



UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

DAYSE ROSÂNGELA SANTOS MARQUES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELO
ANIMAL PARA ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Aracaju
Fevereiro – 2016

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELO
ANIMAL PARA ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON**

Dissertação de Mestrado submetida à banca
examinadora para a obtenção do título de
Mestre em Saúde e Ambiente, na área de
concentração Saúde e Ambiente.

DAYSE ROSÂNGELA SANTOS MARQUES

Orientadoras
Professora Doutora Margarete Zanardo Gomes
Professora Doutora Sônia Oliveira Lima

Aracaju
Fevereiro – 2016

M357a Marques, Dayse Rosângela Santos
Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato hidroetanólico de própolis vermelha em modelo animal para estudo da doença de parkinson / Dayse Rosângela Santos Marques ; orientação [de] Profª. Drª Margarete Zanardo Gomes, Sônia Oliveira Lima. – Aracaju: UNIT, 2016.
59 p.; il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, 2016.

Inclui bibliografia.

1.6-OHDA. 2. Isoflavonas. 3. Tirosina hidroxilase. I. Gomes, Margarete Zanardo (orient.). II. Lima, Sônia Oliveira (orient.) III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 638.135:615.216

Ficha catalográfica: Delvânia Rodrigues dos Santos Macêdo CRB/5 1425

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HIDROETANÓLICO
DE PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA DOENÇA
DE PARKINSON**

Dayse Rosângela Santos Marques

“DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE”.

Aprovada por:

Margarete Zanardo Gomes, Ph.D.
Orientadora

Sônia Oliveira Lima, Ph.D.
Orientadora

Juliana Cordeiro Cardoso, Ph.D.
Universidade Tiradentes (Avaliadora)

Ana Cristina do Nascimento Pinheiro, Ph.D.
Universidade Tiradentes (Avaliadora)

Aracaju
Fevereiro – 2016

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos Específicos	12
CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA	13
3.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
3.1 Doença de Parkinson: quadro clínico epidemiológico	14
3.2 Etiologia e Fisiopatologia da DP	16
3.3 Tratamento da DP	18
3.4 Estudos pré-clínicos com produtos naturais	19
3.5 Própolis	22
3.6 Própolis Vermelha	23
3.6.1 Origem botânica e composição química	23
3.6.2 Atividade biológica	25
CAPÍTULO II – MATERIAL E MÉTODOS	28
4. METODOLOGIA	29
4.1.Obtenção e caracterização do EHPV	29
4.2.Ensaio biológico	29
4.3. Aspectos Éticos	30
4.4. Procedimento cirúrgico	30
4.5 Grupos Experimentais	30
4.5.1 Eutanásia e Obtenção das amostras de tecido	31
4.5.2 Reação imunohistoquímica para a enzima TH	31
4.5.3Análises de imagens	32
4.5.4 Análise estatística	33
CAPITULO III- RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.RESULTADOS	35
5.1 Resultados	35
5.2 Discussão	40
CAPITULO IV- CONCLUSÃO	43
6. Conclusão	44
CAPITULO V- REFERÊNCIAS	45

7. REFERÊNCIAS

46

LISTA DE TABELAS

	Pg.
Tabela 1: Trabalhos pré-clínicos utilizando 6-OHDA para investigação do efeito e mecanismo neuroprotetor de produtos naturais.	21
Tabela 2: Resultados da análise cromatográfica.	35

LISTA DE FIGURAS

	Pg.
Figura 1: Cromatograma do extrato hidroetanólico de própolis vermelha ilustrando os picos correspondentes aos marcadores daidzeína (P1), formononetina (P2), liquiritigenina (P3) e biochanina A (P4).	36
Figura 2: Porcentagem média de neurônios (A) e fibras (B) positivamente marcados para a enzima tirosina-hidroxilase (TH+) na substância negra compacta e no núcleo estriado, respectivamente, em relação ao lado contralateral à lesão. Os roedores foram eutanasiados 21 dias após a microinjeção de solução salina ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA). O extrato hidroetanólico de própolis vermelha foi administrado a cada três dias nas doses de 10 (EHPV 10) e 50 (EHPV 50) mg/kg. Letras diferentes indicam valores estatisticamente distintos. AS colunas representam as médias e as barras representam o EPM.	37
Figura 3: Fotomicrografias mostrando neurônios positivamente marcados para a enzima tirosina-hidroxilase na substância negra compacta de ratos dos grupos salina/veículo (A), 6-OHDA/veículo (B), 6-OHDA/EHPV 10 (C) e 6-OHDA/EHPV 50 (D), do lado da lesão, 21 dias após as cirurgias. Aumento de 100X.	38
Figura 4: Fotomicrografias mostrando fibras positivamente marcadas para a enzima tirosina-hidroxilase no núcleo estriado de ratos dos grupos salina/veículo (A), 6-OHDA/veículo (B), 6-OHDA/EHPV 10 (C) e 6-OHDA/EHPV 50 (D), do lado da lesão, 21 dias após as cirurgias. Aumento de 40X.	39

AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA DOENÇA DE PARKINSON

Dayse Rosângela Santos Marques

RESUMO

As características fisiopatológicas doença de Parkinson (DP) incluem o estresse oxidativo, neuroinflamação e apoptose. O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora contra lesão de nervo ciático periférico em ratos. Este trabalho se propôs a avaliar o efeito neuroprotetor do EHPV contra a lesão da via dopaminérgica nigroestriatal induzida por aplicação intracerebral de hidroxidopamina (6-OHDA) em roedores. O EHPV foi caracterizado quimicamente por cromatografia líquida de alta eficiência. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (CEUA, protocolo número 170610). Ratos Wistar machos (250 ± 50 g) foram anestesiados (cetamina/xilazina, 1 mL / 100 g) e receberam microinjeção intraestriatal unilateral de solução salina contendo ácido ascórbico (0,02%, grupo sham) ou 6-OHDA (20 μ g/2 μ l, grupo lesão) nas coordenadas estereotáticas AP: 1,2; VL: 2,5 e DV: 5,0 em relação ao Bregma. Os roedores foram tratados com veículo (Tween 80, 2% em água destilada, 1 ml) ou EHPV (10 e 50 mg/kg) por via oral durante duas semanas após a lesão, em dias intercalados a partir o dia da cirurgia. A eutanásia em câmara de CO₂ foi realizada no 28º dia, para remoção dos encéfalos que foram fixados em formalina e embebidos em parafina. Secções (5 μ m) do estriado e substância negra compacta (SNc) foram coradas por imunohistoquímica para tirosina-hidroxilase (TH), marcador de neurónios dopaminérgicos. O método indireto avidina-biotina-peroxidase (ABC) foi empregado antes da revelação com diaminobenzidina. Imagens das regiões de interesse foram obtidas com um microscópio óptico acoplado a câmara fotográfica e microcomputador. Foi quantificado o número médio de neurónios positivos para TH na SNc bilateralmente (aumento de 100X), enquanto a inervação estriatal foi avaliada por densitometria óptica (aumento de 40X). Ao menos três campos em cada plano rostrocaudal das estruturas foram registrados. Os dados foram expressos como porcentagem em relação ao lado intacto e as comparações entre os tratamentos foram feitos por meio de ANOVA de uma via seguido por teste post-hoc de Tukey ($P < 0,05$). Na composição química foram identificados os compostos neuroprotetores daidzeína (3,1 mg/g), formononetina (6,3 mg/g), liquiritigenina (10 mg/g) e biochanina A (7,2 mg/g). No ensaio biológico, o número médio de neurónios remanescentes na SNc foi reduzido após lesão ($60,4\% \pm 2,7$) e os valores foram significativamente aumentadas quando administrado o EHPV a 10 mg/kg (grupo lesão tratado com EHPV 10 mg/kg: $88,9\% \pm 6,1$; grupo lesão tratado com EHPV 50 mg: $81,4\% \pm 3,3$; $F_{3-31} = 5,50$, $p = 0,0042$). A inervação dopaminérgica também foi preservada pela administração de HERP 10 (grupo lesão tratado com veículo: $85,6\% \pm 1,9$; grupo lesão tratado com HERP 10 mg: $100,4\% \pm 6,8$; grupo lesão tratado HERP 50 mg: $89,4\% \pm 3,4$; $F_{3-54} = 6,84$, $p = 0,0006$). Em conclusão, o EHPV a 10 mg/kg, rico em isoflavonas, mostrou efeito protetor contra a lesão dopaminérgica induzida pela 6-OHDA e pode representar um agente promissor para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: 6-OHDA, isoflavonas, tirosina hidroxilase.

NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF RED PROPOLIS HYDROALCOHOLIC EXTRACT IN A RAT MODEL OF PARKINSON'S DISEASE.

Dayse Rosângela Santos Marques

ABSTRACT

The hallmarks of Parkinson's disease (PD) physiopathology include oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis. The hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) has received great attention because of its antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions, among others. In this work the neuroprotective effect of HERP against the dopaminergic cell loss induced by hydroxydopamine (6-OHDA) *in vivo* was evaluated. The HERP was chemically characterised by HPLC. The study was approved by the local ethical committee (CEUA, protocol number 170610). Male Wistar rats (250 ± 50 g) were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (1 mL/100g) and received unilateral intraestriatal injection (stereotaxic coordinates AP: 1.2; VL: 2.5 and DV: 5.0 from Bregma) of ascorbate saline (0.02%, sham group) or 6-OHDA (20 µg/2µl, lesion group). The rodents were treated orally with vehicle (Tween 80, 2% in distilled water, 1 mL) or HERP (10 and 50 mg/kg) for 2 weeks thereafter, every other day. The euthanasia was carried out at day 28 in a CO₂ chamber. The rat brains were removed, formalin-fixed and paraffin-embedded. The sections (5 µm) of striatum and substantia nigra pars compacta (SNc) were stained by immunohistochemistry for tyrosine-hydroxylase (TH), a marker for dopaminergic neurons. The Avidin-Biotin Complex (ABC) indirect method was employed before the revelation with diaminobenzidine. Image analysis from the slices was performed with an optic microscope coupled to a photographic camera and a personal computer. The mean number of TH positive neurons in the SNc was bilaterally counted (100X magnification) while striatal innervation was assessed by optical densitometry (40X magnification). For each rat, at least three sections of three different plates in each structure were recorded for the analysis. Histological data were expressed as percentage of the intact side and comparisons between treatments were made through one way ANOVA followed by Tukey post-hoc ($p < 0.05$). In the chemical composition they were identified the neuroprotective compounds daidzein (3.1 mg/g), formononetin (6.3 mg/g), liquiritigenin (10 mg/g) and biochanin A (7.2 mg/g). In the biological assay, the mean number of TH reminiscent neurons in the SNc was reduced after lesion but the values were significantly increased when HERP 10 mg/kg was administered (values from sham, vehicle treated: 94.5% ± 3.3; lesion, vehicle treated: 60.4% ± 2.7; lesion, HERP 10 mg: 88.9% ± 6.1; lesion, HERP 50 mg: 81.4% ± 3.3; $F_{3-31} = 5.50$, $p = 0.0042$). Also the dopaminergic innervation was preserved by HERP 10 mg/kg (sham, vehicle treated: 107.7% ± 4.2; lesion, vehicle treated: 85.6% ± 1.9; lesion, HERP 10 mg: 100.4% ± 6.8; lesion, HERP 50 mg: 89.4% ± 3.4; $F_{3-54} = 6.84$, $p = 0.0006$). Thus, the HERP at 10 mg/kg that is rich in isoflavones was protective against dopaminergic loss induced by 6-OHDA. It can be, therefore, a promising agent for the treatment of neurodegenerative diseases.

Key-words: 6-OHDA, isoflavones, tyrosine hydroxylase

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa crônica que afeta 1% da população acima de 55 anos. É caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra com consequente depleção de dopamina (DA) no núcleo estriado (WIRDEFELDT *et al.*, 2011; MUANGPAISAN *et al.*, 2011).

As manifestações fisiológicas decorrentes da disfunção dopaminérgica no circuito dos núcleos da base incluem tremores, bradicinesia, reflexos posturais anormais, rigidez, acinesia e instabilidade postural. Estas alterações motoras podem ser acompanhadas por sintomas não motores, tais como déficits olfativos, prejuízo do sono e distúrbios neuropsiquiátricos (DEXTER, JENNER, 2013; CHAUDHURI, SCHAPIRA, 2009).

Ainda não existem tratamentos efetivos para esta doença progressiva e debilitante. O precursor dopaminérgico Levodopa tem sido utilizado para tratar os sintomas da DP, mas o tratamento a longo prazo induz o surgimento de anormalidades motoras chamadas discinesias (HAUSER *et al.*, 2007; BASTIDE *et al.*, 2015). Dessa forma, faz-se necessária a busca por novas estratégias visando a interrupção da morte neuronal.

Embora a etiologia da DP ainda não seja completamente esclarecida (OBESO *et al.*, 2010), tem sido reportado que eventos bioquímicos que envolvem o estresse oxidativo, anormalidades da função mitocondrial, neuroinflamação, apoptose e exitotoxicidade (LESZEK *et al.*, 2016; RYAN *et al.*, 2015) estão relacionados à iniciação e progressão da doença (BLESA *et al.*, 2015).

Um interesse crescente tem sido dedicado ao uso de produtos de origem natural para tratamento ou prevenção da DP. Considerando-se a fisiopatologia desta doença, produtos naturais e seus componentes bioativos que reduzem a formação de mediadores pró-inflamatórios e/ou a formação de espécies reativas de oxigênio podem promover neuroproteção, como já observado experimentalmente para os extratos provenientes dos gêneros *Alpinia*, *Astragalus*, *Ginkgo* e *Pueraria*, entre outros (SCHMITT *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013).

