 min. Após lavagem com PBS, os cortes foram cobertos com lamínula para posterior exame (LIMA, 2017).

3.11.2 Imunohistoquímica contra transportador de dopamina (DAT)

DAT é o transportador transmembrana de dopamina que fica localizado na terminação nervosa pré-sináptica, onde é responsável por finalizar a atividade de dopamina pela

recaptação pré-sináptica desse neurotransmissor, ou seja, o transporte de dopamina para o sítio pré-sináptico (RACHAKONDA *et al.*, 2004). O procedimento segue o mesmo para TH, sendo o anticorpo anti-DAT, diluído em 1:100.

3.11.3 Imunohistoquímica para COX-2 e iNOS

Pesquisas indicam que os níveis de COX2 e iNOS encontram-se aumentados em cérebros de pacientes com DP, e isso pode ser reproduzido também no modelo de 6-OHDA. (LIMA, 2018). Foram realizadas as imunohistoquímicas para COX-2 e iNOS no hipocampo/córtex dos animais do estudo. Os cortes histológicos feitos foram de 3 a 4 µm de espessura e as lâminas foram colocadas em estufa a 60°C por 3 horas.

As técnicas de imunohistoquímica seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os anticorpos primários anti-COX2 e anti-iNOS foram usados na diluição 1:200, de acordo com as instruções do fabricante, durante 24 h a 4 ° C.

3.12 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 7.0*. Os dados que apresentaram uma distribuição paramétrica foram analisados pelo teste de Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguidos do teste de comparações múltiplas “t” de *Student Unpaired (post hoc)*. Os dados que não apresentaram uma distribuição paramétrica foram analisados pelo teste de *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de *Dunnett (post hoc)*. Em todas as análises (paramétricas e não paramétricas), considerou-se estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos Comportamentais

4.1.1 Teste do campo aberto

A doença de Parkinson é uma doença crônica, progressiva e neurodegenerativa, caracterizada pela redução de dopamina na via nigroestriatal, resultando na morte de neurônios da substância negra, afetando os movimentos, causando tremores, lentidão, rigidez muscular, alterações na postura e na marcha e dificuldades na fala e na escrita. (SIMUNI, 2007).

A causa da DP continua desconhecida e ainda não existe nenhum tratamento definitivo para a doença. O tratamento utilizado atualmente é a Levodopa que embora seja eficaz do ponto de vista sintomático é incapaz de fornecer uma proteção duradoura necessária para impedir a progressão da doença. (DOUNA *et al.*, 2012). Por isso, cada vez mais, pesquisadores recorrem aos modelos animais de DP na concepção de novas abordagens farmacológicas, no desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e na compreensão da natureza dos processos patogênicos envolvidos na perda neuronal. Os dois modelos animais mais utilizados são o com 6-OHDA e MPTP. Destes, o modelo 6-OHDA tem sido mais amplamente utilizado nos ensaios para novos agentes sintomáticos, bem como para avaliar novas estratégias neuroprotetoras (DUTY; JENNER, 2011).

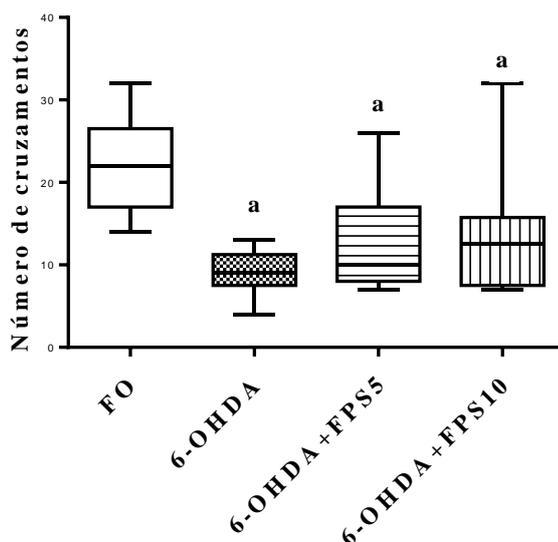
Drogas que apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante são fortes candidatos a neuroproteção. Lima (2018), em seu estudo padronizou o extrato aquoso de *Spirulina platensis*, do qual foi isolada a Fração Proteica deste estudo e constatou em sua composição a presença de fenóis totais e proteína, concluindo que, esta cianobactéria, além de ser uma fonte rica de proteína, possui também propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e neuroprotetoras, importantes para o tratamento de patologias neurodegenerativas como a Doença de Parkinson.

Como a lesão estriatal por 6-OHDA pode ocasionar alterações locomotoras dos animais, avaliamos o efeito da FPS em relação à atividade locomotora no teste campo aberto através dos parâmetros, número de cruzamentos e exploração vertical do rato.

A atividade locomotora, determinada pelo número de cruzamentos (NC) em 5 minutos, mostrou uma redução de 59 % no grupo lesionado por 6-OHDA não tratado, quando comparado ao FO. Nos grupos lesionados e tratados com FPS na dose de 5 e 10mg/kg, não apresentaram diferença significativa na atividade locomotora, quando comparado ao grupo 6-OHDA (Figura 10).

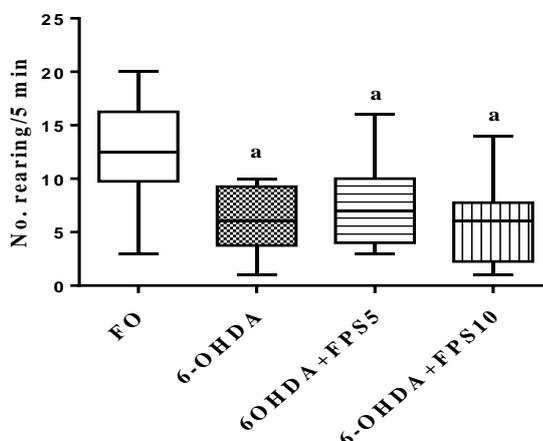
Com relação ao comportamento exploratório vertical, determinado pelo Número de *Rearing* (NR) em 5 minutos, demonstrou que a lesão com 6-OHDA diminuiu em torno de 50% o NR em relação ao grupo FO, não houve diferença significativa com relação ao grupo lesionado e tratados com a FPS5 e FPS10 mg/Kg. (Figura 11).

Figura 10 - Efeitos da FPS sobre o número de cruzamentos em ratos parkinsoniano



Nota: Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo, analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguidos pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Representam o número de cruzamentos (NC, em 5 minutos) de ratos Falso-Operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10mg/Kg (vo) por 14 dias (n=14), onde, **a.** vs FO, $p < 0,05$

Figura 11 - Efeitos da FPS sobre a o número de *Rearing* (exploração vertical) em ratos parkinsonianos



Nota: Os valores são expressos em mediana, mínimo e máximo, analisados pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguidos pelo teste de comparações múltiplas de *Dunn*. Representam o Número de Rearing (NR , em 5 minutos) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal por 6- OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10mg/Kg (vo) por 14 dias (n=14) onde, **a** vs FO, $p < 0,05$

Tendo em vista que a dopamina é essencial para a coordenação motora e a diminuição nos níveis deste neurotransmissor acarreta na falha desse sistema (KUMAR *et al.*, 2012), constatamos neste estudo que a administração intraestriatal de 6-OHDA reduziu de forma significativa à atividade locomotora dos animais do grupo 6-OHDA, (avaliada pelo teste do campo aberto), e os grupos lesionados e tratados com a FPS nas doses de 5 e 10 mg/kg não apresentaram melhora na atividade locomotora quando comparado ao grupo 6-OHDA. Os resultados obtidos corroboram com os do estudo de Lima (2018), que demonstrou que o tratamento com o extrato aquoso de *Spirulina platensis* não apresentou melhora na atividade motora causada pela injeção de 6-OHDA, no teste do Campo Aberto. Já no estudo de Chattopadhyaya *et al.*, (2015), os animais com parkinsonismo induzido por 6-OHDA, tratados com *Spirulina fusiforme*, outra espécie da *Spirulina*, apresentaram melhora na coordenação motora no teste de Rotarod. Kumar *et al.*, (2017), também demonstraram em um modelo de doença de Parkinson induzida por paraquat que a suplementação dietética de *Spirulina platensis* melhora significativamente a atividade locomotora das moscas *DJ-1 β ^{A93}*.

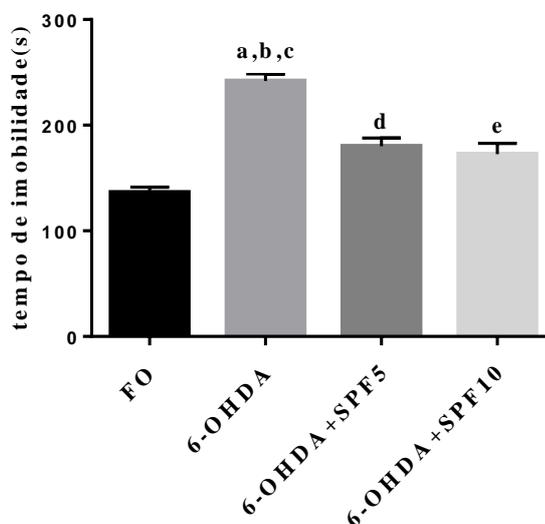
O teste do campo aberto utilizado para avaliar a bradicinesia, um dos sinais cardinais da doença, em animais que sofreram indução experimental da DP, nem sempre apresenta efeitos sobre a movimentação animal como observado no trabalho realizado por Barbiero e colaboradores (2011), o que indica que este teste, por mais que nos dê uma boa ideia da atividade motora do animal, não tem uma aplicação tão direta nestes modelos, como tem o teste de comportamento rotacional por apomorfina.

4.1.2 Teste do Nado Forçado

Apesar de tradicionalmente a Doença de Parkinson ser reconhecida como uma doença do movimento, a mesma pode apresentar também alterações não motoras (MCDONALD; RICHARD; DELONG, 2003). Dentre as manifestações não motoras, a que apresenta maior índice é a depressão. Sua prevalência varia bastante (4% a 70%) nos diferentes estudos, porém, situa-se em torno de 40%. No entanto, não se sabe ao certo qual a causa desta alta incidência. Cogitam-se duas causas: psicológica (questões relacionadas à doença de consequências motoras limitantes e até mesmo incapacitantes) e/ou disfunção cerebral. Geralmente ocorre em estágios iniciais e finais (FERREIRA *et al.*, 2010).

A depressão é a alteração não motora mais comum em pacientes com DP, e quando não tratada pode intensificar os outros sintomas. A atividade antidepressiva - simile, determinada pelo tempo de imobilidade em 5 minutos, avaliado através do TNF, demonstrou que o grupo lesionado por 6-OHDA ($242 \pm 6,73$), apresentou um aumento de 1,78 vezes no tempo de imobilidade em relação ao grupo FO, ($136 \pm 5,21$) O tratamento com FPS nas doses de 5 ($180,0 \pm 7,92$) e 10 mg/kg ($172 \pm 10,24$) reduziu parcialmente o tempo de imobilidade quando comparado ao grupo lesionado (6-OHDA), (Figura 12).

Figura 12 - Efeitos da FPS sobre a atividade antidepressiva-símile em ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM do tempo de imobilidade (TI, em 5 minutos) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 10 e 5 mg/Kg (vo) por 14 dias (n=15 a 20). **a** vs FO, $p < 0,0001$; **b** vs 6-OHDA + FPS 5, $p < 0,0001$; **c** vs 6-OHDA + FPS 10, $p < 0,0001$; **d** vs FO, $p = 0,0007$; **e** vs FO, $p = 0,0073$. (ANOVA *multiple comparisons*).

Neste estudo demonstramos que os tratamentos com a FPS reduziu parcialmente o tempo de imobilidade do animal, quando comparado ao grupo lesionado não tratado (6-OHDA). Resultados similares foram obtidos por Serpa *et al.*, (2017). Em seu estudo os animais lesionados unilateralmente por 6-OHDA e tratados com a *Spirulina platensis* demonstraram uma redução no tempo de imobilidade ao serem submetidos ao teste do nado forçado. De acordo com Lima (2018), há outros estudos relatando efeitos de drogas feitas a partir de plantas ou produtos naturais sobre a depressão em modelos animais de doença de Parkinson, porém seus mecanismos não são claros.

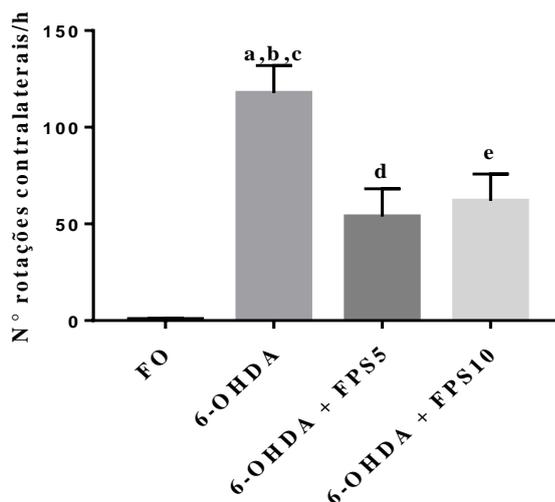
4.3.5 Teste rotacional induzido pela apomorfina

O teste da apomorfina é considerado como padrão-ouro para análises de lesões causadas pela 6-OHDA, porque é robusto, confiável e detecta as alterações na sensibilidade dos receptores de dopamina estriatais, proporcionando dessa forma, a verificação de extensas lesões nigroestriatais (MEREDITH; KANG, 2006).

