



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CONTRIBUIÇÕES AO TRATAMENTO DE DOENÇAS DESMIELINIZANTES:  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS E RETROSPECTIVO EM CÃES**

**TESE DE DOUTORADO**

**DIEGO VILIBALDO BECKMANN**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2013**

**CONTRIBUIÇÕES AO TRATAMENTO DE DOENÇAS DESMIELINIZANTES:  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS E RETROSPECTIVO EM CÃES**

**por**

**Diego Vilivaldo Beckmann**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Mazzanti**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2013**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
Aprova a Tese de Doutorado

**CONTRIBUIÇÕES AO TRATAMENTO DE DOENÇAS DESMIELINIZANTES:  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS E RETROSPECTIVO EM CÃES**

elaborada por  
**Diego Vilibaldo Beckmann**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Alexandre Mazzanti, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Diogo Losch de Oliveira, Dr.** (UFRGS)

**Maribel Antonello Rubin, Dra.** (UFSM)

**Roselia Maria Spanevello, Dra.** (UFPEL)

**Roberta Schmatz, Dra.** (UFSM)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2013.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Pai celestial a minha vida e todas as aprovações e desafios vencidos etapa após etapa.

Aos meus amados Lilian e Pedro. Minha esposa querida, chegamos até aqui juntos, obrigado pelo apoio, ajuda, cumplicidade e compreensão nos meus momentos de ausência durante todos esses anos, e principalmente, por sempre acreditar em mim. Te amo linda! Ao meu filho Pedro, que veio recarregar minhas forças e esperanças neste último ano. Papai te ama filho.

À minha família – Paulo, Leonir, Daniela, Maria Eduarda, Lisa, Leila e Denisardi – todas as coisas que fizeram por mim ao longo do meu caminho, enfrentando dificuldades. O apoio, incentivo e entendimento pela minha ausência em busca de um sonho.

Ao meu orientador, Professor Alexandre Mazzanti, o conhecimento transmitido, por sua dedicação ao grupo de pesquisa em Neurologia/Reabilitação e pelo profissionalismo com que trata a medicina veterinária. Poucos profissionais se doam com tanto afinho aos animais, tu és um exemplo aos alunos. Além do lado profissional, agradeço pelo grande amigo que ganhei dessa convivência de nove anos.

À Professora Cinthia Mazzanti a co-orientação, auxílio e conhecimento para a realização deste trabalho.

À professora Dominguita Graça e a todos do laboratório de bioquímica Toxicológica, no nome das professoras Rosa e Vera.

Aos Professores Ney Luis Pippi e Alceu Gaspar Raiser o conhecimento transmitido, disposição, amizade e auxílio sempre que solicitados.

À Rosmarini, Graciane, Amanda, Bia, Rafael Chaves, Angel e Bruna, o auxílio na execução do projeto de pesquisa, bem como pela amizade. Sentirei saudades de vocês.

A todos os colegas do LACE, a troca de conhecimento, pelos bons momentos vividos e pela amizade.

À CAPES a bolsa de doutorado concedida.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Laboratório de Cirurgia Experimental.

## **RESUMO**

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

### **CONTRIBUIÇÕES AO TRATAMENTO DE DOENÇAS DESMIELINIZANTES: ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS E RETROSPECTIVO EM CÃES**

AUTOR: Diego Vilibaldo Beckmann

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre Mazzanti

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2013.

As doenças desmielinizantes são uma grave consequência da destruição das bainhas de mielina presentes no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP). A desmielinização pode ocorrer tanto em doenças infecciosas como compressivas da medula espinhal em cães. O modelo experimental de desmielinização e remielinização pelo brometo de etídio (BE) promove a diminuição da atividade locomotora semelhantes às observadas na doença de esclerose múltipla (EM). O objetivo deste estudo foi investigar o efeito do flavonoide quercetina nos testes comportamentais, na neurotransmissão colinérgica, na atividade das colinesterases no sangue, na atividade da acetilcolinesterase em linfócitos e nos parâmetros de estresse oxidativo no sangue, durante os eventos de desmielinização e remielinização em ratos submetidos ao modelo experimental pelo BE e realizar levantamento de dados sobre cães com diagnóstico de subluxação atlantoaxial atendidos no hospital veterinário universitário. No primeiro artigo, foram diagnosticados 14 cães com subluxação atlantoaxial, sendo as raças de pequeno porte com idade inferior a 24 meses as mais acometidas. A principal causa da instabilidade foi a agenesia do processo odontóide do eixo e os sinais clínicos variaram desde hiperestesia cervical até tetraparesia não ambulatória. O tratamento cirúrgico demonstrou ser eficaz com tempo de recuperação predominante de 30-60 dias após a cirurgia, não existindo relação deste com a duração dos sinais clínicos. Para o estudo experimental, ratos *Wistar* foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (20 animais por grupo): Controle (injeção de solução salina e tratamento com etanol), Querc (injeção de solução salina e tratamento com quercetina), BE (injeção de BE a 0,1% e tratamento com etanol), e BE + Querc (injeção de BE a 0,1% e tratamento com quercetina). Os animais dos grupos Querc e Querc + BE foram tratados uma vez ao dia com quercetina (50mg/kg) diluída em solução de etanol a 25% na dose de 1 ml/kg. Os animais dos grupos controle e BE foram tratados uma vez ao dia com solução de etanol a 25% na dose de 1 ml/kg. As fases avaliadas foram no pico de desmielinização (dia 7) e no pico de remielinização (dia 21), pós-inoculação de BE. No primeiro manuscrito, os testes comportamentais (teste do beam walking, teste do foot fault e teste do plano inclinado), a atividade da AChE e peroxidação lipídica nas estruturas encefálicas (hipotálamo, hipocampo, cerebelo, córtex, estriado e ponte) foram avaliadas nos dias 7 e 21 pós-inoculação de BE. O tratamento com quercetina promoveu maior velocidade de recuperação locomotora, preveniu a inibição da atividade de AChE e o aumento da peroxidação lipídica em ratos submetidos à desmielinização pelo BE. No segundo manuscrito, os parâmetros de estresse oxidativo no sangue, a atividade das colinesterases no sangue e a atividade da AChE nos linfócitos foram avaliados nos dias 7 e 21 pós-inoculação de BE. O modelo de desmielinização experimental por BE promoveu alteração na atividade da AChE no sangue total e linfócitos, e modificou os parâmetros das enzimas antioxidantes, bem como reduziu a peroxidação lipídica em ratos submetidos à desmielinização pelo BE. Estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão do papel neuroprotetor da quercetina, enfatizando a importância deste antioxidante na dieta humana e animal, e do potencial terapêutico deste composto em doenças desmielinizantes tais como a esclerose múltipla, a cinomose, bem como doenças traumáticas (subluxação atlantoaxial e DDIV, entre outras).

*Palavras-chave: quercetina, cirurgia, desmielinização, colinesterases, testes comportamentais.*

## ABSTRACT

Doctoral Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **CONTRIBUTIONS IN TREATMENT OF DEMYELINATION DISEASES: EXPERIMENTAL STUDY IN RATS AND RETROSPECTIVE STUDY IN DOGS.**

AUTHOR: Diego Vilibaldo Beckmann

ADVISOR: Alexandre Mazzanti

Place and Date of Defense: Santa Maria, February 26<sup>th</sup>, 2013.

Demyelinating diseases are severe owing to the destruction of myelin sheaths present in the central (CNS) and peripheral (PNS) nervous system. The demyelination may occur in infectious and compressive diseases of the spinal cord in dogs. The experimental model of demyelination and remyelination by Ethidium Bromide (EB) promotes impairment of locomotor activities similar to those observed in multiple sclerosis (MS). The purpose of this study was to investigate the effect of flavonoid quercetin on behavioral tests, on cholinergic neurotransmission, on parameters of oxidative stress in blood, on cholinesterase activity in blood and Acetylcholinesterase (AChE) activities in lymphocytes of rats submitted to the EB experimental demyelination model and to review cases of the atlantoaxial subluxation in the neurological records of the Veterinary Hospital. In the first paper, fourteen dogs were diagnosed as affected by atlantoaxial subluxation in dogs and the condition was more frequent in toy breeds under twenty-four month old years. The main cause found for the instability was agenesis of the odontoid process. Clinical signs ranged from cranial cervical pain to non-ambulatory tetraparesis. The surgical treatment demonstrated to be efficacious. The predominant time of recovery was 30-60 days after surgery. No correlation was found between the duration of clinical signs before surgery and the time of recovery. In the experimental study, Wistar rats were randomly distributed into four groups (20 animals per group): Control (pontine saline injection and treatment with ethanol), Querc (pontine saline injection and treatment with quercetin), EB (pontine 0.1% EB injection and treatment with ethanol), and EB+Querc (pontine 0.1% EB injection and treatment with quercetin). The animals of the groups Querc and Querc + EB were treated once daily with quercetin (50mg/kg) diluted in 25% ethanol solution (1 ml / kg) and the animals of the control groups and EB were treated once daily with 25% ethanol solution (1 ml / kg). Two stages were observed: phase of demyelination with a peak on day 7 and phase of remyelination with a peak on day 21 post-inoculation of EB. In the first manuscript, the behavioral tests (the beam walking test, foot fault test and Inclined plane test), AChE activity and lipid peroxidation in the brain structures (pons, cerebellum, hippocampus, hypothalamus, striatum and cortex) were measured. Quercetin promoted earlier locomotor recovery, prevented the inhibition of AChE activity and the increase of lipidic peroxidation. In a second manuscript, parameters of oxidative stress in blood, cholinesterase activity in blood and AChE activities in lymphocytes were measured. The experimental demyelination model by EB promoted alteration in AChE activity of non neural cells, and also modified the oxidative stress parameters in the blood. In addition, quercetin was able to modulate AChE activity and of the antioxidant enzymes, as well as reduces lipid peroxidation in demyelinated rats by EB. These results may contribute to a better understanding of the neuroprotective role of quercetin and the importance of an antioxidant diet in humans and in animals, and the therapeutic potential this flavonoid in demyelination diseases, such as ME in humans, distemper in dogs, as well as in spinal cord compression (atlantoaxial subluxation).

*Key words: quercetin, surgery, demyelination, cholinesterase, behavioral tests.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Forma molecular da quercetina.....23

### MANUSCRITO 1

Scheme Exposure – Oral administration of quercetin (50 mg/kg) once a day during 21 days in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%). Day seven represents the peak of demyelination, and day 21 represents the peak of remyelination.....63

Figure 1. – Effects of quercetin (50mg/kg) and ethidium bromide (EB, 0.1%) treatments on number of failures in the Beam Walking test during 21 days. Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats for group. #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment (ANOVA with repeated measures) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....64

Figure 2. – Effects of quercetin (50mg/kg) and ethidium bromide (EB, 0.1%) treatments on number of errors in the Foot Fault test during 21 days. Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats for group. #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment (ANOVA with repeated measures) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....65

Figure 3. – AChE activity in supernatant fraction of cerebral cortex (A), hippocampus (B), pons (C), striatum (D), hypothalamus (E) and cerebellum (F) in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg), during stages of

demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group. \* $P < 0.05$  compared with the others groups; #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....66

Figure 4. – MDA levels in homogenate of cerebral cortex (A), hippocampus (B), pons (C), striatum (D), hypothalamus (E) and cerebellum (F) in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg), during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group. \* $P < 0.05$  compared with the other groups; #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....67

Figure 5 – **A** – EB group (7 days after EB injection): Long narrow lesion along the base of the pons with spongiosis, gitter cells and moderate inflammatory infiltration. **B** – EB group (21 days after EB injection): Medium sized lesion on the lateral side of the pons close to the trigeminal emergency. There is vascular proliferation and mild inflammatory infiltration. **C** – Control group (7 days after saline injection): Small round lesion on the pontine midline with a conspicuous axonal baloon, some microglia and gitter cells. H&E. Bar: (10x).....68

## MANUSCRITO 2

Figure 1. – AChE activity in whole blood (A) and lymphocytes (B) in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg), during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10



rats per group. \* $P < 0.05$  compared with the others groups; #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....92

Figure 2. – BChE activity in serum of the rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg), during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group. No significant differences in the BChE activity among groups ( $P > 0.05$ ). ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....93

Figure 3. – The serum TBARS level indicated by MDA concentration in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg), during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group \* $P < 0.05$  compared with the others groups; #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....94

Figure 4. – SOD (A) and CAT (B) activities in whole blood in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg), during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group \* $P < 0.05$  compared with the others groups; #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.....95

## LISTA DE QUADROS

### ARTIGO 1

Quadro 1 –	Representação quanto à raça, sexo, idade, etiologia, sinais neurológicos, duração dos sinais clínicos, resposta ao tratamento e tempo de recuperação de 14 cães com subluxação atlantoaxial atendidos HVU-UFSM entre 2003 e 2008.....	33
------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AChE – acetilcolinesterase  
ACh - acetilcolina  
BChE – butirilcolinesterase  
BE – brometo de etídio  
CAT – catalase  
EM – esclerose múltipla  
ERNs – espécies reativas de nitrogênio  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
GFAP – proteína ácida fibrilar glial  
SNC – sistema nervoso central  
SNP – sistema nervoso periférico  
SOD – superóxido dismutase  
SR – surto-remissão  
VIM – vimentina

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Células gliais e bainha de mielina.....	16
2.2	Doenças desmielinizantes do sistema nervoso central.....	17
2.2.1	Esclerose múltipla.....	17
2.2.2	Cinomose.....	18
2.2.3	Trauma medular.....	19
2.3	Modelo experimental de desmielinização pelo brometo de etídio.....	20
2.4	Flavonoide quercetina.....	22
2.5	Atividade das colinesterases.....	24
2.6	Perfil oxidativo.....	26
3.	OBJETIVOS.....	28
3.1	Objetivo geral.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4.	ARTIGO 1.....	30
4.1	Resumo.....	31
4.2	Introdução.....	31
4.3	Material e Métodos.....	32
4.4	Resultados.....	32
4.5	Discussão.....	33
4.6	Conclusão.....	34
4.7	Referências.....	35
5.	MANUSCRITO 1.....	36
5.1	Abstract.....	38
5.2	Introduction.....	39
5.3	Materials and Methods.....	41
5.4	Results.....	46
5.5	Discussion.....	48
5.6	Conflicts of Interest statement.....	52
5.7	Acknowledgements.....	52
5.8	References.....	52
6.	MANUSCRITO 2.....	69
6.1	Abstract.....	71
6.2	Introduction.....	72
6.3	Materials and Methods.....	74
6.4	Results.....	78
6.5	Discussion.....	80
6.6	Conflicts of Interest statement.....	83
6.7	Acknowledgements.....	83
6.8	References.....	83
7.	DISCUSSÃO.....	96
8.	CONCLUSÃO.....	102
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças desmielinizantes são caracterizadas pela destruição das bainhas de mielina (Siegel, 1999) o que prejudica a transmissão do impulso nervoso levando ao aparecimento de sinais neurológicos (Kipp, Van Der Valk *et al.*, 2012). Das doenças que cursam com desmielinização, destacam-se a esclerose múltipla (EM) em humanos e a cinomose em cães (Bennet, 1997; Kipp, Van Der Valk *et al.*, 2012). A compressão contínua da medula espinhal, como ocorre na subluxação atlantoaxial, também pode levar a desmielinização pela interferência na perfusão tecidual, limitando o suprimento arterial e ocluindo a drenagem venosa, causando danos diretos à mielina e axônio, e nestes casos, ocasionando disfunção neurológica, sem lesão anatômica (Anthes, Theriault *et al.*, 1995; Olby, 2010). Além disso, a compressão crônica pode levar a desmielinização parcial devido a perda de lamelas de mielina (Fish e Blakemore, 1983).

O modelo experimental de desmielinização pelo brometo de etídio (BE) tem sido utilizado a fim de avaliar os eventos relacionados à desmielinização e remielinização, em diferentes locais do sistema nervoso, como no tronco encefálico (Graca, Bondan *et al.*, 2001; Bondan, Lallo *et al.*, 2002; Bondan, Lallo *et al.*, 2006; Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). Este modelo mimetiza mudanças enzimáticas e celulares que podem ocorrer em doenças que promovam a destruição das bainhas de mielina dos axônios, tal como a esclerose múltipla em seres humanos e a cinomose em cães (Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006; Orsini, Bondan *et al.*, 2007).

Estudos experimentais e casos clínicos de pacientes com EM relataram perdas na neurotransmissão, resultando em déficits de cognição e de armazenamento de informações (Guimaraes e Sa, 2012; Jongen, Ter Horst *et al.*, 2012; Rendell, Henry *et al.*, 2012), aumento nos sintomas de ansiedade e depressão (Anhoque, Domingues *et al.*, 2011) e, especialmente, dificuldades nas atividades locomotoras (Pelissier, Benaim *et al.*, 2001; Fulk, 2005; Giesser, Beres-Jones *et al.*, 2007).

Vários estudos têm sido realizados com o modelo de desmielinização pelo brometo de etídio na atividade de várias enzimas incluindo a acetilcolinesterase (AChE) (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Spanevello, Mazzanti *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009; Spanevello, Mazzanti *et al.*, 2009). A AChE possui um papel

regulatório na neurotransmissão colinérgica, sendo responsável pela hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Massoulie, Pezzementi *et al.*, 1993). A AChE está distribuída no SNC, sendo também encontrada em eritrócitos, linfócitos e plaquetas de mamíferos. A butirilcolinesterase (BChE) é encontrada na substância branca do encéfalo, sistema vascular, respiratório, digestório, urogenital e também em certas glândulas endócrinas e exócrinas (Kutty, 1980; Whittaker, 1980). Em adição, estudos recentes têm demonstrado o papel desempenhado pelas colinesterases como moduladores do processo inflamatório (Rao, Sridhar *et al.*, 2007).

Há evidências substanciais de que o estresse oxidativo é um causador, ou pelo menos um fator auxiliar na patogenia das principais doenças neurodegenerativas (Uttara, Singh *et al.*, 2009; Ferretti e Bacchetti, 2011; Oliveira, Kallaur *et al.*, 2012). As espécies reativas de oxigênio (EROs) são implicadas como mediadores de desmielinização e dano axonal na EM, pelos níveis locais de EROs que aumentam drasticamente em condições inflamatórias e esgotam o potencial de defesa antioxidante no interior das lesões, gerado principalmente por macrófagos ativados e microglia (Van Meeteren, Teunissen *et al.*, 2005; Van Horssen, Witte *et al.*, 2006).

Recentemente, os produtos naturais na dieta têm ganhado significativa atenção como possíveis candidatos terapêuticos para a neurodegeneração (Linseman, 2009). Dentre estes pode-se destacar a quercetina, que possui ação mais potente, que outros antioxidantes naturais, como a vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -carotenos (Rice-Evans, Miller *et al.*, 1996). Tem sido relatada, a ação citoprotetora em diferentes modelos pró-oxidantes de morte apoptótica (Dajas, Rivera-Megret *et al.*, 2003). Os principais efeitos da quercetina são devidos às suas propriedades antioxidantes, reduzindo diretamente os radicais livres, inibindo a xantina oxidase e a peroxidação lipídica (Plumb, Price *et al.*, 1999; Fiorani, De Sanctis *et al.*, 2001).

Considerando a importância das doenças desmielinizantes em humanos e animais e as propriedades benéficas dos flavonoides, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da quercetina na atividade das colinesterases, nos testes comportamentais e no perfil oxidativo de ratos submetidos ao modelo experimental de desmielinização pelo BE no encéfalo. Além disso, buscou-se identificar e caracterizar a subluxação atlantoaxial em cães atendidos no hospital veterinário universitário. O

estudo dos mecanismos patofisiológicos nos eventos de desmielinização é de fundamental importância na busca de terapias alternativas mais efetivas que beneficiem pacientes com estas doenças neurológicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Células gliais e bainha de mielina

A produção da bainha de mielina no SNC e SNP é realizada pelas células oligodendrócitos e células de Schwann, respectivamente. A mielinização permite a transmissão do impulso nervoso de forma rápida e eficiente, sendo capaz de integrar funções sensoriais, motoras e cognitivas (Lazzarini, 2004; Purves, 2005). A desmielinização se refere ao processo de remoção das bainhas de mielina previamente formadas (Franklin, 2002).

A desmielinização pode ser primária, quando a desmielinização ocorre pela instabilidade ou dano na célula mielinogênica (oligodendrócito e célula de Schwann) ou na própria bainha de mielina, com preservação dos axônios, ou secundária, quando ocorre subsequente à degeneração axonal (Pereira, Dertkigil *et al.*, 1998). Já a remielinização ocorre pela reconstrução das bainhas de mielina perdidas no SNC e pode ser efetuado pelas células precursoras de oligodendrócitos, as quais se diferenciam em oligodendrócitos maduros ocupando a área desmielinizada, sendo este um evento importante para evitar um processo de degeneração axonal (Stangel e Hartung, 2002; Zhao, Fancy *et al.*, 2005). A remielinização também ocorre pela invasão das células de Schwann ao SNC, quando os astrócitos desaparecem (Graca e Blakemore, 1986).

Os astrócitos caracterizam-se pela presença de prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina (VIM), que servem como meio de identificação desse tipo celular em estudos imuno-histoquímicos (Bondan, Lallo *et al.*, 2003). A VIM é encontrada nos astrócitos jovens ou reativos (Bondan, Lallo *et al.*, 2002). O reparo no SNC é sempre realizado com a participação dos astrócitos, independentemente da causa da lesão. Uma reação que inclui o aumento de seu número (astrocitose) e de suas dimensões (astrogliose), com conseqüente aumento da intensidade de marcação de GFAP. Estes fenômenos têm sido referidos como gliose astrocitária, cicatriz glial ou mesmo gliose reativa (Montgomery, 1994).



## **2.2 Doenças desmielinizantes do sistema nervoso central**

As doenças desmielinizantes são uma grave consequência da destruição das bainhas de mielina presentes no SNC e SNP (Siegel, 1999). Tais alterações prejudicam a transmissão do impulso nervoso, levando ao aparecimento de sinais neurológicos (Kipp, Van Der Valk *et al.*, 2012). Uma variedade de eventos patológicos incluindo as reações autoimunes, as intoxicações, as desordens metabólicas, as infecções virais e o trauma mecânico podem afetar tanto as células formadoras de mielina quanto os próprios neurônios (Siegel, 1999).

Dentre as várias doenças que cursam com desmielinização no SNC destacam-se a cinomose dos cães e a EM em humanos (Bennet, 1997; Kipp, Van Der Valk *et al.*, 2012), sendo que os mecanismos patogênicos de muitas destas condições são pouco compreendidos (Mcmartin, Horrocks *et al.*, 1972; Vandeveld, Bichsel *et al.*, 1983; Rudd, Cattaneo *et al.*, 2006; Orsini, Bondan *et al.*, 2007). Em adição, o vírus da cinomose foi muito utilizado como modelo experimental para a EM (Vandeveld, Bichsel *et al.*, 1983; Schobesberger, Zurbriggen *et al.*, 2002). Além disso, a compressão contínua da medula espinhal, como ocorre na subluxação atlantoaxial, também pode levar a desmielinização pela interferência na perfusão tecidual (Anthes, Theriault *et al.*, 1995; Olby, 2010) ou pela pressão direta a mielina (Fish e Blakemore, 1983).

### **2.2.1 Esclerose múltipla**

A EM é uma doença desmielinizante do SNC, sendo considerada atualmente uma das causas mais comuns da incapacidade neurológica crônica em adultos jovens, pois acomete pessoas entre 20 e 40 anos, sendo a incidência maior em mulheres e em indivíduos de cor branca (Moreira, Felipe *et al.*, 2000; Reipert, 2004). A EM é caracterizada pela localização de múltiplas placas de desmielinização na substância branca encefálica e medular (Minguetti, 2001). Estas lesões levam a deficiência ou perda completa dos impulsos nervosos causando assim sinais e sintomas intermitentes

que, com a evolução da doença podem agravar-se progressivamente (Moreira, Felipe *et al.*, 2000; Reipert, 2004).

A apresentação inicial da EM, na maioria dos pacientes, ocorre pela forma surto-remissão (SR), caracterizada por episódios de desmielinização (surto) com consequentes deficiências neurológicas, seguidos por episódios de remielinização (remissão) com desaparecimento dos sinais clínicos (Reipert, 2004). Com o passar do tempo e progresso da doença, a remielinização torna-se menos frequente e a forma SR transforma-se na forma progressiva secundária, no qual ocorre o comprometimento axonal levando a um aumento irreversível dos sinais neurológicos (Moreira, Felipe *et al.*, 2000; Bjartmar, Wujek *et al.*, 2003). No entanto, alguns pacientes manifestam sintomas e sinais neurológicos progressivos desde o início da doença, caracterizando a forma progressiva primária da EM (Reipert, 2004).

A causa da EM não é conhecida até o momento. Acredita-se que seja uma doença autoimune, no qual um indivíduo apresenta predisposição genética e que ao ser exposto a algum fator ambiental (p.ex. infecções virais) pode desencadear um processo autodestrutivo mediado por linfócitos T contra a bainha de mielina e os oligodendrócitos do SNC (Lassmann, 1998; Kornek e Lassmann, 2003).

### **2.2.2 Cinomose**

O vírus da cinomose, um morbilivírus da família *Paramixoviridae*, além de causar alterações neurológicas desmielinizantes, acomete também os sistemas respiratório e gastrointestinal de cães de todas as idades (Amude, Alfieri *et al.*, 2007). Apresenta alta morbidade e mortalidade e o óbito dos animais se relaciona principalmente à infecção do SNC pelo vírus (Rudd, Cattaneo *et al.*, 2006; Orsini, Bondan *et al.*, 2007).

As alterações neurológicas observadas nas infecções pelo vírus da cinomose se devem à desmielinização do encéfalo e da medula espinhal em cães (Amude, Alfieri *et al.*, 2007). O mecanismo exato pelo qual o vírus da cinomose penetra e se dispersa pelo SNC e a forma pela qual as lesões desmielinizantes são geradas, continua sendo objeto de investigação (Mcmartin, Horrocks *et al.*, 1972; Vandeveld, Bichsel *et al.*, 1983; Rudd, Cattaneo *et al.*, 2006; Orsini, Bondan *et al.*, 2007). Acredita-se que o vírus

da cinomose adentra o tecido nervoso por meio de células mononucleares infectadas vindas da circulação sistêmica (Vandeveld e Zurbriggen, 2005; Orsini, Bondan *et al.*, 2007). Na fase inicial da infecção, a desmielinização é associada com a replicação viral na substância branca e em lesões agudas desmielinizantes há diminuição na regulação da transcrição de mielina e comprometimento metabólico das células produtoras de mielina (Vandeveld, Bichsel *et al.*, 1983; Vandeveld e Zurbriggen, 2005; Orsini, Bondan *et al.*, 2007), mas não há nenhuma evidência de que essas células estão em apoptose ou necrose (Mcmartin, Horrocks *et al.*, 1972; Amude, Alfieri *et al.*, 2007).

### **2.2.3 Trauma medular**

As doenças traumáticas compressivas de cães podem levar a desmielinização da medula espinhal, tais como a doença do disco intervertebral (Olby, 2010), espondilomielopatia caudal cervical (Da Costa, 2010) e subluxação atlantoaxial (Watson, De Lahunta *et al.*, 1988). Os eventos que ocorrem na lesão da medula espinhal são geralmente divididos em primários e secundários (Olby, 2010), tendo como resultado a ruptura física da membrana celular, causando hemorragia e isquemia, com conseqüente lesão neuronal e glial generalizada (Janssens, 1991; Bergman R, 2000). A lesão traumática primária desencadeia uma série de eventos secundários, como a formação de uma zona de destruição tecidual, que inclui: hemorragia e destruição do leito microvascular, repentinas mudanças na concentração intracelular do íon, excitotoxicidade, produção de radicais livres e inflamação (Sharma, Olsson *et al.*, 1995). Nos casos de compressão contínua à medula espinhal como aquelas causadas por material de disco intervertebral, deslocamento ou fragmentos vertebrais, tal como na subluxação atlantoaxial, e hematomas epidurais podem afetar a perfusão da medula espinhal, limitando o suprimento arterial e ocluindo a drenagem venosa, causando danos diretos à mielina e axônio, e nestes casos, ocasionar disfunção neurológica, sem lesão anatômica, devido à desmielinização (Anthes, Theriault *et al.*, 1995; Olby, 2010).

### 2.3 Modelo experimental de desmielinização pelo BE

Diferentes modelos experimentais de desmielinização estão sendo utilizados para estudar estratégias terapêuticas nos eventos de desmielinização e remielinização (Altmann & Boyton, 2004), entre eles podemos citar a indução de reações imunológicas contra componentes mielínicos (Reynolds et al., 1996; Gold et al., 2000; Buddeberg et al., 2004), a inoculação viral (Kelly et al., 1982), o uso de pressão mecânica sobre a mielina e a administração de substâncias tóxicas como o cuprizone (Stangel & Hartung, 2002; Yu et al., 2004), a lisolecitina (Lovas et al., 2000) e o brometo de etídio (BE) (Bondan et al., 2000; Riet-Correa et al., 2002; Guazzo, 2005).

Os modelos experimentais utilizando o BE, uma substância intercalante gliotóxica, têm sido utilizados a fim de induzir desmielinização focal no SNC, com posterior remielinização (Yajima e Suzuki, 1979; Graca, Bondan *et al.*, 2001; Bondan, Lallo *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009; Ramos, Maiorka *et al.*, 2009), permitindo a realização de pesquisas sobre a capacidade regenerativa deste tecido (Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação do BE consiste em alterar o DNA mitocondrial levando a uma respiração anormal da célula com consequente necrose (Baumann e Pham-Dinh, 2001). Após, observa-se o desaparecimento oligodendroglial e astrocitário, com perda das bainhas de mielina, ruptura da membrana limitante glial e da barreira hematoencefálica. O BE induz a ausência dos processos astrocitários em muitas áreas de lesão, permitindo a entrada de linfócitos, de células meníngeas infiltrantes e de células de Schwann, as últimas contribuindo para o reparo mielínico central (Bondan, Lallo *et al.*, 2006; Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006).

