

2.10.03 - Farmacologia / Neuropsicofarmacologia

EFEITO DA SILIMARINA EM UM MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR 6-OHDA EM CAMUNDONGOS

Catiuscia M. De Freitas¹, Camila P. Saccol^{2*}, Bárbara N. Krum³, Ana Paula C. Ceretta³, Roselei Fachinetto⁴

1. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da UFSM

2. Estudante de IC do curso de Farmácia da UFSM

3. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSM

4. Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM/ Orientador

Resumo:

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva, a qual afeta cerca de 1-2% da população mundial, provocando distúrbios motores incapacitantes. A silimarina, isolada das sementes da planta *Silybum marianum*, é um composto que tem demonstrado efeitos antioxidantes, neuroprotetores e com baixa toxicidade. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da silimarina em um modelo de parkinsonismo induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em camundongos.

Os camundongos receberam 6-OHDA (via intracerebroventricular) e uma semana após a 6-OHDA iniciou-se o tratamento com silimarina (10, 30 ou 100 mg/kg, via intraperitoenal) durante 7 dias. No 15º dia do protocolo experimental realizaram-se as análises comportamentais.

Os resultados dos testes comportamentais demonstraram que a silimarina recupera, pelo menos em parte, os prejuízos motores induzidos por 6-OHDA, sugerindo um efeito promissor da silimarina na DP.

Autorização legal: Este protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) sob número 4398020415/2015 (Autorização patrimônio genético CNPq número 010757/2014-7).

Palavras-chave: Doença de Parkinson; atividade locomotora; *Silybum marianum*.

Apoio financeiro: CAPES, CNPq e FAPERGS.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: CIC/PRPGP/UFSM

Introdução:

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, a qual é caracterizada pela perda seletiva e progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra, ocasionando uma redução da dopamina no estriado. A dopamina é um importante neurotransmissor produzido a partir da ativação da enzima tirosina hidroxilase no cérebro, possuindo várias funções, dentre elas o controle dos movimentos voluntários. Conseqüentemente, sua redução acarreta sintomas clínicos motores tais como: bradiscinesia, tremor em repouso, rigidez e anormalidades posturais surgindo desta forma a DP, um mal cujas causas ainda não são completamente conhecidas, porém estudos apontam uma provável contribuição do estresse oxidativo.

Atualmente não existem terapias que sejam capazes de prevenir, interromper ou curar a DP. A levodopa é a principal terapia utilizada para atenuar os sintomas motores, no entanto, à longo prazo, pode agravá-los e levar ao surgimento de discinesias. Desta forma, fica evidente a necessidade da busca por novos fármacos que minimizem os efeitos adversos e possam ser efetivos para o tratamento da doença com o intuito da melhora da qualidade de vida do paciente.

Vários modelos animais vêm sendo utilizados para o estudo da DP, dentre eles pode-se citar o modelo da 6-OHDA, a qual é uma neurotoxina análoga da dopamina que causa degeneração dos neurônios dopaminérgicos no sistema nervoso central e produz efeitos que mimetizam, ao menos em parte, a DP em humanos. Diversos compostos têm sido testados neste modelo em busca da produção de efeito terapêutico. Neste trabalho utilizou-se a silimarina, um composto de origem vegetal muito utilizado para o tratamento de doenças hepáticas, com poucos efeitos adversos reportados na literatura e que possui propriedades importantes e possivelmente benéficas para o tratamento da DP. A silimarina é uma mistura de flavonoides obtida das sementes da planta *Silybum marianum* e tem demonstrado efeitos antioxidantes, neuroprotetores e com baixa toxicidade, cujo potencial farmacológico em modelos de DP tem sido pouco explorado.

Considerando que a DP é um distúrbio incapacitante que reduz a qualidade de vida do paciente e os tratamentos disponíveis apresentam eficácia temporária, torna-se relevante a busca por tratamentos que possam melhorar a qualidade de vida do paciente.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da silimarina em um modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA em camundongos.

Metodologia:

Para a realização dos procedimentos experimentais foram utilizados camundongos albinos Swiss machos pesando de 25-35g provenientes do Biotério Central da UFSM e que foram acomodados em biotério setorial com temperatura controlada (22 +/- 3°C) e ciclo claro/escuro 12/12-h, com livre acesso a comida e água. Este protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta universidade sob número 4398020415/2015.