A apomorfina é um agonista do receptor DA que, em baixas doses, provoca rotações contralaterais ao estimular ambos os receptores D1 e D2 supersensíveis, preferencialmente no lado desnervado. No entanto, só haverá uma resposta positiva se a porcentagem da dopamina perdida for muito elevada (CALOU *et al.*, 2014). As rotações contralaterais e/ou ipsilaterais à lesão estriatal são comportamentos motores que podem ser observados durante o teste. Estas respostas antagonônicas estão associadas ao nível da lesão no sistema nigro estriatal e a presença de alterações morfológicas e funcionais nos neurônios espinhosos médios do estriado (IANCU *et al.*, 2005).

Neste estudo o comportamento rotacional, determinado pelo número das rotações contralaterais induzidas pela apomorfina examinada em 1 hora, demonstrou que o grupo 6-OHDA ($117,7 \pm 14,15$), aumentou cerca de 117 rotações contralaterais por hora, quando comparado com o grupo FO que não apresentou nenhum comportamento rotacional. O número de rotações diminuiu cerca de 54,2% e 47,3% , nos grupos lesionados e tratados com a FPS nas doses de 5 ($53,85 \pm 14,32$) e 10 mg/kg ($61,92 \pm 13,92$) respectivamente, quando comparados ao grupo 6- OHDA (Figura 13).

Figura 13 - Efeito da inibição da FPS sobre comportamento rotacional induzido pela apomorfina em ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM do número de rotações contralaterais (NRC, em 1 hora) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 10 e 5 mg/Kg (vo) por 14 dias. **a** vs FO, $p < 0,0001$; **b** vs 6-OHDA + FPS 5, $p = 0,0008$; **c** vs 6-OHDA + FPS 10, $p = 0,0052$; **d** vs FO, $p = 0,0029$; **e** vs FO, $p = 0,0007$. (ANOVA *multiple comparisons*).

O desequilíbrio no conteúdo de dopamina entre os lados esquerdo e direito do cérebro causa a assimetria rotacional, consequentemente o animal começa a apresentar rotações oriundas do lado cerebral de maior atividade devido a presença de um maior número de neurônios dopaminérgicos viáveis (UNGERSTEDT, 1971). Estudos anteriores: (CHATTOPADHYAYA *et al.*, 2015; LIMA *et al.*, 2017), demonstraram aumento no número de rotações contralaterais dos ratos lesionados no teste da apomorfina duas a três semanas após a indução da lesão com 6-OHDA, em contrapartida os animais lesionados e tratados com a *Spirulina* apresentaram uma diminuição significativa deste parâmetro, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. O tratamento com a FPS mostrou seu possível efeito neuroprotetor, ao diminuir as rotações contralaterais neste teste e isto provavelmente esteja ligado à preservação parcial dos níveis de dopamina no corpo estriado, demonstrado pelos resultados de monoaminas realizados pelo HPLC.

4.4 Avaliação Neuroquímica

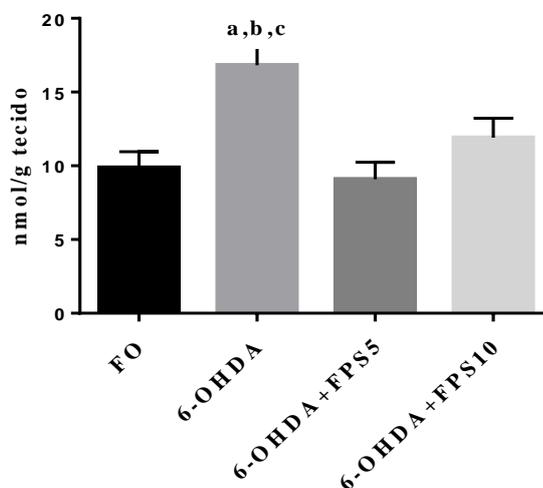
4.2.1 Concentração de Nitrito/Nitrato (NO₂/NO₃) em tecidos cerebrais (Córtex Pré-Frontal e Hipocampo) de ratos parkinsonianos

A partir a dosagem de NO₂/NO₃ podemos avaliar de modo indireto, a concentração de óxido nítrico no tecido tendo em vista que estes dois são seus metabólitos.

A avaliação da concentração de nitrito/nitrato (μM) no CPF de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA mostrou uma produção de nitrito igual a 16,82 ±1,3 e o tratamento com FPS nas doses de 5 (9,09±1,14) e 10 mg/kg (11,92±1,3) foram capazes de reduzir em 45,9% e 29,1% respectivamente, as concentrações de nitrito/nitrato (Figura 14).

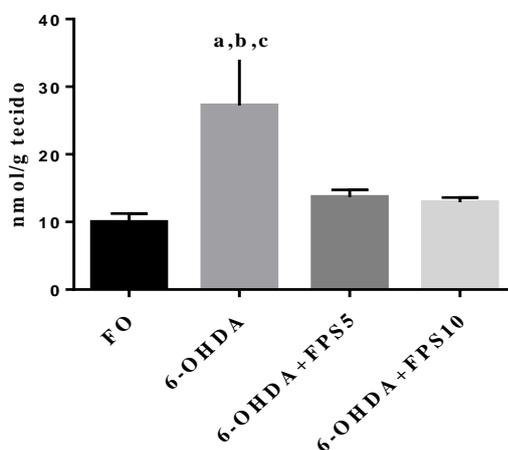
Quanto a concentração de nitrito/nitrato (μM) no hipocampo de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA mostrou uma produção de nitrito igual a 27,21±7,21 e o tratamento com FPS nas doses de 5mg/kg (13,76±1,08) e 10 mg/kg (12,91±0,71) foram capazes de reduzir em 49,4% e 52,5% respectivamente, as concentrações de nitrito/nitrato (Figura 15).

Figura 14 - Efeito da FPS sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) em Córtex Pré-Frontal (CPF) de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da concentração de nitrito (μ M) em CPF de ratos submetidos à lesão estriatal por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10mg/Kg (vo). **a** vs FO, $p=0,0009$; **b** vs 6-OHDA + FPS5, $p=0,0003$; **c** vs 6-OHDA + FPS10, $p=0,0284$ (ANOVA *multiple comparisons*).

Figura 15 - Efeito da FPS sobre a concentração de nitrito/nitrato (NO₂/NO₃) em Hipocampo (HP) de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da concentração de nitrito (μ M) em hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10mg/Kg (vo) ($n=9$ a 15). **a** vs FO, $p=0,0116$; **b** vs 6-OHDA + FPS5, $p=0,0369$; **c** vs 6-OHDA + FPS10, $p=0,0196$ (ANOVA *multiple comparisons*).

Neste estudo, vimos que a injeção de 6-OHDA produziu dano oxidativo, ao apresentar elevação das concentrações de TBARS e do nitrito/nitrato nas áreas estudadas, CPF e HP. O

estudo de Costa (2016) já havia evidenciado que a 6-OHDA apresenta efeitos oxidativos sobre várias regiões do cérebro, tais como CPF, cerebelo e HP, sendo este último o primeiro a sofrer os efeitos da 6-OHDA na indução deste processo, mesmo antes do surgimento do comprometimento motor decorrente da perda da regulação dopaminérgica na via nigroestriatal. Isso demonstra que a destruição progressiva produzida pela 6-OHDA pode afetar outras áreas cerebrais e não somente aos neurônios da via nigroestriatal.

Neste estudo foi utilizado o método de Griess para determinar as concentrações de nitrato / nitrito e o teste de tiobarbitúrico para malonaldeído para determinar a peroxidação lipídica nas áreas cerebrais de animais parkinsonianos (Córtex Pré Frontal e Hipocampo) Os resultados demonstraram que o 6-OHDA promoveu aumento significativo nos níveis de nitrito/nitrato e peroxidação lipídica (TBARS) que são indicadores indiretos de EO. Outros trabalhos já relataram que a indução de 6-OHDA na região nigroestriatal causa aumento dos níveis de nitrito e TBARS (RAJAEI *et al.*,2016; LIMA *et al*, 2017). Estudos realizados anteriormente com a *Spirulina* corroboram com os resultados obtidos neste estudo. Bermejo-Bescós *et al.*,(2008), mostraram que o extrato proteico de *S. platensis* e da ficocianina apresentaram atividade antioxidante nas células da linhagem SH-SY5Y(neuroblastoma humano), protegendo a atividade das enzimas antioxidantes celulares (GPx total, GPx-Se e GR) bem como aumentando a glutatona reduzida nas células contra o estresse oxidativo induzido pelo ferro, sugerindo que o extrato protéico de *S. platensis* é um poderoso antioxidante, uma vez que, foi capaz de interferir na morte celular mediada por radicais livres. Tobón-Velasco *et al.*, (2013), demonstraram em seus estudos, que o tratamento crônico com *Spirulina máxima*, outra espécie da *Spirulina*, apresenta efeito protetor contra a toxicidade causada pelo 6-OHDA no estriado de ratos, ao diminuir os níveis de óxido nítrico, ERO e lipoperoxidação na referida área cerebral. O estudo de Lima *et al.*,(2017) mostrou que o tratamento com a *Spirulina platensis* (SPI) reduziu significativamente o aumento dos níveis de nitrito/nitrato no estriado direito (lesionado) quando comparado ao grupo 6-OHDA não tratado, corroborando com resultado deste estudo.

Portanto, vimos que a 6-OHDA intensificou a produção de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal e no hipocampo e o tratamento com a FPS apresentou potencial antioxidante ao reduzir de forma significativa este parâmetro, acompanhada da diminuição nas concentrações

de TBARS e redução na imunomarcação para isoforma iNOS justificando, seu possível efeito neuroprotetor.

4.2.2 Concentração de TBARS em tecidos cerebrais (Cortex Pré - Frontal e Hipocampo) de ratos parkinsonianos

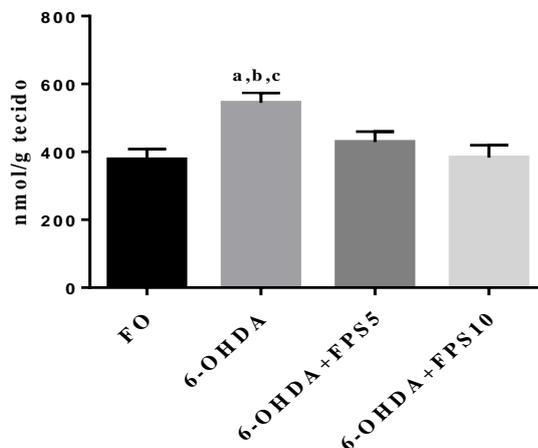
O aumento do produto de Peroxidação Lipídica, em termos do nível de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), juntamente com a diminuição do nível de moléculas antioxidantes endógenas no cérebro, podem contribuir para a morte neuronal dopaminérgica (VERMA; NEHRU, 2009).

A peroxidação lipídica tem sido considerada como fenômeno deletério associado a doenças neurodegenerativas. Em contrapartida a C-ficocianina, principal composto ativo das algas azul-verde *Spirulina platensis*, presente em grande quantidade na fração proteica, apresenta propriedades antioxidantes bem conhecidas, mas seu efeito sobre a peroxidação lipídica precisa ser mais estudado (ROCHE *et al.*, 2018)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) se formam como subproduto da peroxidação lipídica. A avaliação da concentração de malonildialdeído (MDA) no CPF de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA mostrou um aumento de $544,1 \pm 30,37$ e o tratamento com FPS nas doses de 5 ($429 \pm 30,42$) e 10 mg/kg ($382,7 \pm 36,76$) foram capazes de reduzir em 21,1% e 29,6% respectivamente, os níveis de peroxidação lipídica, expressa como conteúdo de MDA ($\mu\text{M/g}$ de tecido) (Figura 16).

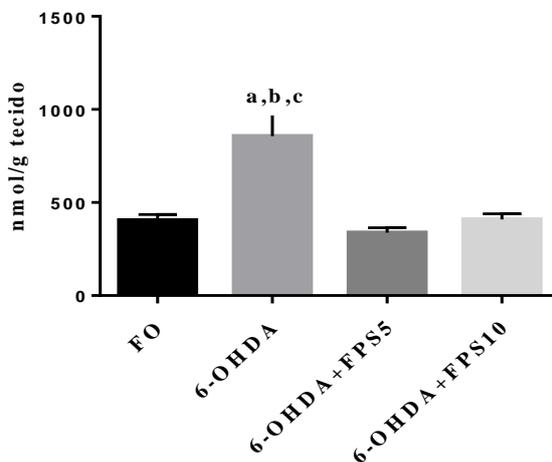
Quanto a concentração de MDA no HP de ratos com lesão estriatal por 6-OHDA mostrou um aumento de $856,5 \pm 126,0$ (n=12) e o tratamento com FPS nas doses de 5 ($337,8 \pm 26,20$) e 10 mg/kg ($408,9 \pm 30,87$) reduziram em 60,6% e 52,2% respectivamente, os níveis de peroxidação lipídica, expressa como conteúdo de MDA (malonildialdeído) ($\mu\text{M/g}$ de tecido) (Figura 17).

Figura 16 - Efeito da FPS sobre a concentração de TBARS em Córtex Pré -Frontal de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da concentração de TBARS (μ M) em Córtex Pré Frontal de ratos submetidos à lesão estriatal por 6- OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10 mg/Kg (vo) por 14 dias. **a** vs FO, $p=0,0053$; **b** vs 6-OHDA + FPS5, $p=0,0030$; **c** vs 6-OHDA + FPS10, $p=0,0045$. (ANOVA e teste *t-Student Unpaired*, como teste *post hoc*).

Figura 17 - Efeito da FPS sobre a concentração de TBARS em Hipocampo (HP) de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da concentração de TBARS (μ M) em hipocampo de ratos submetidos à lesão estriatal por 6- OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10 mg/Kg (vo) por 14 dias. **a** vs FO, $p<0,0001$; **b** vs 6-OHDA + FPS5, $p<0,0001$; **c** vs 6-OHDA + FPS5, $p<0,0001$ (ANOVA e teste *t-Student Unpaired*, como teste *post hoc*).