A própolis vermelha é um produto natural de origem apícola encontrado na Nordeste do Brasil. Estudos utilizando extratos da própolis vermelha mostraram que este composto exerce ação antioxidante (CABRAL *et al.*, 2009; FROZZA *et al.*, 2013), e anti-inflamatória (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015), além de apresentar atividades anticancerígena (PINHEIRO *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015), cicatrizante (ALMEIDA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013), antimicrobiana (BISPO JUNIOR *et al.*, 2012), antifúngica (PIPPI *et al.*, 2015) e citotóxica

contra células tumorais (FRANCHI *et al.*, 2012). Também foi observada ação neuroprotetora do extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) após lesão de nervo periférico (BARBOSA *et al.*, 2015) e lesão medular (DOS SANTOS, 2013) em ratos.

As ações biológicas do EHPV são comumente associadas a grandes quantidades de flavonóides como a biochanina A, formononetina, isoliquiritigenina, rutina, liquiritigenina, daidzeína, quercetina, dalbergina e pinocembrina em sua composição química (DAUGSCH *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; AWALE *et al.*, 2008). Destaca-se que alguns destes compostos apresentaram ação neuroprotetora *in vivo* frente à isquemia e trauma cerebral como a formononetina (LIANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014), a daidzeína (ARAS *et al.*, 2015) e a biochanina A (WANG *et al.*, 2015).

Portanto, considerando as propriedades químicas, antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora da própolis vermelha, suscita-se como hipótese que o EHPV possa diminuir a morte neuronal dopaminérgica, tal como ocorre na DP. Assim, o presente trabalho se propôs a avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento oral com EHPV após lesão da via nigroestriatal por aplicação de 6-OHDA em ratos. Este modelo animal tem sido útil para esclarecer os mecanismos de morte celular e avaliar estratégias terapêuticas para a doença, além de reproduzir os principais processos celulares da DP, como o estresse oxidativo, neurodegeneração progressiva, neuroinflamação e morte por apoptose (BLESA *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL:

Avaliar o efeito neuroprotetor do tratamento oral com EHPV sobre a morte neuronal dopaminérgica em modelo experimental para estudo da DP.

2.2 ESPECÍFICOS:

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Caracterizar quimicamente o EHPV obtido da própolis vermelha de Sergipe por meio de análise cromatográfica, a fim de identificar principais compostos bioativos;

Avaliar o efeito do tratamento com EHPV sobre a quantidade de neurônios dopaminérgicos remanescentes e sobre a densidade de inervação dopaminérgica após lesão, por meio de análise imunohistoquímica.

Capítulo I – REVISÃO DE LITERATURA

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Doença de Parkinson: quadro clínico e epidemiológico

A doença de Parkinson (DP) foi relatada pela primeira vez em 1755 a partir das pesquisas do médico James Parkinson. A doença foi denominada por Parkinson como paralisia agitante, pois se caracteriza por movimentos trêmulos involuntários com redução da força muscular, inclinação do tronco para frente e aceleração involuntária da marcha, ou festinação (PARKINSON, 1817, 2002).

As manifestações clínicas da DP incluem ainda rigidez, acinesia, bradicinesia e instabilidade postural (RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2011). Estas manifestações motoras podem ser acompanhadas por sintomas não motores, tais como déficit olfativo, prejuízo do sono e distúrbios neuropsiquiátricos (CHAUDHURI, SCHAPIRA, 2009). Dado o conjunto de sintomas, a DP interfere negativamente na qualidade de vida dos indivíduos acometidos e de seus familiares (NAVARRO-PETERNELLA, MARCON, 2010).

Atualmente, a DP é a segunda desordem neurodegenerativa crônica em prevalência relacionada à idade (DEXTER; JENNER, 2013). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que a DP atinge 1 a 2% da população acima de 65 anos, sendo que no Brasil sua prevalência é de 3% e estima-se que 200 mil pessoas sofram com o problema. Considerando-se o envelhecimento da população - no Brasil estima-se que em 2050 haverá 226 idosos de 60 anos ou mais para cada 100 crianças e adolescentes (IBGE, 2009) – este quadro se torna ainda mais relevante.

As características fundamentais da DP estão associadas a disfunções no circuito neuronal dos núcleos da base, presentes no encéfalo, que têm como função o planejamento, iniciação, execução e finalização de movimentos coordenados. A denominação núcleos da base se refere a cinco núcleos subcorticais interligados: caudado, putâmen, globo pálido (porção interna e externa), núcleo subtalâmico e substância negra (parte compacta e reticulada). O globo pálido localiza-se na lateral da cápsula interna, medialmente ao putâmen, e divide-se em segmentos interno (GPi) e externo (GPe). Em adição a esses agrupamentos neuronais telencefálicos, o núcleo subtalâmico (NST) no diencefalo e a substância negra no mesencéfalo também são considerados como núcleos da base (SCALZO; JÚNIOR, 2009).

Neste circuito, os estímulos aferentes são recebidos do córtex cerebral e os estímulos eferentes são enviados através do tálamo, de volta aos córtices pré-frontal, pré-motor e

motor (QUIROGA-VARELA *et al.*, 2013). O neoestriado (caudado e putâmen) recebe aferências do córtex sensório-motor e constitui o principal núcleo de entrada do circuito. Sua atividade, que influencia os núcleos da saída e, por conseguinte, a facilitação ou inibição dos movimentos, é regulada por conexões aferentes da substância negra parte compacta (JUNIOR; FELICIO; PRADO, 2006), que sintetiza como neurotransmissor a dopamina (JONES; AUSTEN-GODWIN, 2000).

Na DP ocorre degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta (SNc) com consequente depleção de dopamina no neoestriado. Esta via é chamada de nigroestriatal. Na ausência de dopamina, é inibida a transmissão que facilita os movimentos (por meio da ação da dopamina em receptores estriatais tipo D1), enquanto é hiperativada a transmissão que os inibe (por meio da ação da dopamina em receptores estriatais tipo D2) (CRUZ *et al.*, 2011). Ocorre um bloqueio da ativação cortical pelo tálamo e o córtex motor deixa de programar e comandar movimentos, com consequente acinesia, rigidez muscular e diminuição dos movimentos, enquanto descargas dessincronizadas no tálamo levam à ocorrência de tremores (DEJEAN *et al.*, 2012; LENT, 2010).

A perda inicial de neurônios dopaminérgicos na DP que promove o aparecimento dos sintomas é da ordem de 60% a 70%, maior na camada ventrolateral da substância negra compacta, progredindo para as camadas medial, ventral e dorsal (PEREIRA *et al.*, 2007). Embora seja considerada uma afecção caracterizada por déficits do sistema dopaminérgico, também ocorrem distúrbios nos sistemas colinérgico, serotoninérgico e noradrenérgico, uma vez todos que estes neurotransmissores participam das vias de sinalização dos núcleos da base (JELLINGER, 2012).

Os neurônios dopaminérgicos contêm neuromelanina e, com a perda de neurônios na DP, essa região sofre despigmentação. Por este motivo, acredita-se que quanto mais clara a substância negra, maior é a perda de dopamina. À medida que a doença progride e os neurônios se degeneram, eles desenvolvem inclusões citoplasmáticas, que são denominados corpos de Lewy. A deposição da proteína alfa sinucleína, que forma os corpos de Lewy e a redução na expressão da enzima tirosina hidroxilase (enzima limitante da síntese de dopamina) são marcas patológicas da DP (ZUCCA *et al.*, 2014; SOUZA, 2011).

3.2 Etiologia e Fisiopatologia da DP

A DP é uma doença idiopática, decorrente de vários fatores, que podem ser genéticos ou ambientais e envolvem eventos como o estresse oxidativo, anormalidades da função mitocondrial, neuroinflamação, apoptose e excitotoxicidade (RYAN *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2011). A exposição a agentes tóxicos ambientais, principalmente pesticidas, metais e

solventes pode levar à perda seletiva dos neurónios dopaminérgicos na SNc através da alteração dos mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento da DP, tais como a disfunção mitocondrial, ativação da micróglia e inflamação, que convergem na produção de estresse oxidativo (BLESA *et al.*, 2015; CHIN-CHAN, NAVARRO, QUINTANILLA; 2015).

Em condições fisiológicas normais, existe um equilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio e sua eliminação pelo sistema de óxido-redução. O estresse oxidativo se dá quando há um desequilíbrio entre produção e eliminação com tendência para predomínio de produção e é causa de dano neuronal observado em várias doenças neurológicas incluindo a DP (MOSLEY *et al.*, 2006). É definido como a situação na qual a formação de espécies reativas (de oxigênio, nitrogênio, etc.) excede a capacidade de defesa antioxidante e de reparo da célula, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a a morte por apoptose ou necrose (BARBOSA *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2008).

A produção da dopamina ocorre no encéfalo pela ativação da enzima tirosina hidroxilase, que transforma o aminoácido tirosina em L-DOPA. Esta, posteriormente, será descarboxilada constituindo a dopamina. Regiões encefálicas ricas em catecolaminas são extremamente vulneráveis a geração de radicais livres (MEDEIROS *et al.*, 2016; SEGURA-AGUILAR *et al.*, 2014; MOSLEY *et al.*, 2006). Por exemplo, durante o processo de metabolismo da dopamina, são gerados radicais livres como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). A metabolização da dopamina pode ocorrer através de enzimas como a monoamino oxidase (MAO) ou por decomposição espontânea através da auto-oxidação, neste caso ocorre liberação do radical livre H_2O_2 e formação de dopamina-quinona. Níveis elevados de H_2O_2 podem liberar íons férricos de proteínas como a hemoglobina e citocromo, que por sua vez reduzem o H_2O_2 a radical hidroxila (HO^-) (ZUCCA *et al.*, 2014; RODRIGUES; CAMPOS, 2006). O HO^- é o radical mais reativo encontrado *in vivo* capaz de oxidar carboidratos, lipídios, proteínas e DNA. Portanto, o metabolismo da DA pode agravar os danos nos tecidos pelo aumento dos níveis do radical livre H_2O_2 (DANIELSON e ANDERSEN, 2008; RAPPOLD e TIEU, 2011).

O dano oxidativo pode ser gerado por disfunção mitocondrial, auto-oxidação da dopamina, agregação de alfa-sinucleína, ativação da micróglia, alterações na sinalização mediada por cálcio (excitotoxicidade) e excesso de íons ferro. Em adição, alterações nas vias de transcrição de sistemas antioxidantes como a glicogênio sintase quinase 3β (GSK- 3β), fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NrF2), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), fator nuclear kappa B (NF- κ B) e atividade diminuída de superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona tem sido correlacionada com o aumento da idade e com a incidência da DP (KUMAR *et al.*, 2012).

Ao mesmo tempo, estudos experimentais e *post-mortem* sugerem que a inflamação está presente tanto em lesões agudas do Sistema Nervoso Central (SNC) quanto em doenças neurodegenerativas (HERNANDEZ-ROMERO *et al.*, 2012). Células da glia estão envolvidas na neuroinflamação e a desregulação ou ativação glial excessiva pode resultar na morte neuronal (HIRSCH *et al.*, 2003). Em condições fisiológicas, esta população de células é capaz de reduzir a liberação do glutamato em processos de excitotoxicidade, diminuir a formação de radicais livres, restabelecer a barreira hematoencefálica lesionada e promover a neurovascularização e neurogênese. Entretanto, a reação astrocitária excessiva resulta na falência da reparação da barreira hematoencefálica, infiltração leucocitária, desmielinização severa e morte de células oligodendrócitos (WANG, LIU e ZHOU, 2015).

A ativação microglial prolongada com liberação sustentada de mediadores pró-inflamatórios [fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas (IL) IL-1 β , IL-6] também contribui para gerar o estresse oxidativo (LESZEK *et al.*, 2016) e observou-se que tratamentos com anti-inflamatórios como citocinas anti-inflamatórias [IL-10 e fator de transformação do crescimento beta (TGF β 1)], inibidores de ciclo-oxigenase (COX), NADPH oxidase e do NF- κ B podem diminuir a neurodegeneração, (PETERSON, FLOOD, 2012).

Além dos níveis de citocinas, as neurotrofinas e fatores de morte celular programada (apoptose) também se encontram modificados no cérebro e no líquido cérebroespinal de pacientes, bem como em modelos experimentais de DP. Como exemplo podem ser citados membros da família de genes anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-xL, que exercem seus efeitos na manutenção da integridade da superfície externa da membrana mitocondrial. Por outro lado, genes pró-apoptóticos, como Bax, comprometem a integridade da membrana levando à liberação de fatores proapoptóticos como o citocromo C no citosol, que resulta na ativação da enzima caspase-3 e morte celular. O óxido nítrico e drogas serotoninérgicas parecem ser capazes de modular estes fatores (SHARIFI *et al.*, 2015; SINGH, DIKSHIT, 2007).

3.3 Tratamento da DP

Somente na década de 60, após a identificação das alterações patológicas e bioquímicas no cérebro de pacientes com DP, surgiu o primeiro tratamento com sucesso no tratamento dessa enfermidade. A Levodopa (L-DOPA), produz benefícios clínicos para praticamente todos os pacientes e reduz a mortalidade causada por esta doença. No entanto, logo após a introdução da mesma, se tornou evidente que o tratamento por longo prazo era complicado pelo desenvolvimento de efeitos adversos que incluem flutuações motoras chamadas discinesias e complicações neuropsiquiátricas (HAUSER *et al.*, 2007; BASTIDE *et al.*, 2015).

Os medicamentos mais utilizados no tratamento da DP são: anticolinérgicos para melhorar os tremores; antidepressivos tricíclicos, inibidores seletivos de recaptação da serotonina, antipsicóticos e anticonvulsivantes e os fármacos dopaminérgicos que estimulam diretamente os receptores de dopamina. Neste caso, destaca-se a L-DOPA devido à diminuição dos sintomas parkinsonianos (FOX *et al.*, 2011; GOETZ *et al.*, 2005).

