

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

Jeane Binotto Reinheimer

**EFEITO DA (+)-CATEQUINA SOBRE A DISCINESIA OROFACIAL
INDUZIDA POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS E ATIVIDADE
DA MONOAMINOXIDASE**

Santa Maria, RS
2018

Jeane Binotto Reinheimer

**EFEITO DA (+)-CATEQUINA SOBRE A DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA
POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS E ATIVIDADE DA
MONOAMINOXIDASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Roselei Fachinetto

Santa Maria, RS
2018

Reinheimer, Jeane Binotto
Efeito da (+)-catequina sobre a discinesia orofacial
induzida por reserpina em camundongos e atividade da
monoaminoxidase / Jeane Binotto Reinheimer.- 2018.
66 p.; 30 cm

Orientadora: Roselei Fachinetto
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2018

1. Discinesia tardia 2. Movimentos de mascar no vazio
3. Estresse oxidativo 4. Antioxidante 5. Monoaminoxidase
I. Fachinetto, Roselei II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Jeane Binotto Reinheimer. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: jika.b.reinheimer@gmail.com

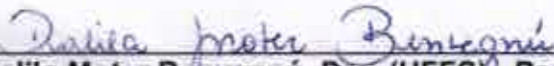
Jeane Binotto Reinheimer

**EFEITO DA (+)-CATEQUINA SOBRE A DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA
POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS E ATIVIDADE DA
MONOAMINOXIDASE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 20 de março de 2018:

Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)


Dalila Moter Benvegnú, Dra. (UFFS)- Parecer

Gabriela Trevisan dos Santos, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela vida e saúde e por sempre guiar minha caminhada.

Aos meus pais, Fatima e Hilário, por todo o amor e carinho. Obrigada por todas as palavras confortantes nos momentos de nervosismo e ansiedade e também pelo apoio nas minhas decisões. Amo vocês!

Ao meu namorado, Éverton, por todo amor, carinho, apoio, compreensão e incentivo. Obrigada por sempre estar ao meu lado torcendo pelo meu sucesso! Te amo!

À minha orientadora, Prof.^a Rose, pela orientação, paciência, confiança e ensinamentos.

Aos amigos do laboratório, pelo coleguismo, amizade, momentos de risadas e alegria.

Aos meus amigos, de longe e perto, por transmitirem energia positiva e votos de sucesso.

Ao CNPq, FAPERGS e a CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

À Universidade Federal de Santa Maria e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica pela possibilidade de realização deste curso.

Enfim, à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram e agregaram valor a este trabalho. Gratidão eterna!

A única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz. Se você ainda não encontrou o que é, continue procurando. Não sossegue. Assim como todos os assuntos do coração, você saberá quando encontrar.

(Steve Jobs)

RESUMO

EFEITO DA (+)-CATEQUINA SOBRE A DISCINESIA OROFACIAL INDUZIDA POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS E ATIVIDADE DA MONOAMINOXIDASE

AUTORA: Jeane Binotto Reinheimer

ORIENTADORA: Roselei Fachinetto

A discinesia tardia (DT) consiste num distúrbio incapacitante e debilitante, decorrente do uso crônico de antipsicóticos que afeta em torno de 20% a 50% dos pacientes. É caracterizada por movimentos involuntários, repetitivos e anormais que envolvem principalmente a musculatura da região oro-língua-facial. Há várias hipóteses que tentam explicar seu mecanismo fisiopatológico, porém nenhuma está completamente elucidada. Há evidências de que o estresse oxidativo decorrente do metabolismo da dopamina pela monoaminoxidase (MAO) está associado com a manifestação desse efeito adverso extrapiramidal. Nos Estados Unidos, *Valbenazine* e *Deutetrabenazine* foram aprovados pelo *Food and Drug Administration* para o tratamento da DT, porém estes fármacos podem causar efeitos adversos graves, como arritmia cardíaca. No Brasil, não há nenhum tratamento totalmente eficiente em amenizar esses movimentos involuntários. A (+)-catequina é um composto polifenólico com propriedades antioxidantes e possui atividade neuroprotetora promissora. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da (+)-catequina sobre a discinesia orofacial (DO) induzida por reserpina em camundongos, e o possível envolvimento da enzima MAO. *In vitro*, a (+)-catequina inibiu a atividade das duas isoformas de MAO em concentrações de 0,34 e 1,03 mM de forma reversível para MAO-A e parcialmente reversível para MAO-B. Para avaliar os efeitos da (+)-catequina sobre a DO induzida por reserpina, camundongos Swiss machos (pesando 25-35 g) foram tratados diariamente durante 4 dias com reserpina (1 mg/kg, s.c.) ou seu veículo. Depois, a (+)-catequina (10, 50 ou 100 mg/kg, i.p.) ou o seu veículo foram administrados por mais 20 dias. Nos dias 6, 8, 15 e 26 do período experimental, foram quantificados os movimentos de mascar no vazio (VCMs) e atividades locomotora e exploratória. A reserpina aumentou os VCMs e diminuiu a atividade locomotora e exploratória. A (+)-catequina diminuiu o número de VCMs somente após a segunda administração da dose de 10 mg/kg no 6º dia do período experimental no grupo pré-tratado com reserpina sem alterar nenhum outro parâmetro comportamental. As outras doses testadas não modificaram nenhum parâmetro comportamental. Não foi observada qualquer alteração na atividade de MAO no estriado e substância negra de camundongos tratados com reserpina ou (+)-catequina. Portanto, mais estudos devem ser realizados para esclarecer a potencial neuroproteção da (+)-catequina e seu impacto como terapia farmacológica, visando o aumento da qualidade de vida dos pacientes com DT.

Palavras-chave: Discinesia tardia. Movimentos de mascar no vazio. Estresse oxidativo. Flavanol. Antioxidante. Monoaminoxidase.

ABSTRACT

EFFECT OF (+)-CATECHIN ON RESERPINE INDUCED OROFACIAL DISCINESIA IN MICE AND MONOAMINOXIDASE ACTIVITY

AUTHOR: Jeane Binotto Reinheimer

ADVISOR: Roselei Fachinetto

Tardive dyskinesia (TD) is a disabling and debilitating disorder due to the chronic use of antipsychotics that affects around 20% to 50% of patients. It is characterized by involuntary, repetitive and abnormal movements that mainly involve the musculature of the oro-tongue-facial region. There are several hypotheses that attempt to explain its pathophysiological mechanism, but none is fully elucidated. There is evidence that oxidative stress produced throughout the metabolism of dopamine by monoaminoxidase (MAO) is associated with the manifestation of this extrapyramidal adverse effect. In the United States, Valbenazine and Deutetrabenazine have been approved by the Food and Drug Administration for the treatment of TD, but these drugs can cause serious adverse effects, such as cardiac arrhythmia. In Brazil, there is no totally efficient treatment to minimize these involuntary movements. A (+)-catechin is a polyphenolic compound with antioxidant properties and has promising neuroprotective activity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of (+)-catechin on orofacial dyskinesia induced by reserpine in mice and the possible involvement of the MAO enzyme. *In vitro*, (+)-catechin inhibited the activity of the two MAO isoforms at concentrations of 0.34 and 1.03 mM reversibly for MAO-A and partially reversible for MAO-B. To evaluate the effects of (+)-catechin on reserpine-induced OD, male Swiss mice (weighing 25-35 g) were treated daily for 4 days with reserpine (1 mg/kg, s.c.) or vehicle. Then (+)-catechin (10, 50 or 100 mg/kg, i.p.) or its vehicle was administered for another 20 days. On days 6, 8, 15 and 26 of the experimental period, vacuous chewing movements (VCMs) and locomotor and exploratory activities were quantified. Reserpine increased VCMs and decreased locomotor and exploratory activities. A (+)-catechin decreased the number of VCMs only after the second administration of the 10 mg/kg dose on the 6th day of the experimental period in the pre-treated group with reserpine without changing any other behavioral parameter. The other doses tested did not modify any behavioral parameters. No alteration was observed in MAO activity in the striatum and substantia nigra of mice treated with reserpine or (+)-catechin. Therefore, further studies should be performed to clarify the potential neuroprotection of (+)-catechin and its impact as pharmacological therapy, aiming to increase the quality of life of patients with TD.

Key words: Tardive dyskinesia. Vacuous chewing movements. Oxidative stress. Flavanol. Antioxidant. Monoaminoxidase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DT	discinesia tardia
DO	discinesia orofacial
MAO	monoaminoxidase
AIMS	do inglês <i>Abnormal Involuntary Movement Scale</i>
ESRS	do inglês <i>Extrapyramidal Symptoms Rating Scale</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
VMAT	do inglês <i>vesicular monoamine transporter</i>
VMAT-2	do inglês <i>vesicular monoamine transporter type 2</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DA	dopamina
TH	tirosina hidroxilase
DAT	do inglês <i>DA transporter</i>
COMT	catecol-O-metiltransferase
HVA	do inglês <i>homovanillic acid</i>
DOPAC	do inglês <i>3,4-dihydroxyphenylacetic acid</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido dismutase
VCMs	do inglês <i>vacuous chewing movements</i>
IUBMB	do inglês <i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
MAO-A	monoaminoxidase A
MAO-B	monoaminoxidase B
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
OH ⁻	radical hidroxila
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IUPAC	do inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
CAT	(+)-catequina
iECA	inibidor da enzima conversora da angiotensina
JNK	do inglês <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
p38	do inglês <i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
BHE	barreira hematoencefálica
MPP ⁺	do inglês <i>1-methyl-4-phenylpyridinium</i>
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
LPS	lipopolissacarídeos
TNF- α	fator de necrose tumoral- α
IL-6	interleucina-6
IL-4	interleucina-4
ERK1/2	do inglês <i>quinase regulada por sinal extracelular</i>
ECGC	epigallocatequina-3-galato
ERK1/2	do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
SNC	sistema nervoso central

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Discinesia Tardia (DT).....	14
2.2 Hipóteses da fisiopatologia da DT	17
2.3 Enzima monoaminoxidase (MAO).....	19
2.4 Modelo animal de DT	21
2.5 (+)-Catequina (CAT).....	22
3 JUSTIFICATIVA	27
4 OBJETIVOS	28
4.1 Objetivo Geral	28
4.2 Objetivos específicos	28
5 RESULTADOS	29
MANUSCRITO - Effects of catechin on reserpine-induced vacuous chewing movements: analysis of <i>in vitro</i> and <i>ex vivo</i> MAO activity	30
6 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	55
7 CONCLUSÃO GERAL	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROJETO EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (CEUA/UFSM)	65

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está apresentada na forma de um manuscrito científico.

No item **INTRODUÇÃO e REFERENCIAL TEÓRICO**, está descrita uma revisão sucinta sobre os temas abordados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte deste estudo estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra no item **RESULTADOS**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas do manuscrito encontram-se no próprio e representam a íntegra deste estudo.

O item **CONCLUSÕES** encontrado no final desta dissertação, apresenta conclusão geral referente aos dados encontrados neste estudo e apresentados no manuscrito.

O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem na **INTRODUÇÃO e REFERENCIAL TEÓRICO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

As doenças psiquiátricas e neurodegenerativas são condições patológicas extremamente debilitantes que afetam milhares de pessoas em todo o mundo. São patologias que lesionam ou degeneram o sistema nervoso central (SNC) acarretando em déficits físicos, cognitivos e comportamentais que fazem com que os pacientes percam sua saúde e qualidade de vida. Devido à alta complexidade dos circuitos neuronais centrais, o entendimento detalhado da fisiopatologia dessas doenças ainda não foi alcançado. Conseqüentemente, a busca pela cura ou novas estratégias farmacológicas é desafiadora. Existem disponíveis intervenções farmacológicas e não farmacológicas que visam amenizar ou bloquear os sintomas clínicos. Entretanto, todo medicamento pode causar reações adversas que, muitas vezes, podem ser tão graves quanto a doença primária.

Muitos pacientes psiquiátricos fazem uso de antipsicóticos para tratar transtornos psicóticos. Estes fármacos exercem seus efeitos farmacológicos através do bloqueio de receptores de dopamina na via dopaminérgica mesolímbica (GOPALAKRISHNA; ITHMAN; LAURIELLO, 2016). No entanto, os fármacos não são seletivos para esta via e bloqueiam também receptores dopaminérgicos na via nigroestriatal (GOPALAKRISHNA; ITHMAN; LAURIELLO, 2016). O bloqueio crônico dos receptores dopaminérgicos, especialmente D₂, pelos antipsicóticos típicos na via dopaminérgica nigroestriatal é o fenômeno associado ao aparecimento da condição motora hiperkinética, conhecida como discinesia tardia (DT) (STAHL, 2014). Esse distúrbio é caracterizado por movimentos anormais, involuntários e repetitivos que envolvem a musculatura da região oro-língua-facial e, que também pode afetar os membros superiores e inferiores, e o tronco (AQUINO, LANG, 2014; DMS-5, 2014). A fisiopatologia da DT ainda não é completamente compreendida, contudo, há hipóteses que sugerem mecanismos que possam estar envolvidos com a manifestação clínica. A hipótese clássica propõe que o bloqueio crônico dos receptores D₂ causa uma suprarregulação dos mesmos, fazendo com que haja um aumento compensatório na quantidade de receptores associado à supersensibilidade (ANDRADE; BERTOLUCCI; PEREIRA, 1984; STAHL, 2014). No entanto, outras hipóteses trazem evidências de que fenômenos como o estresse oxidativo, hipofunção do sistema GABAérgico, excitotoxicidade

glutamatérgica entre outros, podem impactar no processo de surgimento e instalação da DT no organismo (LISTER et al., 2014; WALN; JANKOVIC, 2013). No Brasil, ainda não existe um tratamento eficaz para a DT. Portanto, é necessário que estudos científicos que visam compreender a fisiopatologia da DT e elaborar novas estratégias farmacoterapêuticas sejam realizados.

Em animais, a DT pode ser estudada através do modelo animal de discinesia orofacial (DO) induzida por reserpina. A reserpina depleta os níveis de monoaminas nos terminais nervosos, pois é um bloqueador não seletivo e irreversível do transportador vesicular de monoaminas (NEISEWANDER; LUCKI; MCGONIGLE, 1991). Ao bloquear este transportador, a DA não é liberada na fenda sináptica e, conseqüentemente, seus níveis intracelulares são aumentados. Por sua vez, a metabolização desta monoamina pela enzima monoaminoxidase (MAO) também está aumentada, o que pode levar a produção excessiva de metabólitos reativos e citotóxicos. Neste modelo, o número de movimentos de mascar no vazio é o principal parâmetro de avaliação em roedores (ANDREASSEN; JØRGENSEN, 2000; NEISEWANDER; LUCKI; MCGONIGLE, 1991).

Neste cenário, é interessante a pesquisa de compostos que possuam propriedades neuroprotetoras. A (+)-catequina (CAT) é um polifenol, pertencente à classe flavanol (classe também chamada catequina), presente em várias plantas incluindo o chá verde (EL-SHAHAWI et al., 2012). Conhecida por apresentar atividade antioxidante, a CAT neutraliza as espécies reativas de oxigênio (EROs) decorrentes do metabolismo de substâncias, como neurotransmissores, prevenindo assim sua participação em reações de oxirredução que podem gerar dano oxidativo celular (HARWANSH et al., 2016). Dados da literatura demonstram que a CAT é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, portanto, sugere-se que ela pode atuar no SNC (WU et al., 2012). Também já se tem relatos de que a CAT é um composto promissor como agente terapêutico em modelos de doenças associadas ao SNC como por exemplo depressão, doença de Parkinson e Alzheimer (AHMED et al., 2013; LEE et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013).