Os resultados deste trabalho demonstraram que o 6-OHDA promoveu aumento significativo nas concentrações de TBARS e o tratamento com a FPS reduziu significativamente os níveis de TBARS tanto no Cortex pré frontal quanto no Hipocampo quando comparado com o grupo lesionado.

Deng e Chow (2010) investigaram o efeito antioxidante do extrato metanólico de *Spirulina* na peroxidação lipídica espontânea em homogenato de cérebro de rato, e demonstrou que o extrato de *Spirulina* inibe drasticamente a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malondialdeído (MDA), em quase 95%, indicando a potente atividade antioxidante da *Spirulina*. Lima *et al.*,(2017) mostraram em seu estudo que o tratamento com a *Spirulina platensis* reverteu significativamente o aumento dos níveis de peroxidação lipídica no estriado direito (lesionado) do grupo 6-OHDA não tratado.

Deste modo, o tratamento com a FPS apresentou um possível efeito neuroprotetor, ao apresentar atividade antioxidante uma vez que foi capaz de reduzir de forma significativa a concentração de TBARS (marcador de peroxidação lipídica), diminuir as concentrações de nitrito/nitrato e inibir a imunomarcção para iNOS mostrados nos ensaios imunohistoquímicos.

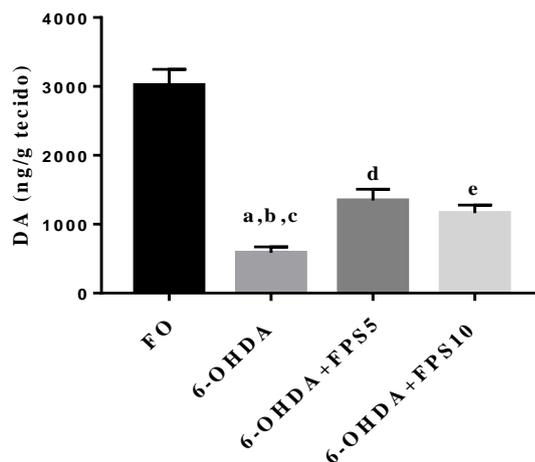
4.2.3 Avaliação dos níveis estriatais de Dopamina (DA) e seu metabolito DOPAC

A principal característica neuroquímica da doença de Parkinson é a depleção dopaminérgica no sistema nigroestriatal devido à denervação neuronal local. A observação dos níveis de dopamina e de seus metabólitos na via nigroestriatal consiste em uma ferramenta importante na busca de agentes que consigam restabelecer ou aumentar a transmissão dopaminérgica com conseqüente melhora do quadro global da doença.

Diminuição na concentração de dopamina (DA) e DOPAC no estriado direito dos animais já era esperada e, de fato, foi observada neste estudo. A injeção intraestriatal de 6-OHDA causou dano neuronal dopaminérgico, reduzindo as concentrações de DA em 80,6 % no grupo 6-OHDA ($584,9 \pm 85,4$) quando comparado ao FO ($3018 \pm 229,4$). Após tratamentos com FPS5 ($1345 \pm 161,9$) e 10 mg/kg ($1162 \pm 117,7$) aumentou parcialmente os níveis de DA, quando comparado ao grupo 6-OHDA (Figura 18).

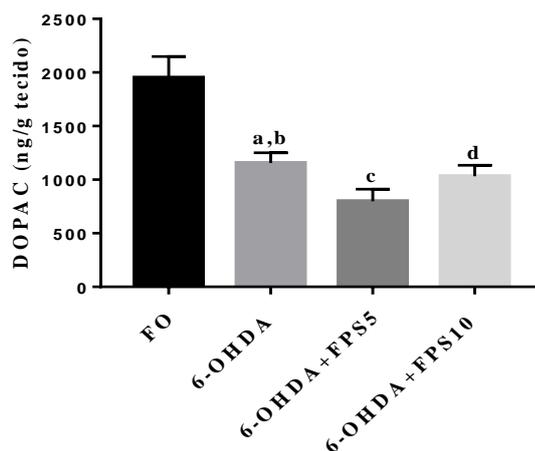
Já em relação ao DOPAC, reduziu em 40,8% no grupo 6-OHDA (584,9±85,4) quando comparado ao FO (3018 ± 229,4). O grupo tratado com FPS 10 (1033±102,1) não apresentou resultado significativo em relação ao grupo lesionado não tratado (6-OHDA) (1154± 97,81) (Figura 19).

Figura 18 - Níveis de DA no estriado direito de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias ± EPM dos níveis de DA (ng/g de tecido) em corpo estriado de ratos Falso-Operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10 mg/Kg (vo) por 14 dias. **a.** vs FO, $p < 0,001$; **b.** vs 6-OHDA + FPS5 $p = 0,0003$; **c.** vs 6-OHDA + FPS10, $p = 0,0116$; **d.** vs FO, $p < 0,001$; **e.** vs FO, $p < 0,001$ (ANOVA e teste *t-Student Unpaired*, como teste *post hoc*).

Figura 19 - Níveis de DOPAC no Estriado Direito de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias ± EPM dos níveis de DOPAC (ng/g de tecido) em corpo estriado de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS nas doses de 5 e 10 mg/Kg (vo) por 14 dias. **a.** vs FO, $p = 0,0008$; **b.** vs 6-OHDA + FPS5 $p = 0,0314$; **c.** vs FO, $p < 0,0001$; **d.** vs FO, $p = 0,0001$ (ANOVA e teste *t-Student Unpaired*, como teste *post hoc*).

Neste estudo vimos que os grupos tratados com a FPS aumentou parcialmente a depleção de DA quando comparados com o grupo 6-OHDA. Este resultado corrobora com os resultados obtidos em estudos anteriores. Lima *et al.*,(2017) demonstraram que o tratamento com a *Spirulina platensis* recuperou parcialmente os déficits de DA e DOPAC de animais lesionados com 6-OHDA. Chattopadhyaya *et al.*,(2015) demonstraram que o tratamento com *Spirulina fusiforme*, outra espécie de *Spirulina*, aumentou significativamente os níveis de dopamina em ratos parkinsonianos no modelo da 6-OHDA. Chamorro *et al.*,(2006), avaliaram o papel neuroprotetor da *Spirulina máxima*, outra espécie de *Spirulina*, contra a neurotoxicidade da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), em modelo da doença de Parkinson,e mostraram que o pré-tratamento com a *Spirulina maxima* impediu parcialmente o efeito de MPTP na diminuição da DA.

Portanto, o tratamento com a FPS apresentou uma possível atividade neuroprotetora ao elevar parcialmente os níveis de dopamina, seguido do aumento na imunomarcação para Tirosina Hidroxilase, e recuperação da imunorreatividade para DAT, mostrando uma maior integridade dos neurônios através destes importantes biomarcadores de DP.

4.3 Ensaios de imunohistoquímica

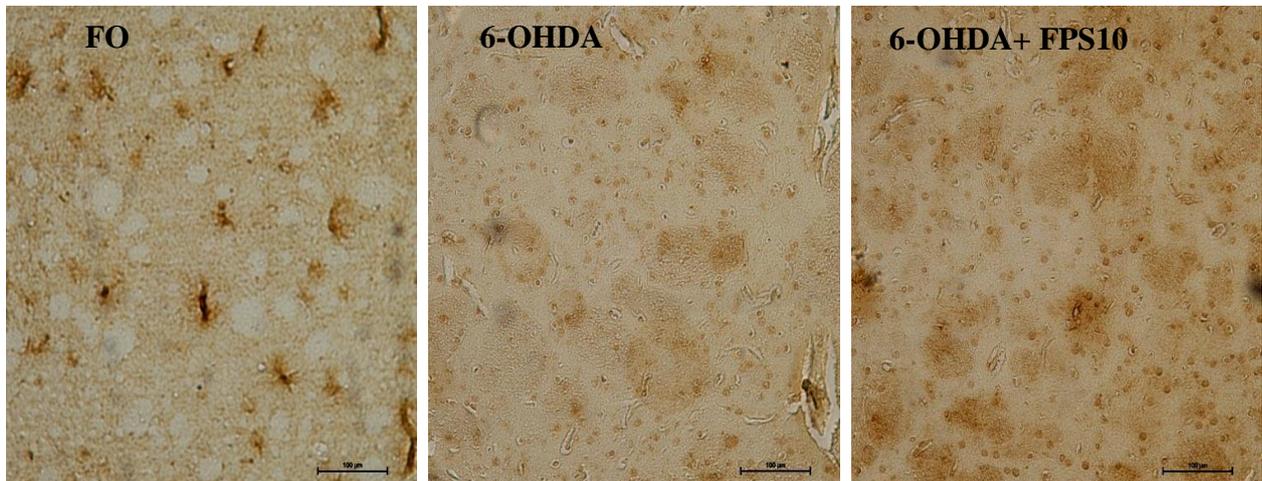
4.3.1 Imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) em Estriado Direito de ratos parkinsonianos

A Tirosina Hidroxilase está presente em todas as células dopaminérgicas e catalisa a formação de L-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA), a etapa limitante na biossíntese de DA. Assim, a DP pode ser considerada como uma síndrome estriatal com deficiência de TH sendo essa enzima um biomarcador em modelos de DP (TABREZ *et al.*,2012).

As análises imunohistoquímica para TH, no estriado direito, mostraram uma intensa imunomarcação (densidade ótica) no grupo FO, que foi reduzida em 61% no grupo 6-OHDA. O tratamento com o FPS na dose de 10mg/kg quando comparado ao grupo 6-OHDA recuperou a imunomarcação em 71%, apresentando também aumento significativo na

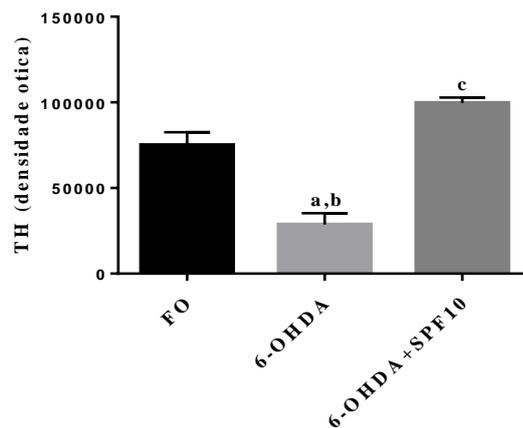
imunomarcção em relação ao FO (Figuras 20 e 21). Os resultados foram quantificados pelo *software ImageJ* (NIH, USA).

Figura 20 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para TH em Estriado Direito de ratos parkinsonianos



Nota: Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) no lado direito de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (100x).

Figura 21 - Densidade ótica de imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH) em estriado direito de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para TH no Estriado Direito (ED) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n= 5). **a.** vs FO, $p= 0,0004$; **b.** vs 6-OHDA+FPS10, $p < 0,0001$; **c.** vs FO, $p 0,0339$. (ANOVA *multiple comparisons*).

Estes resultados estão de acordo com estudos que utilizaram o mesmo modelo e que apontam uma perda considerável de neurônios dopaminérgicos observada por meio da diminuição acentuada da marcação de imunohistoquímica para TH (JANG *et al.*, 2012). Por outro lado, mostramos que o tratamento com a FPS apresentou efeito neuroprotetor com o aumento parcial nos níveis de DA, corroborando com a recuperação na imunorreatividade para TH.

Alguns estudos corroboram com o resultado obtido, Stromberg *et al.*,(2005), mostraram que os animais que foram submetidos ao modelo de DP por lesão intrastriatal de 6-OHDA, e tiveram uma dieta enriquecida com *Spirulina* apresentaram através de ensaios imuno-histoquímicos recuperação das fibras TH positivas para dopamina estriatal e neurônios positivos para TH no SNpc. Zhang *et al.*,(2015) mostraram que o pré-tratamento com polissacarídeo derivado de *Spirulina platensis* (PSP) inibiu a diminuição na imunorreatividade na expressão de TH induzida por MPTP, e Lima *et al.*,(2017), também mostraram que os animais lesionados com 6-OHDA e tratados com a *Spirulina Platensis* produziu uma recuperação quase completa da diminuição drástica da imunorreatividade para TH.

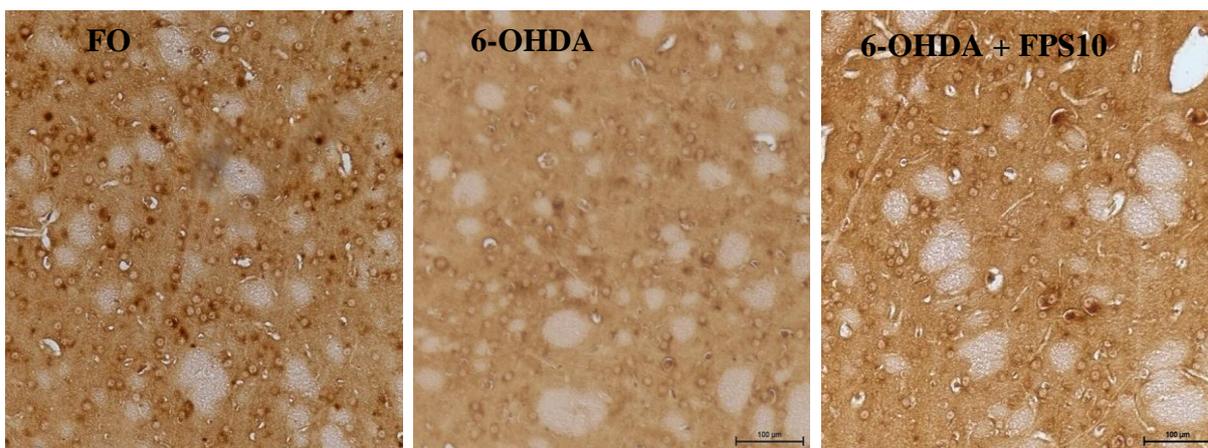
4.3.2 Imunohistoquímica para o transportador de dopamina (DAT)

O transportador dopaminérgico (DAT) modula a concentração de dopamina nos terminais pré-sinápticos dos neurônios dopaminérgicos. Cerca de setenta por cento da dopamina removida da fenda sináptica no neostriado ocorre através da recaptura pré-sináptica pelo DAT. Na DP há redução na densidade de DAT no neostriado devido à perda dos terminais dopaminérgicos (STORCH; LUDOLPH; SCHWARZ, 2004).