A L-DOPA é o tratamento padrão para a DP, mas os efeitos adversos provocados por este fármaco fazem com que seja cautelosa a sua utilização. Quando o tratamento farmacológico e de reabilitação da DP passam a não surtir os efeitos terapêuticos desejados ou ocorrem manifestações adversas não controladas apesar do ajuste da medicação, indica-se o tratamento cirúrgico que pode ser realizado através de duas condutas distintas: a estereotaxia (palidotomia ou talamotomia) e a estimulação cerebral profunda. Ainda assim, os resultados do tratamento cirúrgico não são efetivos para alguns pacientes (GONÇALVES, LEITE, PEREIRA, 2011).

Os efeitos colaterais dos fármacos antiparkinsonianos tradicionais determinam que esses só sejam iniciados quando os sintomas venham a prejudicar a qualidade de vida (HECHTNER *et al.*, 2014). Na fase mais avançada da DP, por ser um distúrbio neurodegenerativo, os tratamentos medicamentosos serão menos eficazes em amenizar seus sintomas (ROGRIGUES, CAMPOS, 2006; MANCOPES *et al.*, 2013). É estimado que o custo anual mundial com medicamentos antiparkinsonianos esteja em torno de 11 bilhões de dólares, sendo cerca de 3 a 4 vezes mais caro para os pacientes na fase avançada da doença (FINDLEY, 2007; RODRIQUEZ-BLAZQUEZ *et al.*, 2015).

Ainda que estudos recentes tenham proposto modificações na formulação, vias de administração e terapias concomitantes à L-DOPA para redução dos efeitos adversos (LOTIA, JANKOVIC, 2016), novas alternativas terapêuticas são necessárias visando a melhora da qualidade de vida dos indivíduos acometidos.

3.4 Estudos pré-clínicos com produtos naturais

Modelos experimentais que utilizam animais tem sido de fundamental importância para o avanço do conhecimento acerca da fisiopatologia da DP, bem como ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (JACKSON-LEWIS, BLESÁ, PRZEDBORSKI, 2012). A 6-hidroxdopamina (6-OHDA) é uma toxina eficaz para induzir morte neuronal dopaminérgica em ratos, camundongos, gatos e primatas, predominantemente usada para produção de lesões unilaterais. A droga é injetada na via nigroestriatal e se acumula nos neurônios dopaminérgicos levando-os à morte (UNGERSTEDT, 1968). Em ratos, os efeitos da depleção extensa de dopamina podem ser acessados por exames comportamentais, como o teste rotatório em resposta a agonistas dopaminérgicos e o teste de campo aberto.

Embora os efeitos da 6-OHDA causem sintomas semelhantes aos da DP, as lesões proporcionadas não resultam na formação de corpos de Lewy na substância negra. Entre os efeitos comportamentais, destacam-se a acinesia, bradicinesia e a instabilidade postural (DAUER AND PRZEDBORSKI, 2003).

O primeiro modelo de exploração da neurotoxicidade da 6-OHDA foi desenvolvido em 1968 por Ungerstedt que consistiu na injeção da toxina bilateralmente na SNc de ratos, obtendo-se um modelo animal de acinesia com uma taxa de mortalidade muito elevada (UNGERSTEDT 1971a,b). Somente posteriormente a 6-OHDA foi injetada unilateralmente e tornou-se uma das neurotoxinas mais amplamente utilizadas para modelagem experimental para DP. A aplicação unilateral permite avaliar os mecanismos de morte celular do lado lesionado e os mecanismos compensatórios no lado contralateral (SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).

A 6-hidroxidopamina (6-OHDA) não atravessa a barreira hematoencefálica, o que exige a sua injeção direta na parte compacta da substância negra (SNc) ou no corpo estriado por meio de cirurgia estereotáxica para desencadear a morte neuronal. Sua característica principal associada à DP é gerar o estresse oxidativo, mas também observa-se neuroinflamação e apoptose. A 6-OHDA, tem alta afinidade pelo transportador de dopamina (DA) na fenda sináptica, é captada pelo sistema de transporte da dopamina e age de modo seletivo sobre os neurônios dopaminérgicos da substância negra. Após a entrada na célula, a toxina é convertida em 6-OHDA-quinona em uma reação que produz espécies reativas de oxigênio (ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2008; RODRIGUES; CAMPOS, 2006).

Quando injetada diretamente na SNc (corpos celulares) ou no feixe prosencefálico medial (axônios), a morte neuronal ocorre rapidamente e massiva. Por outro lado, a aplicação no estriado (terminais) promove, através do transporte retrógrado da toxina, perda parcial e progressiva dos neurônios dopaminérgicos mesencefálicos que pode ser verificada depois de quatro semanas após a lesão (KIRIK *et al.*, 2000).

Este modelo tem sido amplamente utilizado nos últimos anos para investigação de novos produtos com potencial para interromper ou retardar a morte neuronal dopaminérgica, entre eles os produtos naturais, com ação antioxidante, anti-inflamatória e antiapoptose. Alguns exemplos, bem como os mecanismos de ação destes produtos frente às modificações deletérias no sistema dopaminérgico são ilustrados na tabela 1.

Os produtos naturais foram usados na antiguidade para o tratamento de várias doenças (GRAGG *et al.*, 2013). Produtos farmacêuticos modernos de origens naturais foram desenvolvidos através do avanço tecnológico e industrial (MISHRA; TIWARI, 2011). Inovações têm acontecido para melhorar os tratamentos convencionais e intensificar as pesquisas a partir da utilização destes produtos, que exercem importantes ações biológicas através de estruturas diversificadas em sua composição química (SCHMITT *et al.*, 2011;

ZHANG *et al.*, 2013). No Brasil, o avanço nas pesquisas para utilização de produtos naturais tem proporcionado a descoberta de novos componentes químicos (KUMAR *et al.*, 2007).

Tabela 1: Trabalhos pré-clínicos utilizando 6-OHDA para investigação do efeito e mecanismo neuroprotetor de produtos naturais.

Referência	Produto	Efeitos sobre a lesão
BITU PINTO <i>et al.</i> , 2015. <i>Evid Based Complement Alternat Med.</i>	<i>Camellia sinensis</i> (chá verde); Epicatequina, Epigallocatequina	Reversão de déficits motores, emocionais e cognitivos, diminuição da peroxidação lipídica, diminuição da formação e nitritos e nitratos, restauração dos níveis de dopamina estriatal, recuperação da expressão de TH, inibição da expressão COX-2 e da iNOS.
KIASALARI <i>et al.</i> , 2015. <i>Cell Mol Neurobiol.</i>	<i>Hypericum perforatum</i> (erva de São João)	Reversão de déficits comportamentais, diminuição da formação de malondialdeído e glutathione oxidase, aumento da catalase, normalização a expressão de GFAP e TNF- α , diminuição da fragmentação do DNA e aumento da expressão TH.
CALOU <i>et al.</i> , 2014. <i>Parkinsons Dis.</i>	<i>Myracrodruon urundeuva</i> (planta do semiárido)	Reversão de déficits comportamentais, restauração da expressão de TH, diminuiu a expressão GFAP e OX-42 (microglia), restauração os níveis de DOPAC estriatal.
REZAEI, ALIREZAEI M, 2014. <i>J Physiol Sci.</i>	<i>Althaea officinalis</i>	Diminuição da oxidação lipídica, atenuação de alterações comportamentais, proteção de neurônios marcados para TH.
OH <i>et al.</i> , 2013. <i>Phytother Res</i>	<i>Sanguisorbae radix</i>	Inibição de NADPH oxidase, aumento na expressão do antioxidante endógeno heme oxigenase 1.
SHOBANA, KUMAR, SUMATHI, 2012. <i>Cell Mol Neurobiol</i>	<i>Bacopa monniera</i> Linn	Reversão de déficits comportamentais, diminuição da peroxidação lipídica, restauração de atividade catalase e superóxido dismutase, aumento da glutathione reduzida.
KWON <i>et al.</i> , 2012. <i>Food Chem Toxicol</i>	<i>Lonicera japonica</i>	Inibição de alterações mitocondriais e de genes pró-apoptóticos e inibição do estresse oxidativo mediado por MAPK, PI3K/Akt e NF- κ B

TH: marcador de neurônios dopaminérgicos (corpos celulares e terminais), COX-2: enzima ciclo-oxigenase 2, iNOS: sintase de óxido nítrico induzida - presente em macrófagos, GFAP: proteína glial fibrilar ácida – macroglia, TNF- α : fator de necrose tumoral alfa, DNA: ácido desoxirribonucleico, DOPAC: metabólito de dopamina, MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno, PI3K/Akt: via de sinalização intracelular dependente da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3k)/proteína kinase B (ou AKT) e NF- κ B: factor nuclear kappa B.

3.5 Própolis

A própolis é um produto natural apícola comercializado de forma lucrativa em várias partes do mundo. A utilização deste recurso natural causa um baixo impacto ao meio

ambiente e colabora para o desenvolvimento econômico da região, pois é produzida por pequenos produtores (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Os apiterápicos que apresentam indicações terapêuticas podem ser registrados como medicamentos específicos segundo a Resolução-RDC nº 132, de 29 de maio de 2003, D.O.U. de 02/10/2003 (ANVISA, 2005) e a maioria dos produtos à base de própolis comercializados no Brasil possui registro (BRASIL, 2001). Os limites para a fixação de identidade e qualidade da própolis são preconizados pelo Ministério da Agricultura através da Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. De acordo com a ANVISA (2005) “Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais estas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto”.

A palavra própolis é de origem grega, que significa: “em defesa da cidade ou da colmeia” (BANKOVA *et al.*, 2000). As abelhas utilizam a própolis para impermeabilização, esterilização, embalsamamento e vedação da colmeia para evitar a entrada de intrusos (BURDOCK, 1998; BANKOVA *et al.*, 2000; ALMUTAIRI *et al.*, 2014).

A própolis possui na sua composição resina e bálsamo (50-60 %), ceras (30-40%), óleos essenciais e aromáticos (5-10%), pólen (5%) e outras substâncias como, manganês, estrôncio, alumínio, cálcio, ferro, cobre e vitaminas B1, B2, B6, C e E.. No entanto, a composição química da própolis pode variar de acordo com o local e época de coleta, a flora da região e tais características químicas podem influenciar suas propriedades físicas e biológicas (NUNES *et al.*, 2009; MENDONÇA, 2011). Por este motivo, a caracterização da sua qualidade é de grande importância (PEREIRA *et al.*, 2002; LOTTI *et al.*, 2010; SFORCIN *et al.*, 2011).

As pesquisas reportam ações biológicas da própolis, como atividade antimicrobiana (SIQUEIRA *et al.*, 2008; BISPO JUNIOR *et al.*, 2012;), anti-inflamatória (LÉDON, 1997), cicatrizante, anestésica e antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2013; GECKIL *et al.*, 2005), antitumoral, hematoestimuladora (CAVALCANTE *et al.*, 2011), radioprotetora (ORŠOLIC; BAŠIC, 2005), antiparasitária (MONZOTE *et al.*, 2012), anti-herpes (AMOROS *et al.*, 1992) e ação hormonal (SONG *et al.*, 2002).

Já foram identificados em diferentes amostras de própolis mais de 300 constituintes, dentre eles os flavonoides, fenóis e aminoácidos, ácidos aromáticos, ácidos graxos (PARK *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; LUSTOSA *et al.*, 2008; ALMUTAIRI *et al.*, 2014). Os flavonóides presentes na própolis (LUSTOSA *et al.*, 2008) apresentam atividade antimicrobiana, antioxidante e moduladora do sistema imune (WILLIAMS *et al.*, 2004).

Estudos relatam que o extrato aquoso de própolis possui atividade antioxidante, associada ao alto teor de compostos fenólicos (MANI *et al.*, 2006)

No ano de 2000, 12 diferentes tipos de própolis brasileiras foram classificados e caracterizados de acordo a composição química de tipo 01 a tipo 12 (ALENCAR, *et al.*, 2005). Um novo tipo de própolis que tem como origem botânica a *Dalbergia ecastosphyllum*, espécie originária de manguezais do estado de Alagoas, foi descrito e denominado de “própolis vermelha” por causa de sua cor vermelha intensa. Esta variedade foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira (HAN *et al.*, 2009; ALENCAR *et al.*, 2009; ALENCAR *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

3.6 Própolis vermelha

3.6.1 Origem botânica e composição química

A própolis brasileira vermelha pertence ao 13º grupo de própolis e na última década tem sido objeto de estudos farmacológicos (SILVA *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2008; LIO *et al.*, 2010; PICCINELLI *et al.*, 2011; FRANCHI *et al.*, 2012). A origem botânica da própolis de Sergipe e Alagoas é a planta *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub, conhecida como “rabo-de-bugio”, encontrada em colmeias localizadas no caule de arbustos de manguezais situados no Nordeste do Brasil (DAUGSCH *et al.*, 2011, TRUSHEVA *et al.*, 2006).

A origem botânica da própolis vermelha cubana é denominada de *Clusia nemorosa* (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2002). A origem da própolis vermelha venezuelana é descrita como *Clusia scrobiculata* (TRUSHEVA *et al.*, 2006). Porém, um estudo mais recente sugeriu a *D. ecastophyllum* como origem botânica da própolis vermelha cubana e a contribuição da resina da família Clusiaceae para formação da própolis vermelha brasileira, devido à presença de benzofenonas polisopreniladas na mesma. Essas variações podem alterar a atividade biológica, farmacológica e toxicológica desse produto natural, uma vez que a composição química da fonte vegetal influencia as suas características químicas (PICCINELLI *et al.*, 2011; CABRAL *et al.*, 2009).

Em amostras da variedade vermelha do Brasil, Cuba, México e Venezuela foram identificadas substâncias como isoflavonoides, pterocarpanos, chalconas, flavonoides, benzofenonas preniladas e terpenos. Compostos como vestitol, medicarpina, formononetina, biochanina A, liquiritigenina e isoliquiritigenina são os principais compostos da própolis vermelha cubana (LOPEZ *et al.*, 2014; CUESTA-RUBIO *et al.*, 2007; CAMPO FERNANDEZ *et al.*, 2008; PICCINELLI *et al.*, 2011, BARBOSA *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2015).