O BE tem sido utilizado em diferentes locais do sistema nervoso, a fim de avaliar os eventos relacionados à desmielinização e remielinização, tais como tronco encefálico (Graca, Bondan *et al.*, 2001; Bondan, Lallo *et al.*, 2002; Bondan, Lallo *et al.*, 2006; Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009), nervo ciático (Riet-Correa, Fernandes *et al.*, 2002; Ramos, Maiorka *et al.*, 2009), medula espinhal (Fushimi e Shirabe, 2002; 2004) e nervo óptico (Guazzo, 2005).

No modelo experimental do BE, pode ocorrer completa remielinização da medula espinhal devido às células de Schwann (Graca e Blakemore, 1986). A remielinização no tronco encefálico é incompleta e associada à formação de cavidades císticas multiloculares (Bondan, Lallo *et al.*, 2000). A presença de células de Schwann nas raízes nervosas e nos nervos meníngeos associados ao menor número de astrócitos na medula espinhal são responsáveis pela diferença de resposta de remielinização (Frost, Milner *et al.*, 2000).

A injeção intracisternal de BE causa mudanças degenerativas nos oligodendrócitos e astrócitos nas análises histológicas após 48-72 horas da indução (Yajima e Suzuki, 1979; Bondan, Lallo *et al.*, 2002), apresentando infiltração de macrófagos e ausência de células GFAP positivas (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). Entre o sexto e o décimo dia após a intoxicação de BE a desmielinização está completa (Yajima e Suzuki, 1979; Levine e Reynolds, 1999; Bondan, Lallo *et al.*, 2002). Marcador de mielina foi observado 12 a 15 dias após a intoxicação (Yajima e Suzuki, 1979; Levine e Reynolds, 1999; Graca, Bondan *et al.*, 2001; Bondan, Lallo *et al.*, 2002; Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006), sendo que aos 21 dias após a intoxicação pelo BE, a remielinização encontra-se em um estágio bastante avançado (Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006), demonstrando algumas áreas císticas e processos astrocitários reativos (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). O modelo experimental do BE consiste em uma ferramenta importante para a compreensão dos mecanismos patogênicos de muitas doenças desmielinizantes que, atualmente, são pouco compreendidas (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009; Nassar, Bondan *et al.*, 2009).

Estudos com modelos experimentais de EM e casos clínicos de pacientes relataram prejuízos na neurotransmissão, resultando em déficits de cognição e de armazenamento de informações (Guimaraes e Sa, 2012; Jongen, Ter Horst *et al.*, 2012; Rendell, Henry *et al.*, 2012), aumento nos sintomas de ansiedade e depressão (Anhoque, Domingues *et al.*, 2011) e, especialmente, dificuldades nas atividades locomotoras (Pelissier, Benaim *et al.*, 2001; Fulk, 2005; Giesser, Beres-Jones *et al.*, 2007). Também foi relatado que os antioxidantes naturais, tais como a vitamina E, foi

capaz de prevenir as alterações causadas pelo brometo de etídio (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009).

## 2.4 Flavonoide quercetina

O termo flavonoide é derivado do latim *flavus* que significa amarelo e recebeu este nome por ter sido encontrado originalmente em alimentos de coloração amarelada (Cotelle, 2001). Atualmente, já foi encontrado em alimentos de diversas cores, tais como: vegetais, frutas, sucos e chás (Rice-Evans, Miller *et al.*, 1996; Hollman e Katan, 1999; Cotelle, 2001). Estas substâncias agem nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atrativos visuais, repelentes e como fonte de energia (Pietta, 2000).

Os flavonoides são substâncias fenólicas formados nas plantas pela combinação dos aminoácidos fenilalanina e tirosina com unidades acetato, sendo que existem mais de 8.000 compostos conhecidos como flavonoides, já classificados em seis grupos que são: flavononas, flavonas, flavonóis, isoflavonóides, antocianinas e flavans (Pietta, 2000; Cotelle, 2001). Os flavonoides representam um importante componente da dieta humana (Rice-Evans, Miller *et al.*, 1996; Hollman e Katan, 1999).

Os compostos fenólicos exercem efeitos positivos em doenças crônicas, como por exemplo, afecções neurodegenerativas. Os principais benefícios fisiológicos dos flavonoides têm sido atribuídos às suas propriedades antioxidantes, de eliminação de radicais livres, antibacteriana, anti-inflamatória, antialérgica, antiviral, anti-tumor, anti-isquêmica e vasodilatadora (Lee, Suh *et al.*, 2000; Pietta, 2000; Morimoto, Yasuhara *et al.*, 2003; Pilorget, Berthet *et al.*, 2003; Kim, Son *et al.*, 2004; Novakovic, Gojkovic-Bukarica *et al.*, 2006).

A ação neuroprotetora dos flavonoides foi testada em diversos modelos experimentais da doença de Parkinson, Alzheimer, na isquemia cerebral unilateral ou global e estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (Mandel, Avramovich-Tirosh *et al.*, 2005). Esta ação neuroprotetora pode ocorrer por alteração do metabolismo da glutatona, extinção de espécies reativas de oxigênio, inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  e manutenção dos níveis de ATP (Ishige, Schubert *et al.*, 2001).

A quercetina (3,3',4',5,7-pentaidroxiflavona – figura 1) é encontrada em frutas e vegetais, principalmente na cebola, brócolis, couve, maçã, Ginkgo biloba., chá e também no vinho tinto (Dajas, Rivera-Megret *et al.*, 2003). Quercetina pertence à família dos flavonóides e tem grupos fenólicos na sua estrutura que confere a capacidade antioxidante (Molina, Sanchez-Reus *et al.*, 2003; Lu, Zheng *et al.*, 2006). A quercetina apresenta a sua estrutura química três sítios de quelação de metais que competem entre si (Cornard, Dangleterre *et al.*, 2005).

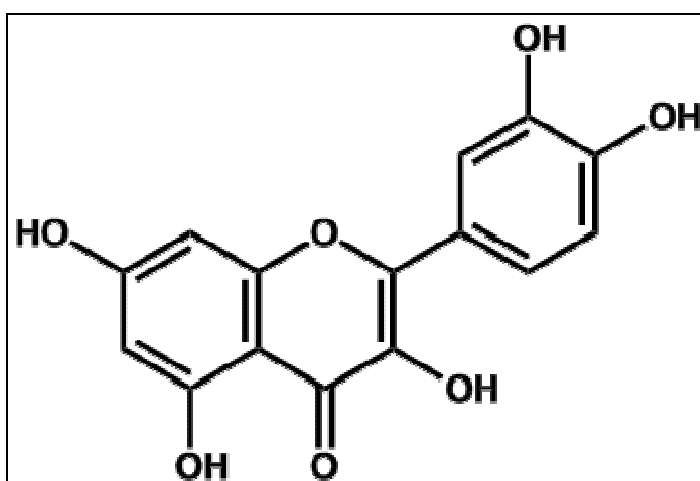


Figura 1 – Forma molecular da quercetina.

O consumo diário estimado de quercetina é em torno de 4 a 68 mg em uma dieta equilibrada (Hertog, Feskens *et al.*, 1993; Knekt, Jarvinen *et al.*, 1997). A toxicidade pela quercetina é bem tolerada, em torno de 1000 mg/dia (dose oral) ou de 756 mg/dia (via intravenosa) (Harwood, Danielewska-Nikiel *et al.*, 2007). Após sua absorção, a quercetina é distribuída em diferentes tecidos de ratos, tais como pulmões (maiores concentrações), rins e fígado (concentrações intermediárias) e, cérebro, tecido adiposo e baço (concentrações baixas) (De Boer, Dihal *et al.*, 2005).

A associação da quercetina com modelos experimentais para doenças neurodegenerativas vem sendo realizado devido suas propriedades terapêuticas neuroprotetoras (Chen, Chan *et al.*, 1996; Lu, Zheng *et al.*, 2006). Estudos relatam a capacidade neuroprotetora da quercetina em proteger culturas de neurônios do

hipocampo da excitotoxicidade induzida pelo  $\beta$ -amiloid (Ansari, Abdul *et al.*, 2009) e em modelo experimental da doença de Alzheimer (Huebbe, Wagner *et al.*, 2010).

A quercetina tem sido apontada como uma substância anti-inflamatória potente (Liu, Sun *et al.*, 2012; Wang, Wang *et al.*, 2012), uma vez que é capaz de regular a lipoxigenase e o metabolismo do ácido araquidônico durante a inflamação (Mirzoeva e Calder, 1996) e por inibir a ativação da fosfolipase A2, prostaglandina E2 e da ciclooxigenase-2 em processos inflamatórios (Lindahl e Tagesson, 1993; Gil, Sanz *et al.*, 1994). Além disso, a quercetina pode quelar íons metálicos de transição, incluindo o ferro, assim prevenindo a ferro-catálise na reação de Fenton (Ferrali, Signorini *et al.*, 2000). Em modelos animais, a quercetina apresentou o efeito de proteger a memória contra danos causados pela D-galactose, assim como da isquemia cerebral (Lu, Zheng *et al.*, 2006; Pu, Mishima *et al.*, 2007).

## 2.5 Atividade das colinesterases

As colinesterases são classificadas de acordo com sua sensibilidade a inibidores, distribuição tecidual, propriedades catalíticas e especificidade aos substratos (Chatonnet e Lockridge, 1989). A AChE (E.C. 3.1.1.7) hidrolisa preferencialmente ésteres com grupamento acetil (como a ACh), enquanto que a BChE (E.C. 3.1.8) hidrolisa outros tipos de ésteres como a butirilcolina (Chatonnet e Lockridge, 1989). A AChE é predominantemente encontrada no SNC, junção neuromuscular e eritrócitos (Grisaru, Sternfeld *et al.*, 1999). Já a BChE é principalmente encontrada no plasma, rins, fígado, intestino, coração, pulmão e tem uma distribuição neuronal muito mais restrita do que a AChE (Mesulam, Guillozet *et al.*, 2002).

O neurotransmissor ACh é rapidamente hidrolisado pela AChE tanto na sinapse colinérgica quanto na junção neuromuscular, finalizando, deste modo, a transmissão do impulso nervoso (Grisaru, Sternfeld *et al.*, 1999). Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica, a AChE tem um potente efeito na adesão celular (Johnson e Moore, 1999), no crescimento dos neuritos (Day e Greenfield, 2002), participa na regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, na osteogênese e também foi proposta a atividade hematopoiética pela presença desta enzima em células



progenitoras do sangue (Soreq e Seidman, 2001). Além disso, a AChE já foi localizada e identificada nos linfócitos onde provavelmente apresenta um papel importante na regulação de funções imunes (Kawashima e Fujii, 2000). Por todos esses fatores, uma inibição desta enzima pode ter grande consequências no cérebro e em outros órgãos (Mesulam, Guillozet *et al.*, 2002).

A secreção de AChE no SNC tem sido encontrada no hipotálamo, substância nigra, estriado, hipocampo, cerebelo, além do fluido cerebrospinal (Paxinos, 1985). Esta enzima é secretada de ambos os terminais axonais dos neurônios, sendo esta taxa de secreção modulada pela estimulação neuronal, nível de neurotransmissor na fenda sináptica e pelo tratamento com fármacos (Descarries, Gisiger *et al.*, 1997). Por ser uma das mais eficientes e conhecidas catálises biológicas, a AChE tem sido investigada como um importante alvo terapêutico em várias doenças neurodegenerativas (Appleyard, 1994; Das, Dikshit *et al.*, 2001). Estudos com ratos desmielinizados experimentalmente pelo brometo de etídio (BE) demonstraram uma redução na atividade da AChE, tanto na ponte como em diferentes estruturas cerebrais (Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009).

A BChE é expressa por distintas populações de neurônios, é um co-regulador da neurotransmissão colinérgica (Darvesh, Grantham *et al.*, 1998) e parece estar envolvida em alguns aspectos do desenvolvimento do sistema nervoso (Kostovic e Goldman-Rakic, 1983). Assim, esta enzima parece agora estar ganhando reconhecimento por seu possível papel em funções fisiológicas normais e seu envolvimento em patologias do SNC (Darvesh, Hopkins *et al.*, 2003). Um indício para isso, é que as propriedades bioquímicas da BChE estão alteradas, principalmente no hipocampo e córtex, nas doenças neurodegenerativas (Darreh-Shori, Brimijoin *et al.*, 2006).

Vários estudos tem demonstrado que a ACh, o principal neurotransmissor do nervo vago, tem importantes ações anti-inflamatórias (Das, 2007; Rao, Sridhar *et al.*, 2007; Rosas-Ballina e Tracey, 2009). No entanto a ACh, bem como outros ésteres de colina são rapidamente hidrolisados pela AChE e BChE (Mesulam, Guillozet *et al.*, 2002). Um aumento nas atividades das enzimas AChE e BChE poderia levar à

diminuição nos níveis de ACh, reduzindo seus efeitos anti-inflamatórios, devido à ausência do controle de feedback negativo exercido pela ACh (Rao, Sridhar *et al.*, 2007). Dessa forma, considerando o efeito anti-inflamatório da ACh, é concebível que as atividades das enzimas AChE e BChE sejam reguladoras intrínsecas da inflamação (Das, 2007; Rosas-Ballina e Tracey, 2009).

## 2.6 Perfil Oxidativo

O radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Essa configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meia vida relativamente curta e quimicamente muito reativas. O radical livre mais simples é o átomo de hidrogênio, pois o mesmo tem apenas um elétron que é, portanto, desemparelhado (Halliwell, 2001).

O estresse oxidativo é definido como o excesso de formação e/ou remoção insuficiente de moléculas reativas, tais como: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Sies, 1993; Turko, Marcondes *et al.*, 2001; Maritim, Sanders *et al.*, 2003). Durante a redução do oxigênio molecular, EROs são formadas e existe a necessidade permanente de inativar estes radicais livres. Os danos induzidos por esses podem afetar muitas moléculas biológicas, incluindo o DNA, o RNA, os lipídios, as proteínas e os carboidratos (Turko, Marcondes *et al.*, 2001).

As EROs incluem radicais livres, como: superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxil (OH), peróxil ( $RO_2$ ), hidroperóxil ( $HRO_2^{\cdot}$ ), assim como espécies não radicalares, que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados são muito instáveis, como por exemplo: peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ácido hipocloroso (HOCl). As ERNs incluem radicais livres como o óxido nítrico (ON) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\cdot}$ ), assim como espécies não radicalares, por exemplo: peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), óxido nitroso ( $HNO_2$ ) e peroxinitrato (RONOO) (Turko, Marcondes *et al.*, 2001; Evans, Goldfine *et al.*, 2002).

A peroxidação lipídica é considerada um evento fisiopatológico importante no estudo de substâncias farmacológicas em diversas doenças neurodegenerativas, em danos isquêmicos e traumáticos (Braugher, Pregenzer *et al.*, 1987; Mossberg, Movitz

*et al.*, 2009). Assim, o excesso ou acúmulo de EROs e ERNs no organismo, além de iniciar a peroxidação das membranas lipídicas (permitindo o acúmulo de peróxidos de lipídios), também pode prejudicar as proteínas e o DNA celular, acelerando processos como o envelhecimento e o câncer (Chen, Chan *et al.*, 1996; Halliwell, 2001).

O SNC é um tecido que consiste substancialmente de membranas e ácidos graxos, o que aumenta a vulnerabilidade dos constituintes da membrana lipídica aos danos oxidativos e a ação direta dos radicais livres (Van Meeteren, Teunissen *et al.*, 2005; Van Horssen, Witte *et al.*, 2006). Este processo ocorre em diferentes condições neurotóxicas e/ou neurodegenerativas, e em grau bem menor nas atividades fisiológicas normais dos circuitos neurais. Os radicais livres podem modificar a produção e o reaproveitamento de neurotransmissores, a atividade dos canais de íons, e a função de diversos transportadores de substâncias para a célula e mitocôndrias, além dos receptores de superfície (Mattson, 1998).

A remoção dos radicais livres do organismo ocorre a partir de mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos. O conjunto enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1), a catalase (CAT, E.C.1.11.1.6), a glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C.1.11.1.9) e a glutathiona redutase (GR, E.C.1.6.4.2). Os processos não-enzimáticos incluem a glutathiona tripeptídeo (GSH) e as vitaminas A, C e E (Sies, 1997). A ausência ou falha na defesa antioxidante permite uma ação mais intensa da peroxidação lipídica, podendo acelerar suas reações prejudiciais à célula (Rao, Rao *et al.*, 2000).

As enzimas antioxidantes, CAT e SOD, constituem um importante sistema de defesa no combate às EROs in vivo. Apesar de quase todos os organismos possuírem defesa antioxidante e sistemas de reparo que são designados a protegê-los dos danos oxidativos, esses sistemas, muitas vezes, são insuficientes para prevenir tal dano por si só (Madhavi, 1995), necessitando de substâncias que forcem suas atividades. Ainda, os níveis de CAT são baixos na maioria das regiões do encéfalo (no hipotálamo e na substância nigra são um pouco maiores do que no córtex e no cerebelo) (Halliwell, 2001).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Investigar o efeito da quercetina na atividade das colinesterases, nos testes neurológicos e no perfil oxidativo de ratos submetidos ao modelo experimental de desmielinização no encéfalo pelo brometo de etídio e realizar levantamento de dados sobre cães com diagnóstico de subluxação atlantoaxial.

#### **3.2. Objetivos específicos**

##### Artigo 1:

Este estudo teve como objetivo avaliar retrospectivamente os casos de subluxação atlantoaxial em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), entre os anos de 2003 e 2008, na busca de identificar os aspectos epidemiológicos (raça, sexo e idade), etiológicos, clínicos (sinais neurológico e duração dos sinais clínicos), terapêuticos (tratamento empregado e resposta ao tratamento) e prognósticos (tempo de recuperação, recidiva e a relação entre a duração dos sinais clínicos e o tempo de recuperação pós-operatória).

##### Manuscrito 1:

Investigar o efeito protetor da quercetina em prevenir alterações nos testes comportamentais, peroxidação lipídica e na neurotransmissão colinérgica em ratos submetidos ao modelo experimental de BE durante eventos de desmielinização e remielinização.

Manuscrito 2:

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da quercetina sobre parâmetros de estresse oxidativo no sangue, atividade das colinesterases no sangue e atividade da AChE em linfócitos de ratos submetidos ao modelo experimental de desmielinização pelo EB.

**4. Artigo 1**

TRABALHO PUBLICADO NA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA:

**SUBLUXAÇÃO ATLANTOAXIAL EM 14 CÃES (2003-2008)**

**Diego Vilibaldo Beckmann, Alexandre Mazzanti, Giancarlo Santini, Rosmarini Passos Dos Santos, Rafael Festugato, Charles R. Pelizzari, Dakir Polidoro Neto e Raquel Baumhardt**

## Subluxação atlantoaxial em 14 cães (2003-2008)<sup>1</sup>

Diego V. Beckmann<sup>2</sup>, Alexandre Mazzanti<sup>3\*</sup>, Giancarlo Santini<sup>2</sup>, Rosmarini P. Santos<sup>2</sup>, Rafael Festugato<sup>2</sup>, Charles R. Pelizzari<sup>2</sup>, Dakir Polidoro Neto<sup>4</sup> e Raquel Baumhardt<sup>4</sup>

**ABSTRACT.-** Beckmann D.V., Mazzanti A., Santini G., Santos R.P., Festugato R., Pelizzari C., Polidoro Neto D. & Baumhardt R. 2010. [Atlantoaxial subluxation in 14 dogs (2003-2008).] Subluxação atlantoaxial em 14 cães (2003-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(2):172-176. Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: alexamazza@yahoo.com.br

A retrospective study on atlantoaxial subluxation in dogs was done by reviewing the cases filed from 2003 to 2008 in the neurological records of the Veterinary Hospital of the Universidade Federal de Santa Maria, at Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The following data were identified: Breed, sex, age, etiology, clinical signs, duration of clinical course, assessment of the therapy employed and its efficacy, response to treatment and relapse. Fourteen dogs were diagnosed as affected by atlantoaxial subluxation and the condition was more frequent in dogs under twenty-four month old years and of toy breeds, such as Poodle (35.7%), Pinscher (21.4%) and Yorkshire terrier (21.4%). The main cause found for the instability was agenesis of the odontoid process. Clinical signs ranged from cranial cervical pain to non-ambulatory tetraparesis. The predominant treatment employed was surgical which demonstrated to be efficacious in 90% of the cases with minor risks of relapse when compared with clinical treatment. The predominant time of recovery was 30-60 days after surgery. No correlation was found between the duration of clinical signs before surgery and the time of recovery.

INDEX TERMS: Atlantoaxial instability, neurology, disease of dogs.

**RESUMO.-** O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo retrospectivo dos casos de subluxação atlantoaxial em cães, por meio de consulta dos registros neurológicos do Hospital Veterinário Universitário (HVU), entre os anos de 2003 e 2008. Foram identificados a raça, o sexo, a idade, a etiologia, os sinais neurológicos, a duração dos sinais clínicos, o tratamento empregado, a resposta ao tratamento, o tempo de recuperação, a recidiva e a relação entre a duração dos sinais clínicos e a recuperação pós-operatória. Foram feitos o diagnóstico de subluxação

atlantoaxial em 14 cães, sendo as raças Poodle (35,7%), Pinscher (21,4%) e Yorkshire Terrier (21,4%) as mais acometidas e a maioria (92,8%) com idade inferior a 24 meses. A principal causa da instabilidade foi a agenesia do processo odontoide do eixo (71,4%) e os sinais clínicos variaram desde hiperestesia cervical até tetraparesia não ambulatória. O tratamento predominante foi o cirúrgico, que demonstrou ser eficaz com recuperação satisfatória em 90% dos casos e menor possibilidade de recidiva, quando comparado ao tratamento clínico. O tempo de recuperação predominante foi de 30-60 dias após a cirurgia, não existindo relação deste com a duração dos sinais clínicos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Instabilidade atlantoaxial, neurologia, doenças de cães.

### INTRODUÇÃO

A subluxação atlantoaxial, também conhecida como instabilidade atlantoaxial, é uma afecção cuja causa princi-

<sup>1</sup> Recebido em 17 de julho de 2009.

Aceito para a publicação em 24 de janeiro de 2010.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Cirurgia, CCR, UFSM, RS

<sup>3</sup> Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. Autor para correspondência: alexamazza@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Curso de Medicina Veterinária, CCR, UFSM, Santa Maria, RS.

pal geralmente é congênita (Sturges 2009). Essa condição tem sido descrita em diferentes espécies, tais como ovinos, equinos, cervídeos, gatos e cães (Palmer 2002). Em cães, ocorre principalmente nos jovens de raças miniaturas (Beaver et al. 2000, Sturges 2009). De acordo com Sharp & Wheeler (2005), vários processos patológicos podem conduzir à doença, tais como agenesia ou hipoplasia do processo odontoide (ou dente), fratura ou separação do processo odontoide e deficiência de ligamentos (ausência ou ruptura).

Os sinais clínicos variam desde dor cervical à tetraplegia e morte por insuficiência respiratória e decorrem de compressão aguda ou crônica da medula espinhal (Platt et al. 2004). Ocasionalmente, podem ser encontrados sinais clínicos associados à lesão no tronco encefálico caudal como hipoventilação e síndrome vestibular (Sturges 2009). O diagnóstico definitivo é dado pela avaliação dos sinais neurológicos, que permite localizar a lesão no segmento cervical da medula espinhal (C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>), associada com técnicas de imagem da coluna vertebral cervical, principalmente radiografias nas posições látero-lateral e ventro-dorsal (Haid 2001, Havig et al. 2005, Sturges 2009). De acordo com Bynevelt et al. (2000), os exames de tomografia e ressonância magnética fornecem uma avaliação mais exata de alterações no processo odontoide do eixo.

O tratamento cirúrgico para a subluxação atlantoaxial está indicado para a permanente redução e estabilização da articulação com eliminação da compressão e prevenção do movimento vertebral (Shires 1998). O tratamento clínico inclui restrição de movimentos em gaiola, aplicação de colete cervical e uso de anti-inflamatórios (Havig et al. 2005).

Este estudo teve como objetivo avaliar retrospectivamente os casos de subluxação atlantoaxial em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), entre os anos de 2003 e 2008, na busca de identificar os aspectos epidemiológicos (raça, sexo e idade), etiológicos, clínicos (sinais neurológico e duração dos sinais clínicos), terapêuticos (tratamento empregado e resposta ao tratamento) e prognósticos (tempo de recuperação, recidiva e a relação entre a duração dos sinais clínicos e o tempo de recuperação pós-operatória).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram revisados todos os protocolos de atendimento dos casos de subluxação atlantoaxial de cães ocorridos entre janeiro de 2003 e dezembro de 2008 e arquivados no Setor de Arquivo do HVU-UFSM. Foram incluídos apenas os casos diagnosticados pelo Serviço de Neurologia dessa instituição. A confirmação dos casos foi obtida pelo exame neurológico que definiu o local da lesão (C1-C5), pelo estudo radiográfico simples em posição látero-lateral e ventro-dorsal (Shires 1998, Haid 2001, Lorigados et al. 2004) e, em alguns casos, durante o procedimento cirúrgico. Informações gerais sobre raça, sexo, idade, etiologia, sinais neurológicos, duração dos sinais clínicos, tratamento empregado, resposta ao tratamento, tempo de recuperação e recidiva foram revisadas e anotadas.

O exame neurológico, compreendido pela avaliação do estado mental, da locomoção, das reações posturais, dos nervos cranianos e dos reflexos segmentares espinhais e pela palpação epaxial, foi realizado em todos os cães. Foi atribuída uma classificação em graus, antes dos tratamentos clínico e cirúrgico, de acordo com os sinais neurológicos, como segue: Grau V - hiperestesia cervical com locomoção normal; Grau IV - ataxia; Grau III - tetraparesia ambulatória; Grau II - tetraparesia não ambulatória; e Grau I - tetraplegia (Platt et al. 2004). O exame radiográfico simples foi realizado em duas posições (ventro-dorsal e látero-lateral) com o cão sob anestesia geral com cuidados para se evitar compressão medular durante a intubação. A posição ventro-dorsal foi empregada para avaliar alterações no processo odontoide. A posição látero-lateral foi utilizada para observar a angulação do processo odontoide e o posicionamento do processo espinhoso do eixo em relação ao arco dorsal do atlas.

Os tratamentos avaliados foram: clínico (uso de anti-inflamatórios esteroidais ou não esteroidais [AINES], com ou sem restrição de movimentos em gaiola e com ou sem uso de colete cervical) ou cirúrgico (artrodesse atlantoaxial mediante cirurgia de estabilização com uso de pinos de Steinmann e resina acrílica auto-polimerizável) (Shires 1998, Sharp & Wheeler 2005).

Os proprietários dos cães foram contatados através de telefonemas para a obtenção do tempo de recuperação (caminhar sem quedas) após o procedimento cirúrgico e do retorno dos sinais clínicos (recidiva). A duração dos sinais clínicos antes da primeira consulta e o tempo de recuperação após o tratamento cirúrgico foi definido como: menor do que 30 dias; entre 30 e 60 dias e maior do que 60 dias.

O resultado do tratamento foi considerado satisfatório (cães com ausência de hiperestesia cervical e que voltaram a caminhar sem quedas), parcialmente satisfatório (cães com ausência de hiperestesia cervical e que voltaram a caminhar com auxílio) ou insatisfatório (cães sem melhora dos sinais clínicos neurológicos).

A duração dos sinais clínicos e o tempo de recuperação pós-operatório foram submetidos à análise estatística de correlação linear simples com nível de significância de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

**Composição da população estudada.** Durante o período estudado (2003-2008), foram observados 14 casos com diagnóstico de subluxação atlantoaxial, cujos resultados encontram-se no Quadro 1.

**Idade, raça e sexo.** A idade dos cães acometidos variou entre cinco e 60 meses e a média foi 16,9 meses ( $\pm 14,2$ ). Oito cães (57,2% dos casos) apresentaram a doença com menos de 12 meses de idade, cinco (35,7%) entre 12 e 24 meses e um (7,1%) acima de 24 meses de idade. As raças acometidas foram: Poodle (5/14 [35,7%]), Pinscher (3/14 [21,4%]), Yorkshire Terrier (3/14 [21,4%]) e Maltês (1/14 [7,1%]). Dois cães (14,3%) não tinham raça definida. A doença ocorreu em 10 fêmeas (71,4%) e quatro machos (28,6%).

**Etiologia.** As causas de subluxação atlantoaxial encontradas incluíram: agenesia do processo odontoide (10/14 [71,5%]), hipoplasia do processo odontoide (3/14 [21,4%]) e deslocamento dorsal do processo odontoide do eixo (1/14 [7,1%]).