A redução na densidade de DAT ocorre mesmo antes do início dos sintomas da DP. Quando aparecem os primeiros sintomas já se evidencia redução de 40 a 60% na atividade dopaminérgica, podendo chegar a diminuir em até 90% com o avançar da doença. Por isso é importante determinar a concentração de DAT, para avaliar a perda de neurônios dopaminérgicos no estriado (SHIH *et al.*, 2006)

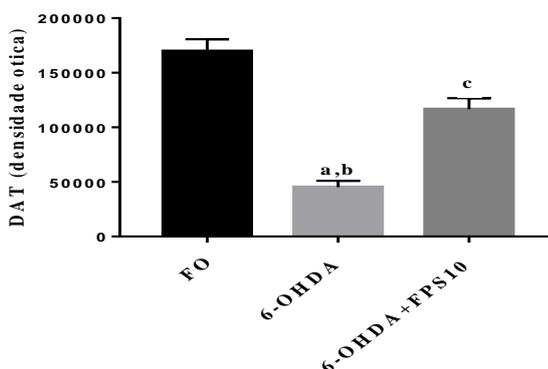
Neste estudo a análise imunohistoquímica para o transportador de dopamina (DAT), no corpo estriado direito, mostrou grande imunomarcagem no grupo FO, a qual foi drasticamente reduzida do grupo lesionado por 6-OHDA (73,3%). Esta redução foi revertida significativamente (61%) no grupo lesionado com 6-OHDA e tratado com FPS 10mg / kg. (Figuras 22 e 23). Os resultados foram quantificados pelo *software ImageJ* (NIH, USA).

Figura 22 - Fotomicrografias representativas de imunohistoquímica para DAT no corpo estriado direito



Nota: Imunohistoquímica para transportador de dopamina (DAT) no lado direito de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo). (100x)

Figura 23 - Densidade ótica de imunohistoquímica para DAT no estriado direito de ratos parkinsonianos.



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para DAT no Estriado Direito (ED) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n= 5). **a.** vs FO, $p < 0,0001$; **b.** vs 6-OHDA+FPS10, $p = 0,0004$; **c.** vs FO, $p = 0,0043$. (ANOVA *multiple comparisons*).

O transportador de dopamina (DAT) é uma proteína transmembranar, responsável pela recaptação da DA na fenda sináptica e à medida que a doença progride há um declínio desse receptor, em um processo exponencial, que pode ser revelado por meio de imagem do receptor DAT, através de tomografia computadorizada, obtidas em pacientes com DP (ANTONINI; BIUNDO, 2014). Demonstramos neste estudo que ocorreu uma diminuição da imunorreatividade para DAT nos animais lesionados por 6-OHDA não tratados, o que foi quase que completamente recuperado após o tratamento com FPS, demonstrando sua potencial atividade neuroprotetora, corroborando com os achados das monoaminas. Alguns estudos com a *Spirulina* apresentaram resultado similar a este: Zhang *et al.*,(2015) mostraram que o pré-tratamento com Polissacarídeo derivado de *Spirulina platensis* (PSP) apresenta efeito neuroprotetor em neurônios dopaminérgicos e nos níveis de dopamina nos camundongos com doença de Parkinson induzida por MPTP ao inibir a diminuição da imunorreatividade na expressão de DAT induzida por MPTP; Lima *et al.*,(2017), mostraram que os animais lesionados com 6-OHDA e tratados com a *Spirulina platensis* produziu uma recuperação quase completa após drástica diminuição da imunorreatividade para DAT.

4.3.3 Imunohistoquímica para COX-2 nas áreas hipocâmpais Giro Denteado, CA1 e CA3, no córtex temporal de ratos parkinsonianos

A ciclooxigenase (COX) catalisa a síntese de prostanoídes. A COX existe como isoformas constitutivas e induzíveis. COX-2 é a isoforma induzível, expressa rapidamente em vários tipos de células em resposta a fatores de crescimento, citocinas e moléculas pró-inflamatórias. Esta enzima, no cérebro, tem sido associada a atividades pró-inflamatória, que se acredita serem fundamentais para os processos de doenças neurodegenerativas como DP,(MINGHETTI, 2004). Devido a importância da COX-2 para a neuroinflamação e para a DP, avaliamos quali e quantitativamente a imunomarcagem para esta enzima nas áreas do hipocampo e Córtex Total de ratos parkinsonianos por meio de fotomicrografia nas regiões do Giro Denteado (Figura 24 e 25), CA1 (Figuras 26 e 27) e CA3 do Hipocampo (Figuras 28 e 29) e córtex temporal (Figuras 30 e 31).

Observou-se através das análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para COX-2 no GD, o grupo 6-OHDA apresentou um aumento em 1,83x, a imunomarcagem para

COX-2 em relação ao FO, o tratamento com a FPS10 reduziu a imunomarcção em 42,4% em comparação ao grupo lesionado (6-OHDA).

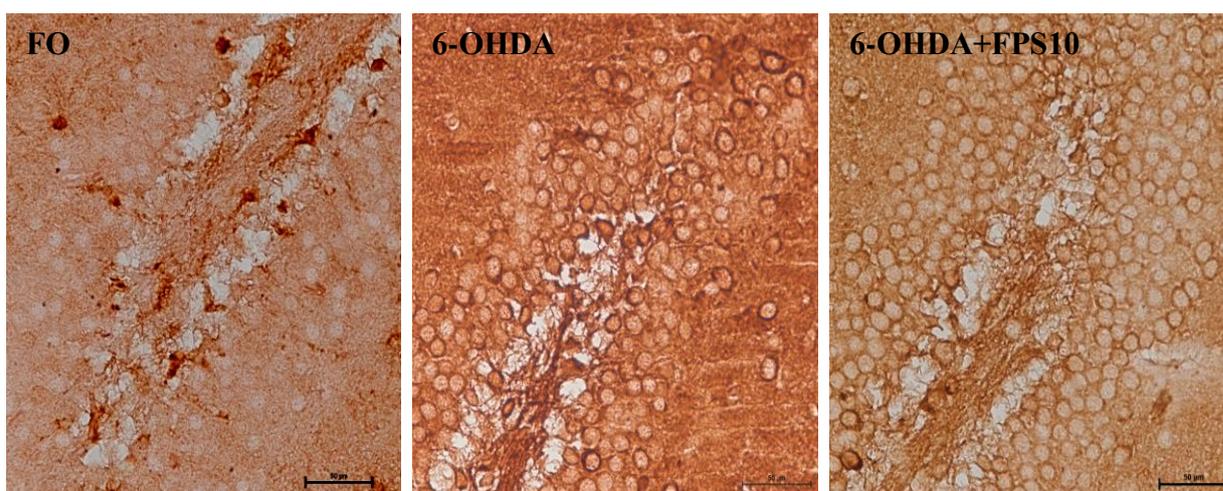
Na área CA1 do hipocampo observou-se através das análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para COX-2 um aumento de 2,55x, na imunomarcção no grupo 6-OHDA quando comparado ao FO, o grupo lesionado e tratado com a FPS10 reduziu a imunomarcção em 24,9% em relação ao 6-OHDA.

Na área CA3 do Hipocampo observou-se através das análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para COX-2 um aumento de 2,09x, na imunomarcção no grupo 6-OHDA quando comparado ao FO, o grupo 6-OHDA + FPS10 reduziu a imunomarcção em 46,6% em relação ao 6-OHDA.

No córtex dos animais do grupo 6-OHDA as análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para COX-2 mostraram um aumento de aproximadamente 1,48x, na imunomarcção em comparação com as mesmas áreas do FO. O grupo tratado com a FPS10 reduziu a imunomarcção para COX-2 em 85,4% em relação ao grupo 6-OHDA.

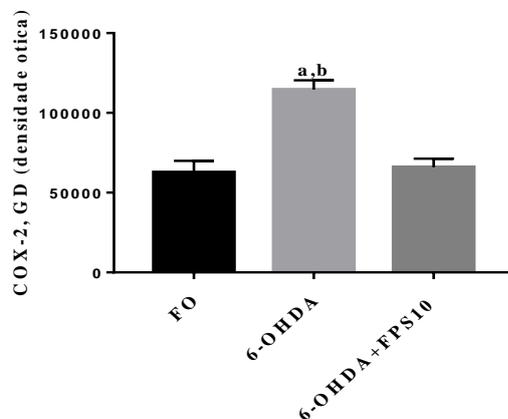
Figura 24 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área do Giro Denteado de ratos parkinsonianos

COX-2 (GD, x200)



Nota: Imunohistoquímica para COX-2 em Giro Denteado (GD) de ratos Falso-Operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x).

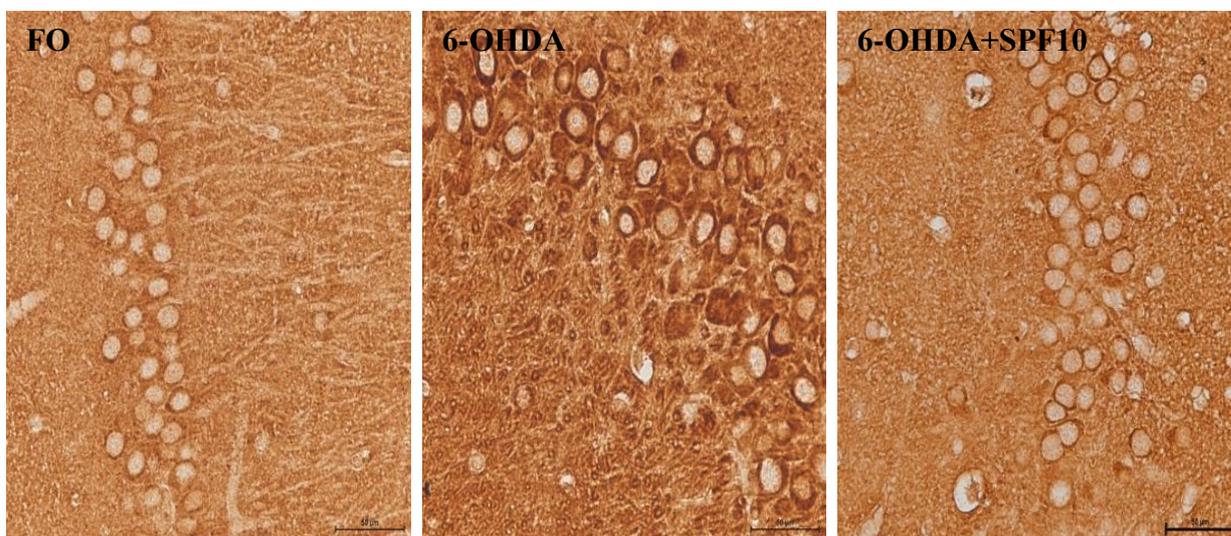
Figura 25 - Densidade ótica de imunomarcção para COX-2 em Giro Denteado de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para COX2 no Hipocampo (GD) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n= 5). **a.** vs FO, $p=0,0002$; **b.** vs 6-OHDA+FPS10, $p= 0,0004$. (ANOVA *multiple comparisons*).

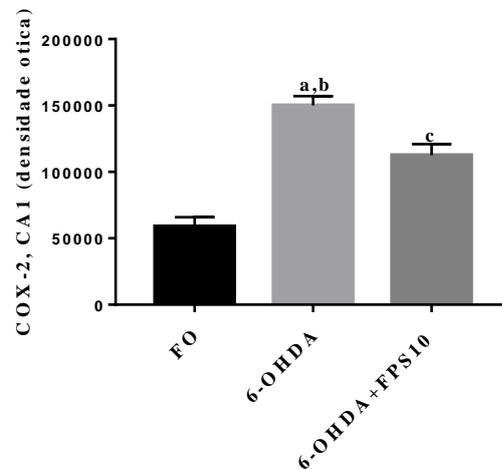
Figura 26 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA1 do hipocampo de ratos parkinsonianos

COX-2 (CA1, x200)



Nota:Imunohistoquímica para COX-2 em Hipocampo (CA1) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x).