Podem ser encontrados na própolis vermelha brasileira flavonoides (rutina, liquiritigenina, daidzeína, pinobanksina, quercetina, dalbergina, pinocembrina, biochanina A,

formononetina, isoliquiritigenina, entre outros) e ácidos fenólicos (DAUGSCH *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008; AWALE *et al.*, 2008). Substâncias como neovestitol, vestitol e isoliquiritigenina são encontradas em amostras de própolis vermelha alagoana. Entre estes, o vestitol demonstra a maior atividade antioxidante e a isoliquiritigenina é a mais ativa quanto à ação antimicrobiana (OLDONI *et al.*, 2011).

Em um estudo recente, amostras de própolis vermelha de diferentes regiões foram agrupadas de acordo com os íons marcadores específicos encontrados na análise química das mesmas. Amostras de Alagoas e Paraíba foram agrupadas no grupo A e as amostras de Sergipe, Cuba e o extrato da *D. ecastophyllum* foram agrupadas no grupo B. No grupo A, o íon marcador na espectrometria de massa foi o m/z 601,35 (provavelmente uma benzofenona proveniente de origem botânica da família Guttiferae). Nesse grupo também foram encontradas, em todas as amostras, a formononetina e biochanina A, que são comuns à *D. ecastophyllum*. Este resultado indica que pelo menos duas espécies de plantas são as principais fontes desse produto. No grupo B os íons marcadores foram formononetina, biochanina A e pinocembrina, os mesmos marcadores da *D. ecastophyllum*. Esse último resultado confirma a origem botânica das amostras analisadas do grupo B. Ainda nesse estudo, o grupo A apresentou um íon marcador correspondente à fórmula molecular $C_{38}H_{50}O_6$ que pode corresponder a três compostos encontrados em amostras de própolis: gutiferona E, oblongifolina A e xantochimol (LOPEZ *et al.*, 2014).

3.6.2 Atividade biológica

Estudos de análise da atividade biológica tem demonstrado que os resultados obtidos pela utilização de própolis vermelha são superiores aos encontrados para outras amostras. Por exemplo, pesquisas demonstraram uma maior atividade antifúngica da própolis vermelha em relação à variedade verde contra as espécies *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton mentagrophytes* (SIQUEIRA *et al.*, 2008). Tal comportamento também pode ser observado na avaliação da atividade citotóxica em células leucêmicas humanas, onde o extrato etanólico da própolis vermelha foi mais eficaz quando comparado ao extrato etanólico da própolis da verde (FRANCHI *et al.*, 2012). A própolis vermelha foi mais efetiva quanto à atividade anti-inflamatória quando comparada com a variedade verde, em modelo de edema induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton (ABREU, 2008).

Machado *et al.* (2016) também compararam a composição química e atividade biológica de diferentes amostras de própolis brasileira (marrom, verde e vermelha) extraídas com etanol ou fluido supercrítico e observaram que os extratos de própolis vermelha

apresentaram maior potencial biológico para os testes de atividade antimicrobiana e antiproliferativa.

Achados indicam que existe uma melhor atividade antioxidante de subfrações de uma amostra de própolis alagoana quando comparado a frações e ao extrato etanólico, relacionada à quantidade de compostos fenólicos. Estes componentes específicos estão relacionados à ação antioxidante (CABRAL *et al.*, 2009). Portanto, a própolis vermelha tem compostos que são conhecidos por possuir propriedades antioxidantes, tais propriedades podem ser de grande importância para atividade anticancerígena (FROZZA *et al.*, 2013; RIGHI *et al.*, 2011).

A administração do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha brasileira na dose 100mg/kg modificou a formação, diferenciação e progressão de carcinoma de células escamosas na pele de murinos. Tais dados sugerem um efeito modulador na carcinogênese dérmica quimicamente induzida (PINHEIRO *et al.*, 2014).

Os isoflavanóides vestitol e principalmente o neovestitol, substâncias isoladas da própolis vermelha, demonstraram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Staphylococcus aureus* e *Actinomyces naeslundii* (BUENO-SILVA *et al.*, 2013). Por outro lado, fungos como *Candida albicans* e bactérias gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* têm demonstrado uma maior resistência a esse produto natural (RIGHI *et al.*, 2011; MONZOTE *et al.*, 2012). Vale destacar que compostos como vestitol e neovestitol, encontrados na própolis vermelha, apresentam atividade anti-inflamatória (BUENO-SILVA *et al.*, 2013).

Estudos têm testado os efeitos da própolis vermelha no processo de cicatrização (BATISTA *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013). A própolis vermelha modulou a dinâmica da evolução da inflamação e o processo de deposição de colágeno, fatores que podem melhorar a cicatrização (ALBUQUERQUE-JÚNIOR *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2013). Polifenóis presentes na própolis vermelha podem reduzir lesões ateroscleróticas, modular fatores angiogênicos e inflamatórios (DALEPRANE *et al.*, 2012).

No sistema nervoso, após hemissecção da medula espinhal em ratos, observou-se que o tratamento com o extrato etanólico da própolis chinesa promoveu um aumento no desempenho motor (KASAI *et al.*, 2011). O tratamento com EHPV também acelerou a recuperação funcional ao mesmo tempo em que diminuiu a neuroinflamação e a perda de motoneurônios após lesão medular (DOS SANTOS, 2013) e lesão de nervo ciático (BARBOSA *et al.*, 2015) em ratos. Esses achados sugerem que o HERP possa representar uma nova estratégia de tratamento de lesões do sistema nervoso e degeneração nervosa inclusive no encéfalo.

Em adição, componentes da própolis vermelha apresentaram ação neuroprotetora *in vivo* frente à isquemia e trauma cerebral, como a formononetina (LIANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014), a daidzeína (ARAS *et al.*, 2015) e a biochanina A (WANG *et al.*, 2015), sendo que o mecanismo subjacente está relacionado à redução da resposta inflamatória e diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio. A formononetina é um dos biomarcadores de própolis vermelha. O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (HERP) e a formononetina apresentam atividade anti-inflamatória significativa (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015).

Efeitos tóxicos ocorrer com o uso de produtos naturais para fins medicamentosos devido às interações metabólicas decorrentes das doses administradas, das características do fármaco e do indivíduo que consome. Foi realizada avaliação da toxicidade aguda e subaguda do EHPV. O estudo de toxicidade aguda indicou que a dose letal se encontra acima de 300 mg/kg e que sinais de toxicidade subaguda aparecem quando administradas doses acima de 200 mg/kg. Portanto, e os resultados indicaram segurança na utilização da dose de 10 mg/kg durante 21 dias (DA SILVA *et al.*, 2015). A própolis vermelha e seus componentes isolados representam, portanto, importante alvo para pesquisas dirigidas à aplicação biomédica (FREIRES, DE ALENCAR, ROSALEN, 2016).

Capítulo II – MATERIAL E MÉTODOS

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção e caracterização do EHPV

A própolis vermelha produzida por abelhas *Apis mellifera* foi coletada em um apiário localizado no município de Brejo Grande, Sergipe (10°28'25"S, 36°26'12"O), Brasil. A amostra de própolis bruta (90,10 g) foi extraída com etanol 70% (v/v; 12,5 mL) em banho de ultrassom, durante 1 hora. Ao final deste processo, procedeu-se à filtração e eliminação do solvente por evaporação obtendo-se o extrato seco (BARBOSA *et al.*, 2015).

Para a realização da cromatografia líquida de alta eficiência (caracterização química do EHPV) foram dissolvidos 10 mg de EHPV em 50 mL de metanol, obtendo-se uma solução 0,2 mg/mL. Esta solução foi filtrada (filtro de 0,45 µm) e uma alíquota de 5 mL foi dissolvida em 25 mL de solução metanol/água obtendo-se uma solução de EHPV a 0,04 mg/mL.

A análise cromatográfica foi realizada conforme descrito por Alencar *et al.* (2007). O cromatógrafo foi equipado com um desgaseificador DGU-20A3, mostrador automático SIL-20A, duas bombas LC-20AD e um detector de arranjo de fotodiodos SPDM20Avp com uma interface CBM-20A. A separação cromatográfica foi realizada utilizando coluna analítica C18 150 x 4,6 mm (tamanho de partícula 5µ). A velocidade de influxo foi de 1 mL / min e o volume de injeção foi de 20 µL. A coluna foi eluída com gradiente linear de metanol (B) água: ácido acético (A) a 1% (v / v). A eluição começou com 40% de B (10 min), seguido por 45 - 50% de B (10 - 15 min), 50 - 55% de B (15 - 20 min), 55 - 65% de B (35 - 40 min), 65 - 75% de B (40 - 45 min), 75 - 85% de B (45 - 50 min), 85 - 40% de B (50 - 60 min), retornando às condições iniciais.

Os cromatogramas foram registrados em 280 nm e os padrões daidzeína, formononetina, liquiritigenina e biochanina A (Sigma-Aldrich, Brasil) foram utilizados como biomarcadores.

4.2 Ensaio biológico

A amostra foi composta por 28 ratos Wistar adultos machos com peso corporal de 250-350 g. Os animais foram alojados em gaiolas com cama de maravalha, em temperatura controlada ($\pm 22^{\circ}\text{C}$), regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h e livre acesso à água e ração para roedores (Labina).

4.3 Aspectos Éticos

Todos os procedimentos estiveram de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Tiradentes (CEUA/UNIT/SE), sob parecer consubstanciado nº 170610.

4.4 Procedimento cirúrgico

Para indução de lesão unilateral da via nigroestriatal (TAJIRI *et al.*, 2010), os animais foram anestesiados previamente com ketamina e xilazina (10 e 100 mg/Kg, i.p., respectivamente) e fixados no aparelho estereotático (Insight, Brasil), com a barra do incisivo fixada 5 mm acima da linha interaural. As coordenadas utilizadas para microinjeção no estriado do lado direito foram: anteroposterior (AP): 1.2 mm e vetrolateral (VL): 2,5 mm em relação ao Bregma e dorsoventral (DV): 5,0 mm em relação à caixa craniana. Foi realizada injeção de 6-OHDA (20 µg/2µl, Sigma-Aldrich, Brasil) dissolvida em 0,9% de solução salina contendo 0,02% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Brasil), utilizando microseringa Hamilton (50 µl) acoplada à bomba de infusão automática (Insight, Brasil) calibrada para a velocidade de influxo de 1 µl/min. A cânula, conectada à seringa por tubo de polietileno (PE 10), foi deixada no local por 2 min adicionais para evitar refluxo. Os animais do grupo controle foram submetidos ao mesmo procedimento, mas receberam veículo (solução salina contendo ácido ascórbico a 0,02%) no lugar da neurotoxina. Ao final da cirurgia, foi aplicada injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA, 0,2 mL/kg) e os animais foram aquecidos por uma lâmpada de 60 W até recuperação da anestesia.

4.5 Grupos Experimentais

Os animais que receberam aplicação intracerebral de 6-OHDA foram distribuídos em grupos experimentais de acordo com os seguintes tratamentos administrados por via oral (p.o., 1 mL): veículo (Tween 80 a 2% em água destilada); EHPV 10 a mg/Kg e EHPV a 50 mg/Kg. Adicionalmente, o grupo que recebeu aplicação intraestriatal de solução salina contendo ácido ascórbico foi tratado com veículo (Tween 80 a 2% em água destilada, p.o.). Ao final desta distribuição, os quatro grupos foram denominados: grupo 6-OHDA/veículo, grupo 6-OHDA/EHPV 10, grupo 6-OHDA/EHPV 50 e grupo salina/veículo, referindo-se, respectivamente à administração intracerebral e oral. Cada grupo foi inicialmente composto

8 animais, em função da previsão de ocorrência de morte após o procedimento cirúrgico de estereotaxia, reportada previamente (FRANCARDO *et al.*, 2011). Ao final do experimento, os grupos foram constituídos por 6 a 8 animais.

Os tratamentos foram iniciados no mesmo dia do procedimento cirúrgico e continuaram a ser administrados três dias por semana: segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira, durante duas semanas (BARBOSA *et al.*, 2015, TAJIRI *et al.*, 2010).

4.5.1 Eutanásia e Obtenção das amostras de tecido

Após quatro semanas os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as amostras teciduais dos encéfalos foram acondicionadas individualmente em coletores com solução de formalina com a devida identificação, para posterior processamento e análise no Laboratório de Biologia e Patologia Experimental do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP). Os encéfalos foram retirados por dissecação e o material foi desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em série de xilóis e incluído em parafina sob a forma de blocos. Os blocos rígidos foram então levados ao micrótomo, para fornecer os cortes de 20 µm de espessura em lâminas gelatinizadas. Foram obtidas séries de secções nas regiões da SNc (-5,0 a -6,0 mm) em relação ao Bregma) e do estriado (0,3 ± 1 mm em relação ao Bregma), tomando-se como referência os planos do Atlas de Paxinos e Watson (2013). Após serem seccionados, os cortes foram colocados para flutuar sobre uma superfície aquecida, onde foram colocados sobre lâminas de vidro e levados para secar em estufa.

4.5.2 Reação imunohistoquímica para a enzima TH (enzima de síntese de dopamina)

As lâminas foram primeiramente desparafinizadas em xilol e hidratadas em série alcoólica decrescente. Procedeu-se, sequencialmente, ao enxágue das seções com tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,0), recuperação antigênica em forno de micro-ondas com tampão citrato em pH 6,0 durante 20 min, bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 0,3% e incubação com soro albumina-bovina 2% contendo anticorpo primário dirigido contra o antígeno de interesse (anti TH produzido em coelho, na diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology) por 120 min. Para aumentar a visualização da ligação foi empregado o método de marcação indireta com anticorpo secundário marcado com biotina (anti-coelho, diluição 1:500) e incubação com o complexo avidina-biotina-peroxidase (1:125, Kit ABC, Vectastain, Vector Laboratories) durante 120 min cada. Para revelação, as secções foram incubadas com o tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB, 2%) em H₂O₂ (0,3%) por 10 minutos e finalmente lavadas em PBS. Todos os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente e de acordo com as recomendações dos fabricantes. O composto

insolúvel, corado marrom e elétron denso que se deposita, marca a localização do antígeno. Finalmente, as lâminas passaram por uma série de álcoois com concentração crescente, para desidratar o tecido e logo após os cortes foram diafanizados em xilol. As lamínulas foram afixadas nas lâminas com bálsamo do Canadá.