**Quadro 1. Representação quanto à raça, sexo, idade, etiologia, sinais neurológicos, duração dos sinais clínicos, resposta ao tratamento e tempo de recuperação de 14 cães com subluxação atlantoaxial atendidos HVU-UFSM entre 2003 e 2008**

Raça/ano de atendimento	Sexo	Idade (meses)	Etiologia	Grau de disfunção neurológica	Duração dos sinais clínicos (dias)	Resposta ao tratamento	Tempo de recuperação (dias)
1. Poodle/2006	F	9	Agenesia	III	21	Satisfatória	43
2. Poodle/2006	F	9	Agenesia	II	37	Satisfatória	52
3. Poodle/2004	F	60	Agenesia	II	44	Satisfatória	42
4. Poodle/2004	F	24	Agenesia	III	26	Satisfatória	33
5. Poodle/2003	F	24	Agenesia	III	38	Morte	-
6. Yorkshire/2003	F	9	Agenesia	III	18	Satisfatória	74
7. Yorkshire/2005	F	21	Agenesia	III	34	Satisfatória	62
8. Yorkshire/2006	M	7	Agenesia	V	66	Satisfatória	15
9. Pinscher/2005	F	7	Agenesia	III	33	Satisfatória	39
10. Pinscher/2005	M	20	Hipoplasia	IV	56	Morte	-
11. SRD/2007	F	7	Hipoplasia	II	42	Parcialmente satisfatória	90
12. SRD/2005	M	17	DDDA	III	53	Satisfatória	23
13. Maltês/2008	F	5	Agenesia	III	24	Satisfatória	21
14. Pinscher/2008	M	11	Hipoplasia	IV	210	**	**

M: macho; F: fêmea; SRD: sem raça definida; DDDA: Deslocamento dorsal do processo odontoide do eixo.

\* Animal submetido ao tratamento clínico, conforme recomendações de Sharp & Wheeler (2005).

\*\* Cão sem tratamento por opção do proprietário.

**Sinais neurológicos.** Os sinais clínicos variaram de hiperestesia cervical à tetraparesia não ambulatória. Todos os cães apresentavam hiperestesia cervical pelo teste de movimentação do pescoço em flexão, extensão e lateralidade durante o fornecimento de alimentos. Quanto ao grau de disfunção neurológica, foi verificado: Grau V (1/14 [7,1%]), Grau IV ([2/14] 14,3%), Grau III (8/14 [57,1%]) e Grau II (3/14 [21,5%]).

**Duração dos sinais clínicos.** A duração dos sinais clínicos antes da primeira consulta foi: <30 dias em quatro cães (28,6%), entre 30 e 60 dias em oito cães (57,1%) e >60 dias, em dois cães (14,3%), sendo a média de 48,9 dias ( $\pm$  49,3) e a variação de 21-210 dias.

**Tratamentos.** Um cão (n<sup>o</sup>8) com apenas dor cervical (Grau V) foi submetido ao tratamento clínico composto por AINES, repouso em gaiola e colete cervical. Uma cadela (n<sup>o</sup>13) que apresentava tetraparesia ambulatória (Grau III) foi submetida ao mesmo tratamento clínico. Em um cão (n<sup>o</sup>14) que se encontrava em Grau IV não foi feito nenhum tratamento por opção do proprietário. Nos demais 11 cães submetidos ao tratamento cirúrgico de estabilização da articulação atlantoaxial, dois (n<sup>o</sup>5 e 10) morreram durante a cirurgia e as necropsias revelaram agenesia e hipoplasia do processo odontoide, respectivamente.

**Resposta aos tratamentos.** Nos dois cães submetidos ao tratamento clínico, em um (n<sup>o</sup>8) a resposta foi considerada insatisfatória decorridos 30 dias, optando-se pela artrodese atlanto-axial. Na cadela (n<sup>o</sup>13), após 27 dias de terapia conservativa, a recuperação foi considerada satisfatória. Dos cães submetidos ao tratamento cirúrgico e com acompanhamento pós-operatório (n=10), foi observado que nove (90%) tiveram recuperação satisfatória e um (n<sup>o</sup>11) teve a recuperação considerada parcialmente satisfatória.

**Tempo de recuperação e recidiva.** O tempo de recu-

peração no tratamento cirúrgico foi o seguinte: <30 dias em dois cães (20%), entre 30 e 60 dias em cinco cães (50%) e >60 dias em três cães (30%), sendo a média de 47,3 dias ( $\pm$  22,9). O tempo de recuperação no único caso de tratamento clínico foi inferior a 30 dias. Não houve diferença significativa entre a duração dos sinais clínicos e o tempo de recuperação pós-operatória. Em nenhum dos cães avaliados foi observada recidiva dos sinais neurológicos.

## DISCUSSÃO

Neste estudo, as raças Poodle, Pinscher e Yorkshire Terrier foram as mais acometidas por subluxação atlantoaxial e a maioria (92,8%) com idade igual ou inferior a 24 meses. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por outros autores (Beaver et al. 2000, Lorigados et al. 2004, Havig et al. 2005, Sturges 2009), que comentaram também a ocorrência da doença em raças de grande porte. Assim, deve-se salientar a importância da suspeita clínica de subluxação atlantoaxial em cães das raças de pequeno porte, com menos de dois anos de idade e que apresentam hiperestesia cervical.

A maioria dos cães deste estudo apresentou doenças congênitas como causa da subluxação atlantoaxial e a agenesia do processo odontoide foi mais frequente que a hipoplasia (71,5% *versus* 21,4%) e o deslocamento dorsal (71,5% *versus* 7,1%). Foi descrito por Braund (1994), que a subluxação atlantoaxial pode ter algum fator hereditário envolvido em linhagens de cães de raças miniaturas na qual a anomalia congênita é comum, principalmente em cães jovens. Por outro lado, Beaver et al. (2000) salientaram que as causas traumáticas podem ocorrer em qualquer raça e idade.

Em apenas um caso, uma cadela com cinco anos de idade apresentando tetraparesia não ambulatória (n<sup>o</sup>3), foi registrado histórico de trauma e, ao observar a radiografia

ventro-dorsal, pode-se constatar a agenesia do processo odontoide. Em teoria, por se tratar de etiologia congênita, os sinais clínicos deveriam ser manifestos ainda quando filhotes (<12 meses). Assim, este achado, por nós considerado atípico, serve de alerta aos clínicos para a ocorrência da doença também em cães adultos. Para alguns autores (Sturges 2009), a maioria dos casos de subluxação atlantoaxial ocorre em cães acima de um ano. A maneira de viver da paciente, sob restrição de movimento, revelado no histórico clínico, pode justificar a não ocorrência desta doença precocemente. Para Lorenz & Kornegay (2006), alguns cães podem não demonstrar sinais clínicos devido ao suporte vertebral adequado de outras estruturas fibrosas e musculares, que evitam a subluxação, sendo que, o menor trauma pode resultar em subluxação do processo odontoide do eixo, compressão da medula espinhal e alteração neurológica (Havig et al. 2005).

A subluxação atlantoaxial foi evidente em exame radiográfico nas incidências látero-lateral (com o cão em posição neutra) e em posição ventro-dorsal (com o tubo endotraqueal removido), para uma avaliação completa do processo odontoide do eixo (Bynevelt et al. 2000). O diagnóstico de deslocamento dorsal do processo odontoide foi dado através de radiografia simples látero-lateral e confirmado durante o procedimento cirúrgico. Este achado provavelmente ocorreu pela ausência ou ruptura do ligamento transversal do eixo.

De acordo com Shires (1998), cães de ambos os sexos podem ser afetados pela subluxação atlantoaxial, entretanto, conforme outro estudo, realizado por Lorigados et al. (2004), fêmeas são mais acometidas. Os casos aqui descritos afetaram predominantemente fêmeas; mas pelo pequeno número de cães aqui descritos, não se pode concluir estatisticamente quanto à predisposição sexual.

A variação dos sinais clínicos observada neste estudo se deve aos diferentes níveis de compressão da medula espinhal, sendo a hiperestesia cervical, a ataxia proprioceptiva (inicialmente mais evidente nos membros pélvicos) e a deficiência proprioceptiva as mais encontradas em casos brandos de compressão medular. Já a tetraplegia raramente é verificada, pois, segundo Sharp & Wheeler (2005), uma lesão na medula espinhal desta gravidade geralmente conduz à deficiência respiratória e morte. Em um cão (nº14) que se encontrava em Grau IV, o proprietário notou locomoção diferente, caracterizada por ataxia proprioceptiva nos quatro membros desde os sete meses de idade. Neste caso, o diagnóstico da doença foi determinado durante uma consulta clínica por outro motivo. Deve-se salientar a importância do exame da locomoção em pacientes com suspeita de doenças neurológicas a fim de auxiliar na determinação da localização da lesão, conforme salientado por Parent (2004).

Para Stainki et al. (1998), a hiperestesia cervical é intensificada pela flexão do pescoço quando o cão é forçado ao movimento. Sharp & Wheeler (2005), no entanto, recomendaram evitar este tipo de manipulação durante o exame neurológico para não agravar o quadro clínico. A

maneira empregada para avaliar a hiperestesia nos cães deste estudo foi através do oferecimento de alimentos palatáveis em diferentes posições (lateral, dorsal e ventral) e concomitante observação da limitação do pescoço durante a tentativa de apreensão, conforme indicado por Da Costa et al. (2006).

Embora o tratamento clínico seja recomendado nos casos de subluxação atlantoaxial, no atual estudo, em um cão (nº1) foi realizada este tipo de terapia composta por anti-inflamatório esteroidal, repouso em gaiola e o uso de colete cervical, conforme recomendações de Havig et al. (2005). Decorridos 30 dias, no entanto, o paciente foi reavaliado e o resultado foi considerado insatisfatório, optando-se pelo tratamento cirúrgico. Por outro lado, em uma cadela (nº13) foi realizada terapia semelhante por apresentar idade inferior a seis meses (Sturges 2009) e o resultado foi considerado satisfatório após 27 dias. Provavelmente, esta diferença na resposta entre os cães esteve no diagnóstico precoce. Já os demais pacientes, no entanto, o histórico revelou que todos tinham sido submetidos à terapia clínica somente com a administração de anti-inflamatório esteroidal ou não esteroidal sem a complementação com a restrição de movimentos e contenção do pescoço, ao contrário do recomendado por Sharp & Wheeler (2005). Diante disso, neste estudo, a eficiência do tratamento clínico não pode ser avaliada, pois a maioria dos pacientes não estava de acordo com a recomendada pela literatura.

O tratamento cirúrgico compreendido por colocação de dois pinos de Steimann mais resina acrílica autopolimerizável demonstrou ser eficaz, sendo indicado para a maioria dos pacientes com subluxação atlantoaxial que apresentam deficiências neurológicas moderadas a graves (Sharp & Wheeler 2005).

O óbito durante a cirurgia em dois cães foi em decorrência de complicações durante a anestesia. O posicionamento do paciente e o acesso cirúrgico ventral próximo ao tronco vago-simpático, que pode ser estimulado pela distração da musculatura do pescoço pelo afastador auto-estático, provavelmente contribuíram para esta ocorrência. Segundo Cybulsky & D'Angelo (1988), é imperativa a monitoração destes pacientes devido às variações nas frequências cardíaca e de pressão arterial que ocorrem durante cirurgia na coluna cervical. Apesar de não haver diferença significativa entre a duração dos sinais clínicos e o tempo de recuperação pós-operatória, salienta-se a importância do diagnóstico precoce a fim de se evitar disfunções neurológicas graves e respostas insatisfatórias ao tratamento.

## CONCLUSÕES

Por meio dos estudos feitos nos registros médicos do HVU-UFSM, pode-se concluir em relação à subluxação atlantoaxial que:

- Cadelas miniaturas, como Poodle, Pinscher e Yorkshire Terrier, e com idade inferior a 24 meses são mais afetadas;

- A causa mais frequente da subluxação atlantoaxial é a agenesia do processo odontoide do áxis;
- O principal sinal neurológico encontrado é a hiperestesia cervical;
- A duração dos sinais neurológicos varia entre 21 e 210 dias;
- O tratamento predominante cirúrgico demonstra ser eficaz, com menor possibilidade de recidiva;
- Não há relação entre a duração dos sinais clínicos e o tempo de recuperação pós-operatória.

### REFERÊNCIAS

- Beaver D.P., Ellison G.W., Lewis D.D., Goring R.L., Kubilis P.S. & Barchard C. 2000. Risk factors affecting the outcome of surgery for atlantoaxial subluxation in dogs: 46 cases (1978-1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216(7):1104-1109.
- Braund K.G. 1994. Neurological diseases, p.81-332. In: *Ibid.* (Ed.), *Clinical Syndromes in Veterinary Neurology*. Mosby, St Louis.
- Bynevelt M., Rusbridge C. & Britton J. 2000. Dorsal dens angulation and a chiari type malformation in a Cavalier King Charles Spaniel. *Vet. Radiol. Ultrasound* 41(6):521-524.
- Cybulsky G. & D'Angelo C.M. 1988. Neurological deterioration after laminectomy for spondylotic cervical myeloradiculopathy: The putative role of spinal cord ischaemia. *J. Neurol. Psych.* 51:717-718.
- Da Costa R.C., Parent J., Dobson H., Holmberg D. & Partlow G. 2006. Comparison of magnetic resonance imaging and myelography in 18 Doberman Pinscher dogs with cervical spondylomyelopathy. *Vet. Radiol. Ultrasound* 47(6):523-531.
- Haid R.W. 2001. C1-C2 transarticular screw fixation: Technical aspects. *Neurosurg.* 49(1):71-74.
- Havig M.E., Cornell K.K., Hawthorne J.C., McDonnell J.J. & Selcer B.A. 2005. Evaluation of nonsurgical treatment of atlantoaxial subluxation in dogs: 19 cases (1992-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 227(2):257-262.
- Lorenz M.D. & Komegay J.N. 2006. Tetraparesia, hemiparesia e ataxia, p.175-218. In: *Ibid.* (Ed.), *Neurologia Veterinária*. 4ª ed. Manole, São Paulo.
- Lorigados C.A.B., Sterman F.A. & Pinto A.C.B.F. 2004. Estudo clínico radiográfico da subluxação atlantoaxial congênita em cães. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 41(6):368-374.
- Palmer M.V. 2002. Atlantoaxial instability in a white-tailed deer fawn (*Odocoileus virginianus*). *J. Wildl. Dis.* 38(4):860-862.
- Parent J. 2004. Ataxia e paresia, p.147-149. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds), *Tratado de Medicina Interna*. 5ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Platt S.R., Chambers J.N. & Cross A. 2004. A modified ventral fixation for surgical management of atlantoaxial subluxation in 19 dogs. *Vet. Surg.* 33(4):349-354.
- Sharp N.J.H. & Wheeler S.J. 2005. *Small Animal Spinal Disorders: Diagnosis and surgery*. 2ª ed. Elsevier Mosby, Philadelphia.
- Shires P.K. 1998. Instabilidade atlantoaxial, p.1261-1272. In: Slatter (Ed.), *Manual de Cirurgia de Pequenos Animais*. 2ª ed. Manole, São Paulo.
- Stainki D.R., Garcia F.S. & Silva N.R. 1998. Instabilidade atlantoaxial em canino: breve revisão e relato de caso. *Revta Fac. Zootec. Vet. Agron., Urugaiana*, 5(1):77-81.
- Sturges B.K. 2009. Diagnosis and treatment of atlantoaxial subluxation, p.1083-1087. In: Bonagura J.D. & Twedt D.C. (Eds), *Kirk's Current Veterinary Therapy*. 14ª ed. Saunders, St Louis.

**5. Manuscrito 1**

TRABALHO SUBMETIDO À INTERNATIONAL JOURNAL OF  
DEVELOPMENTAL NEUROSCIENCE:

**NEUROPROTECTIVE ROLE OF QUERCETIN IN LOCOMOTOR ACTIVITIES AND  
CHOLINERGIC NEUROTRANSMISSION IN RATS EXPERIMENTALLY  
DEMYELINATED WITH ETHIDIUM BROMIDE: A COMPARATIVE STUDY BETWEEN  
STAGES OF DEMYELINATION AND REMYELINATION**

**Diego Vilivaldo Beckmann, Fabiano B. Carvalho, Cinthia M Mazzanti, Rosmarini P. dos Santos, Amanda O. Andrades, Graciane Aiello, Angel Rippilinger, Dominguita L. Graça, Maria Rosa C. Schetinger, Fátima H. Abdalla, Jessié M. Gutierrez, Lizielle S. Oliveira, Alexandre Mazzanti**

1 **Neuroprotective role of quercetin in locomotor activities and cholinergic**  
2 **neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide: a**  
3 **comparative study between stages of demyelination and remyelination**

4  
5 Diego Vilivaldo Beckmann<sup>a</sup>, Fabiano B. Carvalho<sup>b</sup>, Cinthia M Mazzanti<sup>b\*</sup>, Rosmarini P.  
6 dos Santos<sup>a</sup>, Amanda O. Andrades<sup>a</sup>, Graciane Aiello<sup>a</sup>, Angel Rippilinger<sup>a</sup>, Dominguita L.  
7 Graça<sup>b</sup>, Maria Rosa C. Schetinger<sup>c</sup>, Fátima H. Abdalla<sup>c</sup>, Jessié M. Gutierrez<sup>c</sup>, Lizielle S.  
8 Oliveira<sup>c</sup>, Alexandre Mazzanti<sup>a\*</sup>

9  
10 <sup>a</sup>Laboratório de Cirurgia Experimental (DCPA), Centro de Ciências Rurais;  
11 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

12 <sup>b</sup>Setor de Bioquímica e Biologia Molecular do Laboratório de Terapia Celular, Centro de  
13 Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900,  
14 Brasil.

15 <sup>c</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e exatas; Universidade  
16 Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil.

17  
18 \* Corresponding authors.

19 *Alexandre Mazzanti*: Laboratório de Cirurgia Experimental (DCPA), Centro de Ciências  
20 Rurais; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.  
21 Tel./fax: + 55-55 3220 9400

22 *E-mail address*: alexamazza@yahoo.com.br

23 *Cinthia Melazzo Mazzanti*: Clínica de Pequenos animais, Centro de Ciências Rurais,  
24 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. Tel./fax: +  
25 55-55 3220 9557

26 *E-mail address*: cmelazzomazzanti@gmail.com  
27  
28  
29  
30  
31

**Abstract**

The experimental model of demyelination and remyelination by Ethidium Bromide (EB) promotes of locomotor activities similar to that observed in multiple sclerosis disease (MS). The purpose of this study was to investigate whether the flavonoid quercetin can prevent alterations in the behavioral tests and of cholinergic neurotransmission in rats submitted to the EB experimental demyelination model during events of demyelination and remyelination. Wistar rats were randomly distributed into four groups (20 animals per group): Control (pontine saline injection and treatment with ethanol), Querc (pontine saline injection and treatment with quercetin), EB (pontine 0.1% EB injection and treatment with ethanol), and EB+Querc (pontine 0.1% EB injection and treatment with quercetin). The animals of the groups Querc and Querc + EB were treated once daily with quercetin (50mg/kg) diluted in 25% ethanol solution (1 ml / kg) and the animals of the control groups and EB were treated once daily with 25% ethanol solution (1 ml / kg). Two stages were observed: phase of demyelination with a peak on day 7 and phase of remyelination with a peak on day 21 post-innoculation. The behavioral tests (the beam walking test, foot fault test and Inclined plane test), Acetylcholinesterase (AChE) activity and lipid peroxidation in the brain structures (pons, cerebellum, hippocampus, hypothalamus, striatum and cortex) were measured. The quercetin promoted earlier locomotor recovery, suggesting that there was demyelination prevention or further remyelination velocity as well as it was able to prevent the inhibition of AChE activity and the increase of lipidic peroxidation, suggesting that this compound can modulate cholinergic neurotransmission. These results may contribute to a better understanding of the neuroprotective role of quercetin and the importance of an antioxidant diet in humans to benefit in neurodegenerative diseases such as MS.

*Key words:* quercetin, demyelination, ethidium bromide, cholinesterase, behavioral tests

## 63 1. Introduction

64 Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the  
65 central nervous system (CNS) that affects young adults (Bjartmar, Wujek *et al.*, 2003).  
66 The etiology and pathogenesis of MS are still unclear, although there is evidence that it  
67 develops as an autoimmune disease, in which CNS myelin is attacked by auto-  
68 aggressive T-cells (Matute e Perez-Cerda, 2005). Myelin is a membranous structure  
69 that surrounds neuronal axons and acts as an electrical insulator and is vital for the  
70 occurrence of nerve impulse transmission between neurons (Sriram, 2011; Pereira,  
71 Lebrun-Julien *et al.*, 2012). In this way, the process of demyelination of axons leads to a  
72 deficiency or complete loss in the transmission of nerve impulses (Dhib-Jalbut, Arnold *et*  
73 *al.*, 2006; Dutta, McDonough *et al.*, 2006; Peterson e Fujinami, 2007).

74 The period of demyelination results in the appearance of multiple plaques in the  
75 brain and in the white matter of the spinal cord (Goldenberg, 2012). The demyelination  
76 lead to a deficiency or complete loss of axonal nerve impulses (Goldenberg, 2012; Kipp,  
77 Van Der Valk *et al.*, 2012; Meuth, Gobel *et al.*, 2012; Tselis, 2012; Virtanen e Jacobson,  
78 2012), establishing of excitotoxic mechanisms (Pitt, Werner *et al.*, 2000; Matute, Alberdi  
79 *et al.*, 2001; Werner, Pitt *et al.*, 2001), inflammation and irreversible neurological deficits  
80 (Goldenberg, 2012; Guimaraes e Sa, 2012; Kipp, Van Der Valk *et al.*, 2012).

81 Studies with experimental models of MS and clinical cases of patients have  
82 reported impairments in neurotransmission resulting in deficits in cognition and  
83 information storage (Guimaraes e Sa, 2012; Jongen, Ter Horst *et al.*, 2012; Rendell,  
84 Henry *et al.*, 2012), increase in symptoms of anxiety and depression (Anhoque,  
85 Domingues *et al.*, 2011) and especially impairment in locomotors activities (Pelissier,  
86 Benaim *et al.*, 2001; Fulk, 2005; Giesser, Beres-Jones *et al.*, 2007).

87 Experimental studies have shown that the cholinergic system plays an important  
88 role in memory, attention and motor activity, highlighting the importance of AChE as a  
89 therapeutic target by hydrolyzing the excitatory neurotransmitter, acetylcholine (ACh)  
90 (Zimmerman e Soreq, 2006). AChE is an important regulatory enzyme found mainly in  
91 muscles, erythrocytes and cholinergic neurons (Palaria, Grozio *et al.*, 2008). The vast  
92 experimental as well as clinical studies clearly indicate an undisputed major role of ACh  
93 in the regulation of cognitive and motor functions (Nilsson e Bjorklund, 1992; Blokland,



94 1995). It has been provided evidence of the involvement of cholinergic transmission as  
95 an important target of study in MS (Mazzanti, Spanevello, Obregon *et al.*, 2006;  
96 Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Porcel e Montalban, 2006; Mazzanti,  
97 Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009).

98 Studies have shown that AChE inhibitors (AChEIs), initially developed to treat  
99 cognitive dysfunction in Alzheimer's disease due to the loss of cholinergic neurons  
100 (Weinstock, 1995), also have been used in the treatment of other neurological disorders  
101 that include MS (Greene, Tariot *et al.*, 2000; Parry, Scott *et al.*, 2003). On this line,  
102 AChEIs demonstrated anti-inflammatory properties by reducing lymphocyte  
103 proliferation, secretion of pro-inflammatory cytokines and improving myelin integrity by  
104 cholinergic stimulation of oligodendrocytes (Nizri, Adani *et al.*, 2005; Nizri, Hamra-  
105 Amitay *et al.*, 2006; Bartzokis, 2007; Nizri, Irony-Tur-Sinai *et al.*, 2008; Nizri e Brenner,  
106 2011).

107 Researches from our group with experimentally demyelinated on the rats pons  
108 have found a reduction in the AChE activity both in the pons as in different brain  
109 structures (Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*,  
110 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). It was also reported that natural antioxidants,  
111 such as vitamin E, were able to prevent the deleterious effects of ethidium bromide  
112 (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009).

113 Taken together, the search for compounds that protect neurons from excitotoxic  
114 mechanisms and promote an up-regulation of cholinergic neurotransmission may be a  
115 promising and important target of research for this inflammatory demyelinating  
116 pathology. In this context, natural antioxidant compounds have been the subject of  
117 research as possible alternatives forms that associated with conventional  
118 pharmacological treatment, may contribute to the prevention and/or treatment of  
119 neurodegenerative diseases (Feng e Wang, 2012; Linseman, 2012; Smid, Maag *et al.*,  
120 2012).

121 Quercetin is a natural antioxidant that is present in a variety of vegetables and  
122 fruits which are regularly consumed in our diet (Molina, Sanchez-Reus *et al.*, 2003).  
123 Quercetin belongs to the flavonoids family and has phenolic groups in its structure  
124 which confers antioxidant capacity (Molina, Sanchez-Reus *et al.*, 2003; Lu, Zheng *et al.*,



125 2006). This compound has been studied due to its wide therapeutic properties since  
126 neuroprotective activity has been associated with experimental models for  
127 neurodegenerative diseases (Chen, Chan *et al.*, 1996; Lu, Zheng *et al.*, 2006). Studies  
128 have reported the neuroprotective capacity of quercetin to protect cultured hippocampal  
129 neurons from excitotoxicity induced by  $\beta$ -amiloid (Ansari, Abdul *et al.*, 2009) and in an  
130 experimental model of Alzheimer's disease (Huebbe, Wagner *et al.*, 2010).  
131 Furthermore, quercetin has been pointed as a potent anti-inflammatory substance (Liu,  
132 Sun *et al.*, 2012; Wang, Wang *et al.*, 2012) since it is able to regulate the pathways of  
133 lipoxygenase and arachidonic acid metabolism during inflammation (Mirzoeva e Calder,  
134 1996) and to inhibit the activation of phospholipase A2, prostaglandin E2 and  
135 cyclooxygenase-2 in inflammatory processes (Lindahl e Tagesson, 1993; Gil, Sanz *et*  
136 *al.*, 1994).

137 In line with these findings, quercetin has proved a potent antioxidant with anti-  
138 inflammatory and neuroprotective properties in models of neurodegenerative diseases.  
139 However, experimental studies focused on models of demyelination and remyelination  
140 induced by EB associated with quercetin have not been found. Considering that multiple  
141 sclerosis is an inflammatory demyelinating disease accompanied by excytotoxic events  
142 that lead to locomotor deficits and production of reactive oxygen species, we  
143 investigated whether quercetin can prevent alterations in the behavioral tests and of  
144 cholinergic neurotransmission in rats submitted to the experimental EB model during  
145 events of demyelination and remyelination.

146

## 147 2. Materials e methods

148

### 149 2.1 Chemicals

150 Quercetin, acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB),  
151 EB, malondialdehyde tetrabutylammonium salt (MDA), 2-tiobarbituric acid (TBA), tris  
152 hydroxymethyl- aminomethane were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis,  
153 MO). Bovine serum albumin and  $K_2HPO_4$  were purchased from Reagen. All other  
154 reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

155

## 156 2.2 Animals

157 Adult male Wistar rats (80 animals with 85-95 days; 250-300 g) were used. The  
158 animals were maintained at a constant temperature ( $23\pm 1$  °C) on a 12 h light/dark cycle  
159 with free access to food and water. The study was performed in accordance with the  
160 University Ethics Committee Guidelines for experiments with animals (protocol number  
161 23081.005466/2011-13, April 18, 2011).

162

## 163 2.3 Experimental demyelination with EB

164 The experimental protocol was divided in two stages: phase of demyelination  
165 with a peak on day 7 and phase of remyelination with a peak at on day 21 post-  
166 induction. The periods of demyelination and remyelination and dose of 0.1% EB in  
167 saline vehicle were previously established by our study group (Bondan, Lallo *et al.*,  
168 2000; Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). For  
169 both phases, Wistar rats were randomly distributed into four groups (20 animals per  
170 group): Control (pontine saline injection and treatment with ethanol), Querc (pontine  
171 saline injection and treatment with quercetin), EB (pontine 0.1% EB injection and  
172 treatment with ethanol), and EB+Querc (pontine 0.1% EB injection and treatment with  
173 quercetin) (see scheme exposure).

174 For the surgical procedure, the animals were anesthetized with 4% isoflurane in  
175 100% O<sub>2</sub> and the anesthesia was maintained during the surgery with 1.5–2.5%  
176 isoflurane breathing spontaneously via facemask. After the fronto-parietal-occipital area  
177 was shaved, antisepsis with 2% iodine solution was carried out. With the aid of a roof  
178 motor of orthodontic use and a drill number 2, a hole was made 0.85 cm to the right of  
179 the bregma until exposing the duramater. With the use of a Hamilton syringe with a  
180 removable needle of 26s caliber, the solutions were injected in the cistern pons (basal),  
181 an enlargement of the subarachnoid space on the ventral surface of the pons. Ten  
182 microliters of 0.1% EB were injected in the animals from groups EB and EB+Querc, and  
183 the same volume of 0.9% saline solution was injected in the animals from groups  
184 Control and Querc. The duramater was left open and the skin, together with the  
185 remainder of the subcutaneous tissue, was sutured with a nylon thread 4.0. In all  
186 treatments studied, 10 animals from each group were sacrificed 7 and 21 days after the

187 surgical procedure being previously anesthetized with isoflurane and the brain  
188 structures were collected for the subsequent biochemical assays and histological  
189 analyzes. This experimental protocol was developed in the surgical block at the  
190 Veterinary Hospital of the Federal University of Santa Maria and is well standardized by  
191 the research group being performed according to previously published works (Bondan,  
192 Lallo *et al.*, 2000; Bondan, Lallo *et al.*, 2002; Bondan, Lallo *et al.*, 2006; Mazzanti,  
193 Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009; Rendell, Henry *et*  
194 *al.*, 2012).

195

#### 196 *2.4 Treatment*

197 The animals belongs to group Querc and EB+Querc received quercetin (50  
198 mg/kg/per day) (Hertog, Feskens *et al.*, 1993; Knekt, Jarvinen *et al.*, 1997). The  
199 quercetin was dissolved in 25% ethanol. The animals of the Control and EB groups  
200 received 25% ethanol solution. The administration of ethanol or quercetin solutions  
201 began 4 h after the surgical procedure at the dose of 1 ml/kg by oral gavage, once a  
202 day.

203

#### 204 *2.5 Behavioral tests*

205 The rats treated during 21 days (10 rats per group) were submitted to the  
206 evaluation of clinical signs, inclined plane, beam walking and foot fault behavioral tests.  
207 The evaluation of clinical signs was realized to detect cerebellar alteration (head and/or  
208 neck tremor and dysmetria) and vestibular alteration (head tilt and walking in circle).  
209 The animals that showed vestibular or cerebellar clinical signs were excluded from the  
210 experiments (*data not shown*).

211 The behavioral tests were performed on days 1 (24hours after pontine injection),  
212 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 after inducing demyelination.

213

##### 214 *2.5.1 The beam walking test*

215 The rats were trained to walk along an elevated 1.4 m long horizontal 18 mm  
216 diameter wooden dowel during 10 days – training was considered complete when each  
217 rat would reliably cross twice (round trip) without stalling (Jeffery e Blakemore, 1997).

218 During the test, thoracic and pelvic limbs of rats were evaluated by two observers in  
219 each beam side during the round trip. The observers assigned different scores as  
220 follows: 0 - 'normal': foot positioned on top of the beam, no slippage; 1 – 'error': whole  
221 foot slipped below lower surface of the beam. After evaluation, the scores of both  
222 observers were added for every animal.

223

### 224 *2.5.2 Foot fault test*

225 This test consists in placing the rats on an elevated grid floor (40X40cm with grid  
226 openings 3cm<sup>2</sup>). Rats placed their paws on the wire frame while moving along the grid.  
227 The foot fault was recorded when the paw may fell or slipped through the wire, during  
228 each weight-bearing step (Hernandez e Schallert, 1988). There was not previous  
229 training for the foot fault test and this test was evaluated directly by two observers.  
230 Every rat performed a total number of 50 steps for each limb during the evaluation. In  
231 these 50 movements the number of foot faults was recorded.

232

### 233 *2.5.3 Inclined plane test*

234 The animals were placed in an adjustable inclined plane with different angles  
235 (10° to 90°) and stayed in the same angle during 5 seconds at minimum (Rivlin e Tator,  
236 1977). The test was performed a day before the surgery and all rats could stay on the  
237 inclined plane (65°). After the demyelinating procedure, the angle registered was  
238 evaluated and compared with the angle before the surgery.

239

### 240 *2.6 Brain tissue and sample preparation*

241 After behavioral tests, the animals were submitted to euthanasia being previously  
242 anesthetized with halothane in 100 O<sub>2</sub> and the brain was removed and separated into  
243 cerebral cortex (CC), hippocampus (HP), striatum (ST), hypothalamus (HY), cerebellum  
244 (CB) and pons (PO). Next, the cerebral structures were placed in a solution of 10 mM  
245 Tris–HCl, pH 7.4, on ice. Brain structures were homogenized in a glass potter in Tris–  
246 HCl solution. After centrifugation of 1500g at 4°C for 10 min, aliquots of supernatant  
247 results were stored at –80 °C until the AChE assay.

248

### 249 *2.7 Determination of AChE activity in brain*

250 The AChE enzymatic assay was performed as previously described (Ellman,  
251 Courtney *et al.*, 1961), with a modification of the spectrophotometric method as  
252 previously described (Rocha, Emanuelli *et al.*, 1993). The reaction mixture (2 ml final  
253 volume) contained 100 mM K<sup>+</sup>-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM 5,5'-  
254 dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB). The method is based on the formation of the yellow  
255 anion, 5,5'-dithio-bis-acid-nitrobenzoic, measured by absorbance at 412 nm during 2  
256 min incubation at 25°C. The enzyme (40–50 µg of protein) was pre-incubated for 2 min.  
257 The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylthiocholine iodide (AcSCh). All  
258 samples were run in triplicate and the enzyme activity was expressed in µmol  
259 AcSCh/h/mg of protein. Protein was determined previously in a strip that varied for each  
260 structure: CC (0.7 mg/ml), HP (0.8 mg/ml), ST (0.4 mg/ml), HY (0.6 mg/ml), CB (0.6  
261 mg/ml) and PO (0.7 mg/ml).

262

### 263 *2.8 Brain MDA measurement*

264 MDA levels were obtained in the CC, HP, ST, HY, CB and PO by the method  
265 described previously (Ohkawa, Ohishi *et al.*, 1979) with a few modifications (Rossato,  
266 Zeni *et al.*, 2002). In short, the reaction mixture contained 200 µl of brain homogenates  
267 or standard (MDA-malondialdehyde 0.03 mM), 200 µL of 8.1% sodium dodecylsulfate  
268 (SDS), 750 µl of acetic acid solution (2.5 M HCl, pH 3.5) and 750 µl of 0.8% TBA. Since  
269 sucrose interferes in the MDA assay, a portion of the brain was weighed, homogenized  
270 at a proportion of 1 g of tissue to 10 ml of buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.4 plus 10% of  
271 sodium dodecylsulfate (SDS) 10%. The mixtures were heated at 95°C for 90 min. After  
272 centrifugation at 1700 g for 5 min, the absorbance was measured at 532 nm. MDA  
273 tissue levels were expressed as nmol MDA/mg of protein.

274

### 275 *2.9 Protein determination*

276 Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using  
277 bovine serum albumin as standard.

278

279

## 280 *2.10 Histological studies*

281 To confirm the demyelination targeted in the model, three rats of each group  
282 were used for histological analysis of the lesion. The animals were perfused under deep  
283 anesthesia with 10% buffered formalin via the left ventricle at seven and 21 days after  
284 injection. Brain stem coronal slices of the lesion were embedded in paraffin for routine  
285 processing and 5 $\mu$ m sections were produced and stained with hematoxylin and eosin  
286 (H&E).

287

## 288 *2.11 Statistical analysis*

289 Statistical analysis of behavior tests was carried out by One-way ANOVA with  
290 repeated measures. The AChE activity and MDA levels were analyzed by one- or two-  
291 way ANOVA, followed by Tukey's multiple range tests.  $P<0.05$  was considered to  
292 represent a significant difference in all experiments. All data were expressed as mean  $\pm$   
293 SEM.

294

## 295 **3. Results**

296

### 297 *3.1 Behavioral tests*

298

299 *3.1.1 Quercetin prevents the increase of the number of failures in the Beam*  
300 *Walking Test induced by EB in rats.*

301 Figure 1 shows the effect of the treatment with quercetin during 21 days after EB  
302 injection the number of failures on beam walking test. Statistical analysis of testing  
303 (ANOVA with repeated measures) showed that EB injection increases the number of  
304 failures during day 1 [ $F_{3,30}=3.769$ ;  $P<0.05$ ], 3 [ $F_{3,30}=5.251$ ;  $P<0.01$ ], 5 [ $F_{3,30}=6.521$ ;  
305  $P<0.01$ ], 7 [ $F_{3,30}=4.191$ ;  $P<0.05$ ], 9 [ $F_{3,30}=6.571$ ;  $P<0.01$ ], 11 [ $F_{3,30}=10.980$ ;  $P<0.001$ ], 13  
306 [ $F_{3,30}=5.504$ ;  $P<0.01$ ], 15 [ $F_{3,30}=7.337$ ;  $P<0.001$ ] e 17 [ $F_{3,30}=4.186$ ;  $P<0.05$ ].  
307 Furthermore, it was also observed that quercetin was able to prevent the increase in the  
308 number of failures on beam walking test induced by EB on days 9, 11, 13, 15 and 17.  
309 There was no significant difference between groups on days 19 and 21.

310

311            *3.1.2 Quercetin prevents the increase of the number of errors in the Foot Fault*  
312 *Test induced by EB in rats.*

313            Figure 2 shows the effect of the treatment with quercetin during 21 days following  
314 EB injection in the number of errors on foot fault test. Statistical analysis of testing  
315 (ANOVA with repeated measures) showed that EB injection increases the number of  
316 errors in the foot fault test during days 5 [ $F_{3,30}=4.049$ ;  $P<0.05$ ], 7 [ $F_{3,30}=5.708$ ;  $P<0.01$ ],  
317 9 [ $F_{3,30}=6.188$ ;  $P<0.01$ ] and 11 [ $F_{3,30}=7.415$ ;  $P>0.001$ ]. Furthermore, it was also  
318 observed that quercetin was able to prevent the increase of the number of errors  
319 induced by EB on days 7, 9 and 11. There was no significant difference between groups  
320 on days 13 to 21.

321  
322            *3.1.3 Quercetin and EB do not have effects on angle on the inclined plane test.*

323            The angle of inclined plane test was 65° in all rats of the Control, Querc, EB and  
324 EB+Querc groups. So, there was no significant difference between groups in any days.

325  
326 *3.2 Biochemical parameters*

327  
328            *3.2.1 Quercetin prevents the decrease of AChE activity induced by EB in rats.*

329            Figure 3 shows the effect of quercetin treatment on the AChE activity in rats  
330 cerebral cortex (A), hippocampus (B), striatum (C), pons (D), hypothalamus (E) and  
331 cerebellum (F) at 7 and 21 days after EB injection. EB decreased the AChE activity in  
332 the pons, hypothalamus and cerebellum only on day 7 after EB injection. In day 7 the  
333 quercetin prevented the decrease in AChE activity induced by EB in pons [ $F_{1,16}=13.30$ ;  
334  $P<0.01$ , hypothalamus [ $F_{1,16}=12.02$ ;  $P<0.01$ . Day 7] and cerebellum [ $F_{1,16}=5.89$ ;  $P<0.05$ .  
335 Day 7]. No significant differences in the activity of AChE were observed in the other  
336 brain structures (cerebral cortex, hippocampus and striatum) on days 7 and 21 after EB  
337 injection.

338  
339            *3.2.2 Quercetin prevents the increase of MDA levels induced by EB in rats.*

340            Figure 4 shows the effect of quercetin treatment on the MDA-TBARS levels in  
341 cerebral cortex (A), hippocampus (B), striatum (C), pons (D), hypothalamus (E) and

342 cerebellum (F) of rats 7 and 21 days after EB injection. EB increased the TBARS levels  
343 in the pons, hypothalamus and cerebellum on day 7. The quercetin prevented the  
344 increase of the MDA-TBARS levels induced by EB in pons [ $F_{1,16}=5.45$ ;  $P<0.05$ . Day 7],  
345 hypothalamus [ $F_{1,16}=5.23$ ;  $P<0.05$ . Day 7] and cerebellum [ $F_{1,16}=5.16$ ;  $P<0.05$ . Day 7].  
346 In addition, EB also increased the MDA-TBARS levels in the pons on day 21 and the  
347 quercetin prevented this effect [ $F_{1,16}=5.89$ ;  $P<0.05$ . Day 21]. No significant differences in  
348 the TBARS levels were observed in the other brain structures (cerebral cortex,  
349 hippocampus and striatum).

350

### 351 3.3. Histological analysis

352 The lesions induced by EB consisted of areas of demyelination seen as status  
353 spongiosus of the tissue (Figure 5A). More cellular activity and some new blood vessels  
354 were observed within the demyelinated lesion at 21 days; the compactness of the tissue  
355 suggests ongoing remyelination of the lost myelin sheaths (Figure 5B). The rats from  
356 the control group had a small traumatic lesion along the needle track (Figure 5C).

357

## 358 4. Discussion

359 In the present study we correlated EB gliotoxic effects with the behavioral tests,  
360 AChE activity and lipid peroxidation during periods of demyelination and remyelination  
361 in rats treated with the quercetin. This experimental model was a good choice for the  
362 behavioral tests owing the delayed action after EB injection, separating surgical  
363 alterations from the demyelination changes (Blakemore, 1981; Graca e Blakemore,  
364 1986). There are several studies using EB as an experimental demyelination model  
365 (Yajima e Suzuki, 1979; Graca e Blakemore, 1986; Graca, Bondan *et al.*, 2001;  
366 Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Spanevello, Mazzanti *et al.*, 2007). However,  
367 studies that correlate EB demyelination effects with behavioral tests and AChE activity  
368 in rats treated with quercetin have not been found in the literature.

369 EB has been injected with the aim of evaluating demyelination and remyelination  
370 events in the brainstem of Wistar rats (Graca, Bondan *et al.*, 2001; Bondan, Lallo *et al.*,  
371 2002; Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). After the  
372 intracisternal injection of EB, oligodendrocytes and astrocytes suffer degenerative



373 changes between 48 and 72 hours (Yajima e Suzuki, 1979; Dutta, McDonough *et al.*,  
374 2006). Complete demyelination is attained 7 days after injection of EB and the first signs  
375 of remyelination can be observed, with almost complete remyelination around 25-30  
376 days after injection of EB (Bondan, Lallo *et al.*, 2000; Matute, Alberdi *et al.*, 2001).  
377 Histological changes observed in the lesions induced by EB in this experiment match  
378 the lesions observed in former studies using this drug.

379         Regarding the behavioral tests, the results were different in the locomotor ability  
380 of demyelinated animals (groups EB and EB+Querc) in comparison with the control  
381 groups (groups Control and Querc). Furthermore, the behavioral evaluation did not  
382 demonstrate alterations during the whole experimental period in the Control and Querc  
383 groups. This indicates that there was no traumatic surgical influence in this experimental  
384 model. In a study held by BONDAN *et al* (2000), they observed that the surgical lesion  
385 was insignificant, without injury to neuroglial cells or myelin.

386         Nevertheless, the inclined plane test did not demonstrate any difference between  
387 groups, reaching an angle of 65° in all groups. Thus, despite of inclined plane being  
388 considered reliable, consistent and sensitive in spinal cord injury (Rivlin e Tator, 1977;  
389 Panjabi e Wrathall, 1988; Fehlings e Tator, 1995), it failed to detect motor deficits in this  
390 study with brain demyelination induced by EB. The inclined plane was found to be a  
391 poor indicator of injury severity, because it had high intra-animal, intra-group and inter-  
392 group variability formerly mentioned (Pajooohesh-Ganji, Byrnes *et al.*, 2010).

393         Whereas the beam walking test is a proven test in this experimental model of  
394 demyelination by EB (Bondan, Lallo *et al.*, 2006), it is the first time that foot fault test  
395 was used in this experimental model. By means of the results obtained in the foot fault  
396 test, it is also possible to use this test to evaluate demyelination and remyelination  
397 events, similar to the beam walking graph (Figure 1 and 2). We determined 50  
398 movements per each limb (step) to gage the fault percentage, not the same  
399 methodology previously describe (Hernandez e Schallert, 1988). These authors used  
400 time to count total faults and total steps.

401         The beam walking and foot fault tests presented similar results (Figures 1 and 2).  
402 It was observed impairment of locomotor activity by injection of EB (EB and EB+Querc  
403 groups) between 1<sup>st</sup> and 7<sup>th</sup> day in the beam walking test and on the 5<sup>th</sup> day in the foot

404 fault test. This marked difference between pontine injection of saline (Control and Querc  
405 groups) and pontine injection of EB (EB and EB+Querc groups), demonstrated that the  
406 experimental model of demyelination by EB promotes locomotor alterations. The  
407 flavonoid quercetin was not able to decrease the demyelination by EB.

408 Additionally, it was observed impairment of locomotor activity only in the EB  
409 group between 9<sup>th</sup> and 17<sup>th</sup> day in the beam walking test and between 7<sup>th</sup> and 11<sup>th</sup> day  
410 in the foot fault test. Moreover, the animals of EB+Querc group showed similar  
411 behavioral results to the Control and Querc groups, demonstrating that these animals,  
412 which received quercetin, showed motor recovery in less time. It is possible to perceive  
413 that quercetin promoted locomotor recovery earlier, suggesting that there was  
414 demyelination prevention or further remyelination velocity (Bondan, Lallo *et al.*, 2006).  
415 These may be observed by the capacity of exerting neuroprotective effects in  
416 inflammatory brain injury by modulation of neuronal signaling (Spencer, Kuhnle *et al.*,  
417 2003; Spencer, Rice-Evans *et al.*, 2003). Moreover, (Kao, Ou *et al.*, 2010).proposed  
418 that this effect may be achieved through down-regulation of tyrosine kinase, of PI3  
419 kinase and of MAPK, through a suppression of transcription factors involved in  
420 inflammatory signaling (NFkB, AP-1 and STAT-1) or through a disruption of membrane  
421 lipid raft accumulation.

422 In this study was observed an increase in the levels of lipid peroxidation in the  
423 HY, CB and PO and it was also possible to observe that the quercetin prevented  
424 increase of the ROS generation in these structures after 7 days of demyelination (Figure  
425 4). It is important to highlight that lipid peroxidation was extended until 21 days alone on  
426 the PO, probably for being a structure rich in myelin (fatty acid) and is thus more prone  
427 to be attacked by free radicals. It demonstrates that the experimental model by EB  
428 produced ROS and initiated lipid peroxidation in the EB vehicle. It is well recognized  
429 that demyelinating events results in altered membrane functions in the CNS. These  
430 alterations occur due to an enhancement of free radical formation which promotes  
431 increased lipid peroxidation, having as major consequence oxidative deterioration of the  
432 cellular membranes (Besler, Comoglu *et al.*, 2002; Spanevello, Mazzanti *et al.*, 2009;  
433 Mitosek-Szewczyk, Gordon-Krajcer *et al.*, 2010; Miller, Mrowicka *et al.*, 2011).

434 AChE is a significant biological component of the membrane. This enzyme  
435 hydrolyses the neurotransmitter ACh in the synaptic cleft, modulating the cholinergic  
436 neurotransmission (Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006). AChE is present in G4  
437 (membrane bound) and G1 (cytosolic) form in different brain regions (Das, Dikshit *et al.*,  
438 2001). In the mammalian brain a G4 form represents 60-90% of the total AChE,  
439 depending on the anatomical region, the remainder being composed by G1 and G2  
440 forms (Descarries, Gisiger *et al.*, 1997).

441 In this study, AChE activity was evaluated in the CC, HP, PO, ST, HT and CE,  
442 and the detected alterations were not homogeneous in all evaluated brain structures. In  
443 the PO, HY and CB a significant inhibition ( $p < 0.05$ ) in AChE activity was observed only  
444 after 7 days of injection EB whereas in other structures there was no change in the  
445 activity of this enzyme (Figure 3). These results are in agreement with previous studies  
446 (Mazzanti, Spanevello, Obregon *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006;  
447 Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009) that demonstrated  
448 a change in the AChE activity at seven and 21 days of injection of EB, but that also was  
449 not homogeneous in the evaluated cerebral structures.

450 This lack of uniformity in the profile of AChE in this study may be a reflection of  
451 the route of administration, dose, time of exposure, absorption and metabolism of  
452 quercetin in the organism. Moreover, AChE responds to various insults including  
453 oxidative stress, an important event related to the pathogenesis of a variety of CNS  
454 disorders such as MS (Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Jha e Rizvi, 2009;  
455 Abdel-Salam, Khadrawy *et al.*, 2012). Additionally, alterations in the lipid membrane  
456 observed in this study (PO, HY AND CE) could be a decisive factor in the modification  
457 of the conformational state of the AChE molecule and would explain changes of activity  
458 of this enzyme in this study.

459 The results of this study clearly demonstrate that an injection of 0.1% EB solution  
460 in the cisterna pons determined decrease in locomotor ability of the rats in the  
461 behavioral tests, decrease in AChE activity in the PO, HY and CE and increase the  
462 lipidic peroxidation in these structures.

463 In addition, treatments with quercetin promoted locomotor recovery earlier,  
464 suggesting that there was prevention or further remyelination velocity and it was able to

465 prevent the inhibition of AChE activity and the decrease of lipidic peroxidation,  
466 suggesting that this compound can modulate cholinergic neurotransmission. These  
467 results may contribute to a better understanding of the neuroprotective role of quercetin,  
468 emphasizing the importance of this antioxidant in the human diet, as well its use as  
469 adjuvant in the treatment of neurodegenerative diseases such as MS.

470

#### 471 **Conflicts of Interest statement**

472 There are no conflicts of interest.

473

#### 474 **Acknowledgements**

475 This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
476 Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul  
477 (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
478 Superior (CAPES), Brazil.

479

#### 480 5. Reference

481

482 Abdel-Salam, O. M., Y. A. Khadrawy, *et al.* The effect of gabapentin on oxidative stress  
483 in a model of toxic demyelination in rat brain. J Basic Clin Physiol Pharmacol, v.23, n.2,  
484 p.61-8. 2012.

485

486 Anhoque, C. F., S. C. Domingues, *et al.* Anxiety and depressive symptoms in clinically  
487 isolated syndrome and multiple sclerosis. Arq Neuropsiquiatr, v.69, n.6, Dec, p.882-6.  
488 2011.

489

490 Ansari, M. A., H. M. Abdul, *et al.* Protective effect of quercetin in primary neurons  
491 against Aβ(1-42): relevance to Alzheimer's disease. J Nutr Biochem, v.20, n.4, Apr,  
492 p.269-75. 2009.

493

494 Bartzokis, G. Acetylcholinesterase inhibitors may improve myelin integrity. Biol  
495 Psychiatry, v.62, n.4, Aug 15, p.294-301. 2007.

- 496
- 497 Besler, H. T., S. Comoglu, *et al.* Serum levels of antioxidant vitamins and lipid  
498 peroxidation in multiple sclerosis. Nutr Neurosci, v.5, n.3, Jun, p.215-20. 2002.
- 499
- 500 Bjartmar, C., J. R. Wujek, *et al.* Axonal loss in the pathology of MS: consequences for  
501 understanding the progressive phase of the disease. J Neurol Sci, v.206, n.2, Feb 15,  
502 p.165-71. 2003.
- 503
- 504 Blakemore, W. F. Remyelination in the CNS. Prog Clin Biol Res, v.59A, p.105-9. 1981.
- 505
- 506 Blokland, A. Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory? Brain Res  
507 Brain Res Rev, v.21, n.3, Nov, p.285-300. 1995.
- 508
- 509 Bondan, E. F., M. A. Lallo, *et al.* [Blood-brain barrier breakdown following gliotoxic drug  
510 injection in the brainstem of Wistar rats]. Arq Neuropsiquiatr, v.60, n.3-A, Sep, p.582-9.  
511 2002.
- 512
- 513 \_\_\_\_\_. [Evaluation of locomotor activity after a local induction of toxic demyelination in  
514 the brainstem of Wistar rats]. Arq Neuropsiquiatr, v.64, n.2B, Jun, p.496-503. 2006.
- 515
- 516 \_\_\_\_\_. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local  
517 ethidium bromide injection in Wistar rats. J Submicrosc Cytol Pathol, v.32, n.4, Oct,  
518 p.603-12. 2000.
- 519
- 520 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
521 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72,  
522 May 7, p.248-54. 1976.
- 523
- 524 Chen, Z. Y., P. T. Chan, *et al.* Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by  
525 number and location of their aromatic hydroxyl groups. Chem Phys Lipids, v.79, n.2,  
526 Mar 29, p.157-63. 1996.

- 527
- 528 Das, A., M. Dikshit, *et al.* Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and  
529 female rats of adult and old age. Life Sci, v.68, n.13, Feb 16, p.1545-55. 2001.
- 530
- 531 Descarries, L., V. Gisiger, *et al.* Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. Prog  
532 Neurobiol, v.53, n.5, Dec, p.603-25. 1997.
- 533
- 534 Dhib-Jalbut, S., D. L. Arnold, *et al.* Neurodegeneration and neuroprotection in multiple  
535 sclerosis and other neurodegenerative diseases. J Neuroimmunol, v.176, n.1-2, Jul,  
536 p.198-215. 2006.
- 537
- 538 Dutta, R., J. McDonough, *et al.* Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal  
539 degeneration in multiple sclerosis patients. Ann Neurol, v.59, n.3, Mar, p.478-89. 2006.
- 540
- 541 Ellman, G. L., K. D. Courtney, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of  
542 acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol, v.7, Jul, p.88-95. 1961.
- 543
- 544 Fehlings, M. G. e C. H. Tator. The relationships among the severity of spinal cord injury,  
545 residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons  
546 after experimental spinal cord injury. Exp Neurol, v.132, n.2, Apr, p.220-8. 1995.
- 547
- 548 Feng, Y. e X. Wang. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. Oxid Med Cell  
549 Longev, v.2012, p.472932. 2012.
- 550
- 551 Fulk, G. D. Locomotor training and virtual reality-based balance training for an individual  
552 with multiple sclerosis: a case report. J Neurol Phys Ther, v.29, n.1, Mar, p.34-42. 2005.
- 553
- 554 Giesser, B., J. Beres-Jones, *et al.* Locomotor training using body weight support on a  
555 treadmill improves mobility in persons with multiple sclerosis: a pilot study. Mult Scler,  
556 v.13, n.2, Mar, p.224-31. 2007.
- 557

- 558 Gil, B., M. J. Sanz, *et al.* Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant  
559 synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. Life Sci, v.54, n.20,  
560 p.PL333-8. 1994.  
561
- 562 Goldenberg, M. M. Multiple sclerosis review. P\_T, v.37, n.3, Mar, p.175-84. 2012.  
563
- 564 Graca, D. L. e W. F. Blakemore. Delayed remyelination in rat spinal cord following  
565 ethidium bromide injection. Neuropathol Appl Neurobiol, v.12, n.6, Nov-Dec, p.593-605.  
566 1986.  
567
- 568 Graca, D. L., E. F. Bondan, *et al.* Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in  
569 an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. Arg  
570 Neuropsiquiatr, v.59, n.2-B, Jun, p.358-61. 2001.  
571
- 572 Greene, Y. M., P. N. Tariot, *et al.* A 12-week, open trial of donepezil hydrochloride in  
573 patients with multiple sclerosis and associated cognitive impairments. J Clin  
574 Psychopharmacol, v.20, n.3, Jun, p.350-6. 2000.  
575
- 576 Guimaraes, J. e M. J. Sa. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. Front Neurol, v.3,  
577 p.74. 2012.  
578
- 579 Hernandez, T. D. e T. Schallert. Seizures and recovery from experimental brain  
580 damage. Exp Neurol, v.102, n.3, Dec, p.318-24. 1988.  
581
- 582 Hertog, M. G., E. J. Feskens, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary  
583 heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet, v.342, n.8878, Oct 23, p.1007-11.  
584 1993.  
585
- 586 Huebbe, P., A. E. Wagner, *et al.* Effect of dietary quercetin on brain quercetin levels and  
587 the expression of antioxidant and Alzheimer's disease relevant genes in mice.  
588 Pharmacol Res, v.61, n.3, Mar, p.242-6. 2010.

- 589
- 590 Jeffery, N. D. e W. F. Blakemore. Locomotor deficits induced by experimental spinal  
591 cord demyelination are abolished by spontaneous remyelination. Brain, v.120 ( Pt 1),  
592 Jan, p.27-37. 1997.
- 593
- 594 Jha, R. e S. I. Rizvi. Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity:  
595 correlation with oxidative stress. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech  
596 Repub, v.153, n.3, Sep, p.195-8. 2009.
- 597
- 598 Jongen, P. J., A. T. Ter Horst, *et al.* Cognitive impairment in multiple sclerosis. Minerva  
599 Med, v.103, n.2, Apr, p.73-96. 2012.
- 600
- 601 Kao, T. K., Y. C. Ou, *et al.* Inhibition of nitric oxide production by quercetin in  
602 endotoxin/cytokine-stimulated microglia. Life Sci, v.86, n.9-10, Feb 27, p.315-21. 2010.
- 603
- 604 Kipp, M., P. Van Der Valk, *et al.* Pathology of Multiple Sclerosis. CNS Neurol Disord  
605 Drug Targets, May 11. 2012.
- 606
- 607 Knekt, P., R. Jarvinen, *et al.* Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other  
608 malignant neoplasms. Am J Epidemiol, v.146, n.3, Aug 1, p.223-30. 1997.
- 609
- 610 Lindahl, M. e C. Tagesson. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by  
611 quercetin. Inflammation, v.17, n.5, Oct, p.573-82. 1993.
- 612
- 613 Linseman, D. A. Therapeutic Antioxidants for Neurodegenerative Disease. Recent Pat  
614 CNS Drug Discov, Aug 1. 2012.
- 615
- 616 Liu, C. M., Y. Z. Sun, *et al.* Protective role of quercetin against lead-induced  
617 inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF-kappaB  
618 pathway. Biochim Biophys Acta, v.1820, n.10, Oct, p.1693-703. 2012.
- 619



- 620 Lu, J., Y. L. Zheng, *et al.* Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in  
621 mouse brain. Behav Brain Res, v.171, n.2, Aug 10, p.251-60. 2006.
- 622
- 623 Matute, C., E. Alberdi, *et al.* The link between excitotoxic oligodendroglial death and  
624 demyelinating diseases. Trends Neurosci, v.24, n.4, Apr, p.224-30. 2001.
- 625
- 626 Matute, C. e F. Perez-Cerda. Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming  
627 lesions. Trends Neurosci, v.28, n.4, Apr, p.173-5. 2005.
- 628
- 629 Mazzanti, C. M., R. Spanevello, *et al.* Pre-treatment with ebselen and vitamin E  
630 modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. Int J Dev  
631 Neurosci, v.27, n.1, Feb, p.73-80. 2009.
- 632
- 633 \_\_\_\_\_. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally  
634 demyelinated with ethidium bromide. Int J Dev Neurosci, v.25, n.4, Jun, p.259-64. 2007.
- 635
- 636 Mazzanti, C. M., R. M. Spanevello, *et al.* Ethidium bromide inhibits rat brain  
637 acetylcholinesterase activity in vitro. Chem Biol Interact, v.162, n.2, Aug 25, p.121-7.  
638 2006.
- 639
- 640 \_\_\_\_\_. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium  
641 bromide and treated with interferon beta. Neurochem Res, v.31, n.8, Aug, p.1027-34.  
642 2006.
- 643
- 644 Meuth, S. G., K. Gobel, *et al.* Immune Therapy of Multiple Sclerosis - Future Strategies.  
645 Curr Pharm Des, May 16. 2012.
- 646
- 647 Miller, E., M. Mrowicka, *et al.* The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in  
648 vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. Neurochem Res,  
649 v.36, n.6, Jun, p.1012-6. 2011.
- 650

- 651 Mirzoeva, O. K. e P. C. Calder. The effect of propolis and its components on eicosanoid  
652 production during the inflammatory response. Prostaglandins Leukot Essent Fatty  
653 Acids, v.55, n.6, Dec, p.441-9. 1996.
- 654
- 655 Mitosek-Szewczyk, K., W. Gordon-Krajcer, *et al.* Free radical peroxidation products in  
656 cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid  
657 therapy. Folia Neuropathol, v.48, n.2, p.116-22. 2010.
- 658
- 659 Molina, M. F., I. Sanchez-Reus, *et al.* Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and  
660 protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. Biol Pharm Bull, v.26,  
661 n.10, Oct, p.1398-402. 2003.
- 662
- 663 Nilsson, O. G. e A. Bjorklund. Behaviour-dependent changes in acetylcholine release in  
664 normal and graft-reinnervated hippocampus: evidence for host regulation of grafted  
665 cholinergic neurons. Neuroscience, v.49, n.1, Jul, p.33-44. 1992.
- 666
- 667 Nizri, E., R. Adani, *et al.* Bifunctional compounds eliciting both anti-inflammatory and  
668 cholinergic activity as potential drugs for neuroinflammatory impairments. Neurosci Lett,  
669 v.376, n.1, Mar 7, p.46-50. 2005.
- 670
- 671 Nizri, E. e T. Brenner. Modulation of inflammatory pathways by the immune cholinergic  
672 system. Amino Acids, Dec 23. 2011.
- 673
- 674 Nizri, E., Y. Hamra-Amitay, *et al.* Anti-inflammatory properties of cholinergic up-  
675 regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. Neuropharmacology, v.50, n.5,  
676 Apr, p.540-7. 2006.
- 677
- 678 Nizri, E., M. Irony-Tur-Sinai, *et al.* Suppression of neuroinflammation and  
679 immunomodulation by the acetylcholinesterase inhibitor rivastigmine. J Neuroimmunol,  
680 v.203, n.1, Oct 15, p.12-22. 2008.
- 681

- 682 Ohkawa, H., N. Ohishi, *et al.* Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric  
683 acid reaction. Anal Biochem, v.95, n.2, Jun, p.351-8. 1979.
- 684
- 685 Pajooheh-Ganji, A., K. R. Byrnes, *et al.* A combined scoring method to assess  
686 behavioral recovery after mouse spinal cord injury. Neurosci Res, v.67, n.2, Jun, p.117-  
687 25. 2010.
- 688
- 689 Paleari, L., A. Grozio, *et al.* The cholinergic system and cancer. Semin Cancer Biol,  
690 v.18, n.3, Jun, p.211-7. 2008.
- 691
- 692 Panjabi, M. M. e J. R. Wrathall. Biomechanical analysis of experimental spinal cord  
693 injury and functional loss. Spine (Phila Pa 1976), v.13, n.12, Dec, p.1365-70. 1988.
- 694
- 695 Parry, A. M., R. B. Scott, *et al.* Potentially adaptive functional changes in cognitive  
696 processing for patients with multiple sclerosis and their acute modulation by  
697 rivastigmine. Brain, v.126, n.Pt 12, Dec, p.2750-60. 2003.
- 698
- 699 Pelissier, J., C. Benaim, *et al.* [Locomotor reeducation and multiple sclerosis. A critical  
700 analysis of the literature]. Rev Neurol (Paris), v.157, n.8-9 Pt 2, Sep, p.1030-40. 2001.
- 701
- 702 Pereira, J. A., F. Lebrun-Julien, *et al.* Molecular mechanisms regulating myelination in  
703 the peripheral nervous system. Trends Neurosci, v.35, n.2, Feb, p.123-34. 2012.
- 704
- 705 Peterson, L. K. e R. S. Fujinami. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and  
706 neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol, v.184, n.1-2,  
707 Mar, p.37-44. 2007.
- 708
- 709 Pitt, D., P. Werner, *et al.* Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. Nat  
710 Med, v.6, n.1, Jan, p.67-70. 2000.
- 711

- 712 Porcel, J. e X. Montalban. Anticholinesterasics in the treatment of cognitive impairment  
713 in multiple sclerosis. J Neurol Sci, v.245, n.1-2, Jun 15, p.177-81. 2006.
- 714
- 715 Rendell, P. G., J. D. Henry, *et al.* Prospective memory, emotional valence, and multiple  
716 sclerosis. J Clin Exp Neuropsychol, Apr 4. 2012.
- 717
- 718 Rivlin, A. S. e C. H. Tator. Objective clinical assessment of motor function after  
719 experimental spinal cord injury in the rat. J Neurosurg, v.47, n.4, Oct, p.577-81. 1977.
- 720
- 721 Rocha, J. B., T. Emanuelli, *et al.* Effects of early undernutrition on kinetic parameters of  
722 brain acetylcholinesterase from adult rats. Acta Neurobiol Exp (Wars), v.53, n.3, p.431-  
723 7. 1993.
- 724
- 725 Rossato, J. I., G. Zeni, *et al.* Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of  
726 thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations  
727 produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. Neurosci Lett, v.318,  
728 n.3, Feb 1, p.137-40. 2002.
- 729
- 730 Sallis, E. S., C. M. Mazzanti, *et al.* OSP-Immunofluorescent remyelinating  
731 oligodendrocytes in the brainstem of toxically-demyelinated Wistar rats. Arg  
732 Neuropsiquiatr, v.64, n.2A, Jun, p.240-4. 2006.
- 733
- 734 Smid, S. D., J. L. Maag, *et al.* Dietary polyphenol-derived protection against neurotoxic  
735 beta-amyloid protein: from molecular to clinical. Food Funct, Aug 24. 2012.
- 736
- 737 Spanevello, R., C. M. Mazzanti, *et al.* Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities  
738 in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally  
739 demyelinated. Brain Res Bull, v.80, n.1-2, Aug 28, p.45-51. 2009.
- 740

- 741 Spanevello, R. M., C. M. Mazzanti, *et al.* Activities of enzymes that hydrolyze adenine  
742 nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide  
743 and treated with interferon-beta. Life Sci, v.80, n.12, Feb 27, p.1109-14. 2007.  
744
- 745 Spencer, J. P., G. G. Kuhnle, *et al.* Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin  
746 and its in vivo metabolites. Biochem J, v.372, n.Pt 1, May 15, p.173-81. 2003.  
747
- 748 Spencer, J. P., C. Rice-Evans, *et al.* Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and  
749 ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action  
750 on neuronal viability. J Biol Chem, v.278, n.37, Sep 12, p.34783-93. 2003.  
751
- 752 Sriram, S. Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination. J  
753 Neuroimmunol, v.239, n.1-2, Oct 28, p.13-20. 2011.  
754
- 755 Tselis, A. Epstein-Barr virus cause of multiple sclerosis. Curr Opin Rheumatol, v.24, n.4,  
756 Jul, p.424-8. 2012.  
757
- 758 Virtanen, J. O. e S. Jacobson. Viruses and Multiple Sclerosis. CNS Neurol Disord Drug  
759 Targets, May 11. 2012.  
760
- 761 Wang, L., B. Wang, *et al.* Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity,  
762 suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. Eur J Pharmacol,  
763 v.690, n.1-3, Sep 5, p.133-41. 2012.  
764
- 765 Weinstock, M. The pharmacotherapy of Alzheimer's disease based on the cholinergic  
766 hypothesis: an update. Neurodegeneration, v.4, n.4, Dec, p.349-56. 1995.  
767
- 768 Werner, P., D. Pitt, *et al.* Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions  
769 correlates with oligodendrocyte and axonal damage. Ann Neurol, v.50, n.2, Aug, p.169-  
770 80. 2001.  
771

772 Yajima, K. e K. Suzuki. Demyelination and remyelination in the rat central nervous  
773 system following ethidium bromide injection. Lab Invest, v.41, n.5, Nov, p.385-92. 1979.

774

775 Zimmerman, G. e H. Soreq. Termination and beyond: acetylcholinesterase as a  
776 modulator of synaptic transmission. Cell Tissue Res, v.326, n.2, Nov, p.655-69. 2006.

777

778

779

780

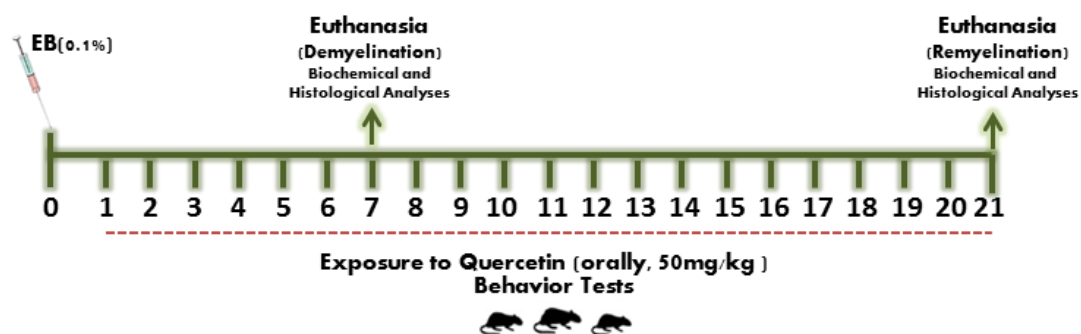
781

782 **Legends and Pictures**

783

784

785



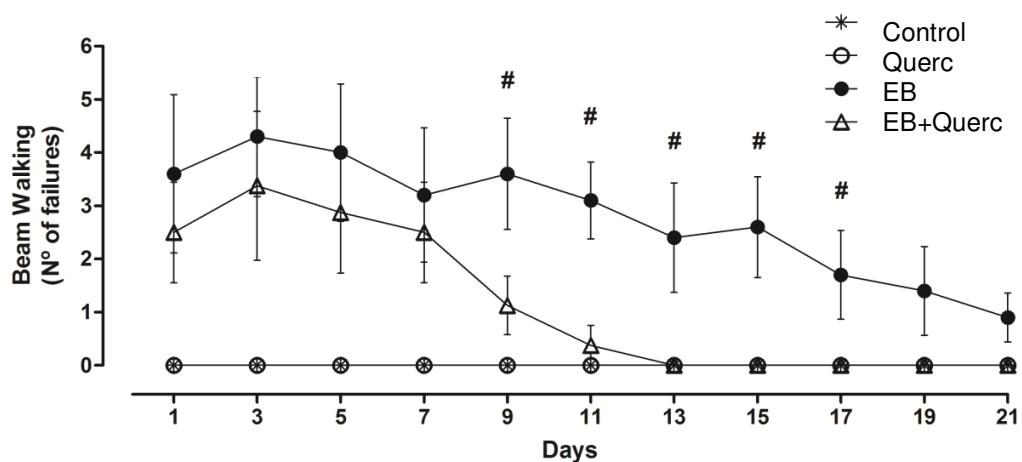
786

787

788 **Scheme Exposure.** Oral administration of quercetin (50 mg/kg) once a day during 21  
789 days in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%). Day seven  
790 represents the peak of demyelination, and day 21 represents the peak of remyelination.

791

792



793

794

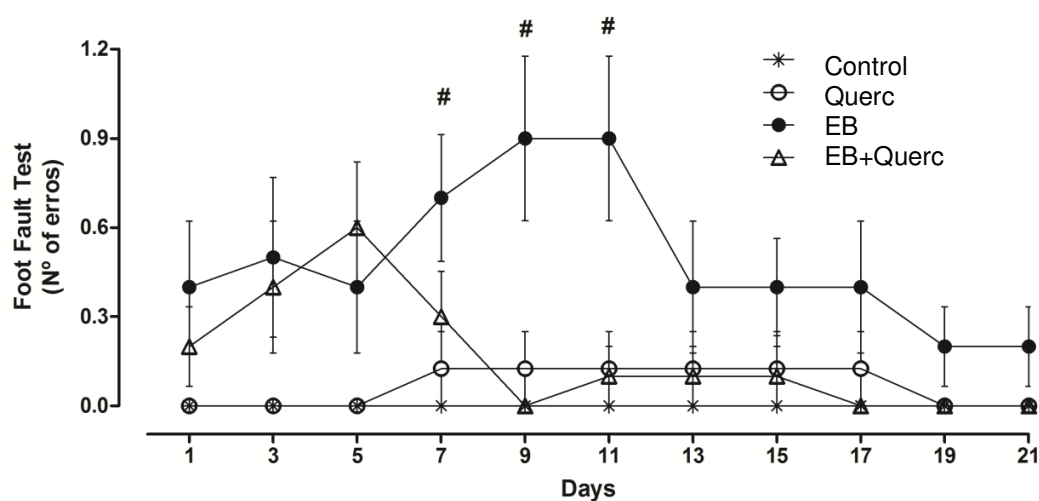
795 **Figure 1.** Effects of quercetin (50mg/kg) and ethidium bromide (EB, 0.1%)  
 796 treatments on number of failures in the Beam Walking test during 21 days. Data are  
 797 reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats for group. #Denotes a significant Vehicle or  
 798 Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of  
 799 EB treatment (ANOVA with repeated measures) followed by Tukey's Multiple  
 Comparison Test.

800

801



802



803

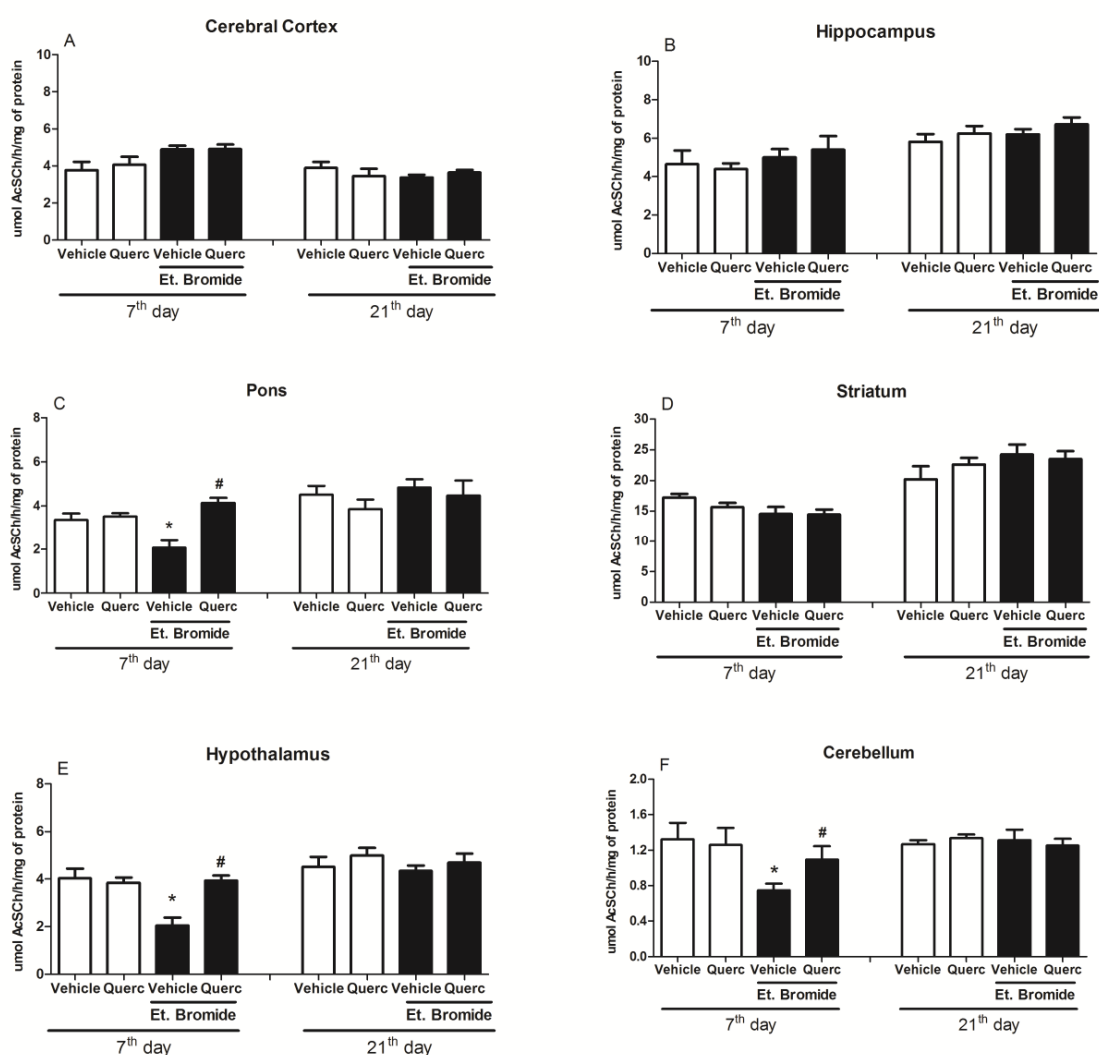
804

805 **Figure 2.** Effects of quercetin (50mg/kg) and ethidium bromide (EB, 0.1%)  
 806 treatments on number of errors in the Foot Fault test during 21 days. Data are reported  
 807 as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats for group. #Denotes a significant Vehicle or Querc vs  
 808 EB or Querc+EB interaction suggesting that quercetin prevents the effect of EB  
 809 treatment (ANOVA with repeated measures) followed by Tukey's Multiple Comparison  
 810 Test.

811

812

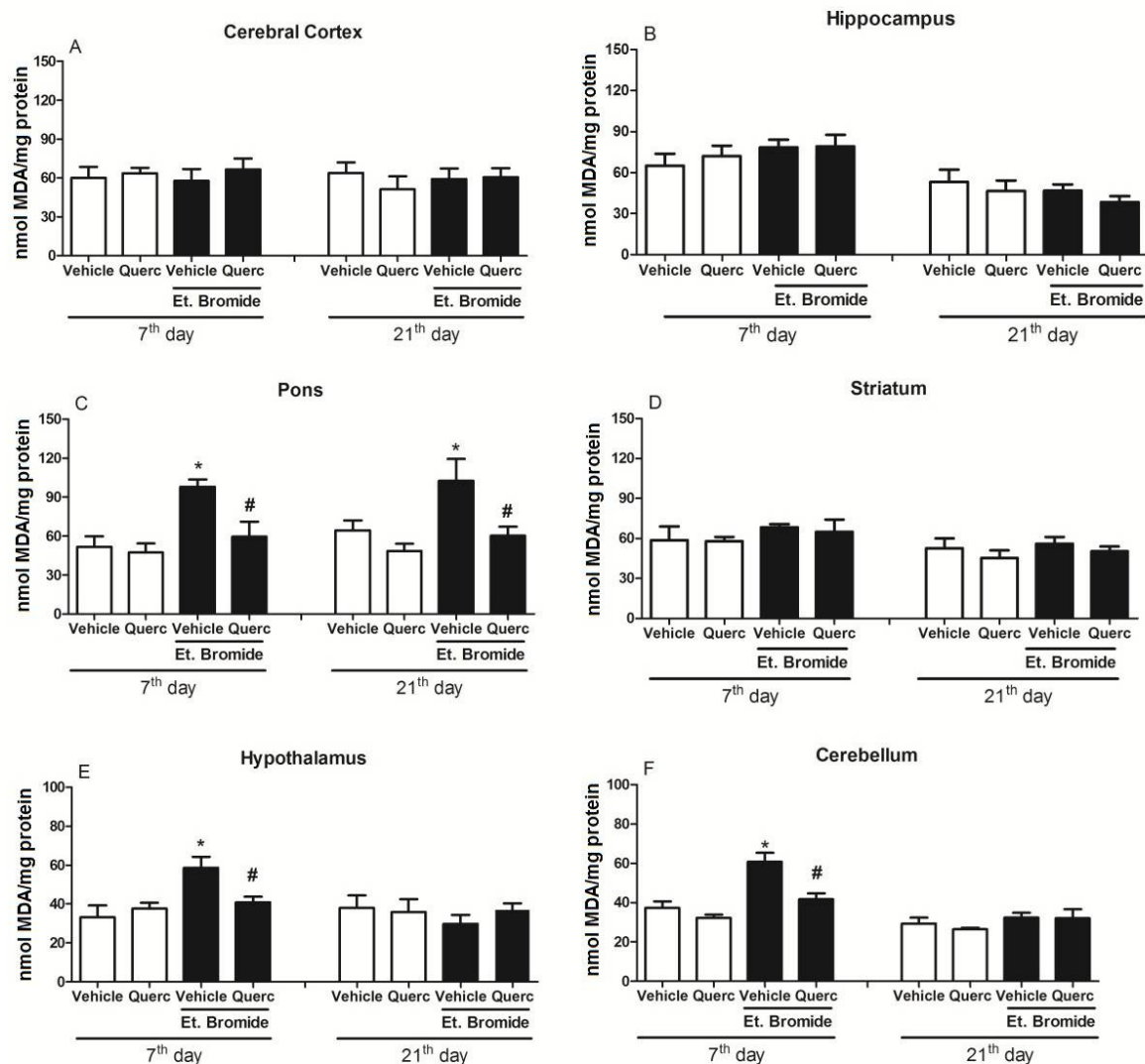
813



814

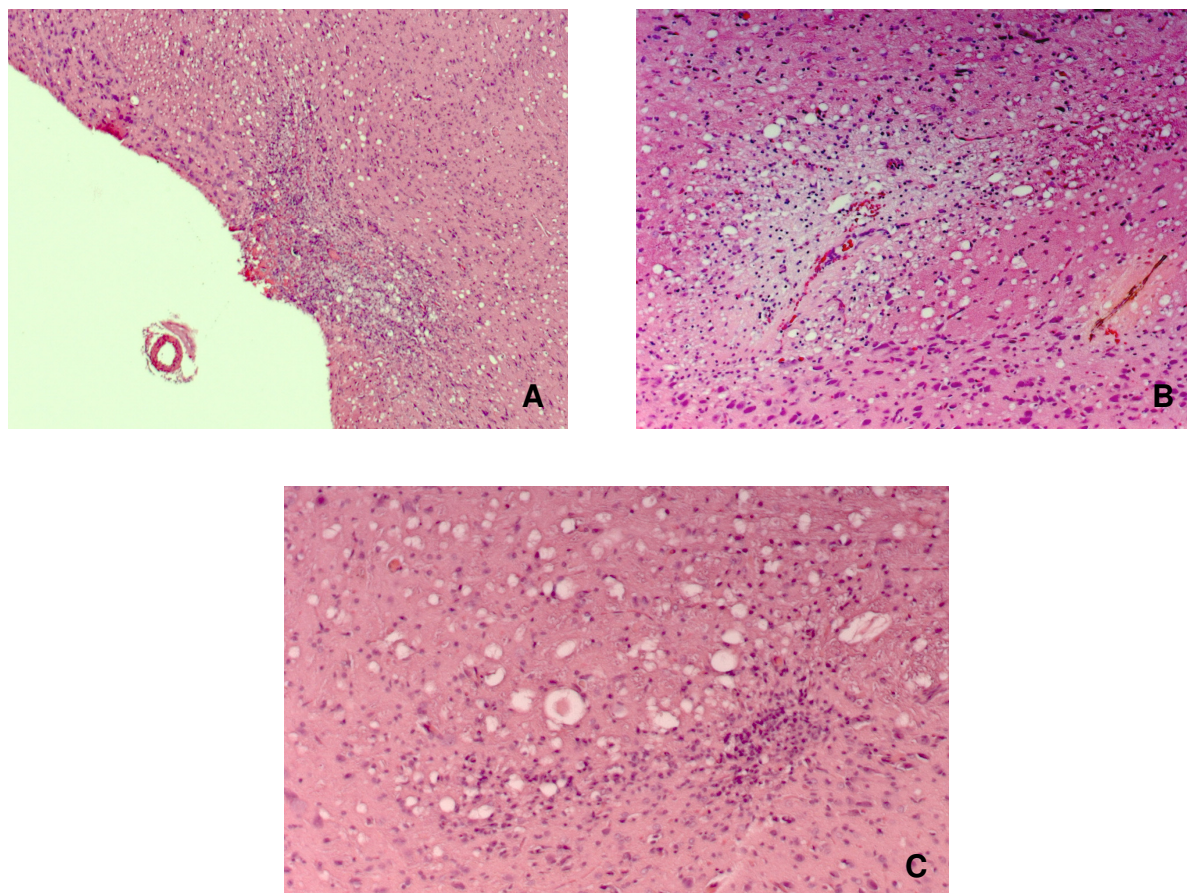
815

816 **Figure 3.** AChE activity in supernatant fraction of cerebral cortex (A),  
 817 hippocampus (B), pons (C), striatum (D), hypothalamus (E) and cerebellum (F) in rats  
 818 experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin  
 819 (50mg/kg), during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data  
 820 are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group. \* $P < 0.05$  compared with the  
 821 others groups; #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction  
 822 suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*)  
 followed by Tukey's Multiple Comparison Test.



823  
 824 **Figure 4.** MDA levels in homogenate of cerebral cortex (A), hippocampus (B),  
 825 pons (C), striatum (D), hypothalamus (E) and cerebellum (F) in rats experimentally  
 826 demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg),  
 827 during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported  
 828 as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group. \* $P < 0.05$  compared with the other groups;  
 829 #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that  
 830 quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's  
 831 Multiple Comparison Test.

832



833  
834

835  
836 **Figure 5. A** – EB group (7 days after EB injection): Long narrow lesion along the  
837 base of the pons with spongiosis, gitter cells and moderate inflammatory infiltration. **B** – EB  
838 group (21 days after EB injection): Medium sized lesion on the lateral side of the pons  
839 close to the trigeminal ganglion. There is vascular proliferation and mild inflammatory  
840 infiltration. **C** – Control group (7 days after saline injection): Small round lesion on the  
841 pontine midline with a conspicuous axonal balloon, some microglia and gitter cells. H&E.  
842 Bar: (10x)

**6. Manuscrito 2**

TRABALHO A SER SUBMETIDO:

**OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND CHOLINESTERASE ACTIVITY OF  
BLOOD AND LYMPHOCYTES IN RATS EXPERIMENTALLY DEMYELINATED WITH  
ETHIDIUM BROMIDE AND TREATED WITH QUERCETIN**

**Diego Vilivaldo Beckmann, Fabiano Barbosa Carvalho, Cinthia M Mazzanti,  
Gustavo Thomé, Roberta Schmatz, Rosmarini Passos dos Santos, Amanda  
Oliveira de Andrades, Graciane Aiello, Angel Rippilinger, Bruna Marquadt,  
Dominguita Lühns Graça, Alexandre Mazzanti**

1 **Oxidative stress parameters and cholinesterase activity of blood and**  
2 **lymphocytes in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and**  
3 **treated with quercetin**

4

5 Diego Vilibaldo Beckmann<sup>a</sup>, Fabiano Barbosa Carvalho<sup>b</sup>, Cinthia M Mazzanti<sup>b\*</sup>, Gustavo  
6 Thomé<sup>c</sup>, Roberta Schmatz<sup>c</sup>, Rosmarini Passos dos Santos<sup>a</sup>, Amanda Oliveira de  
7 Andrades<sup>a</sup>, Graciane Aiello<sup>a</sup>, Angel Rippilinger<sup>a</sup>, Bruna Marquadt<sup>a</sup>, Dominguita Lührs  
8 Graça<sup>a</sup>, Alexandre Mazzanti<sup>a\*</sup>

9

10 <sup>a</sup>Laboratório de Cirurgia Experimental (DCPA), Centro de Ciências Rurais;  
11 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

12 <sup>b</sup>Setor de Bioquímica e Biologia Molecular do Laboratório de Terapia Celular, Centro de  
13 Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria.

14 <sup>c</sup>Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e exatas; Universidade  
15 Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS 97105-900, Brasil.

16

17 \* Corresponding authors.

18 *Alexandre Mazzanti*: Laboratório de Cirurgia Experimental (DCPA), Centro de Ciências  
19 Rurais; Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.  
20 Tel./fax: + 55-55 3220 9400

21 *E-mail address*: alexamazza@yahoo.com.br

22 *Cinthia Melazzo Mazzanti*: Clínica de Pequenos animais, Centro de Ciências Rurais,  
23 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. Tel./fax: +  
24 55-55 3220 9557

25 *E-mail address*: cmelazzomazzanti@gmail.com

26

27

28

29

30

31

**Abstract**

The purpose of this study was to investigate the effect of quercetin on parameters of oxidative stress in blood, cholinesterase activity in blood and AChE activities in lymphocytes of rats submitted to the experimental model of demyelination by ethidium bromide (EB). Wistar rats were randomly distributed into four groups (20 animals per group): Control (pontine saline injection and treatment with ethanol), Querc (pontine saline injection and treatment with quercetin), EB (pontine 0.1% EB injection and treatment with ethanol), and EB + Querc (pontine 0.1% EB injection and treatment with quercetin). The animals of the groups Querc and Querc + EB were treated once daily with quercetin (50mg/kg) diluted in 25% ethanol solution (1 ml / kg) and the animals of the control groups and EB were treated once daily with 25% ethanol solution (1 ml / kg). Two stages were observed: phase of demyelination with a peak on day 7 and phase of remyelination with a peak on day 21 post-innoculation of EB. The parameters of oxidative stress in blood, cholinesterase activity in blood and AChE activities in lymphocytes were measured. The present study demonstrated that the experimental demyelination model by EB promotes increase in AChE activity and alters the oxidative stress parameters in the blood. In addition, the quercetin was able to prevent the effect of EB on the AChE activity and of the antioxidants enzymes, as well as reduce lipid peroxidation in demyelinated rats by EB. Taken together, these results can contribute to a better understanding of the protective role of quercetin, emphasizing the important therapeutic potential of this compound in demyelinating diseases.

*Key words:* quercetin, stress oxidative, demyelination, ethidium bromide, cholinesterase

## 63           **1. Introduction**

64           Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the  
65 central nervous system (CNS) that affects young adults (Bjartmar, Wujek *et al.*, 2003).  
66 The etiology and pathogenesis of MS are still unclear, although there is evidence that it  
67 develops as an autoimmune disease, in which CNS myelin is attacked by auto-  
68 aggressive T-cells (Matute e Perez-Cerda, 2005). Thus, the process of demyelination of  
69 axons leads to a deficiency or complete loss in the transmission of nerve impulses  
70 (Dhib-Jalbut, Arnold *et al.*, 2006; Dutta, McDonough *et al.*, 2006; Peterson e Fujinami,  
71 2007).

72           The model of demyelination by ethidium bromide (EB) has been used to simulate  
73 enzymatic and cellular events related to demyelination and remyelination, such as MS  
74 (Graca, Bondan *et al.*, 2001; Bondan, Lallo *et al.*, 2002; Bondan, Lallo *et al.*, 2006;  
75 Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). Several studies have  
76 been conducted with the model of demyelination by EB on the activity of some enzymes  
77 including acetylcholinesterase (AChE) (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Spanevello,  
78 Mazzanti *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009).

79           The cholinesterases are classified according with the inhibitors sensitivity, tissue  
80 distribution, catalytic properties and specificity to the substrates (Chatonnet e Lockridge,  
81 1989). The AChE (EC 3.1.1.7) hydrolyses preferentially esters with acetyl grouping,  
82 such as acetylcholine (ACh), while the butyrylcholinesterase (EC 3.1.8, BChE)  
83 hydrolyzes other types of esters, such as butirilcolina (Chatonnet e Lockridge, 1989).  
84 AChE is predominantly found in the CNS, neuromuscular junction, and lymphocytes  
85 (Kawashima e Fujii, 2000). Whereas BChE is mainly found in plasma, kidney, liver,  
86 intestine, heart, lung and has a much more restricted neuronal distribution of the AChE  
87 (Kutty, 1980; Whittaker, 1980; Mesulam, Guillozet *et al.*, 2002).

88           AChE has a regulatory role in cholinergic neurotransmission being responsible  
89 for rapid hydrolysis of the neurotransmitter ACh (Massoulie, Pezzementi *et al.*, 1993).  
90 Moreover the known role on cholinergic transmission, the AChE has an effect potent in  
91 cell adhesion (Johnson e Moore, 1999), on grow of the neurites (Day e Greenfield,  
92 2002), osteogenesis and structural regulation of post synaptic differential (Soreq e  
93 Seidman, 2001). The AChE is secreted from both axonal terminals of neurons, and this



94 secretion is modulated by neuronal stimulation, levels of neurotransmitter in the  
95 synaptic cleft and by treatment (Descarries, Gisiger *et al.*, 1997). It is one of the most  
96 efficient and known biological catalysis, AChE has been investigated as an important  
97 therapeutic target for various neurodegenerative diseases (Appleyard, 1994; Das,  
98 Dikshit *et al.*, 2001).

99 In addition, recent studies have demonstrated the role of cholinesterase as  
100 modulators of inflammation (Das, 2007; Rao, Sridhar *et al.*, 2007; Rosas-Ballina e  
101 Tracey, 2009). An increase in the AChE and BChE activities could decrease ACh levels  
102 and, consequently, to reduce anti-inflammatory effects through absence of negative  
103 feedback control exercised by ACh (Rao, Sridhar *et al.*, 2007). Thus, considering the  
104 suppressor inflammatory effect of ACh, it is possible that the activity of the enzymes  
105 AChE and BChE are intrinsic regulators of inflammation (Das, 2007; Rao, Sridhar *et al.*,  
106 2007). Furthermore, the ACh mediates the cholinergic anti-inflammatory pathway by  
107 inhibiting the production of tumor necrosis factor, interleukin-1 and macrophage  
108 migration inhibitory factor (Borovikova, Ivanova *et al.*, 2000). Thus, the vagus nerve and  
109 nicotinic ACh receptors on tissue macrophages are answerable by signs of cholinergic  
110 anti-inflammatory pathway (Pavlov e Tracey, 2006; Das, 2007).

111 On the other hand, local levels of reactive oxygen species (ROS) can increase  
112 dramatically in inflammatory conditions and deplete the antioxidant defense potential  
113 within the lesions, generated mainly by activated macrophages and microglia, and these  
114 reactive species are considered as mediators of demyelination and axonal damage in  
115 MS (Van Meeteren, Teunissen *et al.*, 2005; Van Horssen, Witte *et al.*, 2006). In addition,  
116 there is substantial evidence that oxidative stress is a cause or a contributing factor in  
117 the pathogenesis of a number of neurodegenerative diseases including MS (Uttara,  
118 Singh *et al.*, 2009; Ferretti e Bacchetti, 2011; Oliveira, Kallaur *et al.*, 2012).

119 Recently, natural products have increased significant attention as potential  
120 therapeutic candidates for neurodegeneration (Linseman, 2009). Among these we can  
121 highlight quercetin, which has filed more potent than other natural antioxidants such as  
122 vitamin C, vitamin E and  $\beta$ -carotene (Rice-Evans, Miller *et al.*, 1996). It has been  
123 reported the cytoprotective action in different models of pro-oxidant apoptotic death  
124 (Dajas, Rivera-Megret *et al.*, 2003). The quercetin has neuroprotective effects in

125 inflammatory brain injury by modulation of neuronal signaling (Spencer, Kuhnle *et al.*,  
126 2003; Spencer, Rice-Evans *et al.*, 2003). Moreover, proposed that this effect may be  
127 achieved through down-regulation of tyrosine kinase, of PI3 kinase and of MAPK,  
128 through a suppression of transcription factors involved in inflammatory signaling (NFkB,  
129 AP-1 and STAT-1) or through a disruption of membrane lipid raft accumulation (Kao, Ou  
130 *et al.*, 2010).

131 The study of the pathophysiological mechanisms of demyelination is important to  
132 search more effective alternative therapies that benefit patients with these inflammatory  
133 neurological disorders. Therefore, considering the importance of demyelinating  
134 diseases and the beneficial properties of flavonoids, the purpose of this study was to  
135 investigate the effect of quercetin on parameters of oxidative stress in blood,  
136 cholinesterase activity in blood and AChE activities in lymphocytes of rats submitted to  
137 experimental model of demyelination by EB.

138

## 139 **2. Materials and methods**

140

### 141 *2.1. Chemicals*

142 Quercetin, acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB),  
143 EB, malondialdehyde tetrabutylammonium salt (MDA), 2-tiobarbituric acid (TBA), tris  
144 hydroxymethyl- aminomethane were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis,  
145 MO). Bovine serum albumin and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> were purchased from Reagen. All other  
146 reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity.

147

### 148 *2.2. Animals*

149 Adult male Wistar rats (80 animals with 85-95 days; 250-300 g) were used. The  
150 animals were maintained at a constant temperature (23±1 °C) on a 12 h light/dark cycle  
151 with free access to food and water. The study was performed in accordance with the  
152 University Ethics Committee Guidelines for experiments with animals (protocol number  
153 23081.005466/2011-13, April 18, 2011).

154

155

156           2.3. *Experimental demyelination with ethidium bromide*

157           The experimental protocol was divided in two stages: phase of demyelination  
158 with a peak on day 7 and phase of remyelination with a peak at on day 21 post-  
159 induction. The periods of demyelination and remyelination and dose of 0.1% EB in  
160 saline vehicle were previously established by our study group (Bondan, Lallo *et al.*,  
161 2000; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). For both  
162 phases, Wistar rats were randomly distributed into four groups (20 animals per group):  
163 Control (pontine saline injection and treatment with ethanol), Querc (pontine saline  
164 injection and treatment with quercetin), EB (pontine 0.1% EB injection and treatment  
165 with ethanol), and EB+Querc (pontine 0.1% EB injection and treatment with quercetin).

166           For the surgical procedure, the animals were anesthetized with 4% isoflurane in  
167 100% O<sub>2</sub> and the anesthesia was maintained during the surgery with 1.5–2.5%  
168 isoflurane breathing spontaneously via facemask. After the fronto-parietal-occipital area  
169 was shaved, antisepsis with 2% iodine solution was carried out. With the aid of a roof  
170 motor of orthodontic use and a drill number 2, a hole was made 0.85 cm to the right of  
171 the bregma until exposing the duramater. With the use of a Hamilton syringe with a  
172 removable needle of 26s caliber, the solutions were injected in the cistern pons (basal),  
173 an enlargement of the subarachnoid space on the ventral surface of the pons. Ten  
174 microliters of 0.1% EB were injected in the animals from groups EB and EB+Querc, and  
175 the same volume of 0.9% saline solution was injected in the animals from groups  
176 Control and Querc. The duramater was left open and the skin, together with the  
177 remainder of the subcutaneous tissue, was sutured with a nylon thread 4.0. In all  
178 treatments studied, 10 animals from each group were sacrificed 7 and 21 days after the  
179 surgical procedure being previously anesthetized with isoflurane and blood and brain  
180 were removed for the subsequent biochemical assays and histological analyzes. This  
181 experimental protocol was developed in the surgical block at the Veterinary Hospital of  
182 the Federal University of Santa Maria and is well standardized by the research group  
183 being performed according to previously published works (Bondan, Lallo *et al.*, 2000;  
184 Bondan, Lallo *et al.*, 2002; Bondan, Lallo *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2006;  
185 Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009; Rendell, Henry *et al.*, 2012).

186

187           2.4. *Treatment*

188           The animals belongs to group Querc and EB+Querc received quercetin (50  
189 mg/kg/per day) (Hertog, Feskens *et al.*, 1993; Knekt, Jarvinen *et al.*, 1997). The  
190 quercetin was dissolved in 25% ethanol. The animals of the Control and EB groups  
191 received 25% ethanol solution. The administration of ethanol or quercetin solutions  
192 began 4 h after the surgical procedure at the dose of 1 ml/kg by oral gavage, once a  
193 day.

194

195           2.5. *AChE assay in whole blood*

196           The AChE enzymatic assay was determined by the method of (Ellman, Courtney  
197 *et al.*, 1961) modified by (Worek, Mast *et al.*, 1999). The incubation system was  
198 composed of sodium phosphate buffer 0.063 mM pH 7.4, DTNB 0.316 mM and 0.5 mL  
199 of the hemolyzed blood. The increase in absorbance was registered over 2 min at 436  
200 nm. The specific activity of whole blood AChE was calculated and the results are  
201 expressed as mU/ $\mu$ mol of whole blood.

202

203           2.6. *AChE assay in lymphocytes*

204           The isolation of peripheral lymphocytes was performed as described by (Boyum,  
205 1968), using Ficoll Hypaque density gradient. After separation, only samples with at  
206 least 95% of lymphocytes, as verified in the coulter STKS (Miami—USA), were used.  
207 Lymphocyte viability and integrity were confirmed by determining the percentage of  
208 cells, excluding 0.1% trypan blue and measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity.  
209 AChE activity was determined according to the method described by (Ellman, Courtney  
210 *et al.*, 1961) and modified by (Fitzgerald e Costa, 1993). Briefly, proteins of all samples  
211 were adjusted to 0.1–0.2 mg/ml. 0.2 ml of intact cells was added to a solution containing  
212 1.0 mM ACh, 0.1 mM 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and 0.1M phosphate  
213 buffer (pH 8.0). Immediately before and after incubation for 30min, at 27 °C, the  
214 absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. AChE was calculated from  
215 the quotient between lymphocyte AChE activity and protein content, and the results  
216 were expressed as  $\mu$ mol/h/mg of protein.

217

218            *2.7. BChE assay in serum*

219            The serum BChE activity was determined as described by (Ellman, Courtney *et*  
220 *al.*, 1961). The BChE activity was assayed in a medium containing sodium phosphate  
221 buffer 0.1 mol/L, pH 7.4, DTNB 0.30 mmol/L and 50 mL of serum. After 2 min of pre-  
222 incubation at 30°C, the reaction was started with 1 mmol of butyrylthiocholine. The  
223 increase in absorbance was registered over 2 min at 412 nm. The specific activity was  
224 expressed in  $\mu$ moles BcSCh/h/mg of protein of serum.

225

226            *2.8. Lipid peroxidation*

227            Lipid peroxidation was measured in serum, through TBARS levels according to a  
228 modified method of (Jentzsch, Bachmann *et al.*, 1996). Results were obtained by  
229 spectrophotometry and expressed as nanomoles of MDA per milliliter of protein in  
230 serum (nmol/MDA/mL of protein).

231

232            *2.9. Superoxide dismutase and catalase activities*

233            To determine superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were  
234 determined using blood samples collected in tubes with citrated and diluted in saline  
235 solution (1:10) and stored at -20°C.

236            Determination of CAT activity in blood was carried out in accordance with a  
237 modified method of (Nelson e Kiesow, 1972). This assay involves the change in  
238 absorbance at 240 nm, for 2min, due to CAT dependent decomposition of hydrogen  
239 peroxide. The enzyme activity was calculated using the molar extinction coefficient  
240 (0.0432cm<sup>2</sup>/mmol) as the results were expressed as nmol CAT per milligram protein.

241            SOD activity measurement was based on the inhibition of the radical superoxide  
242 reaction with adrenalin as described by (Mccord e Fridovich, 1969). In this method,  
243 SOD present in the sample competes with the detection system for radical superoxide.  
244 A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50% the speed of  
245 adrenalin oxidation. It leads to formation of the red colored product, adrenochrome,  
246 which is detected by spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the  
247 speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium

248 containing glycine–NaOH (50 mM, pH 10) and adrenalin (1 mM). The results were  
249 expressed as UI SOD per milligram protein.

250

### 251 *2.10. Histological studies*

252 To confirm the demyelination targeted in the model, three rats of each group  
253 were used for histological analysis of the lesion. The animals were perfused under deep  
254 anesthesia with 10% buffered formalin via the left ventricle at seven and 21 days after  
255 injection. Brain stem coronal slices of the lesion were embedded in paraffin for routine  
256 processing and 5µm sections were produced and stained with hematoxinilin and eosin  
257 (H&E).

258

### 259 *2.11. Protein Determination*

260 Protein was measured by the Coomassie Blue method (Bradford, 1976), using  
261 bovine serum albumin as standard.

262

### 263 *2.12. Statistical analysis*

264 Statistical analyses were analyzed by one- or two-way ANOVA, followed by  
265 Tukey's multiple range tests.  $P<0.05$  was considered to represent a significant  
266 difference in all experiments. All data were expressed as mean  $\pm$  SEM.

267

## 268 **3. Results**

269

### 270 *3.1 AChE assay in whole blood*

271 Figure 1A shows the effect of quercetin treatment on the AChE activity in whole  
272 blood of the rats at 7 and 21 days after EB injection. Only on day 21 EB increased the  
273 AChE activity in whole blood. The quercetin prevented the increase of the AChE activity  
274 in whole blood on day 21 after EB injection ( $P<0.05$ ).

275

### 276 *3.2 AChE assay lymphocytes*

277 Figure 1B shows the effect of quercetin treatment on the AChE activity in  
278 lymphocytes of the rats at 7 and 21 days after EB injection. EB increased the AChE

279 activity in lymphocytes on days 7 and 21. Querc prevented the increase of the AChE  
280 activity in lymphocytes on days 7 and 21 after EB injection ( $P<0.05$ ).

281

### 282 *3.3 BChE in serum*

283 Figure 2 shows the effect of quercetin treatment on the BChE activity in whole  
284 blood of the rats at 7 and 21 days after EB injection. No significant differences in the  
285 BChE activity were observed among the groups ( $P>0.05$ ).

286

### 287 *3.4 Levels of TBARS*

288 Figure 3 shows the effect of quercetin treatment on the serum TBARS level in  
289 serum of the rats at 7 and 21 days after EB injection. Only on day 7 EB increased the  
290 serum TBARS level, indicated by MDA concentration. The quercetin prevented the  
291 increase of the serum TBARS level on day 7 after EB injection ( $P<0.05$ ).

292

### 293 *3.5 CAT and SOD activities*

294 Figure 4A shows the effect of quercetin treatment on the SOD activity in whole  
295 blood of the rats at 7 and 21 days after EB injection. Only on day 7 EB increased the  
296 SOD activity. quercetin prevented the increase of the SOD activity in whole blood on  
297 day 7 after EB injection ( $P<0.05$ ).

298 Figure 4B shows the effect of quercetin treatment on the CAT activity in whole  
299 blood of the rats at 7 and 21 days after EB injection. Only on day 7 EB decreased the  
300 CAT activity. The quercetin prevented the decrease of the CAT activity in whole blood  
301 on day 7 after EB injection ( $P<0.05$ ).

302

### 303 *3.6 Histological analysis*

304 The lesions induced by EB consisted of areas of demyelination seen as status  
305 spongiosus of the tissue. More cellular activity and some new blood vessels were  
306 observed within the demyelinated lesion at 21 days; the compactness of the tissue  
307 suggests ongoing remyelination of the lost myelin sheaths. The rats from the control  
308 group had a small traumatic lesion along the needle track.

309

#### 310 **4. Discussion**

311 In the present study we verified the effect of quercetin on the AChE activity in  
312 blood and lymphocyte and BChE activity in serum of demyelinated rats by EB. Also was  
313 evaluated, serum TBARS, blood SOD and CAT activities during periods of  
314 demyelination and remyelination. There are several studies using EB as an  
315 experimental demyelination model associated with the investigation of enzymes that are  
316 important for the proper functioning of the CNS (Yajima e Suzuki, 1979; Graca e  
317 Blakemore, 1986; Graca, Bondan *et al.*, 2001; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2006;  
318 Spanevello, Mazzanti *et al.*, 2007). However, studies that correlate EB demyelination  
319 effects with peripheral cholinesterase activity and oxidative stress in rats treated with  
320 quercetin have not been found in the literature.

321 EB has been injected with the aim of evaluating demyelination and remyelination  
322 events in the brainstem of Wistar rats (Graca, Bondan *et al.*, 2001; Bondan, Lallo *et al.*,  
323 2002; Sallis, Mazzanti *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). After the  
324 intracisternal injection of EB, oligodendrocytes and astrocytes suffer degenerative  
325 changes between 48 and 72 hours (Yajima e Suzuki, 1979; Dutta, McDonough *et al.*,  
326 2006). Complete demyelination is attained on the day 7 and the first signs of  
327 remyelination can be observed, with almost complete remyelination around 25-30 days  
328 after injection of EB (Bondan, Lallo *et al.*, 2000; Matute, Alberdi *et al.*, 2001).  
329 Histological changes observed in the lesions induced by EB in this experiment match  
330 the lesions observed in former studies using this drug.

331 In this study we demonstrated that the model experimental by EB can affected  
332 the cholinergic signaling in non-neural cells. In the whole blood, the AChE activity  
333 showed increase on day 21 in the EB group. Already in the lymphocytes was observed  
334 an increase in its activity in rats demyelinated by EB both on day 7 and 21. These  
335 results demonstrate the sensitivity of the enzyme activity in lymphocytes as marker of  
336 low-grade systemic inflammation, since in both events (demyelination and  
337 remyelination) there was a change in the activity of this enzyme. When there is an  
338 increase in the AChE activity, a rapid degradation of ACh occurs. ACh is considered as  
339 molecule with anti-inflammatory action, because it binds to nicotinic receptors on  
340 lymphocytes surfaces, and thus inhibits the proliferation of cytokines, serotonin,



341 histamine, leukotrienes, which are among the mediators of the inflammatory process  
342 (Kawashima e Fujii, 2003; Nizri, Hamra-Amitay *et al.*, 2006).

343 In addition, the quercetin administration was able to prevent the increase of  
344 AChE activity in blood cells and lymphocytes occasioned by EB demyelination. These  
345 results showed that quercetin affected the cholinergic signaling in non-neural cells  
346 preventing increase of AChE activities by EB. This prevention could be explained for the  
347 neuroprotective effects in inflammatory brain injury by modulation of neuronal signaling  
348 (Spencer, Kuhnle *et al.*, 2003; Spencer, Rice-Evans *et al.*, 2003). The anti-inflammatory  
349 effects may be achieved through reduction the proliferation of peripheral blood  
350 mononuclear cells and modulation of the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  released by  
351 peripheral blood mononuclear cells in the culture supernatants (Sternberg, Chadha *et al.*,  
352 2008), and by decrease in IL-12-induced T cell proliferation and Th1 differentiation  
353 (Muthian e Bright, 2004).

354 In relation the BChE, this enzyme could also serve as marker of low-grade  
355 systemic inflammation since it is able to hydrolyse choline esters as the AChE (Das,  
356 2007). In this study not was observed alteration in the BChE activity in both events  
357 (demyelination and remyelination). This result can be explained by the fact that BChE is  
358 less efficient in ACh hydrolysis at low concentrations but highly efficient at high  
359 concentrations (Silver, 1974). On the other hand, when the AChE activity is inhibited the  
360 BChE can increase your activity and also take the place of AChE in ACh degradation  
361 (Li, Stribley *et al.*, 2000).

362 Another important aspect to be discussed is that quercetin is more potent than  
363 other antioxidants such as vitamin C, vitamin E and  $\beta$ -carotenes, which are antioxidant  
364 nutrients (Rice-Evans, Miller *et al.*, 1996). Moreover, quercetin showed the effect of  
365 memory protect against damage caused by D-galactose and cerebral ischemia in  
366 animal models (Lu, Zheng *et al.*, 2006; Pu, Mishima *et al.*, 2007). In this sense, due to  
367 that demyelinating events may increase free radical formation the effect of quercetin  
368 may be very important as a free radical scavenger, stabilizing the curvature and fluidity  
369 of the cell membranes.

370 In this study, TBARS contents showed increase in EB group when compared  
371 with Control, Querc and EB + Querc groups (Figure 3). These results agree in part with

372 those obtained in patients with MS, where oxidative stress parameters in blood and  
373 cerebrospinal fluid were consistently found to be increased (Naidoo e Knapp, 1992;  
374 Koch, Ramsaransing *et al.*, 2006). The lipid peroxidation is considered an important  
375 pathophysiological event in the study of pharmacologically substances in several  
376 neurodegenerative diseases in ischemic and traumatic injury (Braughler, Pregonzer *et*  
377 *al.*, 1987; Mossberg, Movitz *et al.*, 2009).

378 In addition, the increase lipid peroxidation under demyelinating events could be  
379 due to increase oxidative stress in the cell as a result of depletion of antioxidant defense  
380 systems. Antioxidants enzymes form the first line of defense against ROS in the  
381 organism include the enzymes SOD, CAT and glutathione peroxidase (GSH-Px), which  
382 play an important role in scavenging the toxic intermediate. CAT e SOD are the two  
383 major enzymes that remove ROS *in vivo*. SOD catalyzes the dismutation of superoxide  
384 anion ( $O_2^{\bullet}$ ) into hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), which is then degraded to  $H_2O$  by CAT or by  
385 GSH-Px (Madhavi, 1995). In this study was observed the increase of SOD activity in EB  
386 group at seven days when compared to the Control, Querc and EB + Querc groups  
387 suggesting that this enzyme is trying to remove ROS as demonstrated by increased  
388 lipidic peroxidation in EB group (Figure 3 and 4). Furthermore, the quercetin  
389 administration was able to prevent the increase of SOD activity occasioned by EB  
390 demyelination.

391 With respect to CAT activity, our findings revealed that significant decreased in  
392 rats demyelinated of the EB group when compared to the Control, Querc and EB +  
393 Querc groups. One possible mechanism for this reduction in CAT activity may be due to  
394 the inactivation (exhaustion) this enzyme caused by the excess of free radicals. These  
395 results were in agreement with others authors that have shown lower CAT activity in MS  
396 (Syburra e Passi, 1999) and in the EB demyelination model (Mazzanti, Spanevello *et*  
397 *al.*, 2009). In this line, it is important to observe that demyelinated rats treated with  
398 quercetin, alterations in TBARS and CAT were reverted to control levels (Control and  
399 Querc groups), demonstrating that quercetin may have an important antioxidant role in  
400 reducing the damage caused by free radicals in demyelinating events.

401 In conclusion, the present study demonstrated that the experimental  
402 demyelination model by EB promote alteration in AChE activity of non neural cells, and

403 also alter the oxidative stress parameters in the blood. In addition, the quercetin was  
404 able to modulate the AChE activity and of the antioxidants enzymes, as well as reduce  
405 lipid peroxidation in demyelinated rats by EB. Taken together, these results can  
406 contribute to a better understanding of protective role of quercetin, emphasizing  
407 important therapeutic potential this compound in demyelinating diseases such as MS.

408

409

#### 410 **Conflicts of Interest statement**

411 There are no conflicts of interest.

412

#### 413 **Acknowledgements**

414 This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e  
415 Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul  
416 (FAPERGS) and Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
417 Superior (CAPES), Brazil.

418

419

#### 420 **5. References**

421 Appleyard, M. E. Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase. Biochem Soc Trans,  
422 v.22, n.3, Aug, p.749-55. 1994.

423

424 Bjartmar, C., J. R. Wujek, *et al.* Axonal loss in the pathology of MS: consequences for  
425 understanding the progressive phase of the disease. J Neurol Sci, v.206, n.2, Feb 15,  
426 p.165-71. 2003.

427

428 Bondan, E. F., M. A. Lallo, *et al.* [Blood-brain barrier breakdown following gliotoxic drug  
429 injection in the brainstem of Wistar rats]. Arq Neuropsiquiatr, v.60, n.3-A, Sep, p.582-9.  
430 2002.

431

432 \_\_\_\_\_. [Evaluation of locomotor activity after a local induction of toxic demyelination in  
433 the brainstem of Wistar rats]. Arq Neuropsiquiatr, v.64, n.2B, Jun, p.496-503. 2006.

- 434  
435 \_\_\_\_\_. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local  
436 ethidium bromide injection in Wistar rats. J Submicrosc Cytol Pathol, v.32, n.4, Oct,  
437 p.603-12. 2000.
- 438  
439 Borovikova, L. V., S. Ivanova, *et al.* Vagus nerve stimulation attenuates the systemic  
440 inflammatory response to endotoxin. Nature, v.405, n.6785, May 25, p.458-62. 2000.
- 441  
442 Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation  
443 of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining  
444 centrifugation and sedimentation at 1 g. Scand J Clin Lab Invest Suppl, v.97, p.77-89.  
445 1968.
- 446  
447 Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram  
448 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72,  
449 May 7, p.248-54. 1976.
- 450  
451 Braugher, J. M., J. F. Pregenzer, *et al.* Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of  
452 iron-dependent lipid peroxidation. J Biol Chem, v.262, n.22, Aug 5, p.10438-40. 1987.
- 453  
454 Chatonnet, A. e O. Lockridge. Comparison of butyrylcholinesterase and  
455 acetylcholinesterase. Biochem J, v.260, n.3, Jun 15, p.625-34. 1989.
- 456  
457 Dajas, F., F. Rivera-Megret, *et al.* Neuroprotection by flavonoids. Braz J Med Biol Res,  
458 v.36, n.12, Dec, p.1613-20. 2003.
- 459  
460 Das, A., M. Dikshit, *et al.* Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and  
461 female rats of adult and old age. Life Sci, v.68, n.13, Feb 16, p.1545-55. 2001.
- 462  
463 Das, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-  
464 grade systemic inflammation. Med Sci Monit, v.13, n.12, Dec, p.RA214-21. 2007.

- 465  
466 Day, T. e S. A. Greenfield. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on  
467 hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms. Neuroscience, v.111, n.3,  
468 p.649-56. 2002.
- 469  
470 Descarries, L., V. Gisiger, *et al.* Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. Prog  
471 Neurobiol, v.53, n.5, Dec, p.603-25. 1997.
- 472  
473 Dhib-Jalbut, S., D. L. Arnold, *et al.* Neurodegeneration and neuroprotection in multiple  
474 sclerosis and other neurodegenerative diseases. J Neuroimmunol, v.176, n.1-2, Jul,  
475 p.198-215. 2006.
- 476  
477 Dutta, R., J. McDonough, *et al.* Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal  
478 degeneration in multiple sclerosis patients. Ann Neurol, v.59, n.3, Mar, p.478-89. 2006.
- 479  
480 Ellman, G. L., K. D. Courtney, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of  
481 acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol, v.7, Jul, p.88-95. 1961.
- 482  
483 Ferretti, G. e T. Bacchetti. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. J Neurol Sci,  
484 v.311, n.1-2, Dec 2011, p.92-7. 2011.
- 485  
486 Fitzgerald, B. B. e L. G. Costa. Modulation of muscarinic receptors and  
487 acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated  
488 organophosphate exposure in rats. Fundam Appl Toxicol, v.20, n.2, Feb, p.210-6. 1993.
- 489  
490 Graca, D. L. e W. F. Blakemore. Delayed remyelination in rat spinal cord following  
491 ethidium bromide injection. Neuropathol Appl Neurobiol, v.12, n.6, Nov-Dec, p.593-605.  
492 1986.
- 493

- 494 Graca, D. L., E. F. Bondan, *et al.* Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in  
495 an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. Arg  
496 Neuropsiquiatr, v.59, n.2-B, Jun, p.358-61. 2001.
- 497
- 498 Hertog, M. G., E. J. Feskens, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary  
499 heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet, v.342, n.8878, Oct 23, p.1007-11.  
500 1993.
- 501
- 502 Jentsch, A. M., H. Bachmann, *et al.* Improved analysis of malondialdehyde in human  
503 body fluids. Free Radic Biol Med, v.20, n.2, p.251-6. 1996.
- 504
- 505 Johnson, G. e S. W. Moore. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at  
506 the peripheral anionic site. Biochem Biophys Res Commun, v.258, n.3, May 19, p.758-  
507 62. 1999.
- 508
- 509 Kao, T. K., Y. C. Ou, *et al.* Inhibition of nitric oxide production by quercetin in  
510 endotoxin/cytokine-stimulated microglia. Life Sci, v.86, n.9-10, Feb 27, p.315-21. 2010.
- 511
- 512 Kawashima, K. e T. Fujii. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. Pharmacol  
513 Ther, v.86, n.1, Apr, p.29-48. 2000.
- 514
- 515 \_\_\_\_\_. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. Life Sci, v.72,  
516 n.18-19, Mar 28, p.2101-9. 2003.
- 517
- 518 Knekt, P., R. Jarvinen, *et al.* Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other  
519 malignant neoplasms. Am J Epidemiol, v.146, n.3, Aug 1, p.223-30. 1997.
- 520
- 521 Koch, M., G. S. Ramsaransing, *et al.* Oxidative stress in serum and peripheral blood  
522 leukocytes in patients with different disease courses of multiple sclerosis. J Neurol,  
523 v.253, n.4, Apr, p.483-7. 2006.
- 524

- 525 Kutty, K. M. Biological function of cholinesterase. Clin Biochem, v.13, n.6, Dec, p.239-  
526 43. 1980.
- 527
- 528 Li, B., J. A. Stribley, *et al.* Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible  
529 function in the acetylcholinesterase knockout mouse. J Neurochem, v.75, n.3, Sep,  
530 p.1320-31. 2000.
- 531
- 532 Linseman, D. A. Targeting oxidative stress for neuroprotection. Antioxid Redox Signal,  
533 v.11, n.3, Mar, p.421-4. 2009.
- 534
- 535 Lu, J., Y. L. Zheng, *et al.* Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in  
536 mouse brain. Behav Brain Res, v.171, n.2, Aug 10, p.251-60. 2006.
- 537
- 538 Madhavi, D. L. D., S.S.; Salunkhe, D.K. . Toxicological aspects of food antioxidants. In:  
539 (Ed.). Food Antioxidants. New York: Dekker, 1995. Toxicological aspects of food  
540 antioxidants, p.267
- 541
- 542 Massoulie, J., L. Pezzementi, *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterases.  
543 Prog Neurobiol, v.41, n.1, Jul, p.31-91. 1993.
- 544
- 545 Matute, C., E. Alberdi, *et al.* The link between excitotoxic oligodendroglial death and  
546 demyelinating diseases. Trends Neurosci, v.24, n.4, Apr, p.224-30. 2001.
- 547
- 548 Matute, C. e F. Perez-Cerda. Multiple sclerosis: novel perspectives on newly forming  
549 lesions. Trends Neurosci, v.28, n.4, Apr, p.173-5. 2005.
- 550
- 551 Mazzanti, C. M., R. Spanevello, *et al.* Pre-treatment with ebselen and vitamin E  
552 modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. Int J Dev  
553 Neurosci, v.27, n.1, Feb, p.73-80. 2009.
- 554

- 555 \_\_\_\_\_ . Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally  
556 demyelinated with ethidium bromide. Int J Dev Neurosci, v.25, n.4, Jun, p.259-64. 2007.  
557
- 558 Mazzanti, C. M., R. M. Spanevello, *et al.* Acetylcholinesterase activity in rats  
559 experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta.  
560 Neurochem Res, v.31, n.8, Aug, p.1027-34. 2006.  
561
- 562 Mccord, J. M. e I. Fridovich. Superoxide dismutase. An enzymic function for  
563 erythrocyte (hemocuprein). J Biol Chem, v.244, n.22, Nov 25, p.6049-55. 1969.  
564
- 565 Mesulam, M. M., A. Guillozet, *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central  
566 cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine.  
567 Neuroscience, v.110, n.4, p.627-39. 2002.  
568
- 569 Mossberg, N., C. Movitz, *et al.* Oxygen radical production in leukocytes and disease  
570 severity in multiple sclerosis. J Neuroimmunol, v.213, n.1-2, Aug 18, p.131-4. 2009.  
571
- 572 Muthian, G. e J. J. Bright. Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates  
573 experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT  
574 pathway in T lymphocyte. J Clin Immunol, v.24, n.5, Sep, p.542-52. 2004.  
575
- 576 Naidoo, R. e M. L. Knapp. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid  
577 and serum in multiple sclerosis and other conditions. Clin Chem, v.38, n.12, Dec,  
578 p.2449-54. 1992.  
579
- 580 Nelson, D. P. e L. A. Kiesow. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by  
581 catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solutions in the  
582 UV). Anal Biochem, v.49, n.2, Oct, p.474-8. 1972.  
583



- 584 Nizri, E., Y. Hamra-Amitay, *et al.* Anti-inflammatory properties of cholinergic up-  
585 regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. Neuropharmacology, v.50, n.5,  
586 Apr, p.540-7. 2006.  
587
- 588 Oliveira, S. R., A. P. Kallaur, *et al.* Oxidative stress in multiple sclerosis patients in  
589 clinical remission: association with the expanded disability status scale. J Neurol Sci,  
590 v.321, n.1-2, Oct 2012, p.49-53. 2012.  
591
- 592 Pavlov, V. A. e K. J. Tracey. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory  
593 pathway. Biochem Soc Trans, v.34, n.Pt 6, Dec, p.1037-40. 2006.  
594
- 595 Peterson, L. K. e R. S. Fujinami. Inflammation, demyelination, neurodegeneration and  
596 neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol, v.184, n.1-2,  
597 Mar, p.37-44. 2007.  
598
- 599 Pu, F., K. Mishima, *et al.* Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial  
600 memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by  
601 repeated cerebral ischemia in rats. J Pharmacol Sci, v.104, n.4, Aug, p.329-34. 2007.  
602
- 603 Rao, A. A., G. R. Sridhar, *et al.* Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase  
604 may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. Med  
605 Hypotheses, v.69, n.6, p.1272-6. 2007.  
606
- 607 Rendell, P. G., J. D. Henry, *et al.* Prospective memory, emotional valence, and multiple  
608 sclerosis. J Clin Exp Neuropsychol, Apr 4. 2012.  
609
- 610 Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, *et al.* Structure-antioxidant activity relationships of  
611 flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med, v.20, n.7, p.933-56. 1996.  
612
- 613 Rosas-Ballina, M. e K. J. Tracey. Cholinergic control of inflammation. J Intern Med,  
614 v.265, n.6, Jun, p.663-79. 2009.

- 615
- 616 Sallis, E. S., C. M. Mazzanti, *et al.* OSP-Immunofluorescent remyelinating  
617 oligodendrocytes in the brainstem of toxically-demyelinated Wistar rats. Arg  
618 Neuropsiquiatr, v.64, n.2A, Jun, p.240-4. 2006.
- 619
- 620 Silver, A. The Biology of Cholinesterases. New York: Elsevier/Agricultural Research  
621 Council Institute. 1974
- 622
- 623 Soreq, H. e S. Seidman. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. Nat Rev  
624 Neurosci, v.2, n.4, Apr, p.294-302. 2001.
- 625
- 626 Spanevello, R. M., C. M. Mazzanti, *et al.* Activities of enzymes that hydrolyze adenine  
627 nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide  
628 and treated with interferon-beta. Life Sci, v.80, n.12, Feb 27, p.1109-14. 2007.
- 629
- 630 Spencer, J. P., G. G. Kuhnle, *et al.* Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin  
631 and its in vivo metabolites. Biochem J, v.372, n.Pt 1, May 15, p.173-81. 2003.
- 632
- 633 Spencer, J. P., C. Rice-Evans, *et al.* Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and  
634 ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action  
635 on neuronal viability. J Biol Chem, v.278, n.37, Sep 12, p.34783-93. 2003.
- 636
- 637 Sternberg, Z., K. Chadha, *et al.* Quercetin and interferon-beta modulate immune  
638 response(s) in peripheral blood mononuclear cells isolated from multiple sclerosis  
639 patients. J Neuroimmunol, v.205, n.1-2, Dec 15, p.142-7. 2008.
- 640
- 641 Syburra, C. e S. Passi. Oxidative stress in patients with multiple sclerosis. Ukr Biokhim  
642 Zh, v.71, n.3, May-Jun, p.112-5. 1999.
- 643

644 Uttara, B., A. V. Singh, *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review  
645 of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Curr Neuropharmacol,  
646 v.7, n.1, Mar, p.65-74. 2009.

647

648 Van Horssen, J., M. E. Witte, *et al.* Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis.  
649 Biochim Biophys Acta, v.1812, n.2, Feb, p.141-50. 2006.

650

651 Van Meeteren, M. E., C. E. Teunissen, *et al.* Antioxidants and polyunsaturated fatty  
652 acids in multiple sclerosis. Eur J Clin Nutr, v.59, n.12, Dec, p.1347-61. 2005.

653

654 Whittaker, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. Anaesthesia, v.35,  
655 n.2, Feb, p.174-97. 1980.

656

657 Worek, F., U. Mast, *et al.* Improved determination of acetylcholinesterase activity in  
658 human whole blood. Clin Chim Acta, v.288, n.1-2, Oct, p.73-90. 1999.

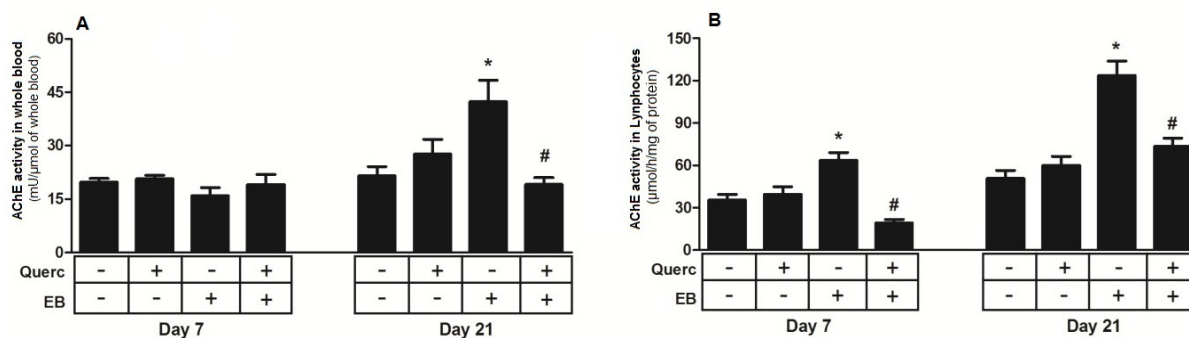
659

660 Yajima, K. e K. Suzuki. Demyelination and remyelination in the rat central nervous  
661 system following ethidium bromide injection. Lab Invest, v.41, n.5, Nov, p.385-92. 1979.

662

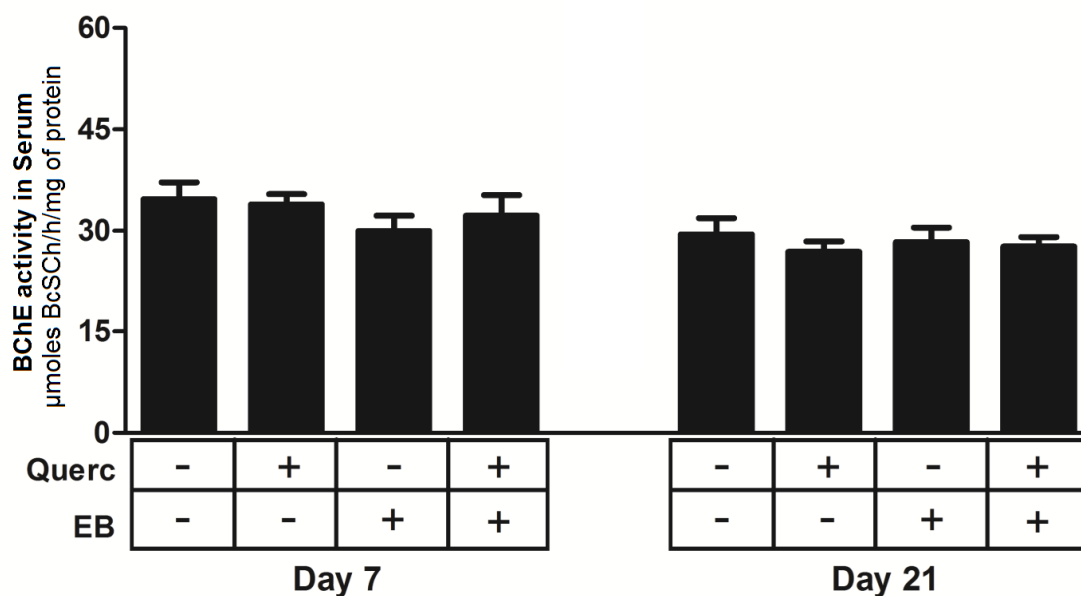
663

664



665  
 666 **Figure 1.** AChE activity in whole blood (A) and lymphocytes (B) in rats experimentally  
 667 demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg),  
 668 during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported  
 669 as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group.  $*P < 0.05$  compared with the others groups;  
 670 #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that  
 671 quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's  
 672 Multiple Comparison Test.  
 673

674

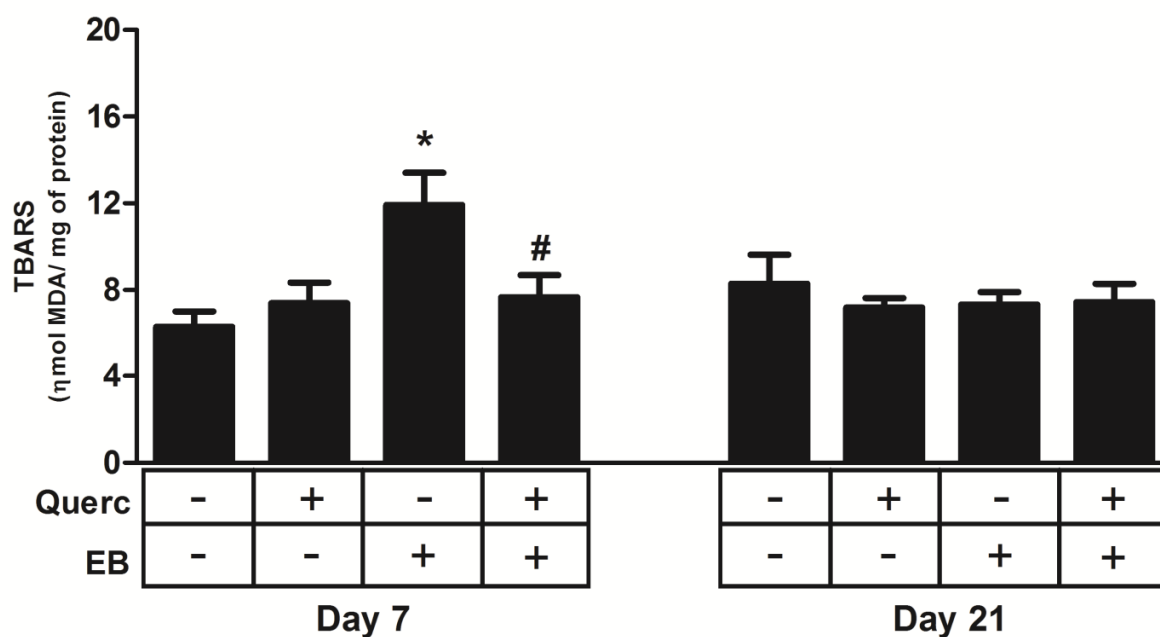


675

676 **Figure 2.** BChE activity in serum of the rats experimentally demyelinated with ethidium  
 677 bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg), during stages of demyelination (7  
 678 days) and remyelination (21 days). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats  
 679 per group. No significant differences in the BChE activity among groups ( $P>0.05$ ).  
 680 ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

681

682

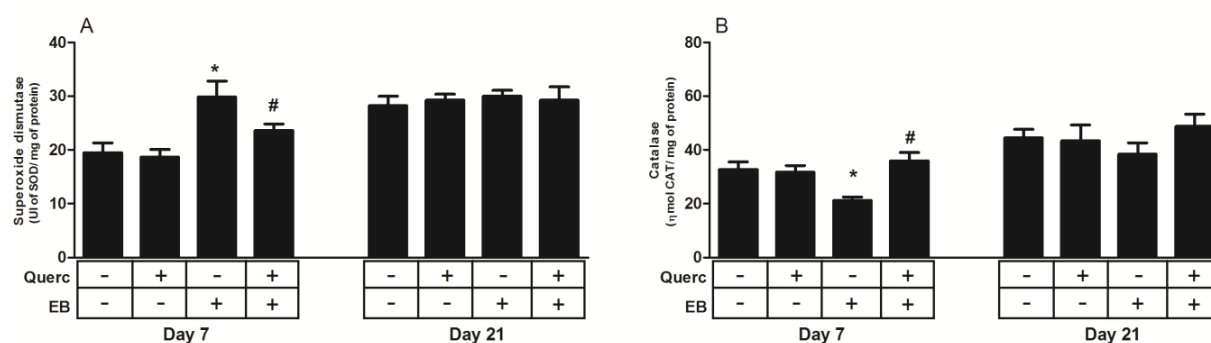


683

684 **Figure 3.** The serum TBARS level indicated by MDA concentration in rats  
 685 experimentally demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin  
 686 (50mg/kg), during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data  
 687 are reported as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group \* $P < 0.05$  compared with the  
 688 others groups; #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction  
 689 suggesting that quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*)  
 690 followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

691

692



693

694 **Figure 4.** SOD (A) and CAT (B) activities in whole blood in rats experimentally  
 695 demyelinated with ethidium bromide (0.1%) and treated with quercetin (50mg/kg),  
 696 during stages of demyelination (7 days) and remyelination (21 days). Data are reported  
 697 as means  $\pm$  S.E.M. with 8-10 rats per group \* $P < 0.05$  compared with the others groups;  
 698 #Denotes a significant Vehicle or Querc vs EB or Querc+EB interaction suggesting that  
 699 quercetin prevents the effect of EB treatment. ANOVA (*two-way*) followed by Tukey's  
 700 Multiple Comparison Test.

## 7. Discussão

Os estudos retrospectivos são realizados pelo grupo de pesquisa (Beckmann D.V., 2010; Santini G., 2010; Santos R.P., 2011; Aiello G., Santos R.P. *et al.*, 2012) com o objetivo de obter dados sobre as principais afecções neurológicas como doença do disco intervertebral, subluxação atlantoaxial e trauma agudo de medula, que sirvam de base para o desenvolvimento de estudos experimentais em busca de terapias alternativas para o tratamento destas patologias (Festugatto R., 2009; Aiello G., 2012; Santos R.P., 2012).

Nas doenças desmielinizantes, tais como a EM em humanos e a cinomose em cães, há prejuízo à transmissão do impulso nervoso levando ao aparecimento de sinais neurológicos (Bennet, 1997; Kipp, Van Der Valk *et al.*, 2012). Além destas, o trauma compressivo contínuo à medula espinhal, como ocorre na subluxação atlantoaxial, pode levar a desmielinização pela interferência da compressão na perfusão, limitando o suprimento arterial e ocluindo a drenagem venosa, causando danos diretos à mielina e axônio (Anthes, Theriault *et al.*, 1995; Olby, 2010) ou ainda pela própria pressão direta que a mielina sofre nestes casos de compressão medular (Fish e Blakemore, 1983). Em ambos os casos pode ocorrer disfunção neurológica, sem lesão anatômica (Anthes, Theriault *et al.*, 1995; Olby, 2010).

No primeiro estudo, buscou-se informação a respeito dos casos de subluxação atlantoaxial em cães atendidos no Hospital Veterinário Universitário (HVU) a fim de caracterizar esta doença que apresenta desmielinização pela compressão crônica da medula espinhal. As informações relevantes deste estudo retrospectivo foram o tipo e a resposta ao tratamento empregado e o tempo de recuperação. Pode-se observar que a opção mais utilizada foi o tratamento cirúrgico, como alternativa ao tratamento clínico. Ambos os tratamentos apresentaram tempo prolongado de recuperação funcional. Os tratamentos clínico (uso de anti-inflamatórios com uso de colete cervical) ou cirúrgico (artrodese atlantoaxial) apresentam recuperação satisfatória e tempo de recuperação semelhante (Sharp e Wheeler, 2005; Shires, 1998).

A imobilização da articulação atlantoaxial, que o colete cervical ou a artrodese proporcionam, permite a prevenção de lesões contínuas. É importante lembrar que em



lesões traumáticas (incluindo lesões primárias e secundárias), além de uma descontinuidade física das vias, ocorre também desmielinização (Bareyre, Kerschensteiner *et al.*, 2004; Maier e Schwab, 2006). A desmielinização no epicentro da lesão pode levar à disfunção axonal crônica, com bloqueio da condução nervosa (Goto e Hoshino, 2001), sendo que pouco se sabe sobre a incidência, extensão e cronicidade da desmielinização após a lesão da medula espinal em humanos (Bunge, Puckett *et al.*, 1993; Kakulas, 1999). Diante disso, surgiu o questionamento do que poderia ser feito para minimizar estes efeitos causados pela desmielinização tanto no tratamento clínico quanto cirúrgico, a fim de diminuir o tempo de recuperação. O flavonoide quercetina apresentou-se como um bom candidato por ser um antioxidante mais eficiente do que a vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno (Rice-Evans, Miller *et al.*, 1996; Miller, Mrowicka *et al.*, 2011) e pelos efeitos neuroprotetores em lesões inflamatórias (Spencer, Kuhnle *et al.*, 2003; Spencer, Rice-Evans *et al.*, 2003). A partir disso, surgiu a necessidade de investigar experimentalmente a ação da quercetina nos eventos de demielinização do tronco encefálico a fim de avaliar a possibilidade do uso deste na clínica veterinária.

Estudos com modelos experimentais e pacientes clínicos de EM relataram prejuízos na neurotransmissão, resultando em deficiência de cognição e de armazenamento de informações (Guimaraes e Sa, 2012; Jongen, Ter Horst *et al.*, 2012; Rendell, Henry *et al.*, 2012), aumento nos sinais de ansiedade e depressão (Anhoque, Domingues *et al.*, 2011) e, principalmente, dificuldades nas atividades locomotoras (Pelissier, Benaim *et al.*, 2001; Fulk, 2005; Giesser, Beres-Jones *et al.*, 2007). Na busca de novas alternativas no tratamento das alterações que ocorrem na EM, testou-se a quercetina, um potente antioxidante e anti-inflamatório, em ratos desmielinizados pelo BE.

O modelo experimental de desmielinização pelo BE foi uma boa escolha para os testes comportamentais realizados no segundo estudo, devido à ação tardia do BE após injeção, separando alterações cirúrgicas das mudanças provenientes da desmielinização (Blakemore, 1981; Graca e Blakemore, 1986). Os testes comportamentais de *beam walking* e *foot fault* apresentaram resultados similares. Durante estes testes, podem-se destacar três principais momentos entre os grupos

controle, Querc, BE e BE+Querc: *Tempo de desmielinização* – alterações da atividade locomotora nos grupos BE e BE+Querc; *Tempo de prevenção* – alterações da atividade locomotora apenas no grupo BE; e *Tempo de remielinização* – não houve diferença entre os grupos. Foi possível observar que no tempo de prevenção, o grupo BE+Querc apresentou resultados semelhantes ao do grupo controle, enquanto que o grupo BE apresentou diferença entre os demais grupos. Além disso, a recuperação acelerada da atividade locomotora, promovida pela quercetina, sugere a existência de prevenção ou de maior velocidade de remielinização (Bondan, Lallo *et al.*, 2006).

É importante salientar que o BE foi injetado com o objetivo de avaliar os eventos de desmielinização e remielinização no tronco encefálico e na medula espinhal de ratos Wistar (Yajima e Suzuki, 1979; Graca e Blakemore, 1986; Graca, Bondan *et al.*, 2001; Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Spanevello, Mazzanti *et al.*, 2007). A desmielinização completa é alcançada no dia 7 e os primeiros sinais de remielinização podem ser observados, com remielinização quase completa em torno de 25-30 dias após a injeção de EB (Bondan, Lallo *et al.*, 2000; Matute, Alberdi *et al.*, 2001). Diante disso, escolheram-se os dias 7 (pico de desmielinização) e 21 (pico de desmielinização) para realizar as avaliações dos parâmetros nas estruturas encefálicas (atividade da AChE e peroxidação lipídica), no sangue (parâmetros de estresse oxidativo e atividade das colinesterases) e linfócitos (atividade da AChE).

No primeiro manuscrito, a avaliação dos níveis de peroxidação lipídica nas estruturas encefálicas demonstrou aumento na ponte, hipotálamo e cerebelo no dia 7, e somente na ponte no dia 21 após a injeção de BE. Foi possível observar também que a quercetina impediu a geração de ROS nestas estruturas após 7 e 21 dias de desmielinização. É importante destacar que o aumento da peroxidação lipídica permaneceu até 21 dias somente na ponte, provavelmente por esta ser uma estrutura rica em mielina (ácido gordo) e é, portanto, mais propensa a ser acometida por radicais livres. É bem reconhecido que os eventos desmielinizantes resultam em funções de membrana alteradas em vários tecidos, incluindo o cérebro. Essas alterações ocorrem devido a um aumento da formação de radicais livres, que promove um aumento da peroxidação lipídica, tendo como consequência a deterioração oxidativa importante das

membranas celulares (Besler, Comoglu *et al.*, 2002; Spanevello, Mazzanti *et al.*, 2009; Mitosek-Szewczyk, Gordon-Krajcer *et al.*, 2010; Miller, Mrowicka *et al.*, 2011).

A atividade da AChE foi alterada na ponte, hipotálamo e cerebelo somente no dia 7 após injeção do BE e a quercetina preveniu a inibição da atividade desta enzima. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores (Mazzanti, Spanevello, Obregon *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2007; Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009), que demonstraram mudança na atividade da AChE em sete e 21 dias após injeção de EB, mas que também não foi homogênea nas estruturas cerebrais avaliadas. A AChE responde a insultos diversos, incluindo o estresse oxidativo, um importante evento relacionado à patogênese de uma variedade de doenças do SNC, tais como EM (Mazzanti, Spanevello, Pereira *et al.*, 2006; Jha e Rizvi, 2009; Abdel-Salam, Khadrawy *et al.*, 2012). Além disso, alterações na membrana lipídica observada neste estudo pode ser um fator decisivo para a modificação do estado conformacional da molécula de AChE e poderia explicar as alterações da atividade desta enzima no presente estudo.

No terceiro estudo, foi demonstrado que o modelo experimental pela EB pode influenciar a sinalização colinérgica em células não neurais. No sangue total, a atividade da AChE apresentou aumento no dia 21 no grupo EB. Já nos linfócitos foi observado aumento em sua atividade em ratos desmielinizados por EB tanto nos dias 7 e 21. Estes resultados demonstram a sensibilidade da atividade enzimática em linfócitos como marcador de baixo grau de inflamação sistêmica, uma vez que em ambos os eventos (desmielinização e remielinização), houve uma alteração na atividade desta enzima. Quando há um aumento na atividade da AChE, ocorre rápida degradação da ACh.

A ACh é considerada uma molécula com ação anti-inflamatória, uma vez que se liga a receptores nicotínicos nas superfícies de linfócitos e, portanto, inibe a proliferação de citocinas, a serotonina, a histamina, os leucotrienos, os quais estão entre os mediadores do processo inflamatório (Kawashima e Fujii, 2003; Nizri, Hamra-Amitay *et al.*, 2006). Além disso, a administração de quercetina foi capaz de impedir o aumento da atividade da AChE em células do sangue e nos linfócitos ocasionado pela desmielinização pelo BE. Estes resultados demonstraram que a quercetina influenciou

a sinalização colinérgica em células não neurais, prevenindo o aumento da atividade da AChE ocasionada pelo EB. Essa prevenção pode ser explicada pelos efeitos neuroprotetores da quercetina na lesão encefálica inflamatória pela modulação da sinalização neuronal (Spencer, Kuhnle *et al.*, 2003; Spencer, Rice-Evans *et al.*, 2003). Os efeitos anti-inflamatórios podem ser alcançados através da regulação dos fatores envolvidos, como a tirosina-quinase, PI3 quinase, NFkB, AP-1 e STAT-1 (Kao, Ou *et al.*, 2010). Em relação à BChE, esta enzima pode também servir como marcador de baixo grau de inflamação sistêmica, uma vez que é capaz de hidrolisar os ésteres de colina, como a AChE (Das, 2007). Neste estudo não foi observada alteração na atividade da BChE em ambos os eventos (desmielinização e remielinização). Este resultado pode ser explicado pela BChE ser menos eficiente na hidrólise em baixas concentrações de ACh, mas altamente eficaz em concentrações elevadas (Silver, 1974). Por outro lado, quando ocorre a inibição da atividade da AChE, pode ocorrer o aumento da atividade da BChE.

Outro aspecto importante a ser discutido é que a quercetina é mais potente do que outros antioxidantes, tais como a vitamina C, vitamina E e  $\beta$ -caroteno (Rice-Evans, Miller *et al.*, 1996; Miller, Mrowicka *et al.*, 2011). Além disso, a quercetina demonstrou o efeito de proteção aos danos contra a memória causados pela D-galactose e isquemia cerebral em modelos animais (Lu, Zheng *et al.*, 2006; Pu, Mishima *et al.*, 2007). Neste sentido, devido ao aumento da formação de radicais livres que podem ocorrer nos eventos de desmielinização, o efeito da quercetina pode ser muito importante como um eliminador de radicais livres, estabilizando a curvatura e a fluidez das membranas celulares. A quercetina foi capaz de modular as enzimas antioxidantes do sangue e reduzir a peroxidação lipídica do sangue de ratos desmielinizados por BE. O aumento da peroxidação lipídica em eventos desmielinizantes pode ser devido ao aumento do estresse oxidativo na célula como um resultado de depleção de sistemas de defesa antioxidantes. As enzimas antioxidantes que constituem a primeira linha de defesa contra ROS no organismo incluem as enzimas CAT, SOD e glutathiona (GSH-Px), as quais desempenham um papel importante na limpeza do intermediário tóxico.