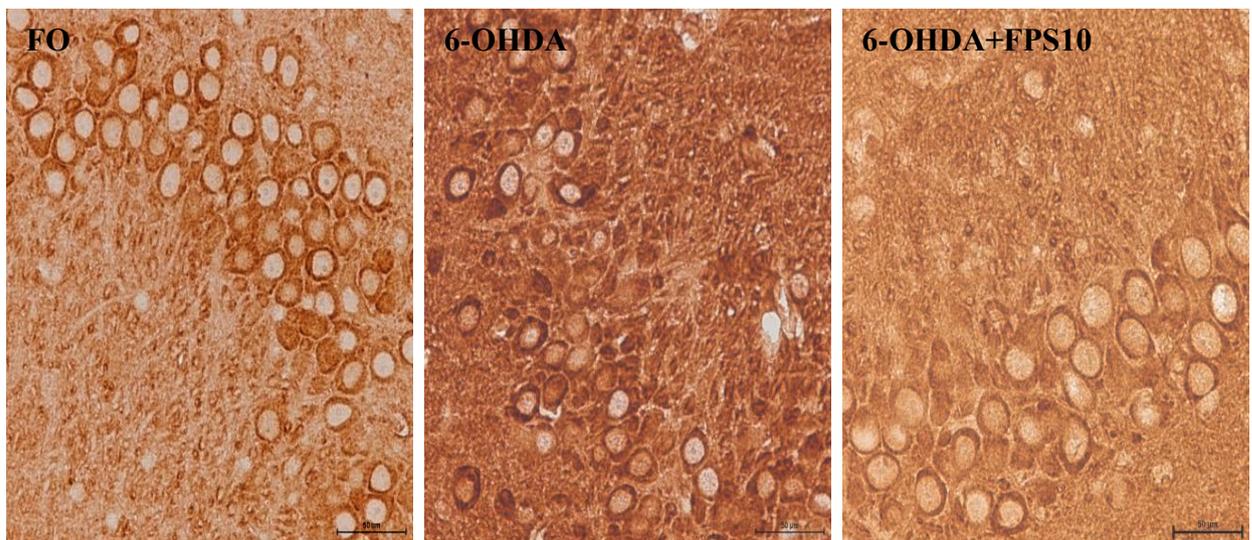
Figura 27 - Densidade ótica de imunomarcção para COX-2 em CA1 de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para COX2 no Hipocampo (CA1) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n= 5). **a.** vs FO, $p < 0,0001$; **b.** vs 6-OHDA+FPS10, $p = 0,0107$; **c.** vs FO, $p = 0,0008$. (ANOVA *multiple comparisons*).

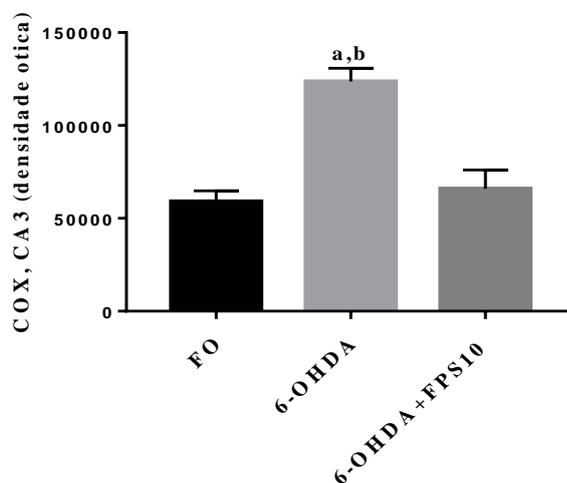
Figura 28 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área CA3 do hipocampo de ratos parkinsonianos

COX-2 (CA3, x200)



Nota: Imunohistoquímica para COX-2 em Hipocampo (CA3) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x).

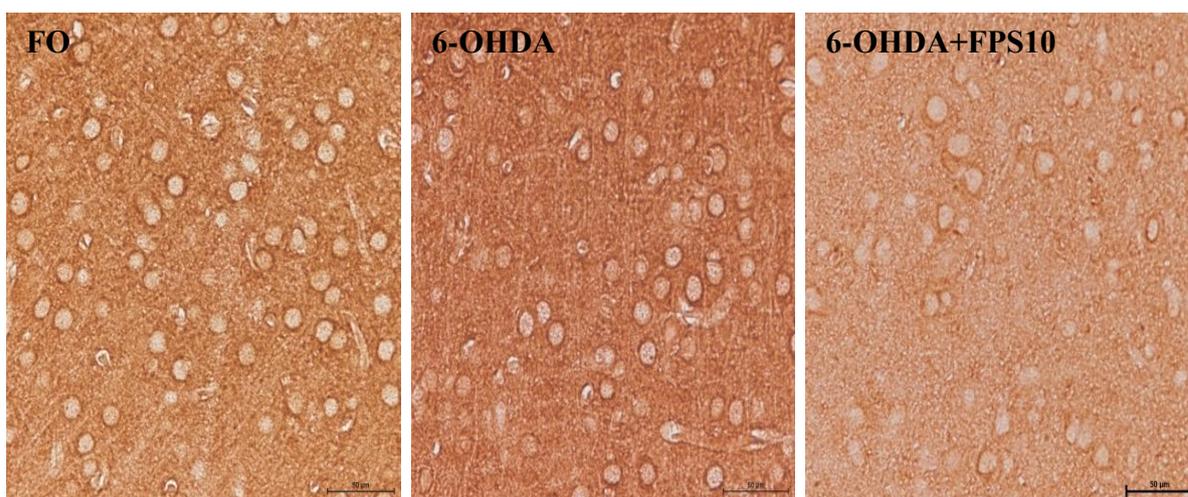
Figura 29 - Densidade ótica de imunomarcção para COX-2 em CA3 de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para COX2 no Hipocampo (CA3) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n= 5). **a.** vs FO, $p=0,0002$; **b.** vs 6-OHDA+FPS10, $p= 0,0006$; (ANOVA *multiple comparisons*).

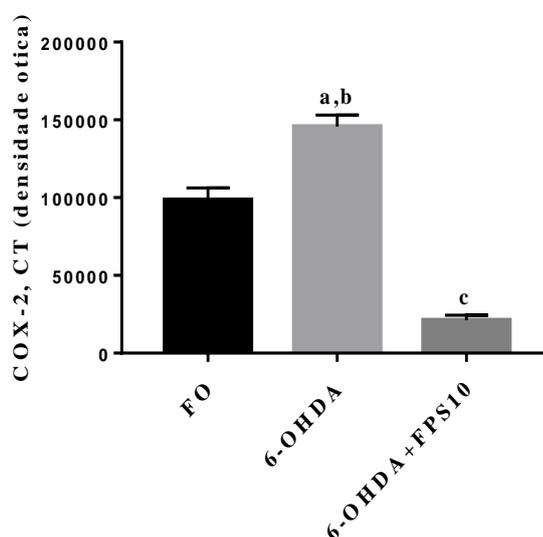
Figura 30 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para COX-2 na área do Cortex de ratos parkinsonianos

COX-2 (CT, x200)



Nota: Imunohistoquímica para COX-2 em Córtex (CT) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x).

Figura 31 - Densidade ótica da imunomarcção para COX-2 em CórteX de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para COX2 no Cortex Total (CT) de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n= 5). **a.** vs FO, $p=0,0007$; **b.** vs 6-OHDA+FPS10, $p <0,0001$; **c.** vs FO, $p <0,0001$ (ANOVA *multiple comparisons*).

O modelo de DP induzida por 6-OHDA não promove apenas alterações motoras, mas também déficits de memória e aprendizados associado à diminuição de células dopaminérgicas na substância negra bem como redução de neurônios no estriado e hipocampo (SAMPAIO, 2014). Sabendo da vulnerabilidade do hipocampo a lesão estriatal por 6-OHDA e da presença da neuroinflamação, no processo patológico da DP, resolvemos avaliar por meio de análises imunohistoquímicas a presença de COX-2, em estruturas como, Giro Denteado, hipocampo propriamente dito (Corno de Amon- CA1, CA3) e córtex em relação, e os possíveis efeitos da FPS nessas estruturas.

Foi demonstrado que a COX-2 é regulada positivamente em neurônios SNc DAérgic em pacientes com DP e em modelos animais de DP e, além disso, o uso de anti-inflamatório não esteroidais (AINEs) protege contra degeneração de dopamina nigro-estriatal induzida por -1,2,3,6- tetrahidropiridina (MPTP) ou 6- hidroxidopamina (6-OHDA) (ESPOSITO *et al.*, 2007).

Demonstramos que houve um aumento significativo na imunomarcção para COX-2, em todas as áreas analisadas do grupo lesionado 6-OHDA não tratado, e após tratamentos com a FPS, essa imunomarcção diminuiu expressivamente. Este resultado está de acordo com o estudo de Lima *et al.*, (2017), o qual demonstrou um grande aumento na imunomarcção para COX-2, no estriado do grupo lesionado 6-OHDA não tratado e após tratamento com a *Spirulina platensis* foi quase completamente revertido; Chen *et al.*, (2012), também investigaram os efeitos da *Spirulina* em células microgliciais BV-2 tratadas com LPS na expressão de genes inflamatórios, e demonstraram que extrato aquoso de *Spirulina platensis* e o seu componente ativo C-ficocianina inibiram a expressão de genes inflamatórios, dentre eles a COX-2.

4.3.4 Imunohistoquímica para iNOS nas áreas hipocâmpais Giro Denteado, CA1 e CA3, e no córtex temporal de ratos parkinsonianos

Durante a progressão da DP, ocorre um aumento na produção de NO como resultado do processo inflamatório, e este aumento nas concentrações de NO, sintetizado pela iNOS, pode desempenhar um importante papel na destruição dos neurônios dopaminérgicos (LIBERATORE *et al.*, 1999). Deste modo, neste trabalho investigamos a imunomarcção para iNOS por meio de fotomicrografia nas regiões do Giro Denteado (Figuras 32 e 33), CA1 (Figuras 34 e 35) e CA3 do hipocampo (Figuras 36 e 37); e no Córtex (Figuras 38 e 39).

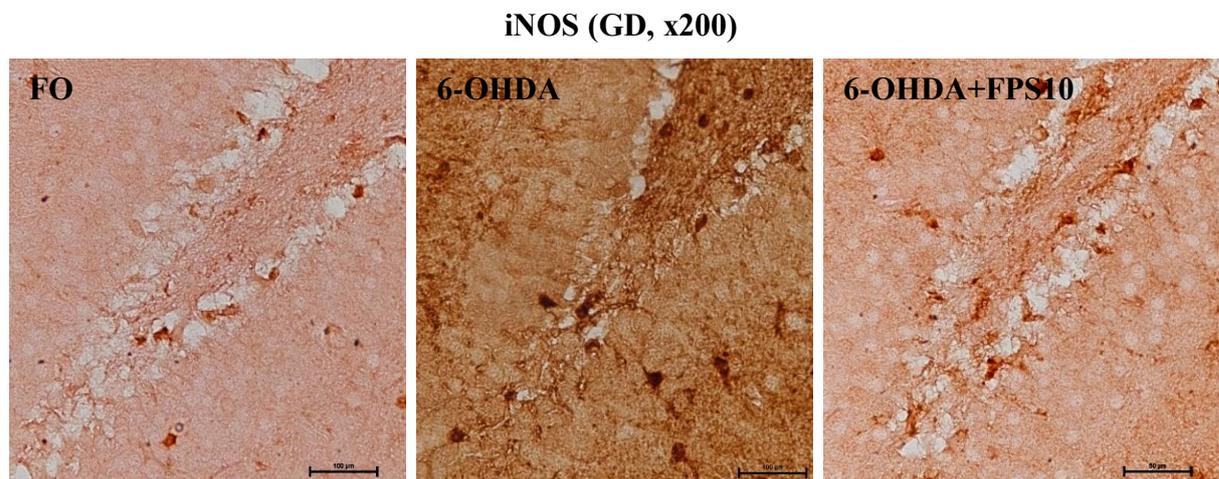
Observou-se através das análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para iNOS nas áreas GD, o grupo 6-OHDA apresentou um aumento em 14,5x, a imunomarcção para iNOS em relação ao FO, o tratamento com a FPS10 reduziu a imunomarcção em 87%, em comparação ao grupo lesionado (6-OHDA).

Na área CA1 do hipocampo observou-se através das análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para iNOS um aumento de 5,2x, na imunomarcção no grupo 6-OHDA quando comparado ao FO, o grupo lesionado e tratado com a FPS10 reduziu a imunomarcção em 91% em relação ao 6-OHDA.

Na área CA3 do Hipocampo observou-se através das análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para iNOS um aumento de 3,7x, na imunomarcacão no grupo 6-OHDA quando comparado ao FO, o grupo 6-OHDA + FPS10 reduziu a imunomarcacão em 72% em relacão ao 6-OHDA.

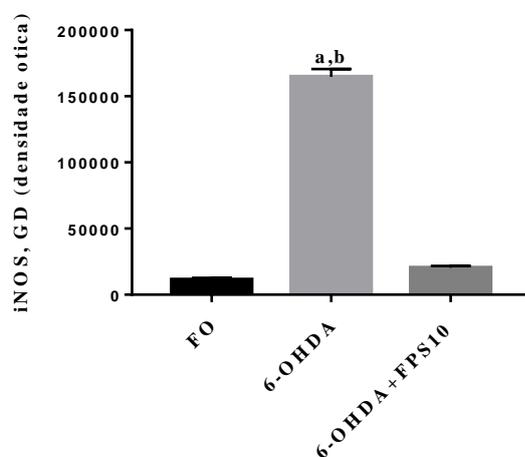
No córtex dos animais do grupo 6-OHDA as análises quantitativa das imagens imunohistoquímica para iNOS mostraram um aumento de aproximadamente 55x, na imunomarcacão em comparacão com as mesmas áreas do FO. O grupo tratado com a FPS10 reduziu a imunomarcacão para iNOS em 84% em relacão ao grupo 6-OHDA.