Portanto, nesse contexto, propõe-se que a CAT pode apresentar efeito neuroprotetor promissor no modelo de DO induzida por reserpina, apontando-a como possível recurso terapêutico para o tratamento de alterações motoras

relacionadas ao sistema dopaminérgico. Além disso, também é importante investigar se o mecanismo pelo qual ela atua é via alterações na atividade da MAO, uma vez que alterações na atividade desta enzima têm sido relacionadas à toxicidade neuronal, o que poderia levar ao surgimento da DT.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Discinesia Tardia (DT)

O termo "Discinesia Tardia" foi criado em 1964 por Faurbye e colaboradores após observarem que o surgimento de movimentos discinéticos em pacientes psiquiátricos ocorre de modo tardio durante uso de antipsicóticos. A DT é um distúrbio do movimento, de origem iatrogênica, ou seja, decorrente do uso crônico de medicamentos antipsicóticos, codificado pelo número 333.85 (G24.01) no Manual de Diagnóstico e Estatística de Transtornos Mentais, Quinta Edição (DMS-5, 2014, do inglês *Diagnostic And Statistical Manual Of Mental Disorders, Fifth Edition*). É caracterizada por movimentos coreiformes (em "dança"), anormais, repetitivos, não rítmicos e involuntários que afetam geralmente a língua, mandíbula e extremidades – em alguns casos pode envolver músculos da faringe, diafragma ou tronco – desenvolvidos devido ao uso crônico (mínimo de 3 meses) de antipsicóticos (AQUINO, LANG, 2014; DMS-5, 2014). Casos mais graves podem apresentar dificuldade em falar, respirar e alimentar-se, o que evidentemente compromete física, emocional e socialmente a vida destes pacientes (CAROFF; CAMPBELL, 2016). Este distúrbio do movimento geralmente é persistente mesmo após a interrupção do tratamento e pode tornar-se irreversível (ANDREASSEN et al., 2003; CAROFF; CAMPBELL, 2016).

O uso de antipsicóticos é a estratégia terapêutica mais utilizada para aliviar os sintomas da esquizofrenia, para a qual, até o momento, não existe cura ou medicamentos que controlem os sintomas sem causar efeitos adversos (MIYAMOTO et al., 2005, STEEDS; CARHART-HARRIS; STONE, 2015). Existem dois tipos de antipsicóticos, os quais divergem em seus mecanismos de ação: os de primeira geração ou típicos e os de segunda geração ou atípicos. Embora tenham suas singularidades, ambos são capazes de antagonizar receptores dopaminérgicos com grau de afinidade e potência diferentes

(BRUIJNZEEL; SURYADEVARA; TANDON, 2014; STHAL, 2014). Os efeitos farmacológicos dos antipsicóticos típicos devem-se principalmente ao bloqueio de receptores de DA D₂ na via mesolímbica, pelos quais possuem alta afinidade. Esta classe tem alto poder de causar efeitos adversos extrapiramidais, como parkinsonismo, síndrome neuroléptica maligna e, tardiamente, DT (STANDAERT; GALANTER, 2009; MELTZER, 2013; WERNER; COVENÃS, 2014). Sabe-se que estes efeitos extrapiramidais ocorrem devido ao bloqueio dopaminérgico na via nigroestriatal (STAHL, 2014; VALLIANATOU, 2016). Clorpromazina, flufenazina e haloperidol são representantes desse grupo de medicamentos. Já os antipsicóticos atípicos possuem uma menor afinidade por receptores de DA D₂ e maior atuação em receptores serotoninérgicos (principalmente 5HT_{2A}) (MELTZER, 2013; RANG; DALE 2011; STAHL, 2014). Além disso, podem causar aumento de peso corporal e alterações metabólicas lipídicas e glicêmicas (BUCHANAN; L'ITALIEN; KORO, 2002). Risperidona, quetiapina e aripiprazol fazem parte desta classe de medicamentos (RANG; DALE 2011). Acreditava-se que os antipsicóticos atípicos não causariam efeitos adversos extrapiramidais, mas atualmente já há relatos de casos de que eles também são capazes de desencadear a manifestação de DT, principalmente se associado a fatores de risco (HEITZMANN et al., 2016).

Existem alguns fatores de risco que suscetibilizam os pacientes a desenvolver síndromes extrapiramidais e DT. Além da exposição crônica e a altas doses aos antipsicóticos, condições como idade avançada, etnia afro-americana, diabetes mellitus, gênero feminino, ocorrência de parkinsonismo induzido por fármacos e genótipos específicos de receptores de DA contribuem para o surgimento e consolidação do distúrbio motor (AIA et al., 2011; CORNETT et al., 2017; STAHL, 2014; SYU et al., 2010; TENBACK; HARTEN; OS, 2009; TENBACK; HARTEN, 2011; WALN; JANKOVIC, 2013).

O diagnóstico da DT é embasado em três elementos: histórico de uso de medicamentos e seu período de administração, apresentação dos sintomas característicos e exclusão de outras condições com fenomenologia similar (WALN; JANKOVIC, 2013). Na clínica, os pacientes devem ser avaliados de forma singular e a sintomatologia é ponderada com o auxílio de escalas, as quais dão suporte ao diagnóstico, avaliação do curso e classificação do grau de severidade dos movimentos anormais. A Escala de Movimento Involuntário

Anormal (AIMS, do inglês *Abnormal Involuntary Movement Scale*) e Escala de Avaliação de Sintomas Extrapiramidais (ESRS, do inglês *Extrapyramidal Symptoms Rating Scale*) são as ferramentas mais comumente utilizadas (GHARABAWI et al., 2005; MACALUSO; FLYNN; PRESKORN, 2017).

Dados epidemiológicos estimam que a DT afeta em torno de 20% a 50% dos pacientes que fazem uso crônico de antipsicóticos. A incidência é maior em pacientes adultos à idosos, principalmente do gênero feminino, alcançando taxas de 30% após exposição mínima de um ano à antipsicóticos típicos. Apesar de ser em menor magnitude, a exposição à antipsicóticos atípicos gera uma incidência de 5,3% em pacientes acima dos 50 anos de idade (WALN; JANKOVIC, 2013). Estes números tendem a aumentar quando se leva em consideração que na clínica, os antipsicóticos têm sido utilizados para outras patologias e não somente as psicoses. Profissionais médicos têm prescrito estes medicamentos não só para conter os sintomas do transtorno esquizofrênico, mas também para tratar outras neuropatologias como transtorno bipolar, depressão e mania (RANG; DALE, 2011; SHIREEN, 2016). Além disso, a DT também pode se desenvolver em pacientes que fazem uso de outras classes de medicamentos que também possuam a propriedade de bloquear receptores dopaminérgicos. Por exemplo, metoclopramida e prometazina são fármacos utilizados no tratamento de distúrbios gastrointestinais que têm sido associados a casos de DT (SAMIE, DANNENHOFFER; ROZEK, 1987; CLOUD, ZUTSHI; FACTOR, 2014). Outro fator que pode impactar neste dado é o fato de que os antipsicóticos de primeira geração, principalmente haloperidol, ainda são referência para tratar a esquizofrenia (DAYAA et al., 2011; OKPATAKU; TAWANI, 2017). No Brasil, estes medicamentos possuem menor custo financeiro, portanto, em teoria, geram menor impacto orçamentário principalmente ao setor público de saúde, o sistema único de saúde (SUS) (LINDNER et al., 2009). Conforme a Portaria de número 364 de 9 de abril de 2013 estabelecida pelo Ministério da Saúde, o haloperidol e a clorpromazina são os antipsicóticos de primeira geração protocolados como terapia medicamentosa para pacientes esquizofrênicos que buscam tratamento via SUS.

No ano de 2017, nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o registro de dois medicamentos indicados para o tratamento da DT, *Valbenazine* e *Deutetrabenazine*. Ambos são inibidores seletivos do

transportador vesicular de monoaminas do tipo 2 (VMAT-2, do inglês *vesicular monoamine transporter type 2*). Estudos clínicos randomizados demonstraram que estes medicamentos possuem notória eficácia sobre a DT. Contudo, eles podem causar efeitos adversos graves, como arritmia cardíaca devido ao prolongamento do intervalo QT e comportamento suicida (CITROME, 2017; DAVIS et al., 2017). No Brasil, no entanto, ainda não se tem medicamentos específicos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que reduzam a severidade dos sintomas ou bloqueie-os. Algumas estratégias farmacológicas são utilizadas na expectativa de aliviá-los, porém, na maioria dos casos são ineficazes. Aumento da dose ou descontinuação do tratamento com o agente antipsicótico, e terapia anticolinérgica ou GABA mimética são algumas das medidas paliativas utilizadas (MEYER, 2012; STAHL, 2014). Assim é necessária a busca de estratégias terapêuticas mais eficazes para tratar a DT.

2.2 Hipóteses da fisiopatologia da DT

Em condições fisiológicas, a DA, neurotransmissor do sistema dopaminérgico, é sintetizada no citoplasma neuronal pela conversão do aminoácido tirosina em L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa) pela enzima tirosina hidroxilase (TH). Esta etapa é limitante de velocidade no processo de síntese da DA e de outras catecolaminas. Por sua vez, a L-DOPA é transformada em DA pela ação da DOPA descarboxilase, que então é transportada para o interior das vesículas pré-sinápticas pelo VMAT-2, onde é armazenada. Quando há estimulação do neurônio ocorre a despolarização neuronal e as vesículas se fundem com a membrana plasmática e liberam DA, de modo dependente do influxo de cálcio, na fenda sináptica. Ao ser disponibilizada no espaço sináptico, a DA transmite o sinal ao se ligar em receptores dopaminérgicos (D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅) presentes na membrana de neurônios pré e pós-sinápticos. Para cessar a ação deste neurotransmissor, seus níveis sinápticos devem ser diminuídos. Para isso, pode ser transportada novamente para o interior dos neurônios pré-sinápticos através do transportador de dopamina (DAT, do inglês *DA transporter*); ligar-se ao receptor dopaminérgico D₂ pré-sináptico ou também chamado autorreceptor, o qual é responsável pelo *feedback* negativo e inibição da síntese e, conseqüentemente, da descarga neuronal de DA; ser metabolizada pelas enzimas MAO e catecol-O-

metiltransferase (COMT) gerando metabólitos, como ácido homovanílico (HVA, do inglês *homovanillic acid*) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC, do inglês *3,4-dihydroxyphenylacetic acid*); ou sofrer auto-oxidação intra ou extracelular, o que levará à formação de dopamina quinona e EROs (EBINGER; MICHOTTE; HERREGODTS, 1987, STANDAERT; GALANTER, 2009).

O sistema dopaminérgico é dividido em vias que conectam neurônios de diferentes áreas cerebrais. A via nigroestriatal, projeta-se da substância negra para os núcleos da base ou estriado. A via mesolímbica projeta-se da área tegmental ventral do mesencéfalo para o *nucleus accumbens*. A via mesocortical, projeta-se da área tegmental ventral do mesencéfalo para áreas do córtex pré-frontal. E a via tuberoinfundibular, projeta-se do hipotálamo para a adeno-hipófise (STHAL, 2014).

Bastante complexa e provavelmente multifatorial, a base fisiopatológica da DT ainda é pouco compreendida, contudo, é consenso que alterações envolvendo o sistema dopaminérgico na via nigroestriatal são responsáveis pelos movimentos anormais. Esta via faz parte do sistema nervoso extrapiramidal e é encarregada pelo controle dos movimentos e função motora (STAHL, 2014). A via nigroestriatal é rica em DA, cujos corpos celulares neuronais partem da substância negra *pars compacta* e suas projeções inervam o corpo estriado (constituído de dois núcleos basais: núcleo caudado e putâmen). Nos neurônios dopaminérgicos pós-sinápticos no estriado há uma maior densidade de receptores de DA D₁ e D₂ (STANDAERT; GALANTER, 2009).

Existem algumas hipóteses neuroquímicas que tentam explicar os mecanismos fisiopatológicos da DT, porém nenhuma delas está bem elucidada. A hipótese clássica está baseada na supersensibilidade dopaminérgica na via nigroestriatal. Acredita-se que com o bloqueio crônico de receptores pós-sinápticos de DA, especialmente D₂, o sistema neuronal estriatal se encontraria em um estado hiperdopaminérgico e causaria um aumento compensatório na densidade e na sensibilidade dos receptores (ANDRADE; BERTOLUCCI; PEREIRA, 1984, STAHL, 2014). Assim, estes responderiam à níveis reduzidos de DA liberada na fenda sináptica na tentativa de superar o bloqueio dos receptores, o que levaria ao surgimento das manifestações clínicas (STAHL, 2014).

Outra hipótese bastante investigada é a do estresse oxidativo. Esta hipótese sugere que devido ao bloqueio crônico dos receptores dopaminérgicos, aumentariam os níveis de DA na fenda sináptica, assim aumentaria a sua recaptação e conseqüentemente sua auto-oxidação e metabolização pelas enzimas MAO e COMT. Portanto, geraria uma superprodução de EROs e DA quinona. Estes compostos são neutralizados pelo sistema de defesa antioxidante celular, que pode ser enzimático ou não enzimático. As enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GPx) fazem parte deste sistema de defesa enzimático. Porém, quando o processo de defesa endógeno não suporta a neutralização do excesso de EROs ocorre o desequilíbrio a favor das forças pró-oxidantes, resultando no estresse oxidativo. Este causaria neurotoxicidade e possível morte neuronal, resultando no comprometimento das vias responsáveis pelo movimento (SINGH; NAIDU; KULKARNI, 2003; WALN; JANKOVIC, 2013). Estudos experimentais têm demonstrado que compostos antioxidantes, tais como ácido gálico (RECKZIEGEL et al., 2013), *Valleriana officinalis* (FACHINETTO et al., 2007a; PEREIRA et al., 2011), diseleneto de difenila (FACHINETTO et al., 2007b) e resveratrol (BUSANELLO et al., 2012) são capazes de atenuar os movimentos de mascar no vazio (VCMs, do inglês *vacuous chewing movements*) induzidos por fármacos em roedores, cujo movimento é característico de DO em animais.

2.3 Enzima monoaminoxidase (MAO)

A MAO é uma enzima que pertence à classe enzimática oxirredutase e está classificada de acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) pelo número E.C (*Enzyme Commission of the IUBMB*) 1.4.3.4. Existem dois tipos de MAO conhecidas, as isoformas MAO-A e MAO-B, que compartilham em torno de 70% de homologia na sequência de aminoácidos (YOUJIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006). Ambas são encontradas associadas à membrana mitocondrial externa em neurônios e astrócitos no SNC. Também estão distribuídas em outros órgãos e tecidos como fígado, trato gastrointestinal e plaquetas.

Presente em animais, possuem a função de degradar monoaminas endógenas e exógenas. A degradação ocorre pelo processo chamado

desaminação oxidativa que gera produtos como íon amônio e aldeídos (YOU DIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006). No entanto, possuem substratos e inibidores especificamente diferentes. A MAO-A degrada preferencialmente a norepinefrina e serotonina e sua ação é inibida irreversivelmente por clorgilina. Já a MAO-B catalisa principalmente feniletilamina e benzilamina e sua atividade é inibida irreversivelmente pela pargilina. A catálise de dopamina, tiramina, octopamina e triptamina é feita por ambas isoenzimas (DO CANTO, 2014; KALUDERCIC et al., 2014).