Seguindo-se o protocolo experimental previamente aprovado, os camundongos inicialmente receberam imipramina na dose de 25 mg/kg via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes da injeção de 6-OHDA a fim de proteger os neurônios noradrenérgicos. A partir de então, os animais foram divididos em dois grupos e anestesiados com cetamina/xilazina (100 mg/kg / 10 mg/kg i.p.). Após, receberam 60 µg de 6-OHDA (dissolvida em 3 µL de NaCl 0,9% contendo 0,05% de ácido ascórbico) ou veículo (NaCl 0,9% contendo 0,05% de ácido ascórbico) por via intracerebroventricular (i.c.v.) no ventrículo cerebral direito utilizando uma microseringa Hamilton. Após uma semana, os animais foram divididos em oito grupos experimentais e iniciou-se o tratamento com diferentes doses de silimarina: 10, 30 ou 100 mg/kg, contendo 1% de etanol, via i.p., durante sete dias consecutivos. O grupo controle recebeu o veículo da silimarina (NaCl 0,9% contendo 1% de etanol, i.p.). A via intraperitoneal foi escolhida devido a baixa biodisponibilidade da silimarina por via oral.

No 15º dia do protocolo experimental foram realizadas as análises comportamentais relacionadas à atividade, equilíbrio e coordenação motora dos animais através dos testes de campo aberto, caminhada sobre a barra e rotarod. Para a realização do teste do campo aberto, os animais foram colocados individualmente em uma das extremidades da caixa de teste, dividida em dezesseis partes iguais, onde foi contabilizado o número de cruzamentos (parâmetro relacionado à atividade locomotora) durante 5 minutos. No teste da caminhada sobre a barra os animais foram colocados sobre a extremidade de uma barra de madeira horizontal (1,5 cm x 75 cm) elevada a 90 cm do chão com uma caixa escura para o animal entrar na outra extremidade, avaliou-se a latência para o animal atravessar a barra e entrar na caixa escura durante 120 segundos. Já para o teste do rotarod foi efetuado um treinamento vinte e quatro horas antes dos experimentos com todos os animais, os quais deveriam permanecer no aparato (3,7 cm de diâmetro; 8 rpm) durante 60 segundos sem cair. No dia do experimento foi avaliado o número de quedas do aparato até o tempo máximo de 4 minutos.

Os dados obtidos a partir dos testes experimentais foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

Resultados e Discussão:

Em relação aos efeitos da 6-OHDA e/ou da silimarina sobre a atividade locomotora, avaliados através do teste do campo aberto, verificou-se que houve uma diminuição significativa no número de cruzamentos dos animais que receberam 6-OHDA quando comparado com o grupo controle ($p < 0,05$). O tratamento com silimarina em todas as doses recuperou a atividade locomotora dos animais ($p < 0,05$). Além disso, a silimarina não causou nenhum efeito *per se* na atividade locomotora em todas as doses testadas. Quando avaliado o equilíbrio dos animais através do teste da caminhada sobre a barra a administração de 6-OHDA aumentou a latência para atravessar a barra comparado com o grupo controle ($p < 0,05$) e o tratamento com silimarina foi capaz de diminuir essa latência para atravessar a barra ($p < 0,05$).

Quanto aos efeitos da 6-OHDA e/ou silimarina sobre a coordenação motora fina dos animais, avaliados através do teste do rotarod, verificou-se que houve um aumento no número de quedas do aparato rotarod quando comparado com o grupo controle nos animais que receberam 6-OHDA ($p < 0,05$). A análise estatística demonstrou que o tratamento com silimarina na dose de 100 mg/kg diminuiu o número de quedas ($p < 0,05$). Em adição, o tratamento com silimarina *per se* não afetou a coordenação motora fina dos animais em todas as doses testadas.

Diferentes efeitos benéficos da silimarina têm sido demonstrados em diversos estudos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, poucas informações estão disponíveis em relação aos seus efeitos sobre o comprometimento motor em modelos experimentais de DP. Nesse sentido, a análise comportamental é um bom parâmetro para avaliação de possível neuroproteção. Particularmente, em roedores a falta de coordenação e equilíbrio motor é um marcador confiável de degeneração nigroestriatal. Neste sentido, através dos testes experimentais realizados verificou-se, como o esperado, que a 6-OHDA causou prejuízo tanto na atividade quanto na coordenação e equilíbrio motor dos animais e o tratamento com a silimarina foi capaz de reverter esses danos motores.

Conclusões:

Levando-se em consideração os achados neste estudo, envolvendo as alterações motoras induzidas pela administração de 6-OHDA e os bons resultados por parte da silimarina em recuperar os prejuízos motores causados pela 6-OHDA, a silimarina poderia promover um efeito benéfico em aliviar os sintomas motores relacionados à DP. No entanto mais estudos devem ser realizados a fim de encontrar os mecanismos exatos da ação da silimarina neste modelo experimental e, além disso, uma dose ideal que possa ser utilizada em futuros ensaios clínicos.