Figura 32 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área do Giro Dentado de ratos parkinsonianos



Nota: Imunohistoquímica para iNOS em hipocampo área Giro Dentado de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x)

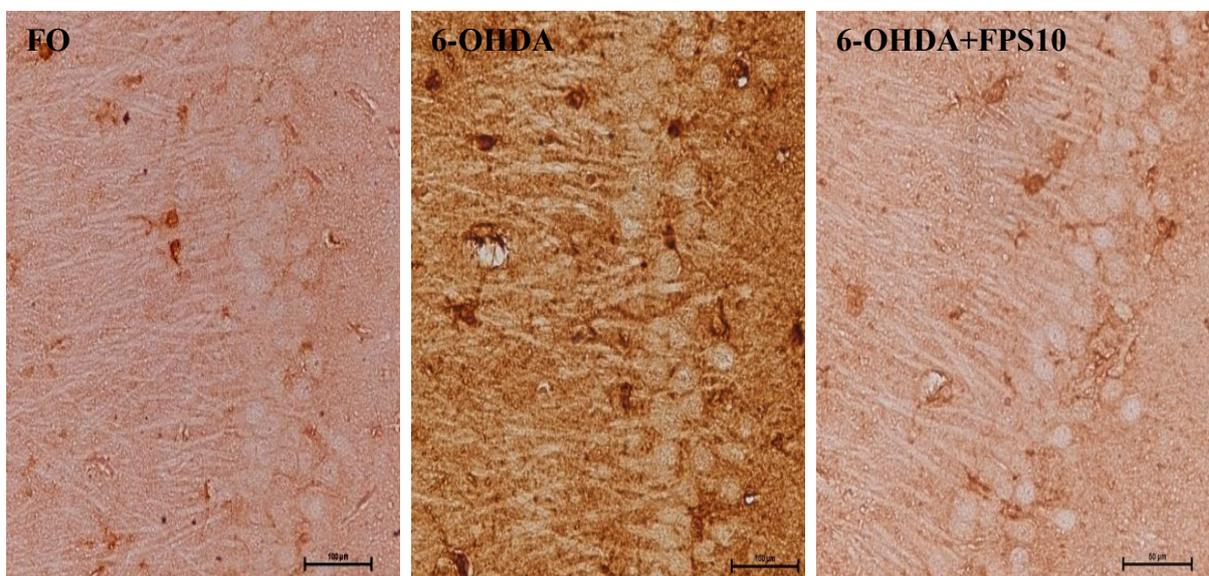
Figura 33 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em hipocampo área Giro Denteado de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para iNOS no hipocampo GD de ratos Falso-Operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n=4 a 5). **a** vs FO, **b** vs 6-OHDA+FPS10, $p < 0,0001$ (ANOVA).

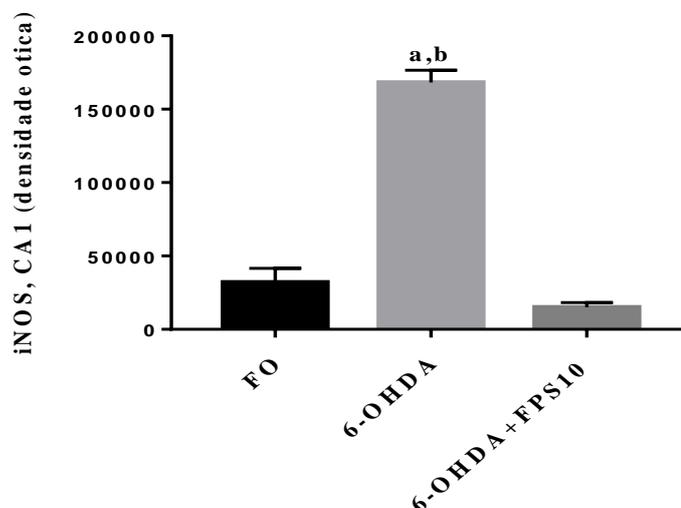
Figura 34 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área CA1 do hipocampo de ratos parkinsonianos

iNOS (CA1, x200)



Nota: Imunohistoquímica para iNOS em hipocampo área CA1 de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x).

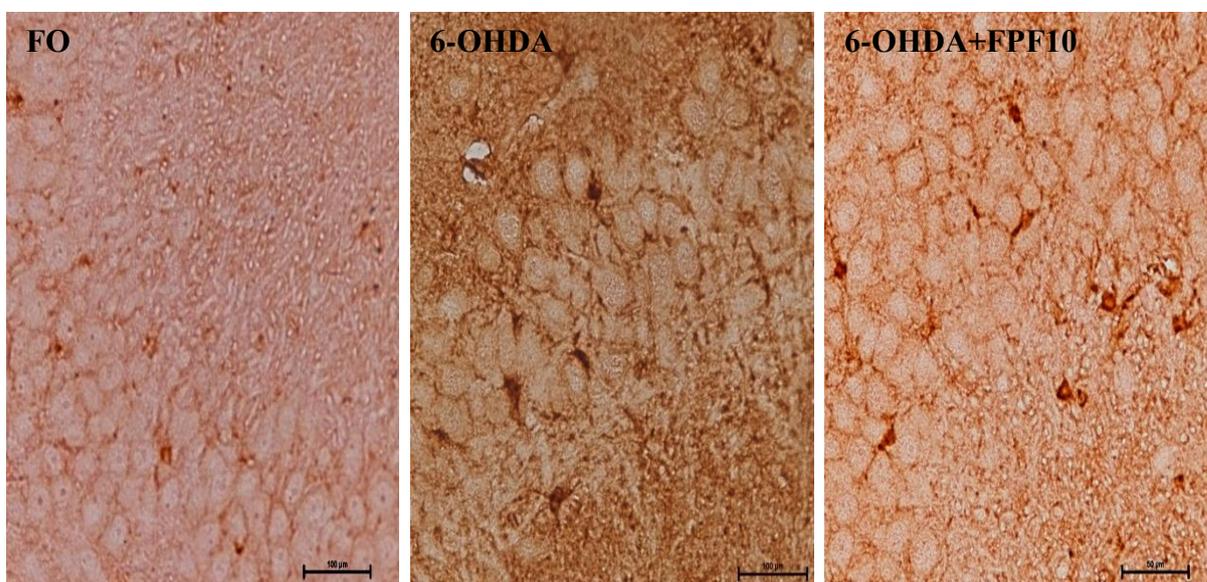
Figura 35 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em hipocampo área CA1 de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para iNOS no hipocampo CA1 de ratos Falso-Operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n=4 a 5). **a** vs FO, **b** vs 6-OHDA+FPS10, $p < 0,0001$ (ANOVA).

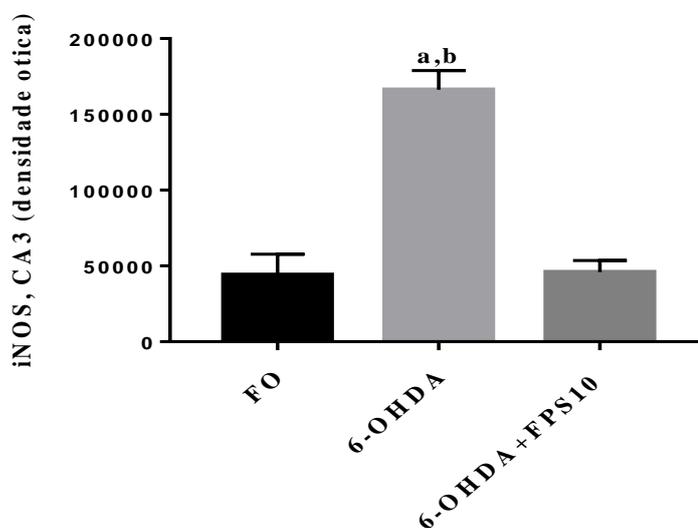
Figura 36 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS na área CA3 do HP de ratos parkinsonianos.

iNOS (CA3, x200)



Nota: Imunohistoquímica para iNOS em hipocampo área CA3 de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x).

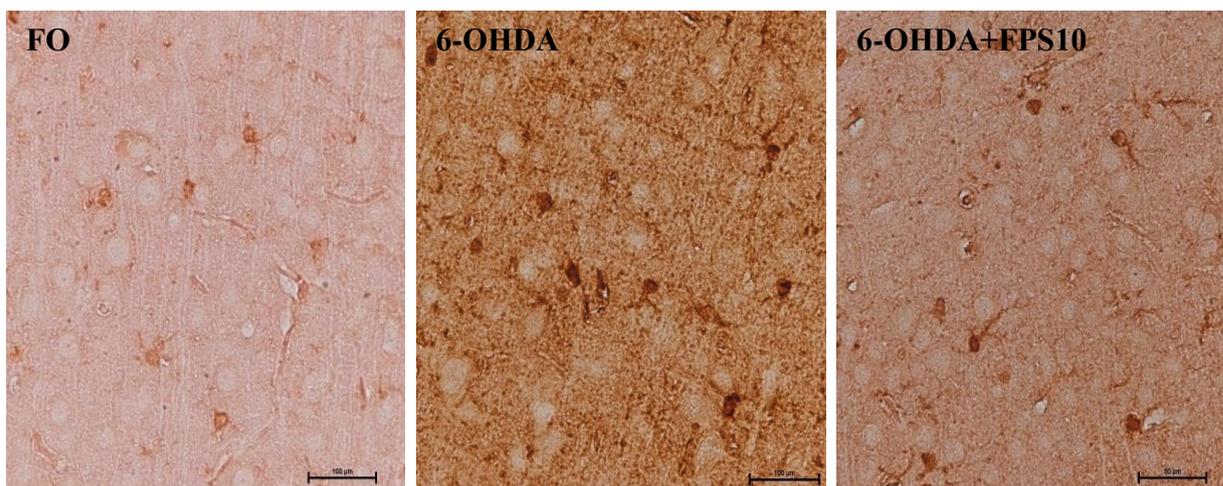
Figura 37 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em hipocampo área CA3 de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para iNOS no hipocampo CA3 de ratos Falso-Operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n=4 a 5). **a** vs FO, **b** vs 6-OHDA+FPS10, $p < 0,0001$ (ANOVA)

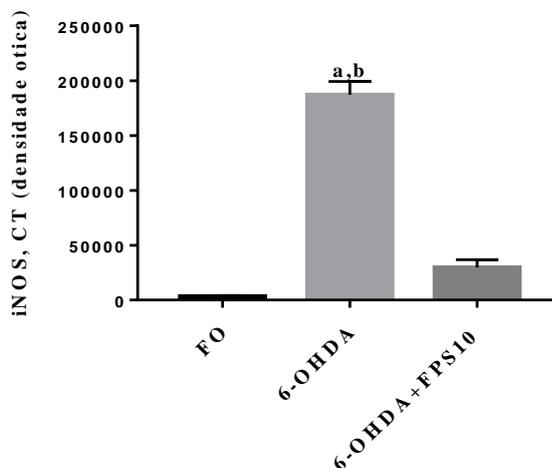
Figura 38 - Fotomicrografia de imunohistoquímica para iNOS em córtex cerebral de ratos parkinsonianos

iNOS (CT, x200)



Nota: Imunohistoquímica para iNOS em Córtex Total de ratos falso-operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose 10 mg/Kg (vo). (200x).

Figura 39 - Densidade ótica da imunomarcção para iNOS em córtex total de ratos parkinsonianos



Nota: Os valores representam as médias \pm EPM da densidade ótica para iNOS no CT de ratos Falso-Operado (FO) e ratos submetidos à lesão estriatal unilateral por 6-OHDA não tratados e tratados com FPS na dose de 10 mg/Kg (vo) por 14 dias (n=4 a 5). **a** vs FO, **b** vs 6-OHDA+FPS10, $p < 0,0001$ (ANOVA)

Neurônios dopaminérgicos são vulneráveis ao estresse oxidativo e ataque inflamatório. Evidências sugerem que a ativação na expressão da iNOS está diretamente ligada à geração de ERO que afeta vários componentes celulares e danifica preferencialmente os neurônios dopaminérgicos do cérebro médio na DP (KOPPULA *et al.*, 2012). Deste modo, um nível aumentado de óxido nítrico sintase indutível (iNOS) na substância negra e no estriado de pacientes com DP sugere toxicidade e inflamação induzidas por citocinas e quimiocinas, que consequentemente induzem estresse oxidativo que irá contribuir para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos e progressão da doença (TIWARI; PAL, 2017).

Portanto, o manejo ou inibição apropriada de ERO gerada por essa enzima pode representar um alvo terapêutico para reduzir a degeneração neuronal na DP. Diante disto, realizamos análises imunohistoquímicas, as quais mostraram um aumento na imunorreatividade para iNOS em todas as áreas estudadas (GD, CA1, CA3 e CT) no grupo lesionado não tratado (6-OHDA), quando comparado ao grupo FO. Por outro lado, após o tratamento com FPS, essa imunorreatividade foi significativamente reduzida em todas as áreas. Trabalhos anteriores com a *Spirulina* mostraram efeitos semelhantes a este: Lima *et al.*, (2017), mostraram um aumento de nove vezes na imunorreatividade estriatal para iNOS no grupo lesionado por 6-OHDA não tratado, quando comparado ao grupo FO, e após o

tratamento com *Spirulina platensis*, essa imunorreatividade foi menor que a observada no grupo FO; Chen *et al.*, (2012), investigaram os efeitos da Spirulina em células microgliais BV-2 tratadas com lipopolissacarídeo na expressão dos genes inflamatórios, óxido nítrico sintase indutível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e mRNAs de interleucina-6 (IL-6), e demonstraram que extrato aquoso de *Spirulina platensis* e o seu componente ativo C-ficocianina inibiram a expressão desses genes, mRNAs, de iNOS, COX-2, TNF- α e IL-6.

Portanto, a FPS, pode representar um alvo terapêutico para reduzir a degeneração neuronal na DP, pois conseguiu inibir as EROs gerada por essa enzima, confirmando os resultados obtidos nos testes que avaliaram sua atividade antioxidante (determinação das concentrações de nitrito/nitrato e TBARS).

5 CONCLUSÕES

A *Spirulina* é uma cianobactéria muito rica em proteína e por este motivo, vem sendo considerada como um super-alimento.