Ambas isoformas da MAO são flavoenzimas, ou seja, necessitam da coenzima FAD (flavina adenina dinucleotídeo) para catalisar seus substratos (TRIPATHI et al., 2018). Estas reações podem gerar EROs radiculares, como radical hidroxila (OH^\cdot), e não radiculares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DO CANTO, 2014). Em processos patológicos, o aumento da atividade ou expressão da MAO pode produzir um excesso de espécies reativas citotóxicas, como por exemplo H_2O_2 (GOTZ et al., 1994). Se o sistema antioxidante endógeno não suportar eliminar todos os compostos citotóxicos produzidos, a homeostase é perdida e o organismo entra em desequilíbrio gerando um estado de estresse oxidativo e, conseqüentemente, dano ou até morte celular (GOTZ et al., 1994; DO CANTO, 2014). A base fisiopatológica de algumas doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson e Alzheimer e também da DT está associada com estresse oxidativo. Neste contexto, acredita-se que na DT ocorre o aumento na atividade ou expressão da MAO para suportar a degradação do excesso de DA em virtude do bloqueio crônico de receptores de DA D_2 pelo antipsicótico. Portanto, neste cenário, a MAO torna-se um possível alvo terapêutico para novas alternativas farmacológicas.

Inibidores da MAO tem grande valor terapêutico. Na clínica, esta classe de fármacos é uma das estratégias farmacológicas utilizadas no tratamento da depressão. Além disso, inibidores da MAO podem ser benéficos como adjuvantes no tratamento da doença de Parkinson (YOU DIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006). Interessantemente, Sachdev, Saharov e Cathcart (1999) mostram que a selegilina, inibidor seletivo e irreversível da MAO-B, previne o desenvolvimento de movimentos orofaciais anormais em ratos tratados com flufenazina. Os autores acreditam que este efeito está associado à inibição da metabolização de monoaminas pela MAO, o que, conseqüentemente, não gera

metabólitos potencialmente reativos, impedindo a instalação de estresse oxidativo celular.

Além disso, compostos antioxidantes como a silimarina e o resveratrol apresentam efeito inibitório sobre a atividade da MAO em teste *in vitro* (DE OLIVEIRA et al., 2015) e em modelo de DO em roedores (BUSANELLO et al., 2011; 2012; 2017), respectivamente.

2.4 Modelo animal de DT

Estudos pré-clínicos de triagem de novos fármacos com potencial terapêutico e também de investigação de mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças utilizam modelos animais como ferramenta de pesquisa (STEEDS; CARHART-HARRIS; STONE, 2015). A DT é estudada através do modelo de discinesia orofacial (DO), geralmente induzida por fármaco, em roedores. Os modelos agudos de DO induzido por antipsicóticos ou por reserpina são os mais utilizados entre a comunidade científica (ANDREASSEN et al., 2003; BURGER et al., 2004; 2005; CARVALHO et al., 2003; NEISEWANDER; CASTAFIEDA; DAVIS, 1994; NEISEWANDER et al., 1996). Nos animais, o número de VCMs, é o principal parâmetro de avaliação da DO (NEISEWANDER et al., 1991). Estes movimentos são caracterizados por aberturas da boca no plano vertical sem propósito e não direcionadas, com ou sem protrusão de língua (ANDREASSEN; JØRGENSEN, 2000).

O modelo de DO induzido por reserpina está bem estabelecido na literatura, pois os animais tratados com esse agente depletor de monoaminas apresentam VCMs (ABÍLIO et al., 2003; CALVENTE et al., 2002; DE FREITAS et al., 2016; NEISEWANDER et al., 1991). Os esquemas de indução dos VCMs com reserpina mais utilizados são os de exposição diária ou intervalada durante 3 ou 4 dias. Estes esquemas fazem com que os movimentos orofaciais se manifestam de forma aguda após a exposição. Alguns pesquisadores consideram tal modelo melhor para representar o parkinsonismo (CAMPÊLO et al., 2017; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013), visto que em humanos este desenvolve-se agudamente após a exposição ao agente causador, já a DT se manifesta de forma tardia. Entretanto, características como persistência dos VCMs após a retirada da reserpina e aumento da incidência com o aumento da

idade fomentam a validade desse modelo a favor da DT, pois são encontradas tanto na DO quanto na DT (DE FREITAS et al., 2016; SILVA et al., 2002).

A reserpina é um alcaloide extraído da raiz da planta *Rauwolfia serpentina*, planta nativa da Índia. Foi introduzida na clínica devido à sua propriedade anti-hipertensiva, porém hoje está em desuso pois há disponível novos fármacos mais eficientes e com menos efeitos adversos (MICHEL; HOFFMAN, 2012). No passado, também já foi utilizada como um agente antipsicótico e foi associada com o desenvolvimento de discinesia em humanos (ABÍLIO et al., 2004; UHRBRAND; FAURBYE, 1960).

Este alcaloide age bloqueando irreversivelmente e não seletivamente o VMAT em neurônios monoaminérgicos centrais e periféricos e assim impossibilita o armazenamento vesicular pré-sináptico de monoaminas pelas terminações nervosas. Conseqüentemente, não acontece o processo de exocitose das monoaminas, que se acumulam no citoplasma neuronal de modo que pouco (devido ao extravasamento por canais/transportadores transmembrana) ou nenhuma são disponibilizadas na fenda sináptica (BISONG; BROWN; OSIM, 2013; MICHEL; HOFFMAN, 2012). Acredita-se que os efeitos extrapiramidais ocorram devido a metabolização do acúmulo dessas monoaminas no citosol, principalmente a DA, neurotransmissor majoritário (cerca de 80%) na via nigroestriatal. Por sua vez, esta metabolização intensa produz metabólitos dopaminérgicos bem como EROs, cujo processo de eliminação pode exceder a capacidade do sistema antioxidante de defesa endógeno. Conseqüentemente, as EROs podem se acumular e comprometer a homeostasia celular, provocando o estresse oxidativo.

2.5 (+)-Catequina (CAT)

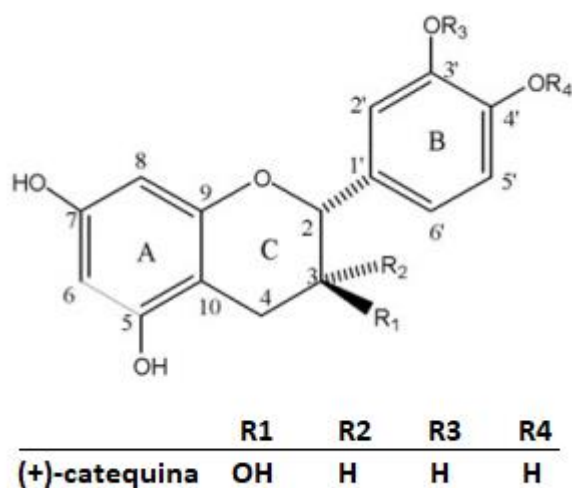
Há centenas de anos atrás, desde a época das antigas civilizações, Hipócrates (conhecido como o “Pai da Medicina”) já apontava o uso de elementos vegetais da natureza para o tratamento de efemeridades. Desde então, o uso de ervas para fins medicinais é culturalmente transmitido de geração a geração. Atualmente, reflexões sobre sustentabilidade enfatizam a constante reformulação de valores e preceitos sobre o melhor aproveitamento de fontes naturais. Com isso, a prática milenar da fitoterapia e nutracêutica na prevenção e tratamento de inúmeras patologias ganhou força e tornou-se

tendência mundial. Assim, o interesse da ciência de investigar o efeito e o perfil farmacológico e toxicológico de plantas medicinais, e também de seus constituintes isoladamente, têm crescido em ritmo acelerado. Como resultado tem-se a descoberta de muitos compostos com aplicabilidade farmacoterapêutica (ARGENTA et al., 2011). A maioria das plantas com propriedades medicinais são ricas em substâncias antioxidantes, por exemplo compostos fenólicos, que são capazes de inibir ou retardar a oxidação de biomoléculas ou impedir a ação danosa das EROs produzidas pelo estresse oxidativo (DE MORAIS et al., 2009). Neste sentido, a temática de diversas pesquisas é estudar o efeito de compostos antioxidantes sobre determinadas condições patológicas, nas quais o estresse oxidativo é o principal fenômeno, supostamente ou não, relacionado com as alterações que originam e instalam-nas no organismo humano.

Os flavonoides, compostos fenólicos encontrados em inúmeras plantas, frutas e bebidas, são conhecidos por possuírem potente atividade antioxidante. Possuem uma estrutura química básica que permite algumas substituições radiculares (DUEÑAS et al., 2010). Devido a essas particularidades estruturais, são classificados em 6 principais subclasses: 1. Flavanol (ou flavan-3-ol ou catequina); 2. Flavonol; 3. Flavona; 4. Antocianina; 5. Isoflavona; e 6. Flavanona (DUEÑAS et al., 2010; LIMÓN et al, 2010).

A CAT é um flavonoide pertencente à família flavanol, cuja singularidade estrutural consiste em uma ligação de uma hidroxila (-OH) ao anel C na posição 3 (Figura 1). Possui nomenclatura IUPAC (2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol e fórmula química $C_{15}H_{14}O_6$.

Figura 1 – Estrutura química planar da (+)-catequina.



Fonte: (adaptado de Dueñas et al., 2010, p. 444).

Este composto polifenólico natural é encontrado no chá verde (*Camellia sinensis*), vinho, cacau, damasco, morango e também em bebidas contendo *Paullinia cupana* (guaraná) (DALLUGE; NELSON, 2000; GOYA et al., 2016; IFEANACHO; IKEWUCHI; IKEWUCHI, 2016, SINGH et al., 2016; TAO et al., 2016). É conhecido por ser um potente eliminador de espécies reativas (DUEÑAS et al., 2010). Chennasamudram e colaboradores (2010) mostraram que a CAT possui propriedades renoprotetoras comparáveis ao enalapril no modelo de *Diabetes mellitus* induzido por estreptozotocina em ratos. O enalapril, cujo mecanismo de ação é a inibição da enzima conversora da angiotensina (iECA), é a principal estratégia terapêutica para tratar a nefropatia diabética (complicação da Diabetes mellitus), contudo é teratogênico. Também foi relatado que a CAT pode atuar como agente protetor na prevenção do envelhecimento cutâneo pois preveniu a morte celular induzida por H₂O₂ em cultura de células de fibroblastos. A inibição da fosforilação das proteínas quinases JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinases*) e p38 (do inglês, *p38 mitogen-activated protein kinases*) pela CAT foi observada e pode ter influenciado na proteção celular contra o envelhecimento (TANIGAWA et al., 2014). Estes efeitos são exemplos de que, cientificamente, este composto apresenta efeitos promissores na prevenção e tratamento de determinadas condições patológicas através da regulação das alterações na maquinaria celular geradas pelo estresse oxidativo.

Infelizmente, o conhecimento sobre todo o processo etiológico de muitas doenças psiquiátricas, motoras e neurodegenerativas ainda é insuficiente, contudo, acredita-se que elas são manifestações clínicas geradas por alterações na transmissão neuronal. Um estudo *in vitro* demonstrou que a CAT é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (FARIA et al., 2011). Wu e colaboradores (2012) observaram que este fenômeno se reproduziu *in vivo* após mensurarem a quantidade de CAT presente no sangue e no hipocampo de ratos, através de um método de microdiálise, depois da administração de 20 mg/kg de peso corporal de CAT via veia femoral. A capacidade de ultrapassar a BHE indica a possibilidade da CAT alcançar o SNC e desempenhar sua ação benéfica ou não (WU et al., 2012). Além disso, parâmetros farmacocinéticos referentes à CAT ainda são escassos. Um estudo farmacocinético de fase I indica que outros flavanóis presentes no chá verde (*Camellia sinensis*), epigallocatequina-3-galato (ECGC) por exemplo, possuem baixa biodisponibilidade após administração oral única (CHOW et al., 2001). Dube, Nicolazzo e Larson (2010) demonstraram que o encapsulamento com nanopartículas de quitosano, um polímero não-tóxico e biodegradável, aumenta significativamente a absorção intestinal *in vitro* da CAT. Ademais, a CAT sofre metabolismo hepático, cujas biotransformações formam diferentes metabólitos conjugados. Exemplos de metabólitos formados são os derivados metilados (em específico 3-O-metil-catequina e 4-O-metil-catequina), nos quais a propriedade antioxidante em pH 7,4 conserva-se, embora em menor intensidade (DUEÑAS et al., 2010). Contudo, metabólitos conjugados geralmente são mais hidrossolúveis que os compostos de origem e ainda não se sabe se os mesmos são capazes de atravessar a BHE e exercer atividade biológica (CHOW et al., 2001).

Na literatura há evidências de que a CAT realmente possui uma promissora atividade protetora do sistema neuronal. Em uma linhagem celular de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, a CAT reduziu a toxicidade e a geração de EROs induzidas por MPP⁺ (íon 1-metil-4-fenilpiridínio), um potente inibidor do complexo I da cadeia respiratória (RUAN et al., 2011). Já em estudos *in vivo*, Ahmed e colaboradores (2013) evidenciaram a prevenção da perda de memória em modelo de demência do tipo-Alzheimer induzida por estreptozotocina em ratos, através de mecanismos de redução de estresse oxidativo. Além disso, Teixeira e colaboradores (2013) demonstraram o potencial neuroprotetor da CAT

sobre o déficit de memória e locomotor induzidos por 6-hidroxidopamina (6-OHDA), sugerindo que seu efeito benéfico pode estar relacionado com a regulação das disfunções mitocondriais e alterações no estado redox celular.

Outros mecanismos também são associados aos seus efeitos na transmissão neuronal. A inflamação dos neurônios está presente em algumas doenças neurodegenerativas, e a ativação da micróglia é um fator ímpar no desencadeamento deste processo. Há relatos de que o pré-tratamento com CAT é capaz de atenuar as respostas inflamatórias microgлияis em linhagem celular microgлияl BV-2 estimuladas por lipopolissacarídeos (LPS), através da modulação da produção de mediadores pró-inflamatórios e citotóxicos, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-4 (IL-4). Também, é capaz de atenuar a produção de óxido nítrico e EROs na micróglia possivelmente via regulação negativa da fosforilação de proteínas de sinalização ERK1/2 (do inglês *extracellular signal-regulated kinases*) e p38 (HUSSEIN; KAMARUDIN; KADIR, 2015). Ademais, a inibição da atividade da MAO-B em homogeneizado de cérebro de ratos pela CAT foi reportada por Hou e colaboradores (2005). Neste experimento, CAT na concentração de 41,4 μ M atua como um inibidor do tipo misto, apresentando valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da quantidade total de enzima) de 88,6 μ M e K_i (constante de equilíbrio) de 74 μ M. No entanto, este estudo não avaliou se a ligação da CAT à MAO é do tipo reversível ou irreversível. Além disso, não se sabe se a CAT poderia exercer ação inibitória sobre a MAO *in vivo*.