4.5.3 Análises de imagens

Inicialmente, as identificações das lâminas foram ocultadas ao examinador para realização de análise cega quanto ao grupo experimental. As imagens da SNc e do estriado foram capturadas das lâminas usando câmera de vídeo Olympus C-7070, acoplada a microscópio Olympus CX31 no aumento de 40X. A SNc foi identificada e fotografada de forma a excluir a área tegmentar ventral e a substância negra reticulada. A imagem foi transferida para o microcomputador onde o número de células (corpos celulares) positivamente marcadas foi quantificado bilateralmente pelo examinador, com auxílio de uma grade sobreposta desenhada para facilitar o procedimento. Ao menos três secções adjacentes representativas de cada plano rostrocaudal da SNc (-5,0; -5,6 e -6,0 mm em relação ao Bregma) da SNc foram examinados (ZARE *et al.*, 2015).

Para quantificação da densidade de fibras positivas para TH no estriado foi realizada leitura da densidade óptica (DO) em níveis de cinza. Uma escala arbitrária pré-fixada com valores inteiros graduados de 0 a 10 para tons de cinza variando de branco a preto, respectivamente, foi estabelecida para secção bilateralmente. A DO foi medida em 2 a 3 secções adjacentes ao nível dos planos 1.3, 0.2 e -1.3 mm em relação ao Bregma (PAXINOS, WATSON, 2013). Estas distâncias foram atribuídas de tal forma que elas representam níveis rostral, medial e caudal, respectivamente, do núcleo estriado. Para cada nível, a marcação não específica foi medida dividindo-se a leitura da DO obtida no córtex.

Em função das variações observadas entre ratos quanto às populações de neurônios da SNc e na ausência de uma análise estereológica, optou-se por apresentar os dados da quantificação do lado lesionado (direito) em porcentagem em relação ao lado intacto (esquerdo), evitando vieses metodológicos devido a diferenças interindividuais (MORRONI *et al.*, 2014; FINE *et al.*, 2014). Da mesma forma, a DO do estriado foi expressa em porcentagem em relação ao lado contralateral para normalização dos dados, considerando-se também a dimensão e variações anatômicas desta estrutura.

4.5.4 Análise estatística

Foi realizada análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey, para comparações entre os tratamentos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significantes. Os graus de liberdade foram designados por F. Foi utilizado o programa *Graph Pad Prism* 5.0 para análise dos dados.

Capítulo III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

A análise cromatográfica evidenciou quatro picos correspondentes aos marcadores daidzeína (P1), formononetina (P2), liquiritigenina (P3) e biochanina A (P4). As quantidades na amostra corresponderam, respectivamente, a 3,1; 6,3; 10 e 7,2 mg/g de extrato. Estes dados podem ser observados na tabela 2 e figura 01.

Tabela 2: Resultados da análise cromatográfica

Pico	Tempo de retenção (min)	Composto	Área	mg/g
P1	12,84	Daidzeína	7034	3,1 mg/g
P2	24,19	Formononetina	19809	6,3 mg/g
P3	26,84	Liquiritigenina	48266	10 mg/g
P4	28,97	Biochanina A	26644	7,2 mg/g

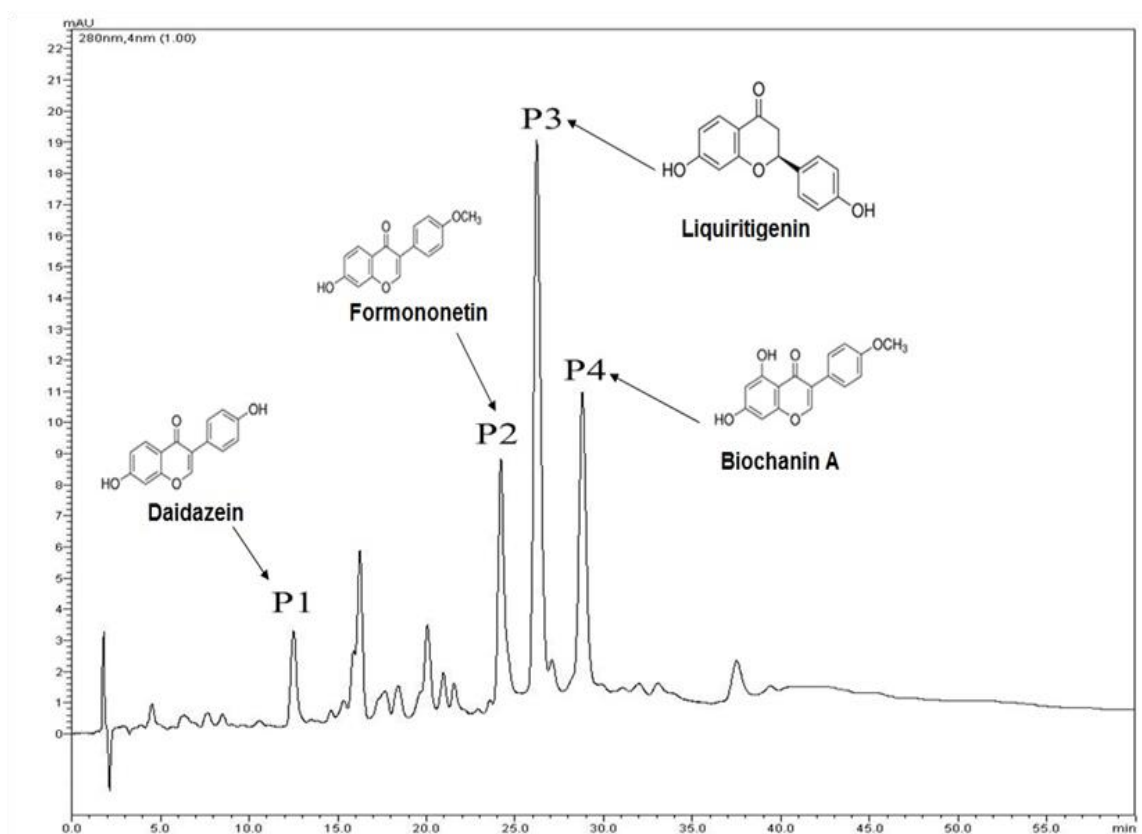


Figura 01: Cromatograma do extrato hidroetanólico de própolis vermelha ilustrando os picos correspondentes aos marcadores daidzeína (P1), formononetina (P2), liquiritigenina (P3) e biochanina A (P4).

No ensaio biológico, foi observada diminuição da porcentagem de neurônios TH+ na SNc no grupo 6-OHDA/veículo em relação ao grupo salina/veículo ($p < 0,01$). Não foi

observada diferença significativa entre os grupos lesionados tratados com veículo e EHPV na dose de 50 mg/kg ($p > 0,05$). Já o tratamento com EHPV na dose de 10 mg/kg promoveu aumento significativo da porcentagem de neurônios TH+ remanescentes ($p < 0,001$) em comparação com o grupo 6-OHDA/veículo e ambas as doses de EHPV apresentaram valores estatisticamente semelhantes aos do grupo salina/veículo. Não foi observada diferença significativa com relação ao efeito entre as doses testadas ($F_{3-31} = 5,50$, $p = 0,0042$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, Figuras 2 e 3).

A análise da DO no CPu evidenciou diminuição da porcentagem de fibras TH+ nos grupos lesionados tratados com veículo ($p < 0,0001$) e EHPV 50 mg/kg ($p > 0,05$) em relação ao grupo salina/veículo. Já o tratamento com EHPV a 10 mg/kg em roedores lesionados promoveu aumento significativo da marcação para TH ($p < 0,05$) em relação ao grupo lesionado tratado com veículo, atingindo médias estatisticamente semelhantes às do grupo salina/veículo. Não foram observadas diferenças significantes quanto às doses de EHPV ($F_{3-54} = 6,84$, $p = 0,0006$, ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Tukey, Figuras 2 e 4).

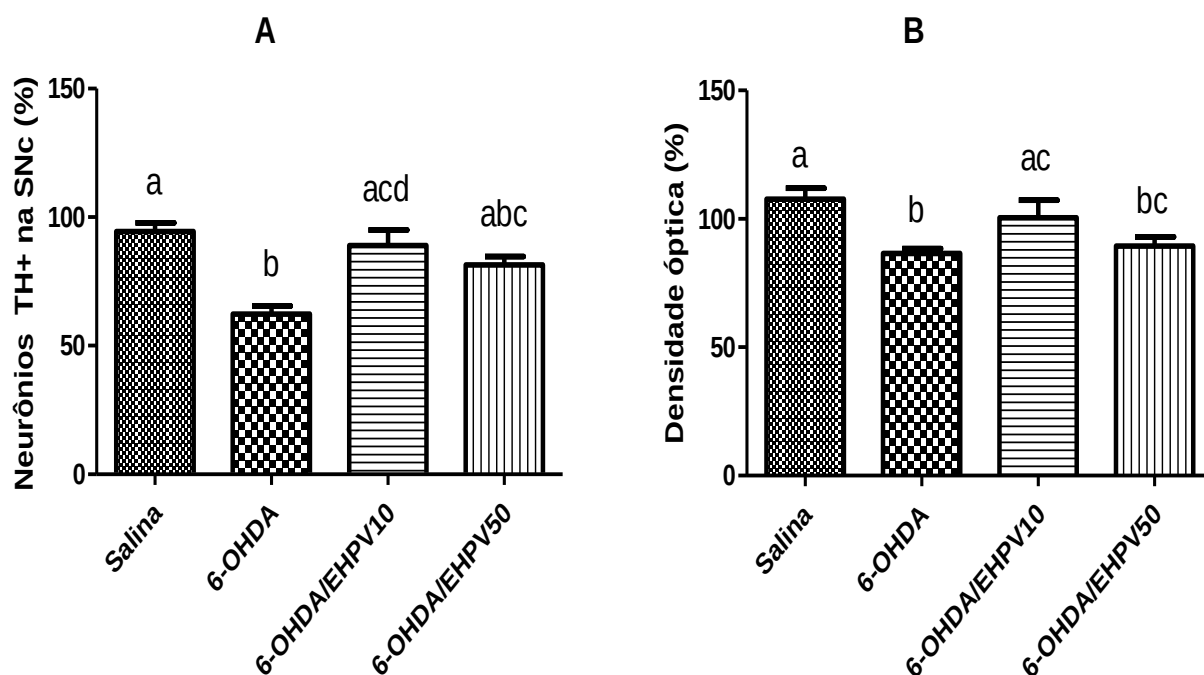


Figura 2: Porcentagem média de neurônios (A) e fibras (B) positivamente marcados para a enzima tirosina-hidroxilase (TH+) na substância negra compacta e no núcleo estriado, respectivamente, em relação ao lado contralateral à lesão. Os roedores foram eutanasiados 28 dias após a microinjeção de solução salina ou 6-hidroxidopamina (6-OHDA). O extrato hidroetanólico de própolis vermelha foi administrado a cada três dias nas doses de 10 (EHPV 10) e 50 (EHPV 50) mg/kg durante duas semanas. Letras diferentes indicam valores estatisticamente distintos. AS colunas representam as médias e as barras representam o EPM.

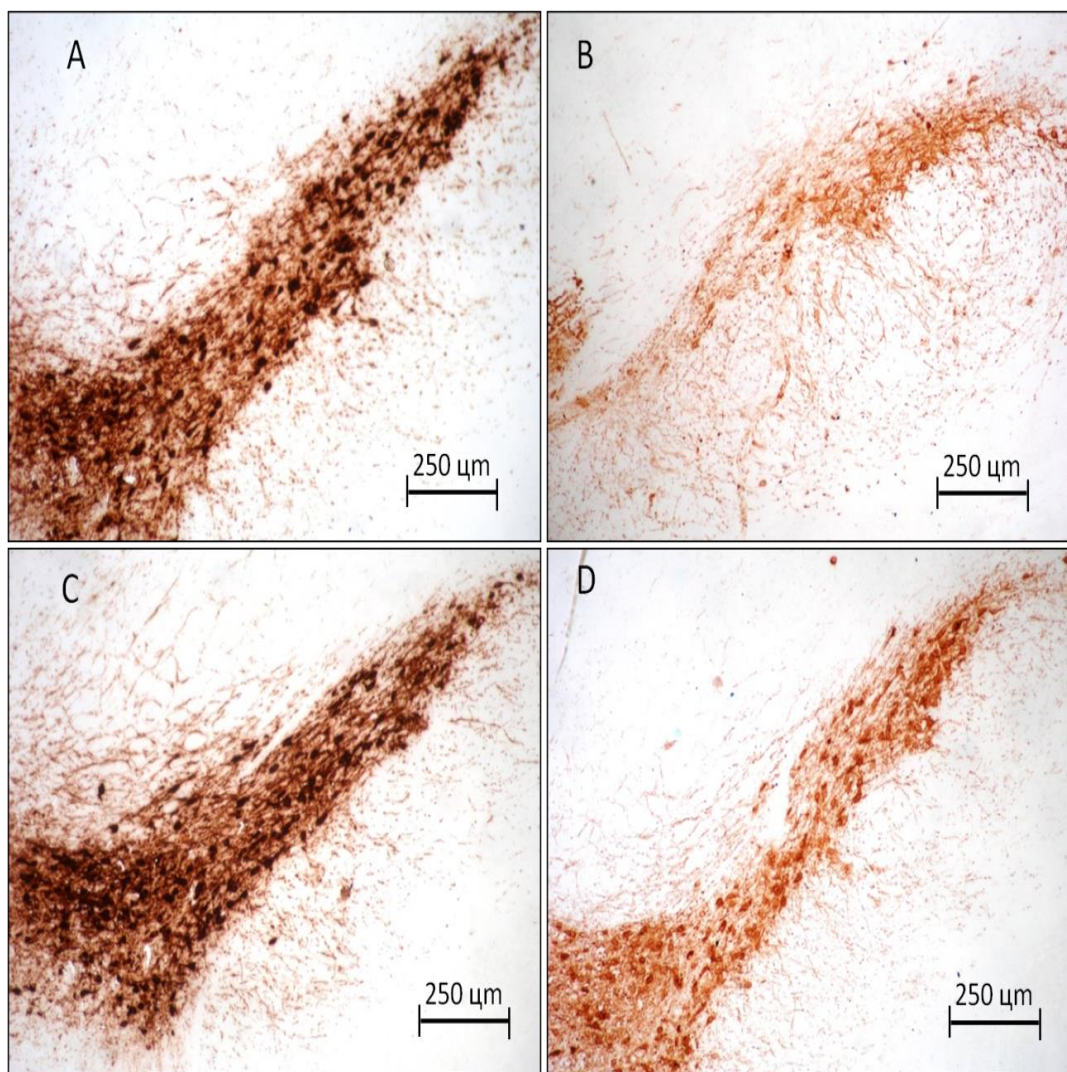


Figura 3: Fotomicrografias mostrando neurônios positivamente marcados para a enzima tirosina-hidroxilase na substância negra compacta de ratos dos grupos salina/veículo (A), 6-OHDA/veículo (B), 6-OHDA/EHPV 10 (C) e 6-OHDA/EHPV 50 (D), do lado da lesão, 28 dias após as cirurgias. Aumento de 100X.