Mostramos no presente trabalho o potencial neuroprotetor da Fração Proteica da *Spirulina platensis* relacionado à reversão parcial ou completa de várias alterações neuroquímicas observadas no Corpo Estriado, Hipocampo e Córtex do animal lesionado por 6-OHDA e tratados com a Fração Proteica da *Spirulina platensis*.

Mostramos que a FPS apresentou potencial efeito neuroprotetor no modelo de hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA (injeção estriatal unilateral), pois foi capaz de reduzir o comportamento rotacional induzido pela apomorfina, diminuiu as concentrações de Nitrito/Nitrato e TBARS, conseqüentemente apresentou aumento parcial nos níveis de DA e nas imunomarcações para TH e DAT; e diminuiu a neuroinflamação ao reduzir a imunomarcação para iNOS e COX2.

Acreditamos que os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da *Spirulina* certamente contribuíram para suas ações neuroprotetoras, sugerindo que a Fração Proteica da *Spirulina platensis* é um candidato em potencial a ser incluído em estudos mais complexos que visem a sua utilização na clínica para o tratamento de Doença de Parkinson.

REFERÊNCIAS

- ANTONINI, A; BIUNDO, R. Parkinson disease: can dopamine transporter imaging define early PD? **Nat Rev Neurol**, v. 10: p. 432–433, 2014.
- AZEVEDO, L. L.; CARDOSO, F. Ação da levodopa e sua influência na voz e na fala de indivíduos com doença de Parkinson. **Rev. Soc. Bras. Fonoaudiol.**, v.14, n.1, p.136-41, 2009.
- BARBIERO, J.K.; SANTIAGO, R.M.; LIMA, M.M.; ARIZA, D.; MORAIS, L.H.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A. Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res.**, 1;,216(1):186-92, 2011.
- BARBOSA, L. F.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quím. Nova**, v.29, n.6, São Paulo, Nov./Dez.2006.
- BARNHAM, K. J.; MASTERS C. L.; BUSH A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.3, p. 205–214, 2004.
- BASSANI, T. B.; VITAL, M. A.B.F.; RAUH, L. K. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease and therapeutic evidence of anti-inflammatory drugs. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, São Paulo v.73n.7 Jul., 2015.
- BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. **J. Appl. Phycol.**, v.5, p.235–241, 1993
- BENGOA-VERGNIORY, N.; ROBERTS, R.F.; WADE-MARTINS, R.; ALEGRE-ABARRATEGUI, J. Alpha-synuclein oligomers: a new hope. **Acta Neuropathol.**, v.134 n.6, p.819–838, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p. 248-254.1976.
- BERMEJO-BESCÓS, P.; PIÑERO-ESTRADA, E.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 6, p 1496-1502, Set 2008.
- BRANGER, B.; CADUDAL, J. L.; DELOBEL, M.; OUOBA, H.; YAMEOGO, P.; OUEDRAOGO, D.; GUERIN, D.; VALEA, A.; ZOMBRE, C.; ANCEL, P. personnels des

CREN. Spirulina as a food supplement in case of infant malnutrition in Burkina-Faso. **Archives de Pédiatrie**, v. 10, n. 5, p. 424-431, 2003.

BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat. I. Situational factors. **Br. J. Psychol.**, v. 48, p. 1-12, 1957.

CALOU, I. B. F.; CERQUEIRA, G. S.; SIQUEIRA, R. M. P. Neurotoxicidade do ferro na fisiopatologia da doença de Parkinson. **Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade**, v. 8, n. 1, p. 45-57, fev. 2015.

CALOU, I.; BANDEIRA, M. A.; AGUIAR-GALVÃO, W.; CERQUEIRA, G.; SILVEIRA, R., NEVES, K. R.; BRITO, G. A.; VIANA, G. S. B. Neuroprotective properties of a standardized extract from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira-do-Sertão), as evaluated by a Parkinson's disease model in rats. **Parkinson's Disease**, v. 2014, 2014.

CHAMORRO, G.; PÉREZ-ALBITER, M.; SERRANO-GARCÍA, N.; MARES-SÁMANO, J. J.; ROJAS, P. *Spirulina maxima* pretreatment partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. **Nutr. Neurosci.**, v. 9, p. 207–212. 2006.

CHATTOPADHYAYA, I.; GUPTA, S.; MOHAMMED, A.; MUSHTAQ, N.; CHAUHAN, S.; GHOSH, S. Neuroprotective effect of *Spirulina fusiform* and amantadine in the 6-OHDA induced Parkinsonism in rats. **BMC Complement. Altern. Med.**, v. 15, p. 320, Ago, 2015.

CHEN, J.-C.; LIU, K. S.; YANG, T.-J.; HWANG, J.-H.; CHAN, Y.-C.; LEE, I.-T. *Spirulina* and *C-phycocyanin* reduce cytotoxicity and inflammation-related genes expression of microglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 252-256, 2012

CHIBA, K.; TREVOR, A.; CASTAGNOLI JR., N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 120, n. 2, p. 574-8. Abr, 1984.

CHUNG, K. K.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. New insights into Parkinson's disease. **Journal of neurology**, v. 250 Suppl 3:III15–24. 2003

COLLINS, L. M.; TOULOUSE, A.; CONNOR, T. J.; NOLAN, Y. M. Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**. v. 62, n. 7, p. 2154– 2168, 2012

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson Disease. **JAMA**. v. 311, n. 16, p. 1670–1683, 2014.

COSTA, R. O. **Avaliação dos efeitos do exercício físico na lesão estriatal unilateral por 6-OHDA em ratos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará – Fortaleza, 150 f. 2016.

DAMIER, P.; HIRSCH, E. C.; ZHANG, P.; AGID, Y.; JAVOY-AGID, F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience**. v. 52, p. 1, p. 1–6, 1993

DAWSON, T.M, DAWSON, V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron**. v.66; p.646-61, 2010

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2010.

DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron**: v.66; p. 646-61, 2010

DEMAAGD, G., PHILIP, A. Part 2: Introduction to the pharmacotherapy of Parkinson's disease, with a focus on the use of dopaminergic agents. **P. T.** v.40, n.9, p.590–600. 2015

DEMIR, B. S.; TÜKEL, S. S. Purification and characterization of lipase from *Spirulina platensis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 123-128, 2010.

DENG, R.; CHOW, T.J. Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. **Cardiovasc. Ther.** v.28, n.4, p.33–45, 2010

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. Review. **Exp Neuro**, 175(2): 303-17, 2002.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M.M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **J. Parkinsons Dis.** v.3, n.4, p.461–491, 2013

DOUNA, H., BAVELAAR, B. M., PELLIKAAN, H., OLIVIER, B., PIETERS, T. Neuroprotection in Parkinson's disease: a systematic review of the preclinical data. **The Open Pharmacology Journal**, v. 6, p.12-26, 2012

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br. J. Pharmacol.** v.164, n.4, p.1357–1391, 2011

FERRAZ, H.B. **Doença de Parkinson: prática clínica e terapêutica**. São Paulo. Editora Atheneu, 2005.

FERREIRA, F. D., FERREIRA, F. M. D., HELENO, R. B., MELLA JÚNIOR, S. E. Doença de Parkinson: aspectos fisiopatológicos e terapêuticos. **Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 2, 2010.

GARBUZOVA-DAVIS, S.; BICKFORD, P.C. Neuroprotective Effect of *Spirulina* in a Mouse Model of ALS. **The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal** v.3, p.36-41, 2010.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.482, p. 419- 425, 2017

GELDERS, G.; BAEKELANDT, V.; VAN DER PERREN, A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **J. Immunol. Res.** v. 2018, p.4784268, Abr. 2018.

GOBBI, L. T. B.; PIERUCCINI-FARIA, F.; SILVEIRA, C. R. A.; CAETANO, M.J. D. Núcleos da base e controle locomotor: aspectos neurofisiológicos e evidências experimentais. **Rev. bras. Educ. Fís. Esp.** v.20, p.97-101, 2006.

GONÇALVES L.H.T.; ALVAREZ A.M.; ARRUDA M.C. Pacientes portadores da doença de Parkinson: significado de suas vivencias. **Acta Paul Enferm** v.20, n.1, p. 62-8, 2007

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUARIENTI, C. **Potencial antioxidante da microalga *Spirulina* frente a condições de estresse oxidativo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande, 2009

HABIB, M. A. B.; PARVIN, M.; HUNTINGTON, T. C.; HASAN, M. R. A review on culture, production and use of *Spirulina* as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **Fisheries and Aquaculture Circular.** n. 1034. 33p, Roma, 2008.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural brain research**, v. 162, n. 1, p. 1-10, 2005.

JAGADEESAN, A J *et al.* Current trends in etiology, prognosis and therapeutic aspects of Parkinson's disease: a review. **Acta bio-medica.** v. 88, n. 3, p. 249-262. Out. 2017

JENNER, P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. **Mov. Disord.** v.13 n.1, p.24-34. 1998

JANG, D.P. Functional neuroimaging of the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters.**,v. 513 (2), p.187–192, 2012.

JIANG, L.; WANG, Y.; YIN, Q.; LIU, G.; LIU, H.; HUANG, Y.; LI, B. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. **J. Cancer.** v.8, n.17, p. 3416–3429, 2017

JOERS, V.; TANSEY, M.G.; MULAS, G.; CARTA, A.R. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. **Prog. Neurobiol.** v.155, p. 57–75, 2016

KOPPULA, S.; KUMAR, H.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease. **Mediators of inflammation**, v. 2012, n.823902. Abr, 2012

KARKOS, P.D.; LEONG, S.C.; KARKOS, C.D.; SIVAJI N.; ASSIMAKOPOULOS D.A. *Spirulina* in Clinical Practice: Evidence-Based Human Applications. **Evid Based Complement Alternat Med.** p.1–4, 2008

KHAN, Z.; BHADOURIA, P.; BIEN, P.S. Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. **Curr Pharm Biotechnol.**v.6, p.373–379, 2005

KIM, Y.S.; JOO, W.S.; JIN, B.K.; CHO, Y.H.; BAIK, H.H.; PARK, C.W. Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport.**; v. 13, n. 9, p. 2387-90, 1998.

KNOTT, C.; STERN, G.; WILKIN, G.P. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: i NOS, Lipocortin-1, and cyclooxygenase-1 and-2. **Mol. Cell. Neurosci.** v.16, p.724–739, 2000

KULSHRESHTHA, A.; ZACHARIA, A.J.; JAROULIYA, U.; BHADAURIYA, P.; PRASAD, G.B.; BIEN, P.S. *Spirulina* in health care management. **Curr. Pharm. Biotechnol.**v.9, p.400–405, 2008

KUMAR, A.; CHRISTIAN, P.K; PANCHAL, K.; GURUPRASAD, B.R.;TIWARI,A.K.Supplementation of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) Improves Lifespan and Locomotor Activity in Paraquat-Sensitive DJ-1^{Δ93} Flies, a Parkinson's Disease Model in *Drosophila melanogaster*. **J. Diet. Suppl.**v.14, n.5, p.573-588, 2017

KUMAR, A.; SHARMA, N.;GUPTA, A.; KALONIA, H.; MISHRA, J. Neuroprotective potential of atorvastatin and simvastatin (HMG-CoA reductase inhibitors) against 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced Parkinson-like symptoms.**Brain Res.**, v. 1471, p. 13–22, 2012.

LIBERATORE, G.T.; JACKSON-LEWIS, V.; VUKOSAVIC, S.; MANDIR, A.S.; VILA, M.; MCAULIFFE, W.G.; DAWSON, V.L.; DAWSON T.M.;PRZEDBORSKI S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. **Nature Medicine.**v. 5,n.12, p. 1403-1409. Dez 1999

LI, J. O. W.; LI, W.; JIANG, Z.G.; GHANBARI, H.A. Oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Int. J. Mol. Sci.**v. 14, n.12, p.24438–24475, 2013

LIMA, F.A.V.; JOVENTINO, I.P.; JOVENTINO, F.P.; ALMEIDA A.C.; NEVES, K.R.T.; CARMO, M.R.; LEAL, L.K. A.M.; ANDRADE G.M.;VIANA, G.S.B. Neuroprotective Activities of *Spirulina platensis* in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Are Related to Its Anti-Inflammatory Effects. **Neurochem Res.** v.42, p. 3390-3400, 2017

LIMA, F.A.V. **Efeito neuroprotetor da spirulina platensis no parkinsonismo experimental induzido pela 6-OHDA.** Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, 107 f, 2018.

LUPATINI, A.L.; COLLA, L.M.; CANAN, C.;COLLA, E. Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. **J. Sci. Food Agric.** v.97,n.3, p.724-732, 2017

MCDONALD, W.M.; RICHARD, I.H.; DELONG, M.R. - Prevalence, etiology and treatment of depression in Parkinson's disease. **Biol Psychiatry** v.54, p.363-75, 2003.

MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral Models of Parkinson's Disease in Rodents: A New Look at an Old Problem. **Mov. Disord**, v.21, n. 10, p. 1595–1606, 2006.

MINGHETTI, L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 63, n.9, p. 901–910. Set,2004

MOON, H.E.; PAEK, S.H. Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. **Exp Neurobiol**. v.24, n.2, p.103-116, Jun. 2015

MORE, S.V.; KUMAR, H.; KIM, I.S.; SONG, S.Y.; CHOI, D.K. Cellular and molecular mediators of neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Mediators Inflamm**. v.2013, p.952375, 2013

MUÑOZ, Y.; CARRASCO, C.M.; CAMPOS, J.D.; AGUIRRE, P.; NÚÑEZ, M.T. Parkinson's Disease: The Mitochondria-Iron Link. **Parkinsons Dis**. v.2016, 2016

NAGATSU, T.; SAWADA, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. **Parkinsonism & related disorders**, v. 15, p. S3-S8, 2009.