3 JUSTIFICATIVA

Considerando todos os apontamentos mencionados anteriormente, é fato que a DT é um efeito adverso extrapiramidal decorrente do uso prolongado de bloqueadores dopaminérgicos de extrema preocupação. Infelizmente, sua fenomenologia reduz drasticamente a qualidade de vida dos pacientes. O pouco esclarecimento sobre a fisiopatologia da DT traz em voga questionamentos sobre quais mecanismos estão relacionados com a sua manifestação. Há evidências científicas de que mais de uma alteração neuronal estão envolvidas com tais movimentos anormais. Apesar disto, acredita-se que o estresse oxidativo gerado pelo aumento da atividade da MAO decorrente da metabolização do excesso de dopamina na via nigroestriatal, consiste em um importante fenômeno causal de danos celulares que levam à DT. Neste contexto, inibidores da MAO e/ou compostos antioxidantes são potenciais agentes neuroprotetores sobre a DT e sobre outras neuropatologias cujas bases fisiopatológicas também estão associadas com estresse oxidativo. Conhecida por sua propriedade antioxidante, a CAT é um forte candidato à agente terapêutico. Além disso, estudos *in vitro* mostram que ela também é capaz de inibir a atividade catalítica da MAO. Portanto, é válido avaliar o efeito da CAT sobre a DO em animais a fim de diminuir a carência de informações sobre alterações neuronais envolvidas com a DT bem como a influência deste composto natural como agente terapêutico. Se benéfica experimentalmente, o uso da CAT na terapêutica pode ser proposto com o intuito de fomentar o desenvolvimento de estratégias farmacológicas, preventivas ou de tratamento, eficazes que possam oferecer melhores condições de bem estar aos pacientes acometidos pela DT.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da CAT sobre a atividade da MAO e sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas por reserpina em camundongos.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da CAT sobre a atividade da MAO *in vitro* e, se houver alterações, determinar se a ligação é passível de reversibilidade;
- Investigar o efeito da CAT sobre os movimentos de mascar no vazio induzidos por reserpina em camundongos;
- Avaliar o efeito da CAT sobre as alterações nas atividades locomotora e exploratória induzidas por reserpina em camundongos;
- Investigar a ação da CAT sobre a atividade da MAO *ex vivo* após exposição à reserpina.

5 RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, o qual se encontra aqui organizado. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio manuscrito. O próprio **manuscrito** está disposto na forma como será submetido para publicação na revista **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**.

MANUSCRITO**EFFECTS OF CATECHIN ON RESERPINE-INDUCED VACUOUS CHEWING MOVEMENTS: ANALYSIS OF *IN VITRO* AND *EX VIVO* MAO ACTIVITY**

Jeane Binotto Reinheimer^a, Catiúscia Molz de Freitas^a, Janaína Paola Schwertz^c, Bárbara Nunes Krum^b, Getúlio Nicola Bressan^a, Ana Paula Chiapinotto Ceretta^b, Roselei Fachinetto^{a,b}.

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^cCurso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author:

Dr^a Roselei Fachinetto

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

Tel.: +55-55-3220 8096; fax: +55-55-3220 8241

E-mail: roseleirf@gmail.com

ABSTRACT

Tardive dyskinesia (TD) is characterized by involuntary, abnormal and repetitive movements that compromise the quality of life of patients chronically using antipsychotics. Its pathophysiology is not fully elucidated but has been associated to alterations in oxidative metabolism of dopamine by monoaminoxidase (MAO) in the nigrostriatal pathway. The aim of this study was to evaluate the effect of (+)-catechin, a polyphenolic compound with antioxidant properties, on orofacial dyskinesia (OD) induced by reserpine in mice, and the possible involvement of MAO. *In vitro*, catechin

inhibited the activity of both MAO isoforms at concentrations of 0.34 and 1.03 mM in a manner reversible for MAO-A and partially reversible for MAO-B. To evaluate the effects of catechin on reserpine-induced OD, male Swiss mice were treated daily for 4 days with reserpine (1 mg/kg, s.c.) or its vehicle. After, catechin (10, 50 or 100 mg/kg, i.p.) or its vehicle were given for another 20 days. On the 6th, 8th, 15th and 26th day of the experimental period, vacuous chewing movements (VCMs), locomotor and exploratory activities were quantified. Reserpine increased the VCMs and decreased the locomotor and exploratory activities. Catechin decreased the number of VCMs only after second administration of a dose of 10 mg/kg in the 6th day of experimental period in the group pre-treated with reserpine without altering any other behavioral parameter. Any alteration was observed to MAO activity in the striatum and substantia nigra of mice treated either with reserpine or catechin. In conclusion, catechin proved to be effective in reversibly inhibiting *in vitro* MAO-A activity, however this was not reproduced *in vivo*. In addition, catechin has an interesting effect as it has been able to attenuate reserpine-induced VCMs in at least one of the doses tested, although this effect has been lost throughout the treatment. Concerning the alterations in locomotor and exploratory parameters induced by reserpine, catechin was not effective in attenuating them. Further studies are needed to elucidate the influence of catechin on TD treatment and also on neurodegenerative diseases and mood disorders.

Key words: Tardive dyskinesia. Vacuous chewing movements. Oxidative stress. Flavanol. Antioxidant. Monoaminoxidase.

1. Introduction

Tardive dyskinesia (TD) is a delayed-onset involuntary movement disorder associated with chronic antagonism of dopaminergic (D₂R) receptors in the central nervous system (Adelufosi et al., 2015; Shireen, 2016). In the clinic, about 30 to 50% of psychiatric patients on continuous antipsychotic treatment develop TD (Clark and Ram, 2016). In addition to typical and atypical antipsychotic drugs, other therapeutic agents, such as metoclopramide, are also associated with the development of this side-effect (Aia et al., 2011; Meyer, 2016). According to the Diagnostic and Statistical Manual of Mental

Disorders (DSM-5), TD is characterized by abnormal repetitive movements, generally involving the tongue, lower face and jaw, and extremities. Its pathogenesis is still not fully understood, however, the most prominent hypotheses is that TD results from D₂ receptor upregulation with postsynaptic dopamine receptor supersensitivity, particularly in the nigrostriatal pathway. A hypothesis that has been highlighted in the literature is the occurrence of oxidative stress due to metabolism of dopamine either by auto oxidation or enzymatic oxidation by monoaminoxidase (MAO) [E.C. 1.4.3.4] (Cornett et al., 2017; Rana, 2013). The catalysis of dopamine by MAO generates metabolites such as homovanillic acid (HVA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide (H₂O₂) (Ebinger et al., 1987). The excessive production of H₂O₂ is correlated with oxidative stress that can lead to toxicity and cell death (Edmondson and Binda, 2018). In this scenario, MAO inhibitors have been suggested to be potential neuroprotective agents in some neurological diseases such as against Parkinson's and Alzheimer's besides depression and anxiety disorders (Tripathi, 2018). Considering both hypothesis, it is a consensus that alterations in the dopaminergic system, particularly in the nigrostriatal pathway, are implicated in the development of TD. Recently, the US Food and Drug Administration (FDA) approved the use of Valbenazine and Deutetrabenazine, selective inhibitors of the vesicular monoamine transporter type 2 (VMAT-2), for the treatment of TD. Although effective, both can cause serious adverse effects, such as cardiac arrhythmia (QT prolongation) and suicidal behavior (Citrome, 2017; Jankovic et al., 2017).

Reserpine-induced orofacial dyskinesia (OD) is one animal model used to investigate the pathophysiology and new pharmacological strategies for the treatment of TD (Abílio et al., 2003; Cunha et al., 2016; Neisewander et al., 1994, Queiroz and Frussa-Filho, 1999; Teixeira et al., 2009; Wang et al., 2015). Reserpine is an irreversible and nonspecific inhibitor of the vesicular monoamine transporter (VMAT), whose function is to transport monoamines into the presynaptic storage vesicles that are exocycled in the synaptic cleft (Stitzel, 1976; Yaffe et al., 2016).

Many plant-derived compounds are studied over several diseases because of their potentially beneficial health properties. The (+)-catechin is a polyphenolic compound, belonging to the class flavanol, found in beverage containing *Paullinia cupana*, wines, cocoa, apricots, strawberries and green tea (*Camellia sinensis*) (Dalluge and Nelson, 2000; Goya et al., 2016; Ifeanacho et al., 2016; Singh et al., 2016; Tao et al., 2016). Studies has shown that catechin acts as an antioxidant and that this property is beneficial

over some pathological conditions (Chennasamudram et al., 2012; Fukuhara et al., 2009; Goya et al., 2016; Mangels and Mohler, 2017). In addition, there are reports of its potential neuroprotective activity by antioxidant mechanisms (Ahmed et al., 2013; Júnior et al., 2003; Singal et al., 2005; Ruan et al., 2011) since it is able to cross the blood-brain barrier in *in vitro* and *ex vivo* studies (Faria et al., 2011; Wu et al., 2012). *In vitro*, catechin is able to MAO (Mazzio et al., 1998), that catalyze the oxidation of monoamines including dopamine and serotonin (Tripathi et al., 2018). This effect has been shown to be promising in the treatment of psychiatric and neurodegenerative disorders such as depression, Parkinson's and Alzheimer's disease (Hou et al., 2005; Mazzio et al., 1998). Furthermore, Teixeira et al. (2013) have suggested that catechin may be useful as adjunctive treatment for Parkinson's disease since it has been effective in protecting the 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal death in rats via antioxidant mechanisms. However, there are neither studies investigating the effects of catechin in a model of abnormal movements induced by reserpine nor if its effects are mediated by alteration in MAO activity.

Thus, the aims of this study were to evaluate: 1) *in vitro* if catechin inhibits the MAO activity in a reversible way; 2) the effect of catechin on reserpine-induced abnormal movements in mice and if catechin acts via alteration in MAO in mice activity.

2. Materials and Methods

2.1 Reagents and drugs

Reserpine, (+)-catechin hydrate, pargyline, clorgiline, kynuramine were purchased from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). All other reagents were of analytical grade of our laboratory which were obtained from companies that certifies purity and quality.

2.2 Animals

Male Swiss mice with 2 months of age (weighing 25-35 g) were kept in polycarbonate cages in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) and 12h light/dark cycle (lights on at 7 a.m.). Food and water were provided *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA). This protocol was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) under the protocol number CEUA 4990290416/2016.

2.3 *In vitro* assays

For the *in vitro* analyzes, it were used brain samples of control mice that left over from other experimental protocols of our laboratory that had been stored at -80°C until the use.

2.3.1 Determination of catechin effects on MAO activity *in vitro*

The activity of the monoaminoxidase (MAO) was determined based on the methodology previously described (Matsumoto et al., 1985; Villarinho et al., 2012 and De Oliveira et al., 2015). Briefly, the tissue was homogenized in assay buffer (16.8 mM Na₂HPO₄, 10.6 mM KH₂PO₄, 3.6 mM KCl, pH 7.4). Assays were performed in duplicate containing 0.25 mg of protein. Catechin was tested at concentrations of 0.03, 0.1, 0.34 or 1.03 mM. The activities of A and B isoforms were isolated pharmacologically by using 250 nM of pargyline (selective MAO-B inhibitor) or clorgiline (selective MAO-A inhibitor) and the reaction was incubated for 20 min at 37 °C. Then, 60 µM kynuramine was added (non-selective enzyme substrate) and the reaction mixture was incubated for a further 30 min at 37 °C. The reaction was stopped with 10% trichloroacetic acid (TCA). The samples were centrifuged at 1000g for 8 minutes at 4°C and the supernatant was mixed with 1N NaOH. The final mixture was measured by a fluorimetric method at 315 nm for excitation and 380 nm for emission. The determination of MAO activity was performed by quantifying the oxidation of kynuramine to 4-hydroxyquinoline (4-HQ). Results were expressed in nmol of 4-HQ per milligram of protein per minute. The IC₅₀ values for both MAO isoforms were determined.

2.3.2 MAO inhibition reversibility assay

Based on the methodology previously described by Harfenist et al. (1996) and Villarinho et al. (2012), the reversibility of MAO inhibition was studied by a dialysis method. Summary, homogenized brain, assay buffer with or without catechin (0.34 or 1.03 mM) and the mixtures were adjusted to contain 0.25 mg of protein measured by the Lowry method. Then the blends were dialyzed for 24h at 25 °C with outer buffer (16.8 mM Na₂HPO₄, 10.6 mM KH₂PO₄, 3.6 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, pH 7.4). For each 1 mL of dialyzed mixture, 40 mL of outer buffer was used. The outer buffer was changed 1, 2, 4 and 6h after dialysis started. Non-dialysed samples were maintained under the same assay conditions. Twenty-four hours after the start of dialysis, dialyzed and nondialyzed

mixtures were simultaneously assayed for MAO-A or MAO-B activity in order to evaluate the reversibility of the inhibition produced by catechin as described above.

2.4 *In vivo* experiments

2.4.1 Experimental design and treatment

Initially, the mice were randomly divided into two groups (n = 40 each): control group (C-C) and reserpine group (R-C). Thus, it was performed a basal behavior to avoid including in the experiment, animals that have high values of spontaneous vacuous chewing movement (VCMs). Only 6 animals were excluded from the experiment because of the altered basal behavior and one animal from the C-100 group died throughout the treatment. Reserpine was dissolved in glacial acetic acid and diluted in 0.9% NaCl (final concentration of acetic acid was 0.2%). Catechin was dissolved in 0.9% NaCl. The injections were given in a volume of 10 mL/kg body weight by the subcutaneous (s.c., reserpine) and intraperitoneal (i.p., catechin) route. The animals R-C and C-C received reserpine 1 mg/kg or vehicle of reserpine (0.9% NaCl 0.2% glacial acetic acid), respectively, daily for 4 days. Twenty-four hours after the last administration of reserpine, the behavioral tests were performed to verify the effects of reserpine. It was quantified the vacuous chewing movement (VCM) and locomotor and exploratory activities (day 6 according to experimental design, Fig. 1). After, each group of mice (C-C and R-C) was randomly subdivided into four experimental groups: vehicle (C-C, control group), catechin 10 mg/kg (C-10), catechin 50 mg/kg (C-50), catechin 100 mg/kg (C-100), reserpine (R-C), reserpine plus catechin 10 mg/kg (R-10), reserpine plus catechin 50 mg/kg (R-50), and reserpine plus catechin 100 mg/kg (R-100). Afterward, the animals received intraperitoneally (i.p.) during 20 days catechin 10 mg/kg in the groups C-10 and R-10; catechin 50 mg/kg in C-50 and R-50; and catechin 100 mg/kg in C-100 and R-100. The animals of the C-C and R-C groups received catechin vehicle (0.9% NaCl). The doses of (+)-catechin were chosen based on the studies of Singal et al. (2005) and Teixeira et al. (2013) where the target of pharmacological effects of (+)-catechin was the central nervous system. The administration of catechin or its vehicle started on day 6 of the experimental protocol. To evaluate the effects of (+)-catechin, the behavioral parameters were quantified on days 8, 15 and 26 according to the experimental design (Fig. 1). Then, the animals were anesthetized with ketamine:xylazine (100:10 mg/kg), and euthanized by cervical dislocation. The brain was removed and the striatum and the region containing

the substantia nigra were immediately separated and stored at -80°C until the analyze of *ex vivo* MAO-A and MAO-B activities.

2.4.2 Behavioral testing

The animals were housed and acclimated to the experimental room for at least 1 hour prior to testing. All tests were conducted between 7:00 and 11:00 a.m. All the observers were blind to the pharmacological conditions.

2.4.2.1 Quantification of the vacuous chewing movements (VCMs)

The mice were placed individually in a glass cage (20cm x 20cm x 19cm) that contained a mirror under the floor to allow better visualization for behavioral analysis. After 6 minutes of adaptation the number of VCMs were quantified continuously for 6 minutes (Fachinetto et al., 2007; De Freitas et al., 2016). VCMs were defined as single mouth openings in the vertical plane not directed towards physical object and movements that occurred during the grooming period were not taken into account.

2.4.2.2 Quantification of the locomotor and exploratory activities

The locomotor and exploratory activities were evaluated through the open field test (Broadhurst, 1960). Mice were placed individually in the center of an open field arena (44cm x 44cm x 44cm) divided into 9 equal squares. Crossing and rearing were measured in a 5 min session with no adaptation period (Busanello et al., 2011). The locomotor activity (crossing) was defined as the total number of lines crossed with four paws within of arena. The exploratory activity (rearing) was determined by the total number of raised (stand-up position where only the two hind legs of the animal are in contact with the floor of the arena).