A SOD e CAT são as duas principais enzimas que removem ROS *in vivo*. No presente estudo, observou-se o aumento da atividade da SOD no grupo BE no dia sete

quando comparado com os grupos controle, Querc e BE + Querc, sugerindo que esta enzima estava tentando remover ROS, como demonstrado pelo aumento da peroxidação lipídica no grupo BE. Além disso, a administração quercetina foi capaz de impedir o aumento da atividade da SOD ocasionada pela desmielinização BE. Houve diminuição da atividade da CAT pelo BE. Um mecanismo possível para esta redução da atividade da CAT pode ser pela inativação (esgotamento) desta enzima, causada pelo excesso de radicais livres. Estes resultados estão de acordo com outros autores que mostraram atividade mais baixa da CAT em MS (Syburra e Passi, 1999) e no modelo de desmielinização pelo BE (Mazzanti, Spanevello *et al.*, 2009). Nesta linha, é importante observar que nos ratos desmielinizados tratados com quercetina, as alterações no TBARS e CAT foram revertidas para os níveis dos grupos controle e quercetina, demonstrando que a quercetina pode ter um importante papel antioxidante na redução dos danos causados por radicais livres em eventos desmielinizantes.

## 8. Conclusão

Por meio dos estudos feitos nos registros médicos do HVU-UFSM, pode-se concluir em relação à subluxação atlantoaxial que as cadelas miniaturas, como Poodle, Pinscher e Yorkshire Terrier, e com idade inferior a 24 meses são mais afetadas; a causa mais frequente da subluxação atlantoaxial é a agenesia do processo odontoide do eixo; o principal sinal neurológico encontrado é a hiperestesia cervical; a duração dos sinais neurológicos varia entre 21 e 210 dias; o tratamento predominante cirúrgico demonstra ser eficaz, com menor possibilidade de recidiva; não há relação entre a duração dos sinais clínicos e o tempo de recuperação pós-operatória.

Quanto ao estudo experimental, o modelo de desmielinização pelo BE promoveu alterações nos testes comportamentais, inibição da atividade da AChE e aumento da peroxidação lipídica nas estruturas encefálicas (ponte, hipotálamo e cerebelo). Além disso, promoveu alteração na atividade da AChE de células não neurais e nos parâmetros de estresse oxidativo do sangue. Os animais submetidos à desmielinização e tratados com quercetina demonstraram maior velocidade de recuperação locomotora, sugerindo prevenção da desmielinização ou aceleração na remielinização; capacidade de prevenir a inibição da atividade da AChE e a diminuição da peroxidação lipídica nas estruturas encefálicas, sugerindo que este composto pode modular a neurotransmissão colinérgica. A quercetina foi capaz ainda de modular a atividade da AChE de células não neurais e das enzimas antioxidantes do sangue, bem como reduzir a peroxidação lipídica do sangue de ratos desmielinizados por BE. Tomados em conjunto, estes resultados podem contribuir para uma melhor compreensão do papel neuroprotetor da quercetina, enfatizando a importância deste antioxidante na dieta humana e animal, bem como do potencial terapêutico em doenças desmielinizantes tais como a esclerose múltipla.

## 9. Referências

Abdel-Salam, O. M., Y. A. Khadrawy, *et al.* The effect of gabapentin on oxidative stress in a model of toxic demyelination in rat brain. J Basic Clin Physiol Pharmacol, v.23, n.2, p.61-8. 2012.

Aiello G. Prednisona e meloxicam no tratamento de ratos submetidos ao trauma agudo da medula espinhal. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012. 62 p.

Aiello G., Santos R.P., *et al.* Epilepsy in dogs: 66 cases (2005-2010). Brazilian Journal of Veterinary Research, v.32, n.4, april 2012, p.347-351. 2012.

Amude, A. M., A. A. Alfieri, *et al.* Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. Res Vet Sci, v.82, n.3, Jun, p.416-22. 2007.

Anhoque, C. F., S. C. Domingues, *et al.* Anxiety and depressive symptoms in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. Arq Neuropsiquiatr, v.69, n.6, Dec, p.882-6. 2011.

Ansari, M. A., H. M. Abdul, *et al.* Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease. J Nutr Biochem, v.20, n.4, Apr, p.269-75. 2009.

Anthes, D. L., E. Theriault, *et al.* Characterization of axonal ultrastructural pathology following experimental spinal cord compression injury. Brain Res, v.702, n.1-2, Dec 8, p.1-16. 1995.

Appleyard, M. E. Non-cholinergic functions of acetylcholinesterase. Biochem Soc Trans, v.22, n.3, Aug, p.749-55. 1994.

Bareyre, F. M., M. Kerschensteiner, *et al.* The injured spinal cord spontaneously forms a new intraspinal circuit in adult rats. Nat Neurosci, v.7, n.3, Mar, p.269-77. 2004.

Baumann, N. e D. Pham-Dinh. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. Physiol Rev, v.81, n.2, Apr, p.871-927. 2001.

Beckmann D.V., M. A., Santini G., Santos R.P., Festugatto R., Pelizzari C., Polidoro Neto D. & Baumhardt R. 2010. Atlantoaxial subluxation in 14 dogs (2003-2008). Brazilian Journal of Veterinary Research, v.30, n.2, February 2010, p.172-176. 2010.

Bennet, C. J., Plum, F.M.D. . Cecil Tratado de Medicina Interna. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. I/II. 1997

Bergman R, L. O., Shell L Acute spinal cord trauma: mechanisms and clinical syndromes. Veterinary Medicine, v.95, n.11, p.846-849. 2000.

Besler, H. T., S. Comoglu, *et al.* Serum levels of antioxidant vitamins and lipid peroxidation in multiple sclerosis. Nutr Neurosci, v.5, n.3, Jun, p.215-20. 2002.

Bjartmar, C., J. R. Wujek, *et al.* Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. J Neurol Sci, v.206, n.2, Feb 15, p.165-71. 2003.

Blakemore, W. F. Remyelination in the CNS. Prog Clin Biol Res, v.59A, p.105-9. 1981.

Bondan, E. F., M. A. Lallo, *et al.* [Blood-brain barrier breakdown following gliotoxic drug injection in the brainstem of Wistar rats]. Arq Neuropsiquiatr, v.60, n.3-A, Sep, p.582-9. 2002.

\_\_\_\_\_. [Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model]. Arq Neuropsiquiatr, v.61, n.3A, Sep, p.642-9. 2003.

\_\_\_\_\_. [Evaluation of locomotor activity after a local induction of toxic demyelination in the brainstem of Wistar rats]. Arq Neuropsiquiatr, v.64, n.2B, Jun, p.496-503. 2006.

\_\_\_\_\_. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. J Submicrosc Cytol Pathol, v.32, n.4, Oct, p.603-12. 2000.

Braugher, J. M., J. F. Pregenzer, *et al.* Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. J Biol Chem, v.262, n.22, Aug 5, p.10438-40. 1987.

Bunge, R. P., W. R. Puckett, *et al.* Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. Adv Neurol, v.59, p.75-89. 1993.

Chatonnet, A. e O. Lockridge. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochem J, v.260, n.3, Jun 15, p.625-34. 1989.

Chen, Z. Y., P. T. Chan, *et al.* Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. Chem Phys Lipids, v.79, n.2, Mar 29, p.157-63. 1996.

Cornard, J. P., L. Dangleterre, *et al.* Computational and spectroscopic characterization of the molecular and electronic structure of the Pb(II)-quercetin complex. J Phys Chem A, v.109, n.44, Nov 10, p.10044-51. 2005.



Cotelle, N. Role of flavonoids in oxidative stress. Curr Top Med Chem, v.1, n.6, Dec, p.569-90. 2001.

Da Costa, R. C. Cervical spondylomyelopathy (wobbler syndrome) in dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.40, n.5, Sep, p.881-913. 2010.

Dajas, F., F. Rivera-Megret, *et al.* Neuroprotection by flavonoids. Braz J Med Biol Res, v.36, n.12, Dec, p.1613-20. 2003.

Darreh-Shori, T., S. Brimijoin, *et al.* Differential CSF butyrylcholinesterase levels in Alzheimer's disease patients with the ApoE epsilon4 allele, in relation to cognitive function and cerebral glucose metabolism. Neurobiol Dis, v.24, n.2, Nov, p.326-33. 2006.

Darvesh, S., D. L. Grantham, *et al.* Distribution of butyrylcholinesterase in the human amygdala and hippocampal formation. J Comp Neurol, v.393, n.3, Apr 13, p.374-90. 1998.

Darvesh, S., D. A. Hopkins, *et al.* Neurobiology of butyrylcholinesterase. Nat Rev Neurosci, v.4, n.2, Feb, p.131-8. 2003.

Das, A., M. Dikshit, *et al.* Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. Life Sci, v.68, n.13, Feb 16, p.1545-55. 2001.

Das, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. Med Sci Monit, v.13, n.12, Dec, p.RA214-21. 2007.

Day, T. e S. A. Greenfield. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms. Neuroscience, v.111, n.3, p.649-56. 2002.

De Boer, V. C., A. A. Dihal, *et al.* Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. J Nutr, v.135, n.7, Jul, p.1718-25. 2005.

Descarries, L., V. Gisiger, *et al.* Diffuse transmission by acetylcholine in the CNS. Prog Neurobiol, v.53, n.5, Dec, p.603-25. 1997.

Evans, J. L., I. D. Goldfine, *et al.* Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev, v.23, n.5, Oct, p.599-622. 2002.

Ferrali, M., C. Signorini, *et al.* Protection of erythrocytes against oxidative damage and autologous immunoglobulin G (IgG) binding by iron chelator fluor-benzoil-pyridoxal hydrazone. Biochem Pharmacol, v.59, n.11, Jun 1, p.1365-73. 2000.

Ferretti, G. e T. Bacchetti. Peroxidation of lipoproteins in multiple sclerosis. J Neurol Sci, v.311, n.1-2, Dec 2011, p.92-7. 2011.

Festugatto R., M. A., Raiser A.G., Pelizzari C., Beckmann D.V., Silva F.S.B., Santos R.R., Polidoro D. Modification of ventral technique approach to the articulation atlantoxial with no section of the muscle sternothyreoid. Ciência Rural, v.39 n.4, July 2009, p.1239-1242. 2009.

Fiorani, M., R. De Sanctis, *et al.* Quercetin prevents glutathione depletion induced by dehydroascorbic acid in rabbit red blood cells. Free Radic Res, v.34, n.6, Jun, p.639-48. 2001.

Fish, C. J. e W. F. Blakemore. A model of chronic spinal cord compression in the cat. Neuropathol Appl Neurobiol, v.9, n.2, Mar-Apr, p.109-19. 1983.

Franklin, R. J. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? Nat Rev Neurosci, v.3, n.9, Sep, p.705-14. 2002.

Frost, E. E., R. Milner, *et al.* Migration assays for oligodendrocyte precursor cells. Methods Mol Biol, v.139, p.265-78. 2000.

Fulk, G. D. Locomotor training and virtual reality-based balance training for an individual with multiple sclerosis: a case report. J Neurol Phys Ther, v.29, n.1, Mar, p.34-42. 2005.

Fushimi, S. e T. Shirabe. The reaction of glial progenitor cells in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. Neuropathology, v.22, n.4, Dec, p.233-42. 2002.

\_\_\_\_\_. Expression of insulin-like growth factors in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. Neuropathology, v.24, n.3, Sep, p.208-18. 2004.

Giesser, B., J. Beres-Jones, *et al.* Locomotor training using body weight support on a treadmill improves mobility in persons with multiple sclerosis: a pilot study. Mult Scler, v.13, n.2, Mar, p.224-31. 2007.

Gil, B., M. J. Sanz, *et al.* Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice. Life Sci, v.54, n.20, p.PL333-8. 1994.

Goto, T. e Y. Hoshino. Electrophysiological, histological, and behavioral studies in a cat with acute compression of the spinal cord. J Orthop Sci, v.6, n.1, p.59-67. 2001.

Graca, D. L. e W. F. Blakemore. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. Neuropathol Appl Neurobiol, v.12, n.6, Nov-Dec, p.593-605. 1986.

Graca, D. L., E. F. Bondan, *et al.* Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. Arg Neuropsiquiatr, v.59, n.2-B, Jun, p.358-61. 2001.

Grisaru, D., M. Sternfeld, *et al.* Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. Eur J Biochem, v.264, n.3, Sep, p.672-86. 1999.

Guazzo, E. P. A technique for producing demyelination of the rat optic nerves. J Clin Neurosci, v.12, n.1, Jan, p.54-8. 2005.

Guimaraes, J. e M. J. Sa. Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. Front Neurol, v.3, p.74. 2012.

Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. Drugs Aging, v.18, n.9, p.685-716. 2001.

Harwood, M., B. Danielewska-Nikiel, *et al.* A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. Food Chem Toxicol, v.45, n.11, Nov, p.2179-205. 2007.

Hertog, M. G., E. J. Feskens, *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. Lancet, v.342, n.8878, Oct 23, p.1007-11. 1993.

Hollman, P. C. e M. B. Katan. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicol, v.37, n.9-10, Sep-Oct, p.937-42. 1999.

Huebbe, P., A. E. Wagner, *et al.* Effect of dietary quercetin on brain quercetin levels and the expression of antioxidant and Alzheimer's disease relevant genes in mice. Pharmacol Res, v.61, n.3, Mar, p.242-6. 2010.

Ishige, K., D. Schubert, *et al.* Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. Free Radic Biol Med, v.30, n.4, Feb 15, p.433-46. 2001.

Janssens, L. A. A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. Journal of Small Animal Practice, v.32, n.11, November 1991, p.572-578. 1991.

Jha, R. e S. I. Rizvi. Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity: correlation with oxidative stress. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, v.153, n.3, Sep, p.195-8. 2009.

Johnson, G. e S. W. Moore. The adhesion function on acetylcholinesterase is located at the peripheral anionic site. Biochem Biophys Res Commun, v.258, n.3, May 19, p.758-62. 1999.

Jongen, P. J., A. T. Ter Horst, *et al.* Cognitive impairment in multiple sclerosis. Minerva Med, v.103, n.2, Apr, p.73-96. 2012.

Kakulas, B. A. A review of the neuropathology of human spinal cord injury with emphasis on special features. J Spinal Cord Med, v.22, n.2, Summer, p.119-24. 1999.

Kao, T. K., Y. C. Ou, *et al.* Inhibition of nitric oxide production by quercetin in endotoxin/cytokine-stimulated microglia. Life Sci, v.86, n.9-10, Feb 27, p.315-21. 2010.

Kawashima, K. e T. Fujii. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. Pharmacol Ther, v.86, n.1, Apr, p.29-48. 2000.

\_\_\_\_\_. The lymphocytic cholinergic system and its biological function. Life Sci, v.72, n.18-19, Mar 28, p.2101-9. 2003.

Kim, H. P., K. H. Son, *et al.* Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. J Pharmacol Sci, v.96, n.3, Nov, p.229-45. 2004.

Kipp, M., P. Van Der Valk, *et al.* Pathology of Multiple Sclerosis. CNS Neurol Disord Drug Targets, May 11. 2012.

Knekt, P., R. Jarvinen, *et al.* Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. Am J Epidemiol, v.146, n.3, Aug 1, p.223-30. 1997.

Kornek, B. e H. Lassmann. Neuropathology of multiple sclerosis-new concepts. Brain Res Bull, v.61, n.3, Aug 15, p.321-6. 2003.

Kostovic, I. e P. S. Goldman-Rakic. Transient cholinesterase staining in the mediodorsal nucleus of the thalamus and its connections in the developing human and monkey brain. J Comp Neurol, v.219, n.4, Oct 1, p.431-47. 1983.

Kutty, K. M. Biological function of cholinesterase. Clin Biochem, v.13, n.6, Dec, p.239-43. 1980.

Lassmann, H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. Mult Scler, v.4, n.3, Jun, p.93-8. 1998.

Lazzarini, R. Myelin Biology and Disorders. Estados Unidos: Elsevier Academic Press, v.I/II. 2004. 1182 p.

Lee, S., S. Suh, *et al.* Protective effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. Neurosci Lett, v.287, n.3, Jun 30, p.191-4. 2000.

- Levine, J. M. e R. Reynolds. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. Exp Neurol, v.160, n.2, Dec, p.333-47. 1999.
- Lindahl, M. e C. Tagesson. Selective inhibition of group II phospholipase A2 by quercetin. Inflammation, v.17, n.5, Oct, p.573-82. 1993.
- Linseman, D. A. Targeting oxidative stress for neuroprotection. Antioxid Redox Signal, v.11, n.3, Mar, p.421-4. 2009.
- Liu, C. M., Y. Z. Sun, *et al.* Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF-kappaB pathway. Biochim Biophys Acta, v.1820, n.10, Oct, p.1693-703. 2012.
- Lu, J., Y. L. Zheng, *et al.* Quercetin reverses D-galactose induced neurotoxicity in mouse brain. Behav Brain Res, v.171, n.2, Aug 10, p.251-60. 2006.
- Madhavi, D. L. D., S.S.; Salunkhe, D.K. . Toxicological aspects of food antioxidants. In: (Ed.). Food Antioxidants. New York: Dekker, 1995. Toxicological aspects of food antioxidants, p.267
- Maier, I. C. e M. E. Schwab. Sprouting, regeneration and circuit formation in the injured spinal cord: factors and activity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.361, n.1473, Sep 29, p.1611-34. 2006.
- Mandel, S. A., Y. Avramovich-Tirosh, *et al.* Multifunctional activities of green tea catechins in neuroprotection. Modulation of cell survival genes, iron-dependent oxidative stress and PKC signaling pathway. Neurosignals, v.14, n.1-2, p.46-60. 2005.
- Maritim, A. C., R. A. Sanders, *et al.* Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol, v.17, n.1, p.24-38. 2003.
- Massoulie, J., L. Pezzementi, *et al.* Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog Neurobiol, v.41, n.1, Jul, p.31-91. 1993.
- Mattson, M. P. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. Trends Neurosci, v.21, n.2, Feb, p.53-7. 1998.
- Matute, C., E. Alberdi, *et al.* The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases. Trends Neurosci, v.24, n.4, Apr, p.224-30. 2001.
- Mazzanti, C. M., R. Spanevello, *et al.* Pre-treatment with ebselen and vitamin E modulate acetylcholinesterase activity: interaction with demyelinating agents. Int J Dev Neurosci, v.27, n.1, Feb, p.73-80. 2009.

\_\_\_\_\_. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. Int J Dev Neurosci, v.25, n.4, Jun, p.259-64. 2007.

Mazzanti, C. M., R. M. Spanevello, *et al.* Ethidium bromide inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. Chem Biol Interact, v.162, n.2, Aug 25, p.121-7. 2006.

\_\_\_\_\_. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. Neurochem Res, v.31, n.8, Aug, p.1027-34. 2006.

Mcmartin, D. N., L. A. Horrocks, *et al.* Enzyme activities associated with demyelinating phase of canine distemper. II. Plasmalogenase. Acta Neuropathol, v.22, n.4, p.288-94. 1972.

Mesulam, M. M., A. Guillozet, *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. Neuroscience, v.110, n.4, p.627-39. 2002.

Miller, E., M. Mrowicka, *et al.* The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. Neurochem Res, v.36, n.6, Jun, p.1012-6. 2011.

Minguetti, G. [Magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: analysis of 270 cases]. Arq Neuropsiquiatr, v.59, n.3-A, Sep, p.563-9. 2001.

Mirzoeva, O. K. e P. C. Calder. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.55, n.6, Dec, p.441-9. 1996.

Mitosek-Szewczyk, K., W. Gordon-Krajcer, *et al.* Free radical peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy. Folia Neuropathol, v.48, n.2, p.116-22. 2010.

Molina, M. F., I. Sanchez-Reus, *et al.* Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. Biol Pharm Bull, v.26, n.10, Oct, p.1398-402. 2003.

Montgomery, D. L. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. Vet Pathol, v.31, n.2, Mar, p.145-67. 1994.

Moreira, M. A., E. Felipe, *et al.* [Multiple sclerosis: descriptive study of its clinical forms in 302 cases]. Arq Neuropsiquiatr, v.58, n.2B, Jun, p.460-6. 2000.

Morimoto, Y., T. Yasuhara, *et al.* Anti-allergic substances contained in the pollen of *Cryptomeria japonica* possess diverse effects on the degranulation of RBL-2H3 cells. J Pharmacol Sci, v.92, n.3, Jul, p.291-5. 2003.

Mossberg, N., C. Movitz, *et al.* Oxygen radical production in leukocytes and disease severity in multiple sclerosis. J Neuroimmunol, v.213, n.1-2, Aug 18, p.131-4. 2009.

Nassar, C. C., E. F. Bondan, *et al.* Effects of aquatic exercises in a rat model of brainstem demyelination with ethidium bromide on the beam walking test. Arg Neuropsiquiatr, v.67, n.3A, Sep, p.652-6. 2009.

Nizri, E., Y. Hamra-Amitay, *et al.* Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. Neuropharmacology, v.50, n.5, Apr, p.540-7. 2006.

Novakovic, A., L. Gojkovic-Bukarica, *et al.* The mechanism of endothelium-independent relaxation induced by the wine polyphenol resveratrol in human internal mammary artery. J Pharmacol Sci, v.101, n.1, May, p.85-90. 2006.

Olby, N. The pathogenesis and treatment of acute spinal cord injuries in dogs. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.40, n.5, Sep 2010, p.791-807. 2010.

Oliveira, S. R., A. P. Kallaur, *et al.* Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. J Neurol Sci, v.321, n.1-2, Oct 2012, p.49-53. 2012.

Orsini, H., E. F. Bondan, *et al.* [Immunohistochemical staining of the astrocytic expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in the central nervous system of dogs with canine distemper]. Arg Neuropsiquiatr, v.65, n.4A, Dec, p.1070-7. 2007.

Paxinos, G. The Rat Nervous System: Forebrain and midbrain. Sidney: Academic. 1985. 535 p.

Pelissier, J., C. Benaim, *et al.* [Locomotor reeducation and multiple sclerosis. A critical analysis of the literature]. Rev Neurol (Paris), v.157, n.8-9 Pt 2, Sep, p.1030-40. 2001.

Pereira, L. A., M. S. Dertkigil, *et al.* Dynamics of remyelination in the brain of adult rats after exposure to ethidium bromide. J Submicrosc Cytol Pathol, v.30, n.3, Jul, p.341-8. 1998.

Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod, v.63, n.7, Jul, p.1035-42. 2000.

Pilorget, A., V. Berthet, *et al.* Medulloblastoma cell invasion is inhibited by green tea (-)epigallocatechin-3-gallate. J Cell Biochem, v.90, n.4, Nov 1, p.745-55. 2003.

Plumb, G. W., K. R. Price, *et al.* Antioxidant properties of flavonol glycosides from green beans. Redox Rep, v.4, n.3, p.123-7. 1999.

Pu, F., K. Mishima, *et al.* Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats. J Pharmacol Sci, v.104, n.4, Aug, p.329-34. 2007.

Purves, D. E. A. Neurociências. . Porto Alegre: Artmed. 2005

Ramos, A. T., P. C. Maiorka, *et al.* Remyelination in experimentally demyelinated connexin 32 knockout mice. Arq Neuropsiquiatr, v.67, n.2B, Jun, p.488-93. 2009.

Rao, A. A., G. R. Sridhar, *et al.* Elevated butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. Med Hypotheses, v.69, n.6, p.1272-6. 2007.

Rao, G. M., A. V. Rao, *et al.* Role of antioxidant enzymes in brain tumours. Clin Chim Acta, v.296, n.1-2, Jun, p.203-12. 2000.

Reipert, B. Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between men and women. The Journal of Men's Health & Gender, v.1, n.4, December 2004, p.334-340. 2004.

Rendell, P. G., J. D. Henry, *et al.* Prospective memory, emotional valence, and multiple sclerosis. J Clin Exp Neuropsychol, Apr 4. 2012.

Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, *et al.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med, v.20, n.7, p.933-56. 1996.

Riet-Correa, G., C. G. Fernandes, *et al.* Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adult Wistar rats. Braz J Med Biol Res, v.35, n.1, Jan, p.99-104. 2002.

Rosas-Ballina, M. e K. J. Tracey. Cholinergic control of inflammation. J Intern Med, v.265, n.6, Jun, p.663-79. 2009.

Rudd, P. A., R. Cattaneo, *et al.* Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. J Virol, v.80, n.19, Oct, p.9361-70. 2006.

Sallis, E. S., C. M. Mazzanti, *et al.* OSP-Immunofluorescent remyelinating oligodendrocytes in the brainstem of toxically-demyelinated Wistar rats. Arq Neuropsiquiatr, v.64, n.2A, Jun, p.240-4. 2006.

Santini G., M. A., Beckmann D.V., Santos R.P., Pelizzari C., Polidoro D & Baumhardt R. Cervical intervertebral disk disease in dogs: 28 cases (2003-2008). Brazilian Journal of Veterinary Research, v.30 n.8, August 2010, p.659-664. 2010.



Santos R.P., M. A., Beckmann D.V., Aiello G., Brum J.S., Leme Junior P.T., Ripplingler A., Neto D.P., Miranda T.F. Polymerization temperature of dental acrylic resin in the spinal cord of rats. Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science, v.64, n.4, 2012, p.865-872. 2012.

Santos R.P., M. A., Beckmann D.V., Berté L., Ripplingler A., Neto D.P. & Baumhardt R. Functional recovery in dogs with thoracolumbar intervertebral disk disease without deep pain perception: 37 cases (2002-2010). Brazilian Journal of Veterinary Research, v.31, n.4, april 2011, p.345-349. 2011.

Schobesberger, M., A. Zurbriggen, *et al.* Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. Acta Neuropathol, v.103, n.1, Jan, p.11-9. 2002.

Sharma, H. S., Y. Olsson, *et al.* A serotonin synthesis inhibitor, p-chlorophenylalanine reduces the heat shock protein response following trauma to the spinal cord: an immunohistochemical and ultrastructural study in the rat. Neurosci Res, v.21, n.3, Jan, p.241-9. 1995.

Sharp, N. J. H. e S. J. Wheeler. Small Animal Spinal Disorders: Diagnosis and surgery. Philadelphia: Elsevier Mosby. 2005

Shires, P. K. Instabilidade atlantoaxial. In: Slatter (Ed.). Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. São Paulo: Manole, 1998. Instabilidade atlantoaxial, p.1261-1272.

Siegel, G. E. Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. 1183p p.

Sies, H. Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem, v.215, n.2, Jul 15, p.213-9. 1993.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol, v.82, n.2, Mar, p.291-5. 1997.

Silver, A. The Biology of Cholinesterases. New York: Elsevier/Agricultural Research Council Institute. 1974

Soreq, H. e S. Seidman. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. Nat Rev Neurosci, v.2, n.4, Apr, p.294-302. 2001.

Spanevello, R., C. M. Mazzanti, *et al.* Effect of vitamin E on ectonucleotidase activities in synaptosomes and platelets and parameters of oxidative stress in rats experimentally demyelinated. Brain Res Bull, v.80, n.1-2, Aug 28, p.45-51. 2009.

Spanevello, R. M., C. M. Mazzanti, *et al.* Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon-beta. Life Sci, v.80, n.12, Feb 27, p.1109-14. 2007.

Spencer, J. P., G. G. Kuhnle, *et al.* Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. Biochem J, v.372, n.Pt 1, May 15, p.173-81. 2003.

Spencer, J. P., C. Rice-Evans, *et al.* Modulation of pro-survival Akt/protein kinase B and ERK1/2 signaling cascades by quercetin and its in vivo metabolites underlie their action on neuronal viability. J Biol Chem, v.278, n.37, Sep 12, p.34783-93. 2003.

Stangel, M. e H. P. Hartung. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. Prog Neurobiol, v.68, n.5, Dec, p.361-76. 2002.

Syburra, C. e S. Passi. Oxidative stress in patients with multiple sclerosis. Ukr Biokhim Zh, v.71, n.3, May-Jun, p.112-5. 1999.

Turko, I. V., S. Marcondes, *et al.* Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.281, n.6, Dec, p.H2289-94. 2001.

Uttara, B., A. V. Singh, *et al.* Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. Curr Neuropharmacol, v.7, n.1, Mar, p.65-74. 2009.

Van Horssen, J., M. E. Witte, *et al.* Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. Biochim Biophys Acta, v.1812, n.2, Feb, p.141-50. 2006.

Van Meeteren, M. E., C. E. Teunissen, *et al.* Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. Eur J Clin Nutr, v.59, n.12, Dec, p.1347-61. 2005.

Vandeveldel, M., P. Bichsel, *et al.* Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. A sequential immunocytochemical study. Acta Neuropathol, v.59, n.4, p.269-76. 1983.

Vandeveldel, M. e A. Zurbriggen. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. Acta Neuropathol, v.109, n.1, Jan, p.56-68. 2005.

Wang, L., B. Wang, *et al.* Quercetin, a flavonoid with anti-inflammatory activity, suppresses the development of abdominal aortic aneurysms in mice. Eur J Pharmacol, v.690, n.1-3, Sep 5, p.133-41. 2012.

Watson, A. G., A. De Lahunta, *et al.* Morphology and embryological interpretation of a congenital occipito-atlanto-axial malformation in a dog. Teratology, v.38, n.5, Nov, p.451-9. 1988.

Whittaker, M. Plasma cholinesterase variants and the anaesthetist. Anaesthesia, v.35, n.2, Feb, p.174-97. 1980.

Yajima, K. e K. Suzuki. Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. Lab Invest, v.41, n.5, Nov, p.385-92. 1979.

Zhao, C., S. P. Fancy, *et al.* Mechanisms of CNS remyelination--the key to therapeutic advances. J Neurol Sci, v.233, n.1-2, Jun 15, p.87-91. 2005.