Figura 4: Fotomicrografias mostrando fibras positivamente marcadas para a enzima tirosina-hidroxilase no núcleo estriado de ratos dos grupos salina/veículo (A), 6-OHDA/veículo (B), 6-OHDA/EHPV 10 (C) e 6-OHDA/EHPV 50 (D), do lado da lesão, 28 dias após as cirurgias. Aumento de 40X.

5.2 Discussão

O EHPV utilizado no presente estudo apresentou, em ordem crescente de quantidade (massa), a daidzeína, a formononetina, a biochanina A e a liquiritigenina em sua composição química. Estes compostos foram observados anteriormente nos extratos hidroetanólico e etanólico de própolis vermelha brasileira, própolis vermelha cubana e de *D. ecatosphillum* (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2015; PICCINELLI *et al.*, 2011) e são considerados característicos, ou marcadores, da própolis vermelha brasileira.

No presente estudo foi observada ação neuroprotetora do EHPV (10 mg/kg) após lesão encefálica, evidenciada através da coloração imunohistoquímica para a enzima de síntese de neurônios dopaminérgicos, a tirosina-hidroxilase (NAKASHIMA *et al.*, 2013). A aplicação da toxina 6-OHDA resultou em diminuição de neurônios e fibras marcados, confirmando a efetividade da lesão em produzir o quadro tecidual semelhante ao observado na doença de Parkinson (BATASSINI *et al.*, 2015). O tratamento com EHPV promoveu recuperação significativa da quantidade de neurônios e fibras remanescentes após lesão da via nigroestriatal em ratos, respectivamente, na substância negra compacta, núcleo onde são encontrados os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos, e no estriado, o núcleo de projeção.

Em estudos prévios, o EHPV administrado na dose de 10 mg/kg também atenuou os déficits motores induzidos por 6-OHDA (BARROSO, 2012) e mostrou ação neuroprotetora frente à lesão nervosa periférica em ratos (BARBOSA *et al.*, 2015). Por outro lado, o tratamento com a maior dose de EHPV (50 mg/kg) não produziu modificações significativas em relação aos demais grupos lesionados. Este achado pode ter relação com o perfil toxicológico descrito para o EHPV, onde doses crescentes administradas diariamente induziram modificações comportamentais e histopatológicas (DA SILVA *et al.*, 2015). Em adição, compostos com potente ação antioxidante, como o suco de romã, mostraram poder de exacerbar o estresse oxidativo em modelo animal para estudo da DP (TAPIAS *et al.*, 2014), o que sugere cautela na indicação da dose.

O mecanismo subjacente à ação biológica neuroprotetora é frequentemente relacionado aos eventos que estão alterados no tecido nervoso em processo de degeneração e morte neuronal dopaminérgica, como disfunção mitocondrial, proteólise, apoptose, excitotoxicidade glutamatérgica, inflamação mediada por células da glia com liberação de mediadores pró-inflamatórios tóxicos, estresse oxidativo gerado por peroxidação lipídica, oxidação proteica e do DNA e oxidação química e enzimática da própria dopamina (DEXTER, JENNER, 2013).

A neuroinflamação mediada por células da glia configura um importante aspecto que contribui para a cascata de eventos que leva à morte celular observada na DP. Estes eventos envolvem alterações na produção de interleucinas (IL) tipo 1 α e 1 β , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico pela microglia. Este último, formado pela enzima sintase de óxido nítrico induzida (iNOS), pode reagir com superóxidos e formar peroxinitrito altamente reativo que promove a oxidação e nitração de proteínas (HIRSCH, HUNOT, 2009).

O efeito neuroprotetor do EHPV neste modelo utilizado para estudo da DP pode ser atribuído, em grande parte, aos marcadores bioativos identificados na composição do EHPV que apresentam ação neuroprotetora. A daidzeína, por exemplo, aplicada em cultivo de células microgлияis murinas expostas a lipopolissacarídeos (que induzem a liberação de mediadores inflamatórios), suprimiu a produção de óxido nítrico e de IL-6, diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio, a fosforilação de MAPK p38 e a ativação NF- κ B. Em adição, o mesmo meio de cultivo condicionado (obtido de células microgлияis ativadas) foi utilizado em neurônios dopaminérgicos e, em presença de daidzeína, a neurotoxicidade foi reduzida (CHINTA *et al.*, 2013).

A daidzeína também promoveu efeito neuroprotetor após isquemia cerebral em ratos por meio da redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ARAS *et al.*, 2015), favoreceu a recuperação funcional em modelo roedor para estudo de acidente vascular encefálico (STOUT *et al.*, 2013), diminuiu a apoptose e aumentou a proliferação celular no hipocampo de ratos (RIVERA *et al.*, 2013). O papel trófico desta substância também foi evidenciado *in vitro*, em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, onde foi observada neuritogênese dependente de proteínas quinases (YANG *et al.*, 2012).

Outro composto encontrado, a formononetina, também apresentou ação neuroprotetora após isquemia induzida por oclusão arterial no encéfalo, diminuindo a razão das proteínas cinases fosforiladas Bax (ativadora de apoptose) e Bcl-2 (inibidor da ativação de apoptose) e aumentando a via de sinalização de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K/Akt) (LIANG *et al.*, 2014). Após trauma encefálico em roedores, a formononetina aumentou as atividades glutatona peroxidase e superóxido dismutase, diminuiu os níveis de malonaldeído, ciclooxigenase 2 (COX-2), TNF- α e as concentrações de IL-6, ao mesmo tempo em que diminuiu a hidrocefalia e lesão neural após lesão (LI *et al.*, 2014). Em estudo *in vitro*, a formononetina diminuiu a neurotoxicidade induzida pelo agonista glutamatérgico N-metil-D-asparato (NMDA). O número de células em apoptose foi atenuado, observando-se aumento da expressão de Bcl-2 e diminuição dos níveis de Bax e caspase-3 (TIAN *et al.*, 2013).

De forma semelhante, a biochanina A foi protetora frente à lesão isquêmica em ratos, com diminuição do volume do edema, melhora o desempenho funcional, diminuição dos níveis de mediadores inflamatórios mieloperoxidase (MPO), TNF- α e IL-1 β e da fosforilação da proteína mediadora pró-inflamatória p-38 (WANG *et al.*, 2015). A biochanina A também diminuiu a apoptose de neurônios em cultura expostos à toxicidade glutamatérgica (TAN *et al.*, 2013) e, quando associada à fomonononetina, daidzeína e genisteína, protegeu neurônios do estresse oxidativo promovido por H₂O₂ (OCCHIUTO *et al.*, 2009).

Finalmente, a liquiritigenina, composto encontrado em maior quantidade na amostra estudada, foi capaz de promover o crescimento e diferenciação neuronal *in vitro* (LIU *et al.*, 2010) e de diminuir os déficits de aprendizado e memória *in vivo*, em modelo animal para o estudo da doença de Alzheimer (LIU *et al.*, 2011), atuando em ambos os casos como agonista de receptores de estrógeno tipo β . Vale destacar que o papel protetor do estrógeno sobre a degeneração de neurônios dopaminérgicos em animais (AL SWEIDI *et al.*, 2012; BOURQUE *et al.*, 2012; CORDELLINI *et al.*, 2012) e em humanos (ADAMS, KUMAR, 2013; DLUZEN, MCDERMOTT, 2000) é mediado por receptores tipo β (MCFARLAND *et al.*, 2013). A ação neuroprotetora da liquiritigenina também foi observada *in vitro*, frente à excitotoxicidade glutamatérgica (YANG *et al.*, 2013).

Portanto, o EHPV apresenta um conjunto de compostos que congregam ações de combate à formação de mediadores inflamatórios tóxicos, de espécies reativas de oxigênio, da excitotoxicidade mediada por glutamato e a apoptose, ao mesmo tempo em que pode promover o crescimento e proliferação celular. Tal combinação pode favorecer o tratamento de diferentes aspectos pertinentes à neurodegeneração dopaminérgica de forma que o EHPV pode configurar uma potencial estratégia terapêutica na DP.

Capítulo IV – CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O EHPV obtido da própolis vermelha de Sergipe mostrou, em ordem crescente de massa, os marcadores daidzeína, formononetina, biochanina A e liquiritigenina.

O tratamento com EHPV a 10 mg/kg protegeu neurônios dopaminérgicos da neurodegeneração da via nigroestriatal em ratos.

Considerando-se as atividades biológicas descritas para os marcadores químicos e a fisiopatologia da DP, sugere-se que o efeito neuroprotetor do EHPV esteja associado a ações de combate à formação de mediadores inflamatórios, de espécies reativas de oxigênio, da excitotoxicidade glutamatérgica e de apoptose, que podem ser moduladas por receptores estrogênicos tipo β , além de um possível efeito neurotrófico.

Capítulo V – REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

ABREU, A. P. L. Estudo comparativo da atividade antiinflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde, Fortaleza – Brasil [Dissertação]. Fortaleza: Universidade federal do Ceará; 2008.

ADAMS C, KUMAR R. The effect of estrogen in a man with Parkinson's disease and a review of its therapeutic potential. *Int J Neurosci*. 2013 Oct;123(10):741-2.

AL SWEIDI S, SÁNCHEZ MG, BOURQUE M, MORISSETTE M, DLUZEN D, DI PAOLO T. Oestrogen receptors and signalling pathways: implications for neuroprotective effects of sex steroids in Parkinson's disease. *J Neuroendocrinol*. 2012 Jan;24(1):48-61.

ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; BARRETO, A. L. S.; PIRES, J. A.; REIS, F. P.; LIMA, S. O.; RIBEIRO, M.A.G.; CARDOSO, J. C. Effect of bovine Type-I collagen-based films containing red própolis on dermal wound healing in rodent model. *International Journal of Morphology* 2009; 27(4): 1105-1110.

ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C. L.; PAREDES-GUZMÁN, J. PARK, Y.K. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural*. 2005. 25(4), 909-915.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal Ethnopharmacology* 2007; 113(2): 78-83.

ALMEIDA, E. B.; CARDOSO, J.; LIMA, A. K.; OLIVEIRA, N. L.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA, S. O.; SOUZA, I. C. L.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing C. *Journal of Ethnopharmacology* 2013; 147: 419-425.

ALMUTAIRI, S.; EAPEN, B.; CHUNDI, S. M.; AKHALIL, A.; SIHERI, W.; CLEMENTS, C.; FEARNLEY, J.; WATSON, D. G.; EDRADA-EBEL, R. New anti-trypanosomal active prenylated compounds from African própolis. *Phytochemistry Letters* 2014; 10: 35-39.

ALVAREZ-FISCHER D, GUERREIRO S, HUNOT S, SAURINI F, MARIEN M, SOKOLOFF P, HIRSCH EC, HARTMANN A, MICHEL PP. Modelling Parkinson-like neurodegeneration via osmotic minipump delivery of MPTP and probenecid. *J Neurochem*. 2008 Nov;107(3):701-11.

AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. E.; CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 1992; 23(3): 231-240.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online] 2005. Acessado em 26 Dez 2014]. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm>.

ARAS, A. B., GUVEN, M., AKMAN, T., OZKAN, A., SEN, H. M., DUZ, U., COSAR, M. Neuroprotective effects of daidzein on focal cerebral ischemia injury in rats. *Neural regeneration research*, v. 10, n. 1, p. 146, 2015.

AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic

PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; 16:181-189.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.

BARBOSA RA, NUNES TL, NUNES TL, PAIXÃO AO, NETO RB, MOURA S, ALBUQUERQUE JUNIOR RL, CÂNDIDO EA, PADILHA FF, QUINTANS-JÚNIOR LJ, GOMES MZ, CARDOSO JC. Pharm Biol. 2015 Oct 29:1-12. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. Pharm Biol. 2015 Oct 29:1-12.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? *Química Nova* 29 (6): 1-x, 2006.

BARROSO, S. DA S. Efeitos comportamentais do exercício e do extrato de própolis vermelha sobre a degeneração de neurônios dopaminérgicos em ratos. Sergipe-Brasil [Dissertação]. Aracaju/SE: Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, 2012.

BASTIDE MF, MEISSNER WG, PICCONI B, FASANO S, FERNAGUT PO, FEYDER M, FRANCARDO V, Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2015 Jul 21. pii: S0301-0082(15)00076-3. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.07.002.

BATISTA, L. L. V.; CAMPESATTO, E. A.; ASSIS, M. L. B.; BARBOSA, A. P. F.; GRILLO, L. A. M.; DORNELAS, C. B. Estudo comparativo do uso tópico de própolis verde e vermelha na reparação de feridas em ratos. *Rev. Col. Bras. Cir* 2012; 39 (6): 515-520.

BISPO JUNIOR, W.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D. W.; PORFIRIO, Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. *Ciências Biológicas e da Saúde* 2012; 33(1): 03-10.

BITU PINTO N1, DA SILVA ALEXANDRE B2, NEVES KR3, SILVA AH3, LEAL LK3, VIANA GS1. Neuroprotective Properties of the Standardized Extract from *Camellia sinensis* (Green Tea) and Its Main Bioactive Components, Epicatechin and Epigallocatechin Gallate, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:161092. doi: 10.1155/2015/161092. Epub 2015 Jun 18.

BLESA J, PHANI S, JACKSON-LEWIS V, PRZEDBORSKI S. Classic and new animal models of Parkinson's disease *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012:845618. Doi: 10.1155/2012/845618. Epub 2012 Mar 28. Review.

BLESA J, TRIGO-DAMAS I, QUIROGA-VARELA A, JACKSON-LEWIS VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015 Jul 8; 9:91. doi: 10.3389/fnana.2015.00091.

BOURQUE M, DLUZEN DE, DI PAOLO T. Signaling pathways mediating the neuroprotective effects of sex steroids and SERMs in Parkinson's disease. *Front Neuroendocrinol.* 2012 Apr;33(2):169-78.

BRASIL. Ministério da Agricultura, **Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001.** Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jan. 2001. Seção 1, p. 18.

BUENO-SILVA, B.; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; IKEGAKI, M. SILVA, G. V. J.; NAPIMOGA, M. H.; ROSALEN, P. L. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. *J. Agric. Food Chem* 2013; 61(19): 4546-4550.

BURDOCK, G. A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* 1998; 36: 347-363.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim. Nova* 2009; 32(6): 1523-1527.

CALOU I1, BANDEIRA MA2, AGUIAR-GALVÃO W2, CERQUEIRA G1, SIQUEIRA R1, NEVES KR1, BRITO GA1, VIANA G3. Parkinsons Dis. 2014; 2014:519615. doi: 10.1155/2014/519615. Epub 2014 Jun 25.

CAMPO FERNANDEZ, M.; CUESTA-RUBIO, O.; ROSADO PEREZ, A.; MONTES DE OCA PORTO, R.; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. GC-MS Determination of Isoflavonoids in Seven Red Cuban Propolis Samples. *J. Agric. Food Chem* 2008; 56: 9927-9932.

CAVALCANTE, DRR.; OLIVEIRA, OS.; GÓIS, SM.; SOARES, AF.; CARDOSO, JC.; PADILHA, FF.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, RLC. Effect of green propolis on oral epithelial dysplasia in rats. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 77 (3), p. 278-284, 2011.

CHAUDHURI, K.R.; SCHAPIRA, A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 8:464–474; 2009.

CHIN-CHAN, Miguel; NAVARRO-YEPES, Juliana; QUINTANILLA-VEGA, Betzabet. Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 9, 2015.

CORDELLINI MF, PIAZZETTA G, PINTO KC, DELATTRE AM, MATHEUSSI F, CAROLINO RO, SZAWKA RE, ANSELMO-FRANCI JA, FERRAZ AC. Effect of different doses of estrogen on the nigrostriatal dopaminergic system in two 6-hydroxydopamine-induced lesion models of Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2011 Jun;36(6):955-61.

CUESTA-RUBIO, O; FRONTANA-URIBE, B.A; RAMÍREZ-APAN, T; CÁRDENAS, J. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Z. Naturforsch* 2002; 57:372-378.

DALEPRANE, J. B.; FREITAS, V. S.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L. A.; DÖRR, F. A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L. A.; ONG, T. P.; ABDALLA, D. S. P. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from própolis. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2012; 23(6): 557-566.

DAUER W, PRZEDBORSKI S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39:889–909.

DAUGSCH, A, MORAES CS, FORT P, PACHECO E, LIMA IB, ABREU JA, ET AL. Própolis vermelha e sua origem botânica. *Mensagem Doce* [Internet]. 2006 [citado 2011 Dez 20]; 89:2-8.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2007; 5(4): 435-441.

DEJEAN C, *et al.* Evolution of the dynamic properties of the cortex–basal ganglia network after dopaminergic depletion in rats. *Neurobiol Dis.* 2012; 46:402–413.

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

DLUZEN DE, MCDERMOTT JL. Gender differences in neurotoxicity of the nigrostriatal dopaminergic system: implications for Parkinson's disease. *J Gend Specif Med.* 2000 Sep-Oct;3(6):36-42

DOS SANTOS, F. H. P., REIS, A. S., DA SILVA, J. F., DA SILVA JUNIOR, B. R., DA SILVA, S. B., ANDRE, A. C. G. M., & DE LIMA, A. F. Avaliação antibacteriana dos extratos hexânico e metanólico de própolis vermelha encontrada no município barra de santo antônio/al. *Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT/AL*, v. 2, n. 3, p. 33-44, 2015.

DOS SANTOS, FANILDES DA SILVA MORAES. Efeitos do tratamento oral com própolis vermelha e exercício de natação sobre a lesão medular em ratos. *Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes*, 2013.

FINDLEY, L. J. The economic impact of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 13(Suppl): S8–S12; 2007.

FINE JM1, FORSBERG AC2, RENNER DB2, FALTESEK KA2, MOHAN KG2, WONG JC2, ARNESON LC2, CROW JM2, FREY WH 2ND2, HANSON LR2. Intranasally-administered deferoxamine mitigates toxicity of 6-OHDA in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2014 Jul 29; 1574:96-104. doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.048. Epub 2014 Jun 10.

FOX, S.H., KATZENSCHLAGER, R., LIM, S.Y., RAVINA, B., SEPPI, K., COELHO, M., POEWE, W., RASCOL, O., GOETZ, C.G., SAMPAIO, C., 2011. The movement disorder society 7045 evidence-based medicine review update: treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 26 (Suppl. 3), S2–S41.

FRANCARDO V1, RECCHIA A, POPOVIC N, ANDERSSON D, NISSBRANDT H, CENCI MA. Impact of the lesion procedure on the profiles of motor impairment and molecular responsiveness to L-DOPA in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2011 Jun;42(3):327-40. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.024. Epub 2011 Feb 19.

FRANCHI, G. C. JR.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 1-6.

FREIRES IA1, DE ALENCAR SM2, ROSALEN PL3. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur J Med Chem.* 2016 Jan 20;110:267-279. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.01.033.

FROZZA, C. O. S.; GARCIA, C. S. C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M. D. O.; SALVADO, M.; MOURA, S.; PADILHA, F. F.; SEIXAS, F. K.; COLLARES, T.; BORSUK, S.; DELLAGOSTIN, O. A.; HENRIQUES, J. A. P.; ROESCH-ELY, M. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red própolis. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 52:137-142.

GECKIL, H.; ATES, B.; DURMAZ, G.; ERDOGAN, S.; YILMAZ, I. Antioxidant, Free Radical Scavenging and Metal Chelating Characteristics of Propolis. *American Journal of Biochemistry and biotechnology*, 1(1), P. 27-31, 2005.

GOETZ, C.G., POEWE, W., RASCOL, O., SAMPAIO, C., 2005. Evidence-based medical review update: pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease: 2001–2004. *Mov. Disord.* 20, 523–539.

GONÇALVES, G., LEITE, M., & PEREIRA, J. (2011). Influência das distintas modalidades de reabilitação sobre as disfunções motoras decorrentes da Doença de Parkinson. *Revista Brasileira de Neurologia*, 47(2), 22–30. Retrieved from <http://files.bvs.br/upload/S/0101-8469/2011/v47n2/a2210.pdf>

GRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013; 1830: 3670-3695.

Haidar I1, Pasillas-Lépine W2, Chaillet A1, Panteley E1,3, Palfi S4,5,6, Senova. Closed-loop firing rate regulation of two interacting excitatory and inhibitory neural populations of the basal ganglia. *Biol Cybern.* 2016 Feb 2. [Epub ahead of print]

HAN, J.; WENG, X.; BI, K.; FOOD CHEM. 2008, 106, 2; Atmani, D.; Chaher, N.; Berboucha, M.; Ayouni, K.; Lounis, H.; Boudaoud, H.; Debbache, N.; Atmani, D.; Food Chem. 2009, 112, 303.

HAUSER, R.A., RASCOL, O., KORCZYN, A.D., JON STOESSL, A., WATTS, R.L., POEWE, W., DE DEYN, P.P., LANG, A.E., 2007. Ten-year follow-up of Parkinson's disease patients randomized to initial therapy with ropinirole or levodopa. *Mov. Disord.* 22, 2409– 2417.

HECHTNER, M.C., VOGT, T., ZOLLNER, Y., SCHRODER, S., SAUER, J.B., BINDER, H., SINGER, S., MIKOLAJCZYK, R., 2014. Quality of life in Parkinson's disease patients with motor fluctuations and dyskinesias in five European countries. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20, 969–974.

HIRSCH, E.C.; BREIDERT, T.; ROUSSELET, E.; HUNOT, S.; HARTMANN, A.; MICHEL, P.P. The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 991:214–228; 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Evolução da razão de dependência da população, total e por grupos de idade específicos e índice de envelhecimento - Brasil - 1940-2050.** Rio de Janeiro: Indicadores sociodemográficos e de saúde no Brasil; 2009.

JACKSON-LEWIS V., BLESÁ, J., PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. *Parkinsonism e Related Disorders*, 18SI, p.SI 83-SI 85, 2012.

JELLINGER, K.A. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. *Mov. Disord* 27:8–30; 2012.

JONES, D.; AUSTEN-GODWIN, R.B. Doença de Parkinson. In: STOKES, MARIA. *Neurologia para fisioterapeutas*. 1ª ed. Premier, 2000. p.167-178.

JÚNIOR, C.O.G; FELÍCIO, A.C; PRADO, G.F. Sistema Extrapiramidal: Anatomia e 51 síndromes clínicas. *Rev. Neurociências*, São Paulo, 2006, v.14, n. 1, 48-51, jan-mar. 2006.

KASAI, M.; FUKUMITSU, H.; SOUMIYA, H.; FURUKAWA, S. Ethanol extract of Chinese propolis facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, p.x-x, 2011.

KIASALARI Z1, BALUCHNEJADMOJARAD T, ROGHANI M. CELL. Hypericum Perforatum Hydroalcoholic Extract Mitigates Motor Dysfunction and is Neuroprotective in Intrastratial 6-Hydroxydopamine Rat Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol*. 2015 Jun 29.

KIRIK D, GEORGIEVSKA B, ROSENBLAD C, BJÖRKLUND A. Delayed infusion of GDNF promotes recovery of motor function in the partial lesion model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 2001 Apr;13(8):1589-99. PubMed PMID: 11328352.

KUMAR H1, LIM HW, MORE SV, KIM BW, KOPPULA S, KIM IS, CHOI DK. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's Disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci*. 2012;13(8):10478-504. doi: 10.3390/ijms130810478. Epub 2012 Aug 21.

KUMAR, S.; CHATTOPADHYAY, S. K.; DAROKAR, M. P.; GARG, A.; KHANUJA, S. P. Cytotoxic activities of xanthochymol and isoxanthochymol substantiated by LC-MS/MS. *Planta Med* 2007; 73(14): 1452-6.

KWON SH1, HONG SI, JUNG YH, KIM MJ, KIM SY, KIM HC, LEE SY, JANG CG. Lonicera japonica THUNB. protects 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by inhibiting activation of MAPKs, PI3K/Akt, and NF- κ B in SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*. 2012 Mar;50(3-4):797-807. Doi: 10.1016/j.fct.2011.12.026. Epub 2011 Dec 28.

LEDÓN, N.; CASACO, A.; GONZALEZ, R.; MERINO, N.; GONZALEZ, A.; TOLON, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologia Sinica*, 18 (3), p.274-276, 1997.

LENT, Roberto. Cem bilhões de neurônios? Conceitos fundamentais de neurociência. 2ª ed. São Paulo. Ed. Atheneu, 2010. 765 p.

LESZEK J, BARRETO GE, GSIOROWSKI K, KOUTSOURAKI E, ÁVILA-RODRIGUES M, ALIEV G. CNS Inflammatory Mechanisms and Oxidative Stress as Key Factors Responsible for Progression of Neurodegeneration: Role of Brain Innate Immune System. *Neurol Disord Drug Targets*. 2016 Feb 2.

LI XZ, ZHANG SN, LIU SM, LU F.Recent advances in herbal medicines treating Parkinson's disease. Fitoterapia. 2013 Jan;84:273-85. doi: 10.1016/j.fitote.2012.12.009. Epub 2012 Dec 21.

LI Z, DONG X, ZHANG J, ZENG G, ZHAO H, LIU Y, QIU R, MO L, YE Y. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. *J Neurol Sci*. 2014 Mar 15;338(1-2):112-7.

LIANG K, YE Y, WANG Y, ZHANG J, LI C.Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway. *J Neurol Sci*. 2014 Sep 15;344(1-2):100-4. doi: 10.1016/j.jns.2014.06.033. Epub 2014 Jun 22.

LIMA CAVENDISH R, DE SOUZA SANTOS J, BELO NETO R, OLIVEIRA PAIXÃO A, VALÉRIA OLIVEIRA J, DIVINO DE ARAUJO E, BERRETTA E SILVA AA, MARIA THOMAZZI S, CORDEIRO CARDOSO J, ZANARDO GOMES M.J Antinociceptive and anti-

inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *J Ethnopharmacol.* 2015 Sep 15; 173:127-33.

LIO, A.; OHGUCHI, K.; INOUE, H.; MARUYAMA, H.; ARAKI, Y.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR_α activation. *Phytomedicine* 2010; 17: 974-979.

LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry* 2014; 146: 174-180.

LOTIA M1,2, JANKOVIC. New and Emerging Medical Therapies in Parkinson's Disease. *J. Expert Opin Pharmacother.* 2016 Feb 1

LOTTI, C., FERNANDEZ, M.C., PICCINELLI, A.L., CUESTA-RUBIO, O. HERNANDEZ, I.M. RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 2209-2213.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2008; 18(3): 447-454.

MACHADO BA1,2, SILVA RP2, BARRETO GDE A2, COSTA SS2, SILVA DF3, BRANDÃO HN3, ROCHA JL3, DELLAGOSTIN OA4, HENRIQUES JA5, UMSZA-GUEZ MA6, PADILHA FF1. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One.* 2016 Jan 8;11(1): e0145954.

MANCOPES, RENATA et al. **Influência da levodopa sobre a fase oral da deglutição em pacientes com Doença de Parkinson.** *Rev. CEFAC* [online]. 2013, vol.15, n.3, pp. 707-712. Epub May 10, 2013. ISSN 1982-0216.

MANI, F.; DAMASCENO, HC.; NOVELLI, EL.; MARTINS, EA.; SFORCIN, JM. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology*, 105 (1-2), p.95-98, 2006.

MCFARLAND K1, PRICE DL, DAVIS CN, MA JN, BONHAUS DW, BURSTEIN ES, OLSSON R. AC-186, a selective nonsteroidal estrogen receptor β agonist, shows gender specific neuroprotection in a Parkinson's disease rat model. *ACS Chem Neurosci.* 2013 Sep 18;4(9):1249-55.

MEDEIROS MS1, SCHUMACHER-SCHUH A1, CARDOSO AM2, BOCHI GV3, BALDISSARELLI J2, KEGLER A2,4, SANTANA D4, CHAVES CM4, SCHETINGER MR2, MORESCO RN3, RIEDER CR1, FIGHERA MR2,4. PLOS ONE. 2016 Jan 11;11(1): e0146129. Iron and Oxidative Stress in Parkinson's Disease: An Observational Study of Injury Biomarkers.

MENDONÇA L.S. Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha. Sergipe-Brasil [Dissertação]. Aracaju/SE: Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, 2011.

MISHRA, B.B; TIWARI, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 4769 - 4807.

MONZOTE, L.; CUESTA-RUBIO, O, FERNANDEZ, M. C.; HERNANDEZ, I. M.; FRAGA, J.; PÉREZ, K.; KERSTENS, M.; MAES, L.; COS, P. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107(8): 978-984.

MORRONI F1, SITA G2, TAROZZI A3, CANTELLI-FORTI G3, HRELIA P2. Neuroprotection by 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate in a 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2014 Nov 17;1589:93-104. doi: 10.1016/j.brainres.2014.09.033. Epub 2014 Sep 23.

MOSLEY, RL.; BENNER, EJ.; KADIU, I.; THOMAS, M.; BOSKA, MD.; HASAN, K.; LAURIE, C.; GENDELMAN, HE. Neuroinflammation, Oxidative Stress and 46. 2006.

MUANGPAISAN W, MATHEWS A, HORI H, SEIDEL D. A systematic review of the worldwide prevalence and incidence of Parkinson's disease. *J Med Assoc Thai.* 2011 Jun;94(6):749-55.

NAVARRO-PETERNELLA FM, MARCON SS. A convivência com a doença de Parkinson na perspectiva do parkinsoniano e seus familiares. *Rev Gaúcha Enferm., Porto Alegre (RS)* 2010 set;31(3):415-22.

Neuroprotective Properties of a Standardized Extract from *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Aroeira-Do-Sertão), as Evaluated by a Parkinson's Disease Model in Rats.

NUNES, L. C. C.; GALINDO, A. B.; DEUS, A. S. O.; RUFINO, D. A; RANDAU, K. P.; XAVIER, H. S.; CITÓ, A. M. G. L.; ROLIM-NETO, P. J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista. Brasileira de Farmacognosia* 2009; 19(2B): 524-529.

OBESO, J.A., RODRIGUEZ-OROZ, M.C., GOETZ, C.G., MARIN, C., KORDOWER, J.H., RODRIGUEZ, M., et al. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat.Med.* 16, 653–661.doi:10.1038/nm.2165.

OH H1, HUR J, PARK G, KIM HG, KIM YO, OH MS. *Phytother Res.* 2013 Jul;27(7):1012-7. doi: 10.1002/ptr.4802. Epub 2012 Aug 30. Sanguisorbae radix protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity by regulating NADPH oxidase and NF-E2-related factor-2/heme oxygenase-1 expressions.

OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; REGITANO-DARCE, M. A. B.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A. M.; ALENCAR, S. M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. *Separation and Purification Technology* 2011; 77: 208-213.

OLIVEIRA, M. E.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E. D. Apicultores do Estado de Sergipe. *Scientia. Plena* 2010; 6: 1.

ORŠOLIC, N.; BAŠIĆ, I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). *Biomedicine&Pharmacotherapy* 2005; 59: 561-570.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P.; AGUIAR, C. L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Ciência Rural* 2002; 32 (6): 997-1003.

PARKINSON, J., 2002. An essay on the shaking palsy, 1817 a. *J. Neuropsychiatry Clin.* 8543 *Neurosci.* 14, 223–236, discussion 222.

PAXINOS, WATSON, 2013. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 7th Edition. Amsterda, Elsevier.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; NETO, F. R. A.; Propolis: 100 anos de Pesquisa e suas Perspectivas Futuras. *Química Nova* 2002; 25 (2): 321-326.

PEREIRA, Márcia Cristina Leite et al. Estratégias para neurorestauração em modelos experimentais de doença de Parkinson. Einstein (São Paulo), v. 5, n. 4, p. 387-391, 2007.

PETERSON LJ1, FLOOD PM. Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012:401264. doi: 10.1155/2012/401264. Epub 2012 Mar 22.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2011; 59 (12): 484-6491.

PINHEIRO, K. S.; RIBEIRO, D. R.; ALVES, A. V. F.; PEREIRA FILHO, R. N.; OLIVEIRA, C. R.; LIMA, S. O. ; REIS, F. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2014; 29:11-117.

PIPPI B, LANA AJ, MORAES RC, GÜEZ CM, MACHADO M, DE OLIVEIRA LF, LINO VON POSER G, FUENTEFRIA AM. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *J Appl Microbiol.* 2015 Apr;118(4):839-50.

QUIROGA-VARELA, A. et al. What basal ganglia changes underlie the parkinsonian state? The significance of neuronal oscillatory activity. *Neurobiology of disease*, v. 58, p. 242-248, 2013.

REZAEI M1, ALIREZAEI M. *J Physiol Sci.* 2014 May;64(3):171-6. doi: 10.1007/s12576-014-0305-z. Epub 2014 Jan 25. Protective effects of *Althaea officinalis* L. extract in 6-hydroxydopamine-induced hemi-Parkinsonism model: behavioral, biochemical and histochemical evidence.

RIBEIRO DR, ALVES ÂV, DOS SANTOS EP, PADILHA FF, GOMES MZ, RABELO AS, CARDOSO JC, MASSARIOLI AP, DE ALENCAR SM, DE ALBUQUERQUE-JÚNIOR RL. Inhibition of DMBA-induced Oral Squamous Cells Carcinoma Growth by Brazilian Red Propolis in Rodent Model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2015 Aug;117(2):85-95.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric* 2011; 91: 2363-2370.

RODRIGUES, Milena; CAMPOS, Luciane Costa. Estratégia para o tratamento com levodopa na doença de Parkinson. *Revista Analytica*, v. 23, p. 44-51, 2006.

RODRIGUEZ-OROZ, M.C., LOPEZ-AZCARATE, J., GARCIA-GARCIA, D., ALEGRE, M., TOLEDO, J., VALENCIA, M., GURIDI, J., ARTIEDA, J., OBESO, J.A., 2011. Involvement of the sub-thalamic nucleus in impulse control disorders associated with Parkinson's disease. *Brain* 134, 36–49.

RYAN BJ, HOEK S, FON EA, WADE-MARTINS R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci.* 2015 Apr;40(4):200-10. doi: 10.1016/j.tibs.2015.02.003. Epub 2015 Mar 8.

SCALZO, PL; TEIXEIRA-JÚNIOR, AL. Participação dos núcleos da base no controle do tônus e da locomoção. *Fisioter. Mov.*, Curitiba, v.22, n.4, p.595-603, out. /dez. 2009.

SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. *Current Opinion in Chemical Biology* 2011; 15: 497-504.

SEGURA-AGUILAR J, PARIS I, MUÑOZ P, FERRARI E, ZECCA L, ZUCCA FA. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2014 Jun;129(6):898-915.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 133: 253-260.

SHARIFI H1, MOHAJJEL NAYEBI A2, FARAJNIA S3, HADDADI R4. Effect of Buspirone, Fluoxetine and 8-OH-DPAT on Striatal Expression of Bax, Caspase-3 and Bcl-2 Proteins in 6-Hydroxydopamine-Induced Hemi-Parkinsonian Rats. *Adv Pharm Bull*. 2015 Nov;5(4):491-5. doi: 10.15171/apb.2015.067. Epub 2015 Nov 30.

SHOBANA C1, KUMAR RR, SUMATHI T. Cell Mol Neurobiol. 2012 Oct;32(7):1099-112. Epub 2012 Apr 17. Alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. protects against 6-hydroxydopamine-induced changes in behavioral and biochemical aspects: a pilot study.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2008; 5: 313-316.

SINGH S, DIKSHIT M. Apoptotic neuronal death in parkinson's disease: Involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev*. 2007;54(2):233–50. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.02.001

SIQUEIRA, A.B.S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R. S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; QUEIROZ, L. A.; PORTO, A. L. F. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. *Applied Microbiology* 2008; 48: 90-96.

SONG, Y. S.; JIN, C. B.; JUNG, K. J.; PARK, E. H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 2002; 82 (2-3): 89-95.

SOUZA, CHEYLLA FABRICIA M., et al. "A doença de Parkinson e o processo de envelhecimento motor: uma revisão de literatura." *Rev Neurocienc* 19.4 (2011): 718-23.

SOUZA, I. C. L.; NASCIMENTO, M. F.; NETA, R. G. S.; SANTOS, J. C.; COSTA, L. P.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C. Effect of the maltodextrin-induced chemical reticulation on the physical properties and healing potential of collagen-based membranes containing Brazilian red propolis extract. *Glob. J. Med. Med. Sci*. 2013; 1: 044-054.

TAJIRI N1, YASUHARA T, SHINGO T, KONDO A, YUAN W, KADOTA T, WANG F, BABA T, TAYRA JT, MORIMOTO T, JING M, KIKUCHI Y, KURAMOTO S, AGARI T, MIYOSHI Y, FUJINO H, OBATA F, TAKEDA I, FURUTA T, DATE I. *Brain Res*. 2010 Jan 15;1310:200-7. doi: 10.1016/j.brainres.2009.10.075. Epub 2009 Nov 10. Exercise exerts neuroprotective effects on Parkinson's disease model of rats.

TAPIAS V1, CANNON JR2, GREENAMYRE JT3. Pomegranate juice exacerbates oxidative stress and nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 May;35(5):1162-76. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.10.077. Epub 2013 Oct 21.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *e-CAM* 2006; 3: 249- 254.

UNGERSTEDT U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968b; 5:107–10.

WANG Q, LIU Y, ZHOU. JTransl Neurodegener. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. 2015 Oct 12;4:19. doi:10.1186/s40035-015-0042-0. E Collection 2015.

WANG W, TANG L, LI Y, WANG Y. Biochanin A protects against focal cerebral ischemia/reperfusion in rats via inhibition of p38-mediated inflammatory responses. *J Neurol Sci.* 2015a Jan 15;348(1-2):121-5.

WANG W, TANG L, LI Y, WANG Y. Biochanin A protects against focal cerebral ischemia/reperfusion in rats via inhibition of p38-mediated inflammatory responses. *J Neurol Sci.* 2015b Jan 15;348(1-2):121-5. doi: 10.1016/j.jns.2014.11.018. Epub 2014 Nov 18.

WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and medicine*, 36 (7), p.838-849, 2004.

WIRDEFELDT K, ADAMI HO, COLE P, TRICHOPOULOS D, MANDEL J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol.* 2011 Jun;26 Suppl 1: S1-58.

YANG EJ1, PARK GH, SONG KS. Neuroprotective effects of liquiritigenin isolated from licorice roots on glutamate-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells. *Neurotoxicology.* 2013 Dec; 39:114-23. doi: 10.1016/j.neuro.2013.08.012. Epub 2013 Sep 5.

ZARE K1, EIDI A, ROGHANI M, ROHANI AH. The neuroprotective potential of sinapic acid in the 6-hydroxydopamine-induced hemi-parkinsonian rat. *Metab Brain Dis.* 2015 Feb;30(1):205-13. doi: 10.1007/s11011-014-9604-6. Epub 2014 Aug 16.

ZHANG, A; SUN, H; WANG, X. Recent advances in natural products from plants for treatment of liver diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 63: 570-577.

ZHOU C, HUANG Y, PRZEDBORSKI S. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. *Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147: 93–104, 2008.

ZHU H, ZOU L, TIAN J, LIN F, HE J, HOU J. Protective effects of sulphonated formononetin in a rat model of cerebral ischemia and reperfusion injury. *Planta Med.* 2014 Mar;80(4):262-8.

ZUCCA, F.A., BASSO, E., CUPAIOLI, F.A., FERRARI, E., SULZER, D., CASELLA, L., et al. (2014). Neuro melanina of the human substantia nigra: an update. *Neurotox.Res.* 25, 13–23.