2.4.3 *Ex vivo* assays

2.4.3.1 Determination of MAO activity

The activity of the MAO *ex vivo* was determined based on the methodology previously described (Matsumoto et al., 1985; Busanello et al., 2017 and De Freitas et al., 2016) with minor modification. To the striatum and region containing the substantia nigra, it was used 0.2 mg and 0.25 mg of protein, respectively. The activity of the MAO was determined by the quantification of the oxidation of kinuramine to 4-hydroxyquinoline (4-HQ). Results were expressed in nmol of 4-HQ per milligram of protein per minute.

2.5 Statistical analysis

Data from *in vitro* MAO activity were analyzed by one-way analyses of variance (ANOVA) followed Tukey's multiple comparisons test. Data from of the VCMs and open-field behaviors of the day 6 were analyzed by unpaired t-test. Data from number of VCMs, open-field behaviors of the days 8, 15, 26 and *ex vivo* MAO activity were analyzed by one-way analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons test. All values are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences were considered statistically significant with $p < 0.05$.

3. Results

Catechin inhibits the MAO-A and MAO-B activities with a reversible profile *in vitro*

Catechin 0.34 and 1.03 mM inhibited MAO-A ($F(4,10)=44.15$ and $p < 0.05$) and MAO-B ($F(4,10)=12.08$ and $p < 0.05$), both in a concentration-dependent manner since the concentration of 1.03 mM was significantly lower than that of 0.34 mM (Figure 2a and 2b).

We also evaluated if the inhibition of both MAO isoforms induced by catechin is reversible or not using dialysis method to remove the catechin from the incubation mixture. Catechin inhibited MAO-A ($F(2,6)=39.89$ and $p < 0.05$; Figure 3a) and MAO-B ($F(2,6)=14.08$ and $p < 0.05$; Fig. 3b) activities in nondialyzed mixture compared with its control. After 24 hours of dialysis, the inhibition was reversed about 100% (in both tested concentrations) to MAO-A while to MAO-B was 12.32% (0.34 mM) and 36% (1.03 mM) when compared to the activity of their respective non-dialysed controls. These results suggest the inhibition of MAO-A by catechin is reversible (Figure 3a) while the inhibition of MAO-B is partially reversible (Figure 3b) depending of the tested concentration.

Catechin decreases the VCMs induced by reserpine depending on the dose and time of treatment

Animals treated with reserpine for 4 days showed a significant increase in VCMs ($p < 0.0001$, Figure 4b) when compared to the control group. One-way ANOVA showed that this effect persisted on days 8 ($F(7,65) = 7.373$, $p < 0.0001$), 15 ($F(7,65) = 15.89$, $p < 0.0001$) and 26 ($F(7,65) = 10.57$, $p < 0.0001$) (Figures 4c, 4d and 4e) of experimental procedure, corresponding to 2, 9 and 20 days after reserpine withdrawal, respectively. Catechin at dose of 10 mg/kg was able to decrease reserpine-induced VCMs on day 8

(Figure 4c), but this effect was not observed on days 15 and 26 (Figures 4d and e). Catechin at doses of 50 and 100 mg/kg did not significantly alter the number of VCMs induced by reserpine in anyone of the days evaluated (Figures 4c, d and e).

Catechin does not modify the effects of reserpine on open-field test

The animals treated with reserpine decreased significantly the number of crossings ($p < 0.0001$) (Figure 5a) when compared to the control group on day 6. One-way ANOVA revealed that the decrease in crossings persisted on days 8 ($F(7,65) = 11.97$, $p < 0.0001$; Figure 5b), 15 ($F(7,65) = 11.55$, $p < 0.0001$; Figure 5c) and 26 ($F(7,65) = 14.01$, $p < 0.0001$; Figure 5d). Any of the catechin doses tested was able to recover the locomotor activity represented by the number of crossings in the open field.

Similarly, the animals treated with reserpine decreased significantly the number of rearings ($p < 0.0001$) (Figure 6a) when compared to the control group on day 6. One-way ANOVA revealed that the decrease in rearings persisted on days 8 ($F(7,65) = 8.828$, $p < 0.0001$; Figure 6b), 15 ($F(7,65) = 12.85$, $p < 0.0001$; Figure 6c) and 26 ($F(7,65) = 16.08$, $p < 0.0001$; Figure 6d). Any of the catechin doses tested was able to recover the exploratory activity represented by the number of rearings in the open field.

Catechin and/or reserpine did not alter the MAO activity in the striatum and in the region containing the substantia nigra of mice

The treatment with reserpine and/or catechin did not significantly alter the MAO-A and MAO-B activities in the striatum nor in the region containing the substance nigra ($p > 0.05$; Figure 7a - d).

4. Discussion

We observed in this study that, *in vitro*, catechin inhibited the activity of MAO-A in a reversible manner while it was partially reversible to MAO-B. In the OD model, catechin was able to reduce reserpine-induced VCMs only at the dose of 10 mg/kg on day 6 and, this effect was lost throughout the treatment. Regarding the behavioral changes induced by reserpine in the open field test, catechin was not effective in restoring such parameters. Furthermore, in the *ex vivo* analyzes, neither catechin nor reserpine altered the activity of both MAO isoforms in the striatum nor in the region containing the substantia nigra.

Reserpine is a widely used OD model by significantly increase the frequency of VCMs in rodents and has been used in studies that intent to understand motor-facial disorders as well as possible strategies of treatment (Burger et al., 2004; Castro et al., 2006; Patil et al. 2012, Reckziegel et al., 2013; Teixeira et al., 2008). However, there is conflicting opinions among researchers if this model represents the symptoms of TD or Parkinsonian tremors observed in the progression of Parkinson's disease. Despite this, there are studies demonstrating, in animals, reserpine is efficient as well as the antipsychotics in producing behavioral changes related to the motor disorders observed in the TD (Carvalho et al., 2003; Silva et al., 2002; Abílio et al., 2003; Cunha et al., 2016; Neisewander et al., 1994, Queiroz and Frussa-Filho, 1999; Teixeira et al., 2009; Wang et al., 2015).

The present study showed that reserpine induced a significant increase in the frequency of VCMs in mice and this response persisted for at least 20 days. This result corroborates the data found in the literature where the response generated by reserpine is maintained even after 20 of its withdrawal (De Freitas et al., 2016; Neisewander et al., 1991; Sussman et al., 1997). Reserpine irreversibly inhibits VMAT and drastically reduces levels of monoamines in the brain as well as its stockage (Neisewander et al., 1994) leaving the monoamines in the cytosol which in turn favors their oxidation either by autoxidation or enzymatically by MAO. In this way, the generation of ROS is increased, whose neutralization by the endogenous defense system can be compromised leading to oxidative stress and neuronal damage. In this scenario, antioxidant compounds with potential to decrease the MAO activity become strong candidates for neuroprotective agents.

There are few studies investigating the effect of catechin on *in vitro* MAO activity. Of our knowledge, only one study demonstrated that, *in vitro*, catechin isolated from *Uncaria rhynchophylla* inhibited the activity of MAO-B in rat brain with an IC₅₀ value of 88.6 μ M (or 25.7 μ g/ml) (Hou et al., 2005). However, they did not investigate if this inhibition was reversible. Our results reveal that in mouse brain homogenate, catechin, at concentrations of 0.34 and 1.03 mM, inhibited the activity of both MAO isoforms. In addition, the inhibition of MAO-A has a reversible profile for both concentrations, since the enzymatic activity was restored when the samples were submitted to dialysis. Already for the inhibition of MAO-B, it is suggested that the dialysis partially disconnected the binding of the catechin to the enzyme.

Then, we subsequently tested the effect of catechin on reserpine-induced abnormal movements in mice and if catechin acts via alteration in MAO in mice activity. Reserpine increased the VCMs after four days of treatment and this effect was maintained throughout the experimental period. Interestingly, only two administrations of 10 mg/kg catechin reduced reserpine-induced VCMs, however, this response was not maintained increasing the number of days for catechin exposure. The other tested doses were not effective in this model. In the literature there are still no studies investigating the influence of catechin on VCMs. However, the administration of catechin at doses of 10 and 30 mg/kg for 2 weeks has been reported to attenuate the increase in contralateral rotations and work memory deficits induced by intrastriatal 6-OHDA in rats. These positive effects are associated with reduced changes in mesencephalic levels of dopamine and noradrenaline and also reduced glutathione (GSH). In addition, catechin also significantly attenuated the loss of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the striatum (Teixeira et al., 2013). Furthermore, another flavanol, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), has been shown to protect against behavioral and biochemical changes induced by reserpine. In this study, Wang et al. (2015) showed that in rats treated with 1 mg/kg reserpine there is an increase in the number of VCMs and a decrease in endogenous antioxidant enzymes and that pretreatment with 30 and 100 mg/kg EGCG attenuates dose-dependent but does not block, the increase of VCMs and increases the levels of superoxide dismutase (SOD), catalase and GSH. Thus, 10 mg/mL catechin was effective in attenuating VCMs in an acute way, however with the passage of treatment the plasma concentration of the catechin in the mice may have remained high with the overlap of the following doses, setting in the loss of the promising antioxidant effect. Therefore, we thought that catechin could be a pro-oxidant compound in this condition and failed to improve OD.

In the open field test, reserpine induced a reduction in crossing and rearing, indicating a loss in exploratory capacity and locomotion. These alterations have already been correlated as a causal factor in the increase in the manifestation of VCMs in animals (Faria et al., 2005). However, studies have shown that some antioxidant compounds are able to improve the OD without modifying the neurotoxic-induced changes in locomotion, suggesting that both behavioral changes do not have a common developmental pathway (Faria et al., 2005; Busanello et al., 2011; 2012; 2017). It is known that the neurotoxicity of reserpine is involved with oxidative stress (Burger et al., 2004; Chen et al., 2016; Nade et al., 2013). Cytoplasmic accumulation of monoamines caused by reserpine storage impedance may lead to overproduction of ROS and other reactive metabolites due to the

degradation of these neurotransmitters (Mishran and Sasmal, 2012). The MAO is responsible for much of this catalysis through oxidative deamination. The main ROS produced by these reactions is hydrogen peroxide (H_2O_2) which has a cytotoxic character (Tripathi et al., 2018). This enzyme is widely distributed in the central nervous system, located in the mitochondrial membrane and in the synaptic cleft, and is also found in the liver and platelets. It has two distinct isoforms, MAO-A and MAO-B, which have specific substrates. MAO-A participates more actively in the degradation of serotonin and noradrenaline; and MAO-B benzylamine and 2-phenylethylamine. Dopamine is degraded by both isoforms (Finberg, 2014). Furthermore, it is known that the basal ganglia which is directly involved in the development of TD is a brain area with high concentrations of metal transitions which could favors the oxidative changes (Mullin et al., 2015; Salem et al., 2017). In this context, as catechin inhibited the MAO *in vitro*, it could alter the activity of this enzyme *in vivo* and, consequently, decreasing the oxidative reactions leading to an improvement in motor changes caused by reserpine. However, we did not detect any change in *ex vivo* activity of MAO-A and MAO-B in striatum or substantia nigra neither when catechin was given to animals previously treated with reserpine nor in a per se effect in those animals previously treated with reserpine vehicle. An explanation to this fact is the real concentration that catechin reaches the central nervous system that could be low to cause significant alterations in MAO activity since the concentrations needed to inhibit the MAO *in vitro* were high. It may also be that the dose of 10 mg/kg catechin has decreased VCMs by direct acting as a ROS chelator. Thus, the antioxidant action of catechin was obtained without altering the MAO activity. We cannot exclude the possibility of an effect on other experimental desing with other doses of catechin and different time of treatment.

Therefore, catechin was not effective in attenuating the behavioral changes observed in the open field throughout the treatment. Interestingly, only two administrations of 10 mg/kg of catechin were effective in attenuating the increase of VCMs, although this effect was lost throughout the experimental protocol. In addition, catechin had no effect on MAO activity *in vivo*. However, it has been shown to have a potential neuroprotective action *in vitro* through the reversible inhibition of MAO. This action should be further investigated in order to clarify its impact on the treatment of TD and also on neurodegenerative diseases and mood disorders.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the FAPERGS and CNPq. We also acknowledge fellowships from CNPq (R.F.) and CAPES (J.B.B., C.M.F, J.P.S., B.N.K., G.N.B. and A.P.C.C.).

References

- Abílio, V.C. et al., 2003. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 27, 109–114.
- Adelufosi, A.O. et al., 2015. Pyridoxal 5 phosphate for neuroleptic-induced tardive dyskinesia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 4, 1–37.
- Ahmed, Md. E. et al., 2013. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. *Neurochemistry International*. 62, 492–501.
- Aia, P.G. et al., 2011. Tardive Dyskinesia. *Current Treatment Options in Neurology*. 13, 231–241.
- Blanchet, P.J. et al., 2012. Relevance of animal models to human tardive dyskinesia. *Behavioral and Brain Functions*. 8, 12 pages.
- Burger, M. et al., 2004. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. *Brain Research Bulletin*. 64, 339–345.
- Broadhurst, P.L., 1960. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. *Fortschritte der Psychosomatischen Medizin*. 1, 63–69.
- Busanello, A. et al. 2011. Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. *Behavioural Pharmacology*. 22 (1), 71-75.
- Busanello, A. et al., 2012. Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 101, 307–310.
- Busanello, A. et al., 2017. Resveratrol protects against vacuous chewing movements induced by chronic treatment with fluphenazine. *Neurochemical Research*. 42 (11), 3033–3040.
- Carvalho, R.C. et al., 2003. Antidyskinetic effects of risperidone on animal models of tardive dyskinesia in mice. *Brain Research Bulletin*. 60, 115–124.

- Castro, J.P.M.V. et al., 2006. Effects of baclofen on reserpine-induced vacuous chewing movements in mice. *Brain Research Bulletin*. 68, 436–441.
- Chen, C. et al., 2016. Nitric oxide pathway activity modulation alters the protective effects of (–)-Epigallocatechin-3-gallate on reserpine-induced impairment in rats. *Behavioural Brain Research*. 305, 198–211.
- Chennasamudram, S.P. et al., 2012. Renoprotective effects of (+)-catechin in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Nutrition Research*. 32, 347–356.
- Citrome, L., 2017. Clinical management of tardive dyskinesia: Five steps to success. *Journal of the Neurological Sciences*. 383, 199–204.
- Clark, G.T., Ram, S., 2016. Orofacial movement disorders. *Oral & Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. 28 (3), 397–407.
- Cornett, E.M. et al., 2017. Medication-induced tardive dyskinesia: A review and update. *Ochsner Journal*. 17 (2), 162–174.
- Cunha, A.S. et al., 2016. Agmatine attenuates reserpine-induced oral dyskinesia in mice: Role of oxidative stress, nitric oxide and glutamate NMDA receptors. *Behavioural Brain Research*. 312, 64–76.
- Dalluge, J.J., Nelson, B.C., 2000. Determination of tea catechins. *Journal of Chromatography A*. 881, 411–424.
- De Freitas, C.M. et al., 2016. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. *Psychopharmacology*. 233, 457–467.
- De Oliveira, D.R. et al., 2015. Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase in vitro. *Industrial Crops and Products*. 70, 347–355.
- Fachinetto, R. et al., 2007. *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: Role of dopamine transporter. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 31, 1478–1486.
- Faria, R.R. et al., 2005. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: Critical role of striatal catalase activity. *Neuropharmacology*. 48, 993–1001.
- Faria, A. et al., 2011. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. *Food & Function*. 2 (1), 39–44.
- Finberg, J.P.M., 2014. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacology & Therapeutics*. 143(2), 133–152.