Referências bibliográficas:

- AHLSKOG, J. E.; MUENTER, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Movement Disorders**, v. 16, p. 448-58, 2001.
- ALACHKAR, A. et al. Locomotor response to L-DOPA in reserpine-treated rats following central inhibition of aromatic l-amino acid decarboxylase: Further evidence for non-dopaminergic actions of l-DOPA and its metabolites. **Neuroscience Research**, v. 68, p. 44-50, 2010.
- AMBEGAOKAR, S. S.; ROY, B.; JACKSON, G. R. Neurodegenerative models in *Drosophila*: polyglutamine disorders, Parkinson disease, and amyotrophic lateral sclerosis. **Neurobiology of disease**, v. 40, p. 29-39, 2010.
- BUSANELLO, A. et al. Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 22, p. 71- 75, 2011.
- COOKSON, M. R. The biochemistry of Parkinson's disease. **Annual Review Biochemistry**, v. 74, p. 29-52, 2005.
- DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. **Science**, v. 302, p. 819-822, 2003.
- FIORENTINI, C. et al. Persistent activation of the D1R/Shp-2/Erk1/2 pathway in L- DOPA-induced dyskinesia in the 6-hydroxy-dopamine rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 54, p. 339-348, 2013.
- GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of disease in man. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, p. 987-1041, 1996.
- GODOY, M. C. M. et al. α 2-Adrenoceptors and 5-HT receptors mediate the antinociceptive effect of new pyrazoles, but not of dipyrone. **European Journal of Pharmacology**, v. 496, p. 93-97, 2004.
- HADDADI, R. et al. Silymarin improved 6-OHDA-induced motor impairment in hemi- parkinsonian rats: behavioral and molecular study. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 22-38, 2014.
- HOU, Y. C. et al. Preventive effect of Silymarin in cerebral ischemia-reperfusion- induced brain injury in rats possibly through impairing NF- κ B and STAT-1 activation. **Phytomedicine**, v. 17, p. 963-973, 2010.
- IRINTCHEV, A. et al. Impacts of lesion severity and tyrosine kinase receptor B deficiency on functional outcome of femoral nerve injury assessed by a novel single- frame motion analysis in mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 802-808, 2005.
- KLOCKGETHER, T. Parkinson's disease: clinical aspects. **Cell and Tissue Research**, v. 318, p. 115-120, 2004.
- LINDGREEN, H. S. et al. The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: Relation to dose and route of administration. **Behavioural Brain Research**, v. 177, p. 150-159, 2007.
- LU, P. et al. Silibinin prevents amyloid beta peptide-induced memory impairment and oxidative stress in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, p. 1270-1277, 2009.
- MACHADO-FILHO, J. A. et al. Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 116-125, 2014.
- MANNA, S. K. et al. Silymarin suppresses tnf-induced activation of nf-kappa b, c-jun n-terminal kinase, and apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 6800- 6809, 1999.
- NAGATSU T, SAWADA M. L-DOPA therapy for Parkinson's disease: Past, present, and future. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 15, p. 3-8, 2009.
- NAUDIN, B. et al. Acute L-DOPA pretreatment potentiates 6-hydroxydopamine- induced toxic effects on nigro-striatal dopamine neurons in mice. **Brain Research**, v. 701, p. 151-157, 1995.
- OBESO, J. A. et al. Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences (Suppl.)**, v. 23, p. S8-S19, 2000.
- PASBAN-ALIABADI, H. et al. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced PC12 cell apoptosis by olive (*Olea europaea* L.) leaf extract is performed by its main component oleuropein. **Rejuvenation Research**, v. 16, p. 134-142, 2013.
- PEPPING, J. Milk thistle: Silybum marianum. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 56, p. 1195-1197, 1999.
- RIBEIRO, R. P. et al. Probucol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 660-668, 2013.
- SMITH, G. A. et al. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: Predicting l-DOPA-induced dyskinesia.

Behavioural Brain Research, v. 226, p. 281- 292, 2012.

TOBÓN-VELASCO, J. C. et al. 6-OHDA-induced apoptosis and mitochondrial dysfunction are mediated by early modulation of intracellular signals and interaction of Nrf2 and NF-κB factors. **Toxicology**, v. 304, p. 109-119, 2013.

WANG, M. J. et al. Silymarin protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced neurotoxicity by inhibiting microglia activation. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 2103-2112, 2002.