ORTIZ, G.G.; GONZALEZ-USIGLI, H.; PACHECO-MOISES, F. P.; MIRELES-RAMÍREZ, M.A.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, A.L.; TORRES-SÁNCHEZ, E.D.; GONZÁLEZ-RENOVATO, E. D.; FLORES-ALVARADO, L. J.; MACÍAS-ISLAS, M.A.; RIVERO-MORAGREGA, P.; SÁNCHEZ GONZÁLEZ, V. Physiology and pathology of neuroimmunology: role of inflammation in Parkinson's Disease. **Physiology and Pathology of Immunology**, p.173-197, 2017

PAIXÃO, A.O.; JESUS, A.V.F.; SILVA F.S.; MESSIAS, G.M.S.; NUNES, T.L.G. M.; NUNES, T. L. G. M.; SANTOS, T.B.; GOMES, M. Z.; CORREIA, M.G.S. Doença de Parkinson: uma desordem neurodegenerativa. **Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 1, n.16, p. 57-65, 2013.

PARIKH, P.; MANI, U.; IYER, U. Role of Spirulina in the control of glycemia and lipidemia in type 2 *diabetes mellitus*. **Journal of Medicinal Food**, v.4, n.4, p.193-199, 2001.

PAXINOS, G; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. London: **Academic Press**, 1986.

PÉREZ-JUÁREZ, A.; CHAMORRO, G.; ALVA-SÁNCHEZ C.; PANIAGUA-CASTRO N.; PACHECO-ROSADO, J. Neuroprotective effect of *Arthrospira* (Spirulina) *platensis* against kainic acid-neuronal death, **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.8, p.1408-1412, 2016

PERFEITO, R.; REGO A.C.; Papel da alfa-sinucleína e da disfunção mitocondrial associada à doença de Parkinson. **Rev Neurocienc**, v.20, n.2, p. 273-284, 2012.

PIÑERO ESTRADA, J.E.; BERMEJO BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**. v.56, p.497-500. Jul, 2001

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **Eur J Pharmacol**. v. 47, n. 4, p. 379-391, 1978.

RACHAKONDA, V.; PAN, T. H.; LE, W. D. Biomarkers of neurodegenerative disorders: how good are they? **Cell Res. Review**. v.14, n. 5, p. 347-358, 2004.

RAJAEI Z, HOSSEINI M, ALAEI H. Effects of crocin on brain oxidative damage and aversive memory in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Arq. Neuro-Psiquiatr**. v.74, n.9, p.723-729, 2016.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: Cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n.2 p. 133-141, 2004.

RANSOHOFF, R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**. v.353, p.777-83, 2016

RIZOR, A.; PAJARILLO, E.; JOHNSON, J.; ASCHNER, M.; LEE, E. Astrocytic Oxidative/Nitrosative Stress Contributes to Parkinson's Disease Pathogenesis: The Dual Role of Reactive Astrocytes. **Antioxidants**. v.8, n.8, p.265, 2019

ROCHE, L. D.; DENIS, N. L.; LLOPIZ-ARZUAGA, A.; PENTON-ARIAS, E.; PENTON-ROL, G. **Efeitos protetores de C-Ficocianina contra a peroxidação lipídica de lipoproteínas séricas e microscópios hepáticos**, 2018. Disponível em < <http://pt.binmeibio-es.com/info/protective-effects-of-c-phycoyanin-against-li-23257711.html> > acesso em: 11/12/19

ROMAY, C.; LEDON, N.; GONZALEZ, R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. **Inflammation Research**, v. 47, n. 8, p. 334-338, 1998.

SAMPAIO, G.S.A. **Sintomas não motores de doença de Parkinson**: modelo de lesão intraestriatal por 6-OHDA em camundongos. Dissertação (mestrado em Neurociências e Biologia Celular) Universidade Federal do Para, Belém, 2014.

SANTANA MB. **Avaliação da estimulação da medula espinhal como modelo de tratamento da doença de Parkinson no primata *Callithrix jacchus***. Tese Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2014.

SANTIAGO-SANTOS, M. C.; PONCE-NOYOLA, T.; OLVERA-RAMIREZ, R.; ORTEGALÓPEZ, J.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R. O. Extraction and purification of phycocyanin from *Calothrix* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2047-2052, 2004.

- SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. *Spirulina platensis* – food for future: A review. **Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology**. v. 4, n.1, p. 26-33, 2014.
- SCHLOSSMACHER, M.G.; TOMLINSON, J.J.; SANTOS, G.; SHUTINOSKI, B.; BROWN, E.G.; MANUEL, D.; MESTRE, T. Modelling idiopathic Parkinson disease as a complex illness can inform incidence rate in healthy adults: the PREDIGT score. **The European journal of neuroscience**.v.45, n.1, p. 175–191, 2017.
- SERPA, E.; LIMA, F. A. V.; PEREIRA J. F.; NEVES K. R.T. Avaliação do efeito neuroprotetor da *Spirulina platensis*, em ratos com lesão estriatal produzida pela 6-hidroxi dopamina (6-OHDA), um Modelo experimental de doença de Parkinson. **Revista Encontros Universitários da UFC**. v.2, n.1, 2017
- SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson’s disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell. Tissue Res**. v.318, p. 215-24, 2004.
- SGARBIERI, V. C. Physiological-functional properties of milk whey proteins. **Rev. Nutr.** v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- SHIH, M.C.; AMARO JR, E.; FERRAZ, H.B.; HOEXTER, M.Q.; GOULART, F.O.; WAGNER J.; LIN, L.F.; FU, Y. K.; MARI, J. J.; LACERDA, A. L.T.; TUFIK, S., BRESSAN, R. A. Neuroimaging of the dopamine transporter in Parkinson’s disease: first study using [^{99m}Tc]-TRODAT-1 and SPECT in Brazil. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**.v.64, n.3a, Set.2006
- SILVA, T. P.; CARVALHO, C.R. A. Doença de Parkinson: o tratamento terapêutico ocupacional na perspectiva dos profissionais e dos idosos. **Cad. Bras. Ter. Ocup**.v. 27, n. 2, p. 331-344, 2019
- SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A.R. The 6-hydroxydopamine modelo of Parkinson’s disease. **Neurotox. Res**,v.11, p.151-67, 2007.
- SIMUNI, T. Diagnosis and management of Parkinson’s disease. **Medscape Neurology**; v.30, 2007.
- SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI S. Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. **Molecules**. v.24 n.8, p.1583, 2019
- SINHA, S.; PATRO, N.; PATRO, I.K. Maternal Protein Malnutrition: Current and Future Perspectives of Spirulina Supplementation in Neuroprotection. **Front Neurosci**. v.12, n.966, 2018
- SOUZA, C.F.M.; ALMEIDA, H.C.P.; SOUSA, J.B.; COSTA, P.H.; SILVEIRA, Y.S.S.; BEZERRA, J.C.L. A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. **Revista Neurociências**, v.19, n.4, p.718-723, 2011
- SPRENGER, F.; POEWE, W. Management of Motor and Non-Motor Symptoms in Parkinson’s Disease. **CNS drugs**, v. 27, n. 4, p. 259-272, 2013

STANDAERT, D.G; CALANTER, J.M. **Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica** "In" HARDMAN, JG; LIMBIRD, LE; GILMAN, AG. Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11 ed., p.166-185, 2010.

STEIDL,S.E.M; ZIEGLER,J.R;FERREIRA, F.V. DOENÇA DE PARKINSON: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Disc. Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 115-129, 2007.

STORCH, A., LUDOLPH, A. & SCHWARZ, J. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J. Neural Transm.* v.111,p. 1267–1286, 2004

STROMBERG, I., GEMMA, C., VILA, J., BICKFORD, P.C. Blueberry- and *Spirulina*-enriched diets enhance striatal dopamine recovery and induce a rapid, transient microglia activation after injury of the rat nigrostriatal dopamine system. **Exp Neurol** v. 196, n.2, p. 298–307, 2005

TABREZ, S., JABIR, N.R., SHAKIL, S., GREIG, N.H., ALAM, Q., ABUZENADAH, A.M., DAMANHOURI, G.A., KAMAL, M.A. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v.11, n.4, p.395-409, Jun 2012

TAN, B. L., NORHAIZAN, M.E., LIEW, W.P.P., RAHMAN, H.S. "Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases" **Frontiers in pharmacology**.v.9 p. 1162, 2018

TEIVE, H.A.G. Etiopatogenia da doença de Parkinson. **Rev Neurocienc** v.13, p. 201-14, 2005

TEIVE, H.A.G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** v. 56 n.1 São Paulo Mar. 1998.

TEIVE. H.A.G.; ZAVALA.J.A.A.; IWAMOTO.F.M.; SÁ. D.; JUNIOR. H.C. WERNECK.L.C. As Contribuições de Charcot e de Marsden para o desenvolvimento dos distúrbios do movimento nos séculos XIX e XX. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** v.59, n. 3-A, p. 633-636, 2001

THOMAS B. Parkinson's Disease: from molecular pathways in disease to therapeutic approaches. **Antioxid Redox Signal**.v.11 n.9, p. 2077-82, 2009

TIWARI,P.C, PAL, R. The potential role of neuroinflammation and transcription factors in Parkinson disease. **Dialogues in Clinical Neuroscience**.v.19, n.1, p. 71–80, 2017

TORRES-DURAN PV, FERREIRA-HERMOSILLO A, JUAREZ-OROPEZA MA. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of Mexican population: a preliminary report. **Lipids Health Dis.** v.6, p.33, 2007

TORRÃO, A. S; CAFÉ-MENDES, C. C; REAL, C. C; HERNANDES, M. S; FERREIRA A. F. B; SANTOS, T. O; CHAVES-KIRSTEN, G. P; MAZUCANTI, C. H. Y; FERRO, E. S; SCAVONE, C; BRITTO, L. R. G. Abordagens diferentes, um único objetivo: compreender os mecanismos celulares das doenças de Parkinson e de Alzheimer. **Rev Bras Psiquiatr.**v.34, n.12, 2012.

TOBON-VELASCO, J.C., PALAFOX-SANCHEZ, V., MENDIETA, L., GARCIA, E., SANTAMARIA, A., CHAMORRO-CEVALLOS, G., LIMON, I.D. Antioxidant effect of *Spirulina (Arthrospira) maxima* in a neurotoxic model caused by 6-OHDA in the rat striatum. **J. Neural. Transm.**v. 120, p. 1179-1189, 2013.

TYSNES O. B., STORSTEIN A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v.124,n.8, p. 901–905. 2017

UNGERSTEDT ,U. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behaviour. **Acta Physiol Scand Suppl.**v.367.p.49-68,1971

VERMA, R., NEHRU, B. Effect of centropheoxine against rotenone-induced oxidative stress in an animal model of Parkinson's disease. **Neurochemistry international.** v.55. p. 369-75, 2009.

WERNECK, A. L. S. Doença de Parkinson: Etiopatogenia, Clínica e Terapêutica. **Artigos de Revisão. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, UERJ, v. 9,n.1.Distúrbios do Movimento. Jan/Jun – 2010.

WILLIAMS-GRAY, C. H.; WORTH, P. F. Parkinson's disease. **Medicine**, v.44, n.9, p.542-546, 2016

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.111, p.544-7, Dez 1962.

WU, G.; FANG, Y.Z.; YANG, S. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition.**v.18, n.10, p. 872-9, 2002

YOUUDIM, M.B.H, EDMONDSON, D. & TIPTON, K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci.** v.7, p. 295-309, 2006.

ZHANG, F.; LU, J.; ZHANG, J.G.; XIE, J.X. Protective effects of a polysaccharide from *Spirulina platensis* on dopaminergic neurons in an MPTP-induced Parkinson's disease model in C57BL/6J mice. **Neural Regen Res.** v.10, n.2, p.308–313, 2015

PARECER CEUA - ESTÁCIO/FMJ

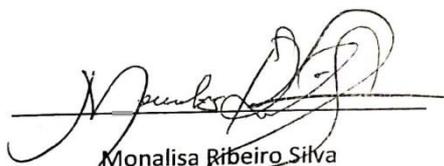
Nº de Protocolo: 2018.01.12

Título do Projeto: AÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DA FRAÇÃO PROTEICA DA SPIRULINA PLANTENSIS NO MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-HODA EM RATOS.

Pesquisador Responsável pelo Projeto: Giovany Michely Pinto da Cruz

A comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte decidiu pela **APROVAÇÃO** dos procedimentos éticos apresentados neste protocolo.

Juazeiro de Norte/CE, 26 de maio de 2018



Monalisa Ribeiro Silva

Presidente da CEUA

Anexo B – Submissão do Artigo em 2019 no Journal of Pharmacy and Pharmacology



(IF: 2.39, Qualis em Biodiversidade: B1)

Journal of Pharmacy and Pharmacology - Manuscript ID JPP-19-0861 [email ref: SE-6-a]

28-Sep-2019

Dear Dr. Viana:

Your manuscript entitled "A protein rich fraction from *Spirulina platensis* exerts neuroprotective action on hemiparkinsonian rats, probably related with its anti-inflammatory and antioxidant properties" by Lopes, Maria Janice; Delmondes, Gyllyandeson; Leite, Giovana; Cavalcante, Débora Rejane; Lima, Francisco Arnaldo; de Aquino, Pedro Everson; Neves, Kelly Rose; Costa, Andréia; Oliveira, Hermógenes David; Felipe, Cícero Francisco; Lima, Iri Sandro; Kerntopf, Marta Regina; Viana, Glauce, has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is JPP-19-0861.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jppharm> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jppharm>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Pharmacy and Pharmacology.

Sincerely,
Journal of Pharmacy and Pharmacology Editorial Office