- Fukuhara, K. et al., 2009. Novel ninhydrin adduct of catechin with potent antioxidative activity. *Tetrahedron Letters*. 50, 6989–6992.
- Goya, L. et al., 2016. Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans. *Nutrients*. 8 (4), 212.
- Harfenist, M. et al., 1996. Selective inhibitors of monoamine oxidase. 3. Structure–activity relationship of tricyclics bearing imidazoline, oxadiazole, or tetrazole groups. *J Med Chem*. 39, 1857–1863.
- Hou, W. et al., 2005. Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. *Journal of Ethnopharmacology*. 100, 216–220.
- Ifeanacho, M. O. et al., 2017. Investigation of the profile of phenolic compounds in the leaves and stems of *Pandiaka heudelotii* using gas chromatography coupled with flame ionization detector. *Food Science & Nutrition*. 5 (3), 646–652.
- Jankovic, J. et al., 2017. Deutetrabenazine in tics associated with Tourette Syndrome. Tremor and other hyperkinetic movements. 6, 422.
- Júnior, H.V.N. et al., 2003. Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 136, 175–180.
- Lowry, O.H. et al., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193 (1), 265–275.
- Mangels, D.R., Mohler, E.R., 2017. Catechins as Potential Mediators of Cardiovascular Health. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 37 (5), 757–763.
- Matsumoto, T. et al., 1985. A sensitive fluorometric assay for serum monoamine oxidase with kynuramine as substrate. *Clinical Biochemistry*. 18, 126–129.
- Mazzio, E.A. et al., 1998. Food constituents attenuate monoamine oxidase activity and peroxide levels in C6 astrocyte cells. *Planta Medica*. 64 (7), 603–606.
- Meyer, J.M., 2016. Forgotten but not gone: new developments in the understanding and treatment of tardive dyskinesia. *CNS Spectrums*. 21, 16–23.
- Mishran, N., Sasmal, D., 2012. Modulations of brain amines and dopaminergic behavior by a novel, reversible and selective MAO-B inhibitor. *Brain Research*. 1470, 45–51.
- Mullin, E.J. et al., 2015. Effect of manganese treatment on the accumulation on biologically relevant metals in rat cochlea and brain by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Biometals*. 28(6), 1009–1016.

- Nade, V.S. et al., 2013. Protective effect of nebivolol on reserpine-induced neurobehavioral and biochemical alterations in rats. *Neurochemistry International*. 63, 316–321.
- Neisewander, J.L., 1991. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. *Brain Research*. 558, 27–35.
- Neisewander, J.L. et al., 1994. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology*. 116, 79–84.
- Patil, R. et al., 2012. Protective effect of leaves of *Murraya koenigii* on reserpine-induced orofacial dyskinesia. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 11 (2), 635–641.
- Queiroz, C.M.T., Frussa-Filho, R., 1999. Effects of buspirone on an animal model of tardive dyskinesia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 23, 1405–1418.
- Rana, A.Q. et al., 2013. New and emerging treatments for symptomatic tardive dyskinesia. *Drug Design, Development and Therapy*. 7, 1329–1340.
- Reckziegel, P. et al., 2013. Gallic acid decreases vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 104, 132–137.
- Ruan, H. et al., 2011. Similar potency of catechin and its enantiomers in alleviating 1-methyl-4-phenylpyridinium ion cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 63, 1169–1174.
- Salem, H. et al., 2017. Antipsychotic-induced Tardive dyskinesia: from biological basis to clinical management. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 17 (9), 883–894.
- Shireen, E., 2016 Experimental treatment of antipsychotic-induced movement disorders. *Journal of Experimental Pharmacology*. 8, 1–10.
- Silva, R.H. et al., 2002. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. *Behavioural Brain Research*. 132, 171–177.
- Singal, A. et al., 2005. Green tea extract and catechin ameliorate chronic fatigue-induced oxidative stress in mice. *Journal of Medicinal Food*. 8 (1), 47–52.
- Singh, J.P. et al., 2016. Composition, bioactive compounds and antioxidant activity of common Indian fruits and vegetables. *Journal of Food Science and Technology*. 53 (11), 4056–4066.
- Sussman, A.N. et al., 1997. Acute reserpine administration elicits long-term spontaneous oral dyskinesia. *European Journal of Pharmacology*. 337, 157–160.

- Tao, W. et al., 2016. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC–MS–MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 131, 140–145.
- Teixeira, A.M. et al., 2008. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: Behavioral and antioxidant evaluations. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 88, 465–472.
- Teixeira, A.M. et al. 2009. Intense exercise potentiates oxidative stress in striatum of reserpine-treated animals. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 92, 231–235.
- Teixeira, M.D.A. et al., 2013. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 110, 1–7.
- Tripathi, A. et al., 2018. Privileged scaffolds as MAO inhibitors: Retrospect and prospects. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 145, 445–497.
- Turrone, P. et al., 2002. The vacuous chewing movement (VCM) model of tardive dyskinesia revisited: is there a relationship to dopamine D2 receptor occupancy?. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 26, 361–380.
- Villarinho, J.G. et al., 2012. Involvement of monoamine oxidase B on models of postoperative and neuropathic pain in mice. *European Journal of Pharmacology*. 690, 107–114.
- Wang, M. et al., 2015. (-)-Epigallocatechin-3-gallate attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 131, 71–76.
- Wu, L. et al., 2012. Pharmacokinetics and blood–brain barrier penetration of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin in rats by microdialysis sampling coupled to high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 9377–9383.

Figures legends

Figure 1. Experimental design. Reserpine (1 mg/kg, s.c.) was administered daily for 4 days. Twenty-four hours after the last administration of reserpine, the animals received catechin (10, 50 or 100 mg/kg, i.p.) once a day for 20 days. The quantification of VCMs and open field test were performed on days 6, 8, 15 and 26. Baseline VCMs were also quantified on day 1. On day 26, the animals were euthanized and the striatum and the region containing the substantia nigra were stored at -80 °C until the determination of MAO activity.

Figure 2. Effect of different concentrations of catechin (0.03, 0.1, 0.34 and 1.03 mM) on *in vitro* MAO-A (a) and MAO-B (b) activities in brain of mice. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$, compared with control (without catechin); # $p < 0.05$, compared with catechin at 30 $\mu\text{g/mL}$; @ $p < 0.05$, compared with catechin at 0.1 and 0.34 mM. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3, performed in duplicate).

Figure 3. Reversibility of MAO-A (a) and MAO-B (b) inhibition induced by catechin at concentrations of 0.34 and 1.03 mM after 24h of dialysis. Values are mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. * $p < 0.05$, compared to nondialysed control; # $p < 0.05$, compared to nondialysed catechin at 100 $\mu\text{g/mL}$.

Figure 4. Number of VCMs in mice treated with reserpine (1 mg/kg, s.c) and/or catechin (10, 50 and 100 mg/kg, i.p.). (a) baseline – before the treatments (b) twenty-four hours after the fourth administration of reserpine or its vehicle on day 6 of experimental period (n= 35-38) (c) effect of catechin (10, 50 and 100 mg/kg) on reserpine-induced VCMs on days 8 (b), 15 (c) and 26 (d) of the experimental period (n=7-10). Data are expressed as mean \pm SEM. All data were analyzed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. * $p < 0.05$, compared with the C-C group; # $p < 0.05$, compared with the R-C group.

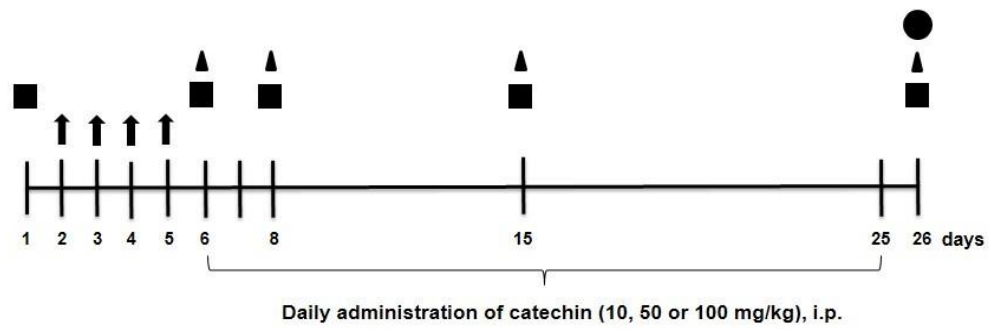
Figure 5. (a) Number of crossing in mice treated with reserpine (1 mg/kg, s.c) or its vehicle on day 6 in the open field test (n= 35-38). Data were analyzed by unpaired t-test. * $p < 0.05$, compared with control group. Effect of catechin (10, 50 and 100 mg/kg, i.p.) on number of crossing on days 8 (b), 15 (c) and 26 (d) of the experimental design (n=7-10). Data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. * $p < 0.05$, compared with the C-C group.

Figure 6. (a) Number of rearing in mice treated with reserpine (1 mg/kg, s.c) on day 5 in the open field test (n= 35-38). Data were analyzed by unpaired t-test. * $p < 0.05$, compared

with control group. Effect of catechin (10, 50 and 100 mg/kg, i.p.) on number of rearing on days 8 (b), 15 (c) and 26 (d) of the experimental design (n=7-10). Data are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test. * $p < 0.05$, compared with the C-C group.

Figure 7. Effect of catechin and/or reserpine on MAO-A (a) and MAO-B (b) activities in the mice striatum (n=9-10); and on the MAO-A (c) and MAO-B (d) activity in the region containing the substantia nigra in mice (n=7-10). Data were analyzed by one-way ANOVA. Data are expressed as mean \pm SEM. Values are expressed in nanomoles of 4-HQ per milligram of protein per minute.

Figure 1



- ↑ = Administration of reserpine 1 mg/kg, s.c.
- = Quantification of VCM
- ▲ = Open field test
- = Biochemical assays

Figure 2

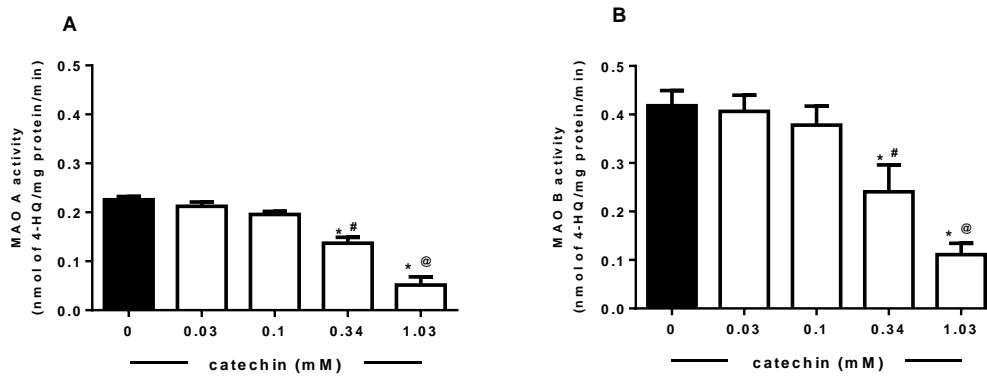


Figure 3

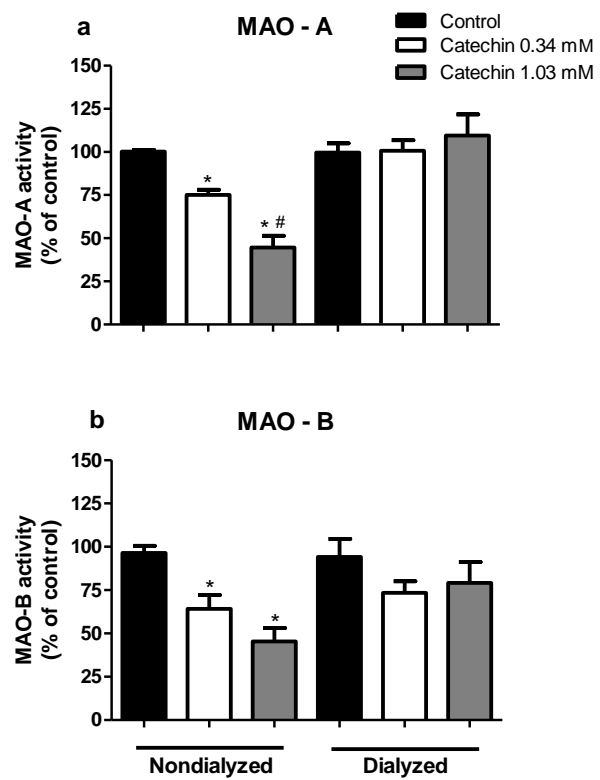


Figure 4

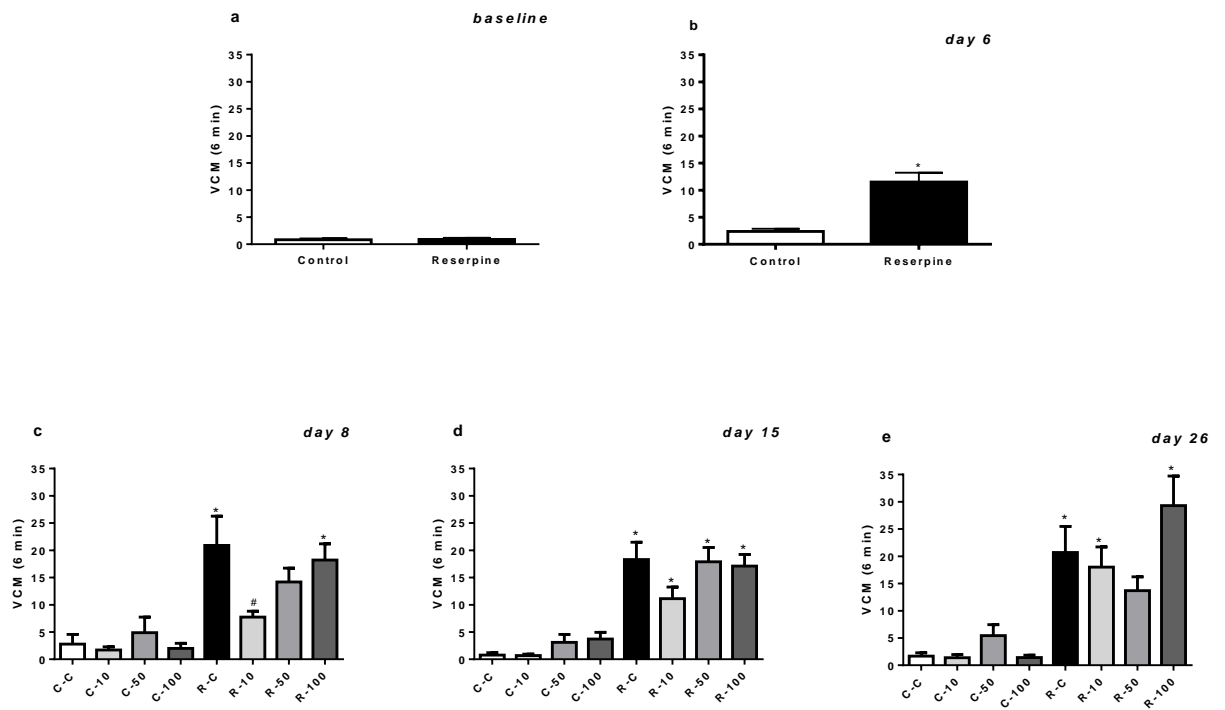


Figure 5

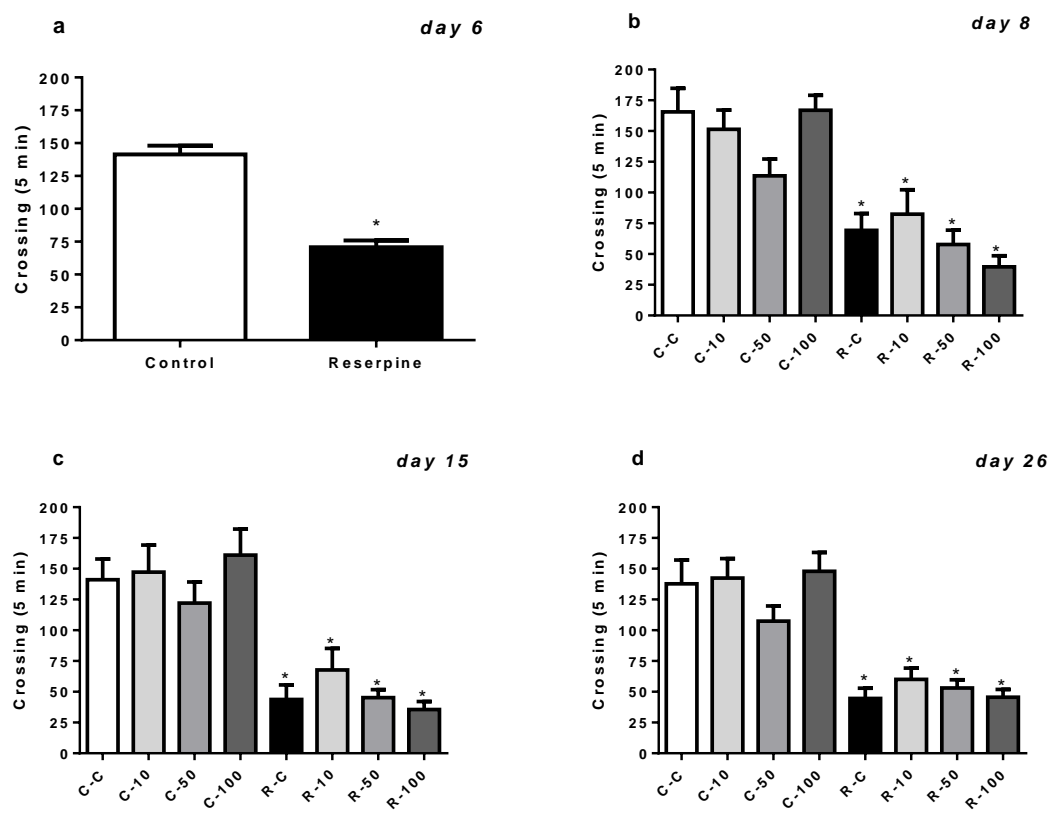


Figure 6

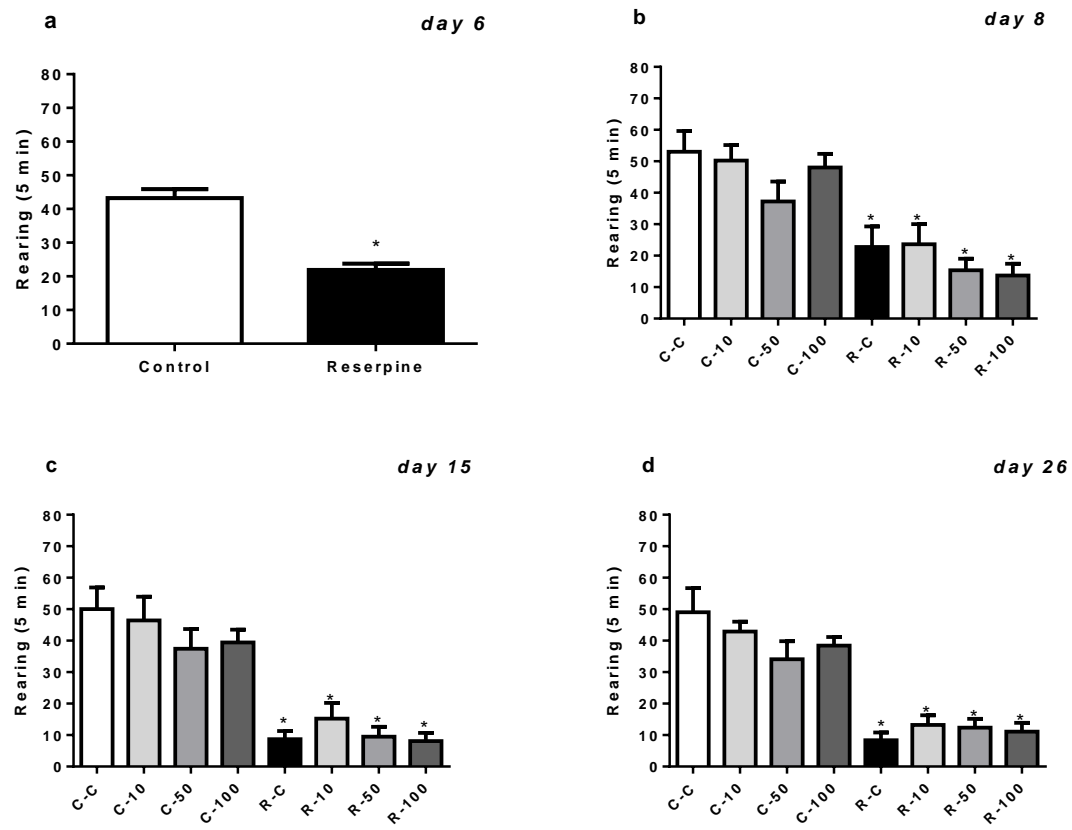
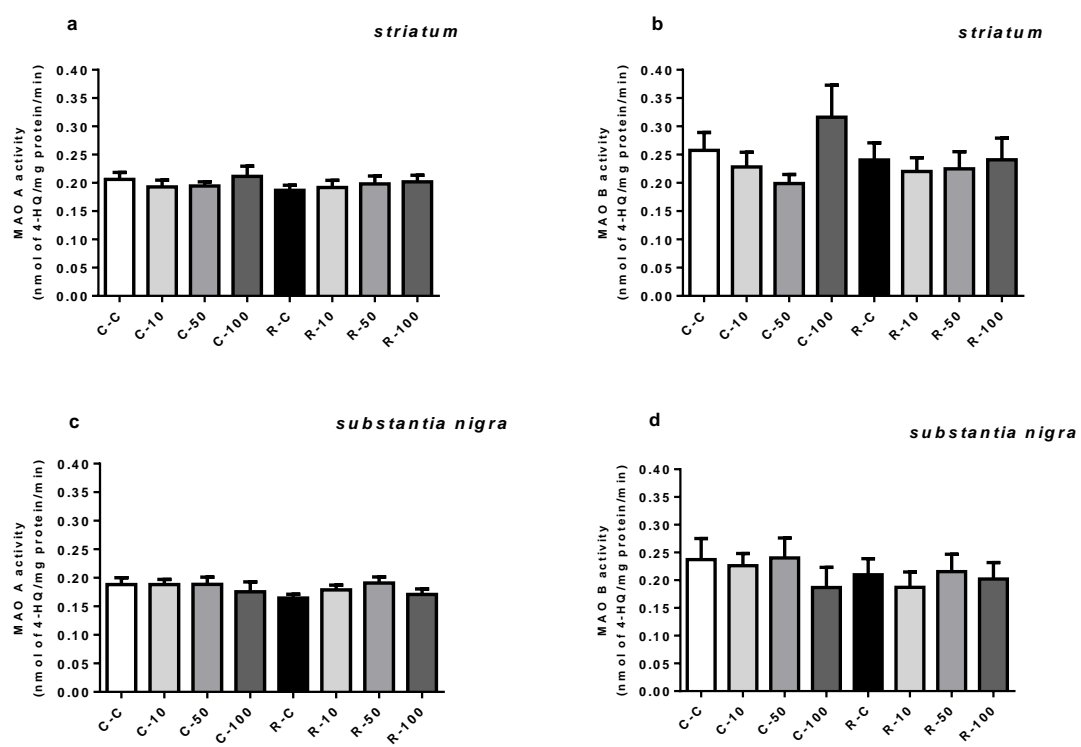


Figure 7



6 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- As doses de 0,34 e 1,03 mM de CAT são capazes de inibir a atividade de ambas as isoformas da MAO *in vitro*. A inibição produzida por ambas concentrações é passível de reversibilidade total para a isoforma A e parcial para a B;
- Em camundongos, a reserpina aumentou significativamente o número de VCMs e somente 2 administrações de CAT 10 mg/kg foi capaz de diminuir esta alteração comportamental, contudo, este efeito não se manteve ao longo do tratamento. As doses de 50 e 100 mg/mL não foram efetivas neste parâmetro;
- A reserpina diminuiu significativamente a atividade exploratória e locomotora dos camundongos e nenhuma das doses de CAT foram capazes de atenuar estas alterações;
- Nem a reserpina nem a CAT causaram alteração significativa na atividade de ambas as isoformas da MAO tanto no estriado quanto na substância negra, indicando que, nestas condições experimentais, as alterações motoras induzidas por reserpina observadas não estão diretamente relacionadas com a atividade da MAO.

7 CONCLUSÃO GERAL

Em suma, a CAT não mostrou-se promissora sobre a DO em camundongos, visto que não foi capaz de atenuar de modo contínuo e dose-dependente as alterações na frequência dos movimentos de mascar no vazio e capacidade exploratória e locomotora induzidos por reserpina. Apesar da CAT apresentar promissora proteção *in vitro* devido a inibição reversível da atividade da MAO, ela não causou alterações na atividade da MAO *ex vivo* no estriado nem na substância negra. Embora os resultados referente à CAT *in vivo* e *ex vivo* não tenham tido uma boa performance como foi hipotetizado, é de grande valia que mais estudos sob outras condições experimentais sejam realizados com a finalidade de averiguar o seu impacto sobre outras doenças além da DT devido a inibição da MAO *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, V. C. et al. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 109-114, 2003.
- ABÍLIO, V. C. et al. Important role of striatal catalase in aging-and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, p. 263–272, 2004.
- AHMED, Md. E. et al. Amelioration of cognitive impairment and neurodegeneration by catechin hydrate in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Neurochemistry International**, v. 62, p. 492–501, 2013.
- AIA, P. G. et al. Tardive Dyskinesia. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 13, p. 231–241, 2011.
- ANDRADE, L.A.F.; BERTOLUCCI, P.H.F.; PEREIRA, J.S. Discinesia tardia: I. fisiopatologia e tratamento. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 42, n.4, p. 362-370, 1984.
- ANDREASSEN, O.A.; JØRGENSEN, H.A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats: Implications for tardive dyskinesia?. **Progress in Neurobiology**, v. 61, p. 525–541, 2000.
- ANDREASSEN, O.A. et al. Oral dyskinesias and histopathological alterations in substantia nigra after long-term haloperidol treatment of old rats. **Neuroscience**, v. 122, p. 717–725, 2003.
- ARGENTA, S. C. et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 7, n.12: p.51-60, 2011.
- AQUINO, C.C.H, LANG, A.E. Tardive dyskinesia syndromes: current concepts. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 20 S1, p. S113–S117, 2014.
- BISONG, S. A.; BROWN, R. E.; OSIM, E. E. Comparative extrapyramidal effects of *Rauwolfia vomitoria*, chlorpromazine and reserpine in mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 107–112, 2013.
- BRASIL. Portaria SAS/MS nº 364, de 9 de abril de 2013. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. Esquizofrenia. CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 de abril de 2013. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-esquizofrenia-livro-2013.pdf>>.
- BRUIJNZEEL, D.; SURYADEVARA, U.; TANDON, R. Antipsychotic treatment of schizophrenia: An update. **Asian Journal of Psychiatry**, v. 11, p. 3-7, 2014.

BUCHANAN, R.; L'ITALIEN, G.; KORO, C. Metabolic adverse events among schizophrenics exposed to antipsychotics in the general practice research database. **European Neuropsychopharmacology**, v. 12 (3), p. 294, 2002.

BURGER, M. et al. Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide. **Brain Research Bulletin**, v. 64, p. 339–345, 2004.

BURGER, M. E. et al. Acute reserpine and subchronic haloperidol treatments change synaptosomal brain glutamate uptake and elicit orofacial dyskinesia in rats. **Brain Research**, v. 1031, p. 202–210, 2005.

BUSANELLO, A et al. Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 22 (1), p. 71-75, 2011.

BUSANELLO, A. et al. Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 101, p. 307–310, 2012.

BUSANELLO, A et al. Resveratrol Protects Against Vacuous Chewing Movements Induced by Chronic Treatment with Fluphenazine. **Neurochemical Research**, v. 42 (11), p. 3033-3040, 2017.

CAMPÊLO, C. L. C. et al. Exposure to an enriched environment facilitates motor recovery and prevents short-term memory impairment and reduction of striatal BDNF in a progressive pharmacological model of parkinsonism in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 328, p. 138–148, 2017.

CALVENTE, P. R. V. et al. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid aggravates reserpine-induced oral dyskinesia in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 26, p. 401–405, 2002.

CAROFF, S.N.; CAMPBELL, E.C. Drug-Induced Extrapyrmidal Syndromes: Implications for Contemporary Practice. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 39, p. 391–411, 2016.

CARVALHO, R. C. et al., Antidyskinetic effects of risperidone on animal models of tardive dyskinesia in mice. **Brain Research Bulletin**, v. 60, p. 115–124, 2003.

CHENNASAMUDRAM, S. P. et al., Renoprotective effects of (+)-catechin in streptozotocin-induced diabetic rat model. **Nutrition Research**, v. 32, p. 347–356, 2012.

CITROME, L. Clinical management of tardive dyskinesia: Five steps to success. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 383, p. 199-204, 2017.

CLOUD, L. J.; ZUTSHI, D.; FACTOR, S. A. Tardive dyskinesia: therapeutic options for an increasingly common disorder. **Neurotherapeutics**, v. 11, p. 166–176, 2014.

CORNETT, E. M. et al. Medication-induced tardive dyskinesia: a review and update. **Ochsner Journal**, v. 00, p. 162–174, 2017.

DALLUGE, J. J.; NELSON, B. C. Determination of tea catechins. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 411–424, 2000.

DAVIS, M. C. et al. Efficient trial design - FDA approval of Valbenazine for Tardive Dyskinesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 376 (26), p. 2503-2506, 2017.

DAYAA, R. P. et al. Alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron prevents oxidative stress in a haloperidol-induced animal model of tardive dyskinesia: Investigating the behavioural and biochemical changes. **Brain Research**, v. 1412, p. 28–36, 2011.

DE FREITAS, C. M. et al. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. **Psychopharmacology**, v. 233, p. 457–467, 2016.

DE MORAIS, S. M. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19 (1B), p. 315-320, 2009.

DE OLIVEIRA, D. R. et al. Silymarin has antioxidant potential and changes the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and monoamine oxidase in vitro. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 347–355, 2015.

DMS-5. Transtornos do Movimento Induzidos por Medicamentos e Outros Efeitos Adversos de Medicamentos. In: **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais** [American Psychiatric Association; tradução: Maria Inês Corrêa Nascimento et al.]; revisão técnica: Aristides Volpato Cordioli et al. 5. ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2014. p. 709-714.

DO CANTO, V. P. **Estudo computacional das monoaminoxidases A e B com substratos e inibidores**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

DUBE, A.; NICOLAZZO, J. A.; LARSON, I. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (-)-epigallocatechin gallate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 219–225, 2010.

DUEÑAS, M. et al. Antioxidant evaluation of O-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 443–449, 2010.

EBINGER, G.; MICHOTTE, Y.; HERREGODTS, P. The significance of homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations in human

lumbar cerebrospinal fluid. **Journal of Neurochemistry**, v. 48 (6), p. 1725-1729, 1987.

EL-SHAHAWI, M. S. et al. Analysis of some selected catechins and caffeine in green tea by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2268–2275, 2012.

FACHINETTO, R. et al. *Valeriana officinalis* does not alter the orofacial dyskinesia induced by haloperidol in rats: Role of dopamine transporter. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 1478–1486, 2007a.

FACHINETTO, R. et al. Diphenyl diselenide decreases the prevalence of vacuous chewing movements induced by fluphenazine in rats. **Psychopharmacology**, v. 194, p. 423–432, 2007b.

FARIA, A. et al. Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier. **Food Function**, v. 2, 39–44, 2011.

GHARABAWI, G. M. et al. Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS) and Extrapyramidal Symptom Rating Scale (ESRS): Cross-scale comparison in assessing tardive dyskinesia. **Schizophrenia Research**, v. 77, p. 119–128, 2005.

GOPALAKRISHNA G., ITHMAN M.H., LAURIELLO J. Update on New and Emerging Treatments for Schizophrenia. **The Psychiatric Clinics of North America**, v. 39 (2), p. 217-238, 2016.

GOTZ, M. E. et al. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. **Pharmacology & Therapeutics**, v.63, p. 37-122, 1994.

GOYA, L. et al. Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: studies of cell culture, animals and humans. **Nutrients**, v. 8, 212, 2016.

HARWANSI, R.K. et al. Enhancement of photoprotection potential of catechin loaded nanoemulsion gel against UVA induced oxidative stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 318-329, 2016.

HEITZMANN, E. et al., 2016 A case of aripiprazole-induced tardive dyskinesia with dramatic evolution. **Case Reports in Psychiatry**, v. 2016, 3 pages, 2016.

HUSSEIN, S. S. S.; KAMARUDIN, M. N. A; KADIR, H. A. (+)-catechin attenuates nf-kb activation through regulation of akt, mapk, and ampk signaling pathways in lps-induced bv-2 microglial cells. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 5, p. 1–26, 2015.

HOU, W. –C et al. Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 216–220, 2005.

IFEANACHO, M. O.; IKEWUCHI, C. C.; IKEWUCHI, J.C. Investgaton of the profle of phenolic compounds in the leaves and stems of *Pandiaka heudeloti* using gas chromatography coupled with flame ionizaton detector. **Food Science & Nutriton**, v. 5, p. 646–652, 2017.

KALUDERCIC, N. et al. Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 73, p. 34-42, 2014.

LEE, B. et al. Chronic administration of catechin decreases depression and anxiety-like behaviors in a rat model using chronic corticosterone injections. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 21 (4), p. 313-322, 2013.

LIMÓN, D. et al. Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. **Mensaje Bioquímico**, v. XXXIV, 143-154, 2010.

LINDNER, L. M. et al. Avaliação econômica do tratamento da esquizofrenia com antipsicóticos no Sistema Único de Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 43 (supl. 1), p. 62-69, 2009.

LINS, L. C. R. F. et al. Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. **Brain Research Bulletin**, v. 139, p. 9–15, 2018.

LISTER, J., NOBREGA, J. N., FLETCHER, P.J., REMINGTON, G. Oxidative stress and the antipsychotic induced vacuuous chewing movement model of tardive dyskinesia: evidence for antioxidant-based prevention strategies. **Psychopharmacology**, v. 231, p. 2237–2249, 2014.

MACALUSO, M.; FLYNN, A.; PRESKORN, S. H. Tardive dyskinesia: a historical perspective. **Journal of Psychiatric Practice**, v. 23 (2), p. 121-129, 2017.

MELTZER, H. Y. Update on typical and atypical antipsychotic drugs. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 393-406, 2013.

MEYER, J.M. Farmacoterapia da psicose e da mania. In: **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**; organizadores, Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann; [tradução: Augusto Langeloh et al.; revisão técnica Almir Lourenço da Fonseca]. 12. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. cap 16.

MICHEL, T; HOFFMAN, B.B. Tratamento da isquemia miocárdica e da hipertensão. In: **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**; organizadores, Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann; [tradução: Augusto Langeloh et al.; revisão técnica Almir Lourenço da Fonseca]. 12. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. cap 27.

MIYAMOTO, S. et al. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. **Molecular Psychiatry**, v. 10, p. 79–104, 2005.

NEISEWANDER, J.L.; LUCKI, I.L.; MCGONIGLE, P. Neurochemical changes associated with the persistence of spontaneous oral dyskinesia in rats following chronic reserpine treatment. **Brain Research**, v. 558, p. 27-35, 1991.

NEISEWANDER, J. L.; CASTAFIEDA, E.; DAVIS, D. A. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 79-84, 1994.

NEISEWANDER, J. L. et al. Effects of amphetamine and 6-hydroxydopamine lesions on reserpine-induced oral dyskinesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 305, p. 13-21, 1996.

OKPATAKU, C. I.; TAWANI, D. Psychotropic prescriptions for the treatment of schizophrenia in an outpatient clinic. **Trends Psychiatry Psychother**, v. 39 (3), p. 165-172, 2017.

PEREIRA, R. P. et al. *Valeriana officinalis* ameliorates vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, p. 1547–1557, 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M. Fármacos antipsicóticos. In: **Rang & Dale: Farmacologia**; tradução Tatiana Ferreira Robaina et al; revisão científica Pedro Fernandes Lara e Ricardo Martins Oliveira-Filho. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. cap 45.

RECKZIEGEL, P. et al. Gallic acid decreases vacuous chewing movements induced by reserpine in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 104, p. 132–137, 2013.

RUAN, H. –I. et al. Similar potency of catechin and its enantiomers in alleviating 1-methyl-4-phenylpyridinium ion cytotoxicity in SH-SY5Y cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 63, p. 1169–1174, 2011.

SACHDEV, P.; SAHAROV, T.; CATHCART, S. the preventative role of antioxidants (selegiline and vitamin e) in a rat model of tardive dyskinesia. **Biological Psychiatry**, v. 46, p. 1672–1681, 1999.

SAMIE, M. R., DANNENHOFFER, M. A.; ROZEK, S. Life-threatening tardive dyskinesia caused by metoclopramide. **Movement Disorders**, v. 2(2), p. 125-129, 1987.

SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 68–77, 2013.

SHIREEN, E. Experimental treatment of antipsychotic-induced movement disorders. **Journal of Experimental Pharmacology**, v. 8, p. 1–10, 2016.

SINGH, A.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S. K. Possible antioxidant and neuroprotective mechanisms of FK506 in attenuating haloperidol-induced orofacial dyskinesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 477, p. 87–94, 2003.

SINGH, J. P. et al. Composition, bioactive compounds and antioxidant activity of common Indian fruits and vegetables. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53 (11), p. 4056–4066, 2016.

SILVA, R. H. et al. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behavioural Brain Research**, v. 132, p. 171–177, 2002.

STAHL, S.M. Psicose e esquizofrenia. In: STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas**; tradução Patricia Lydie Voeux; revisão técnica Irismar Reis de Oliveira. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. cap 4.

STAHL, S. M. Agentes antipsicóticos. In: STAHL, S.M. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas**; tradução Patricia Lydie Voeux; revisão técnica Irismar Reis de Oliveira. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. cap 5.

STANDAERT, D. G.; GALANTER, J. M. Farmacologia da neurotransmissão dopaminérgica. In: GOLAN, D. E.; Jr. TASHJIAN, A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. cap 12.

STEEDS, H.; CARHART-HARRIS, R. L.; STONE, J. M. Drug models of schizophrenia. **Therapeutic Advances in Psychopharmacology**, v. 5(1), p. 43–58, 2015.

SYU, A. et al. association of the HSPG2 gene with neuroleptic-induced tardive dyskinesia. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, p. 1155–1164, 2010.

TANIGAWA, T. et al. (+)-Catechin protects dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 133-140, 2014.

TAO, W. et al. Simultaneous determination of eight catechins and four theaflavins in green, black and oolong tea using new HPLC–MS–MS method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 131, p. 140–145, 2016.

TEIXEIRA, M.D.A. et al. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 110, p. 1–7, 2013.

TENBACK, D. E.; HARTEN, P. N. V.; OS, J. V. Non-therapeutic risk factors for onset of tardive dyskinesia in schizophrenia: a meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 24, p. 2309–2315, 2009.

TENBACK, D. E.; HARTEN, P. N. V. Epidemiology and risk factors for (tardive) dyskinesia. **International review of neurobiology**, v. 98, p. 211-230, 2011.

TRIPATHI, A. C. et al. Privileged scaffolds as MAO inhibitors: Retrospect and prospects. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 445-497, 2018.

UHRBRAND, L.; FAURBYE, A. Reversible and irreversible dyskinesia after treatment with perphenazine, chlorpromazine, reserpine and electroconvulsive therapy. **Psychopharmacologia**, v. 1, p. 408-418, 1960.

VALLIANATOU, K. Antipsychotics. **Medicine**, v. 44, p. 748-752, 2016.

WALN, O.; JANKOVIC, J. An update on tardive dyskinesia: from phenomenology to treatment. **Tremor and other hyperkinetic movements**, v. 3, p. 1-11, 2013.

WERNER, F. -M.; COVEÑAS, R. Safety of antipsychotic drugs: focus on therapeutic and adverse effects. **Expert Opin Drug Saf.**, v. 13 (8), p. 1031-1042, 2014.

WU, L. et al. Pharmacokinetics and blood–brain barrier penetration of (+)-catechin and (–) epicatechin in rats by microdialysis sampling coupled to high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9377–9383, 2012.

YOUDIM, M. B. H.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K. F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7 (4), p. 295-309, 2006.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROJETO EMITIDO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA (CEUA/UFMS)



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "EFEITO DA CATEQUINA SOBRE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS INDUZIDOS POR RESERPINA EM CAMUNDONGOS", protocolado sob o CEUA nº 4990290416, sob a responsabilidade de **Roselei Fachinnetto** e equipe; *Bárbara Nunes Krum ; Catuscia Molz de Freitas; Getúlio Bressan; Janaína Schwerz ; Jeane Binotto Reinheimer* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) na reunião de 23/06/2016.

We certify that the proposal "Effects of cathekin on behavioral and neurochemical parameters induced by reserpine in mice", utilizing 80 Heterogenics mice (80 males), protocol number CEUA 4990290416, under the responsibility of **Roselei Fachinnetto and team; Bárbara Nunes Krum ; Catuscia Molz de Freitas; Getúlio Bressan; Janaína Schwerz ; Jeane Binotto Reinheimer** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 06/23/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2016** a **12/2017**

Área: **Bioquímica Toxicológica**

Procedência: **Biotério Central UFMS**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **60 a 70 dias**

N: **80**

Linhagem: **Swis**

Peso: **23 a 25 g**

Resumo: A discinesia tardia (DT) é um distúrbio do movimento, principalmente da região oro-língua-facial, que se desenvolve em decorrência do uso prolongado de antipsicóticos típicos [haloperidol é o principal representante dessa classe] em aproximadamente 20% dos pacientes esquizofrênicos em tratamento crônico (STANDAERT E GALANTER, 2009). Esse efeito colateral extrapiramidal manifesta-se de forma tardia e pode persistir até mesmo após a retirada do neuroléptico, tornando-se irreversível (ANDREASSEN et al., 2003). Consiste em um distúrbio incapacitante, cuja qualidade de vida dos pacientes é reduzida drasticamente (STAHL, 2011, 698 p.). Até o momento, encontra-se na literatura hipóteses que tentam explicar a fisiopatologia da DT, porém nenhuma delas ainda está bem esclarecida. Entretanto, a hipótese do [estresse oxidativo] tem ganhado uma maior atenção devido a estudos científicos que mostram à auspiciosa neuroproteção de compostos antioxidantes (SINGH et al., 2003). Levando em consideração tais condições, constata-se a necessidade de elucidar o mecanismo de desenvolvimento da DT, bem como formas eficazes de tratamento. A discinesia orofacial induzida por reserpina em roedores é um modelo animal de DT bem aceito pela comunidade científica, pois induz movimentos de mascar no vazio (MMV), protrusões de língua e tremor facial, característicos na DT (BURGER et al., 2003; NEISEWANDER et al., 1991). Além disso, o mecanismo de ação desse fármaco está relacionado com o sistema dopaminérgico e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BISONG et al., 2013; WILLIAMS E TURNER, 2009). Encontra-se aqui mais uma premissa que alimenta a hipótese sugerida por esse estudo, o qual sugere que compostos com ação no sistema dopaminérgico e/ou antioxidantes podem ser eficazes no tratamento da DT. Desta forma, o presente estudo visa avaliar o efeito da catequina, conhecida pela sua propriedade antioxidante (MANDEL E YODIM, 2004), em alterações comportamentais, bioquímicas e neuroquímicas induzidas por reserpina em camundongos. Camundongos machos Swiss serão divididos em 8 grupos experimentais que receberão diariamente, durante 4 dias, reserpina ou veículo (ácido acético 0,2%), e após o último dia de injeção destes, receberão diariamente, durante 20 dias, catequina ou veículo (NaCl 0,9%). Os grupos experimentais são: Controle-controle (C-C), Controle-catequina 10 mg/kg (C-CAT 10), Controle-catequina 50 mg/kg (C-CAT 50), Controle-catequina 100 mg/kg (C-CAT 100), Reserpina-controle (R-C), Reserpina-catequina 10 mg/kg (R-CAT 10), Reserpina-catequina 50 mg/kg (R-CAT 50) e Reserpina-catequina 100 mg/kg (R-CAT 100). No grupo C-C será administrado ácido acético 0,2% e posteriormente solução de NaCl 0,9% (5 mL/kg); no grupo C-CAT 10, C-CAT 50 e C-CAT 100, ácido acético 0,2% e posteriormente catequina 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente; no grupo R-C, reserpina 1 mg/kg e posteriormente solução de NaCl 0,9%; no grupo R-CAT 10, R-CAT 50 e R-CAT 100, reserpina 1 mg/kg e posteriormente catequina 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. A dose de reserpina será de 1,0 mg/kg e de catequina serão de 10, 50 e 100 mg/kg. No primeiro, 10º e 21º dia após a última injeção de reserpina serão avaliados parâmetros comportamentais característicos de distúrbios motores (número de movimentos de mascar no vazio e de protrusões de língua, tempo de tremor facial dos animais) bem como a atividade locomotora e exploratória



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

dos animais. Após os testes comportamentais, no 21º após a última injeção de reserpina, os animais serão eutanaziados por deslocamento cervical. Serão retiradas estruturas cerebrais, tais como córtex, substância negra, estriado e hipocampo, além do fígado e rins, que serão utilizados para análise de parâmetros relacionados ao sistema dopaminérgico (imunoreatividade da tirosina hidroxilase, do transportador de dopamina e receptor D2, bem como a atividade da MAO), ao estresse oxidativo (oxidação da diclorofluoresceína, nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e de tióis, atividade da catalase e da Na⁺/K⁺-ATPase). Acredita-se que a catequina possa ser útil no tratamento de movimentos de mascar no vazio e através deste projeto pretendemos esclarecer o seu possível mecanismo de ação para que futuramente possa ser utilizado como uma terapia medicamentosa adjuvante em pacientes acometidos pela discinesia tardia.

Local do experimento: Laboratório de Neurotoxicidade e Comportamento

Santa Maria, 06 de julho de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria