



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LÍVIA CRISTINA RODRIGUES FERREIRA LINS**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO CARVACROL EM DOIS MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: EVIDÊNCIAS  
COMPORTAMENTAIS E IMUNOHISTOQUÍMICAS**

**ARACAJU-SE  
2017**

**LÍVIA CRISTINA RODRIGUES FERREIRA LINS      EFEITO NEUROPROTECTOR DO CARVACROL EM DOIS MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: EVIDÊNCIAS COMPORTAMENTAIS E IMUNOHISTOQUÍMICAS    2017**

**LÍVIA CRISTINA RODRIGUES FERREIRA LINS**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO CARVACROL EM DOIS MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: EVIDÊNCIAS  
COMPORTAMENTAIS E IMUNOHISTOQUÍMICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Murilo Marchioro

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

**ARACAJU-SE  
2017**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Lins, Livia Cristina Rodrigues Ferreira

L759 Efeito neuroprotetor do carvacrol em dois modelos experimentais da doença de Parkinson: evidências comportamentais e imunohistoquímicas / Livia Cristina Rodrigues Ferreira Lins; orientador Murilo Marchioro; co-orientador José Ronaldo dos Santos. – Aracaju, 2017.

94 f.: il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Monoterpenos. 2. Neuroproteção. 3. Reserpina. 4. Transtornos Parkinsonianos. 5. Oxidopamina. I. Marchioro, Murilo, orient. II. Santos, José Ronaldo dos, co-orient. III. Título.

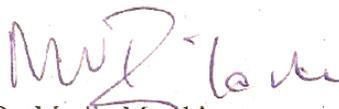
CDU 616.858

**LÍVIA CRISTINA RODRIGUES FERREIRA LINS**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO CARVACROL EM DOIS MODELOS  
EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON: EVIDÊNCIAS  
COMPORTAMENTAIS E IMUNOHISTOQUÍMICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 23/01/2017



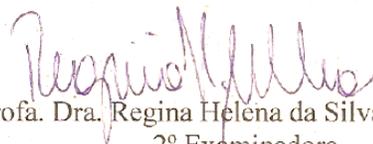
Prof. Dr. Murilo Marchioro  
Orientador



Prof. Dra. Alessandra Mussi Ribeiro  
1º Examinadora



Prof. Dr. Lucindo José Quintans Junior  
3º Examinador



Prof. Dra. Regina Helena da Silva  
2º Examinadora



Prof. Dra. Monica Santos de Melo  
4º Examinadora

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha mãe, Luiza (in memoriam),  
exemplo de dignidade e amor,  
minha amiga e companheira em todo o tempo,  
meu amor maior.*

*TE AMO MÃINHA!*

## AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos, do período do doutorado, eu passei por muitos momentos difíceis, incluindo o período mais traumático da minha vida, porém de alguma forma, todos os desafios me conduziram até aqui. Desta forma, gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus por ter me proporcionado a força que me moveu nos últimos anos.

Agradeço à minha mãe, Luiza, a qual eu dedico este trabalho e todos os trabalhos que virão, pois sem seu incentivo eu jamais teria atingido meus objetivos. Mãe, a senhora não está mais presente em forma física neste mundo, mas tenho certeza que você continua me guiando e me iluminando de onde estiver. Sei que a senhora está me enviando todas as formas de energia positiva que preciso para que possa continuar lutando pelos meus sonhos. Agradeço também a meu pai Cícero que sempre me apoiou na busca dos meus sonhos e que apesar da distância, sempre se fez presente de alguma forma.

Gostaria de agradecer a meu orientador, Prof. Dr. Murilo Marchioro, por toda sua ajuda desde o período do mestrado. Agradeço pela atenção e disponibilidade dispendida a mim ao longo dos últimos anos, além de todo o incentivo e ensinamento que me permitiram crescer profissional e pessoalmente durante o mestrado e o doutorado. O senhor é um exemplo de profissional no qual eu me inspiro todos os dias.

Agradeço a meu co-orientador Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos, o qual me ajudou em todos os momentos que eu o solicitei e que me incentivou a desbravar caminhos desconhecidos. A você Ronaldo, dedico minha admiração e respeito e desejo que a amizade que foi construída ao longo dos últimos anos possa perdurar por muito tempo, conte comigo para o que você precisar.

A todos do Laboratório de Neurofisiologia- LNFS, pela ajuda e companhia ao longo dos últimos anos. Sem a ajuda de vocês, não teria sido possível o desenvolvimento deste trabalho. Com vocês aprendi o poder e a importância do trabalho coletivo. A amizade e companheirismo presentes no nosso grupo nos permite continuar lutando para desenvolver ciência, apesar de todas as dificuldades encontradas no nosso cotidiano. Desejo que a união do nosso grupo permaneça como uma força motriz que nos move para o sucesso. Meu agradecimento especial à Rachel Cintra, Marcos Meneses, Marina Freire, Auderlan Mendonça, Katty Anne, Karenine

Holanda, Luciano de Gois e Pollyana Leal, a turma dos pós-graduandos do LNFS, por todos os momentos e conhecimentos compartilhados.

Ao pessoal do Narayanan Lab, da Universidade de Iowa, que me acolheu e me ajudou durante o período de Doutorado Sanduíche. Em especial ao Prof. MD, PhD. Nandakumar Narayanan que me deu a oportunidade de explorar uma realidade profissional e cultural completamente diferentes. Agradeço por todo o ensinamento e paciência dispendidos a mim durante este período.

Meu agradecimento a Larissa, Rachel e Renan, amigos que se tornaram irmãos para mim e que hoje são minha família. Obrigada por todo o apoio e pelos momentos compartilhados. Vocês são muito especiais para mim. Sou grata por tê-los como amigos.

À Universidade Federal de Sergipe e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por possibilitarem o desenvolvimento deste trabalho. À CAPES pelo suporte financeiro através das bolsas durante o período de doutorado no país e no exterior.

Enfim, meu sincero agradecimento a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram a concluir este trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

### **Efeito neuroprotetor do Carvacrol em dois modelos experimentais da Doença de Parkinson: evidências comportamentais e imunohistoquímicas.** LINS, L.C.R.F. 2017.

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa caracterizada por uma degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos da Substância Negra parte compacta (SNpc), o que resulta nas alterações motoras características desta patologia. Embora sua etiologia ainda permaneça desconhecida, vários estudos indicam que o estresse oxidativo e a inflamação exercem uma função crítica na fisiopatologia da DP e agentes antioxidantes e anti-inflamatórios poderiam desacelerar a neurodegeneração dopaminérgica. Assim, tem sido crescente o número de pesquisas relacionadas a investigação do potencial neuroprotetor destes agentes, entre eles, o Carvacrol (CA). O CA é um monoterpene fenólico encontrado nos óleos essenciais de diversas plantas aromáticas e apresenta uma variedade de atividades farmacológicas sobre o Sistema Nervoso Central, incluindo atividades antioxidante e anti-inflamatória. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar um possível efeito neuroprotetor do CA em ratos submetidos a dois modelos de DP. Foram realizados dois experimentos: no experimento I, ratos Wistar foram submetidos a administração repetida de uma dose baixa (0,1 mg/kg, s.c.) de reserpina (RES) ou veículo da reserpina (VR) e tratados concomitantemente com CA nas doses de 12,5 ou 25 mg/kg (i.p.) ou com o veículo do carvacrol (VC). Ao longo do experimento, os animais tiveram seu comportamento motor avaliado através dos testes de catalepsia, campo aberto e avaliação dos movimentos orais. No experimento II, ratos Long-Evans foram pré-tratados por sete dias com CA nas doses de 50 ou 100 mg/kg (i.p.) ou VC, e então foram submetidos a uma injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) ou veículo no feixe prosencefálico medial (*medial forebrain bundle* -MFB). Os animais foram tratados com CA ou VC por três semanas após a injeção de 6-OHDA e após este período tiveram seu comportamento motor avaliado através dos testes do campo aberto, cilindro, rotarod e rotações induzidas por anfetamina. Em ambos os experimentos, ao fim dos testes comportamentais, os animais foram perfundidos e seus cérebros foram processados para imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH). No experimento I, os resultados mostraram que o CA em ambas as doses (12,5 e 25 mg/kg) preveniu o comportamento de catalepsia e o desenvolvimento de movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela RES, porém não reverteu a redução da atividade locomotora causada pela RES no teste do campo aberto. O CA em ambas as doses preveniu a redução da marcação de TH induzida pela RES na SNpc e no estriado dorsal. No experimento II, os resultados mostraram que o CA na dose de 50 mg/kg preveniu os déficits motores induzidos pela injeção de 6-OHDA nos testes do campo aberto, cilindro e rotarod, e aumentou o número de rotações induzidas por anfetamina. Além disso, o CA atenuou o dano provocado pela injeção de 6-OHDA nos neurônios dopaminérgicos da SNpc e estriado dorsal. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o CA apresenta um efeito neuroprotetor, prevenindo ou atenuando as alterações motoras e neuroquímicas induzidas pela RES e 6-OHDA. Desta forma, o CA pode ser considerado um candidato terapêutico promissor para a prevenção ou tratamento da DP.

**Palavras-chave:** Monoterpenos; Neuroproteção; Reserpina; Transtornos Parkinsonianos; Oxidopamina.

## ABSTRACT

### **Neuroprotective effect of Carvacrol in two rat models of Parkinson's disease: behavioral and immunohistochemical evidences. LINS, L.C.R.F. 2017.**

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by a progressive degeneration of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra pars compact (SNpc) with consequent depletion of dopamine in the striatum, which gives rise to characteristic motor symptoms of PD. Although its etiology is unknown, several studies have suggested that oxidative stress and inflammation play a critical function in the pathophysiology of PD and antioxidant and anti-inflammatory agents could be helpful to slow down the dopaminergic neurodegeneration. Thus, many studies have evaluated the potential neuroprotective effect of these agents, including Carvacrol (CA). CA is a phenolic monoterpene found in essential oils of many aromatic plants and it has a variety of pharmacological effects on Central Nervous System, including antioxidant and anti-inflammatory activities. In this context, the objective of this study was to investigate a possible neuroprotective effect of CA in two rat models of PD. Two experiments were performed: in the experiment I, male Wistar rats were submitted to repeated administration of a low dose (0.1 mg/kg, s.c.) of reserpine (RES) or vehicle of reserpine (VR) and concomitantly treated with CA at doses of 12.5 or 25 mg/kg (i.p.) or vehicle of carvacrol (VC). Across the treatment, the animal motor behavior was evaluated by catalepsy test, open field test and assessment of oral movements. In the experiment II, male Long-Evans rats were pretreated for seven days with CA at doses of 50 or 100 mg/kg (i.p.) or VC, and were then submitted to unilateral injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) or vehicle of 6-OHDA into the medial forebrain bundle (MFB). The animals were treated with CA or VC for three weeks after injection. Thereafter, they were assessed for motor behavioral function by open field, cylinder test, rotarod and amphetamine-induced circling test. In both experiments, upon completion behavioral tests, rats were perfused and their brains were subjected for tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemical analysis. In the experiment I, the results showed that the CA treatment, in both doses 12.5 e 25 mg/kg, was able to prevent the catalepsy behavior and the development of vacuous chewing movements induced by RES, however, CA failed to revert the decreased locomotor activity induced by RES in the open field test. In addition, CA in both doses prevented the depletion of TH immunostaining induced by RES in the SNpc and dorsal striatum. In the experiment II, the treatment with CA at dose of 50 mg/kg prevented the motor deficits induced by 6-OHDA injection in the open field test, cylinder test and rotarod, and increased the number of rotations induced by amphetamine. Moreover, CA attenuated the dopaminergic neurons damage in the SNpc and dorsal striatum induced by 6-OHDA injection. Taken together, our results suggest that CA shows neuroprotective effect, preventing or attenuating motor and neurochemical impairments induced by RES and 6-OHDA, so it may be regarded a promising therapeutic candidate for the prevention or treatment of PD.

**Keywords:** Monoterpene; Neuroprotection; Reserpine; Parkinsonian Disorders; Oxidopamine.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da neuropatologia da Doença de Parkinson.....	24
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo do efeito da dopamina nas vias direta e indireta.....	27
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo dos mecanismos de ação das principais toxinas nos neurônios do SNC usadas para induzir modelos animais de DP.....	33
<b>Figura 4.</b> Mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA.....	35
<b>Figura 5.</b> Estrutura química do Carvacrol.....	38
<b>Figura 6.</b> Ilustração esquemática do delineamento experimental do Experimento I.....	44
<b>Figura 7.</b> Ilustração esquemática do delineamento experimental do Experimento II.....	46
<b>Figura 8.</b> Efeito do Carvacrol sobre o comportamento de catalepsia de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina .....	52
<b>Figura 9.</b> Efeito do Carvacrol sobre a atividade locomotora no teste do campo aberto de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina .....	53
<b>Figura 10.</b> Efeito do Carvacrol sobre o número de movimentos de mastigações no vácuo de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina .....	54
<b>Figura 11.</b> Efeito do Carvacrol sobre o número de células TH + na SNpc de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina .....	55
<b>Figura 12.</b> Efeito do Carvacrol sobre a densidade óptica relativa para TH no estriado dorsal de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina .....	56
<b>Figura 13.</b> Imagens representativas da marcação para TH na SNpc e estriado dorsal de animais submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina .....	57
<b>Figura 14.</b> Efeito do Carvacrol sobre a atividade locomotora no campo aberto de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	58
<b>Figura 15.</b> Efeito do Carvacrol sobre a porcentagem de uso da pata anterior esquerda de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	59
<b>Figura 16.</b> Efeito do Carvacrol sobre o tempo de permanência sobre o eixo do rotarod de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	60
<b>Figura 17.</b> Efeito do Carvacrol no teste de rotação induzida por anfetamina de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	60
<b>Figura 18.</b> Efeito do Carvacrol sobre o número de células TH+ na SNpc de ratos	

submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	61
<b>Figura 19.</b> Imagens representativas da marcação para TH na SNpc de animais submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	62
<b>Figura 20.</b> Efeito do Carvacrol sobre a densidade óptica relativa dos níveis de TH no estriado dorsal de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	63
<b>Figura 21.</b> Imagens representativas do estriado dorsal de animais submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>AP</b>	Anteroposterior
<b>CA</b>	Carvacrol
<b>ChR2</b>	Canal-rodopsina-2
<b>COMT</b>	Catecol o-metil-transferase
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenase-2
<b>Cre</b>	Cre-recombinase
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DAPI</b>	4'6-diamidino-2-fenilindol
<b>DAT</b>	Transportador de Dopamina
<b>DOR</b>	Densidade Óptica Relativa
<b>DP</b>	Doença de Parkinson
<b>DV</b>	Dorsoventral
<b>EPM</b>	Erro Padrão da Média
<b>EROs</b>	Epécies Reativas de Oxigênio
<b>ERNs</b>	Espécies Reativas de Nitrogênio
<b>FRAP</b>	Ferric-Reducing Ability of Plasma
<b>HO•</b>	Radical Hidroxila
<b>GABA</b>	Ácido Gama-Aminobutírico
<b>GPe</b>	Globo Pálido externo
<b>GPI</b>	Globo Pálido interno
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IL</b>	Interleucina
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-diidroxifenilalanina
<b>LRRK2</b>	Quinase 2 repetida rica em leucina
<b>MAO</b>	Monoamina Oxidase
<b>MFB</b>	Feixe prosencefálico medial
<b>ML</b>	Mediolateral
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

<b>MSN</b>	Neurônios espinhosos médios
<b>NAT</b>	Transportador de Noradrenalina
<b>NF-kB</b>	Fator nuclear-kB
<b>NSPG</b>	Non-protein Thiols
<b>NST</b>	Núcleo Subtalâmico
<b>PARK</b>	Parkina
<b>PB</b>	Tampão Fosfato
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Salina
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PTZ</b>	Pentilenotetrazol
<b>RES</b>	Reserpina
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNCA</b>	$\alpha$ -sinucleína
<b>SNpc</b>	Substância Negra parte compacta
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
<b>TH</b>	Tirosina Hidroxilase
<b>THIP</b>	Tetrahidroisoxazolopiridina
<b>TNF</b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>VC</b>	Veículo do Carvacrol
<b>VMAT</b>	Transportador Vesicular de Monoamina
<b>VR</b>	Veículo da Reserpina
<b>VTA</b>	Área Tegumentar Ventral
<b>6-OHDA</b>	6-Hidroxidopamina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1 Doença de Parkinson.....	21
2.2. Características Clínicas da Doença de Parkinson.....	22
2.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	23
2.4 Estresse Oxidativo e Doença de Parkinson .....	28
2.5 Inflamação e Doença de Parkinson.....	29
2.6 Tratamento Farmacológico da Doença de Parkinson.....	30
2.7 Modelos Animais da Doença de Parkinson.....	31
2.7.1 Modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina (RES) .....	32
2.7.2 Modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA.....	34
2.8 Carvacrol .....	37
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 Objetivo Geral.....	41
3.2 Objetivos específicos.....	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
4.1 Animais.....	42
4.2 Drogas.....	42
4.3 Delineamento Experimental.....	43
4.3.1 Experimento I – Efeito do CA no modelo da DP induzido por RES.....	43
4.3.1.1 Testes Comportamentais.....	44
4.3.1.1.1 Teste de Catalepsia.....	44
4.3.1.1.2 Avaliação da atividade locomotora no Campo Aberto.....	44
4.3.1.1.3 Avaliação dos movimentos orais.....	45
4.3.2 Experimento II – Efeito do CA no modelo da DP induzido pela 6-OHDA.....	45
4.3.2.1 Cirurgia Estereotáxica.....	46
4.3.2.2 Testes Comportamentais.....	47
4.3.2.2.1 Atividade locomotora no Campo Aberto.....	47
4.3.2.2.2 Teste do Cilindro.....	47

4.3.2.2.3 Teste do Rotarod.....	47
4.3.2.2.4 Teste de rotações induzidas por anfetamina.....	48
<b>4.4 Perfusão dos animais e processamento dos cérebros .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 Imunohistoquímica para TH.....</b>	<b>49</b>
<b>4.6 Contagem de células TH+.....</b>	<b>50</b>
<b>4.7 Avaliação da Densidade Óptica Relativa (DOR) para TH.....</b>	<b>50</b>
<b>4.8 Análise estatística.....</b>	<b>51</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Experimento I: Efeito do CA no modelo da DP induzido por RES.....</b>	<b>52</b>
5.1.1 Teste de Catalepsia.....	52
5.1.2 Atividade Locomotora no Campo Aberto.....	53
5.1.3 Avaliação dos movimentos orais.....	54
5.1.4 Imunohistoquímica para TH.....	55
5.1.4.1 Contagem de células TH+ .....	55
5.1.4.2 Densidade Óptica Relativa (DOR) para TH .....	56
<b>5.2 Experimento II- Efeito do CA no modelo de DP induzido pela 6-OHDA.....</b>	<b>58</b>
5.2.1 Atividade locomotora no Campo Aberto.....	58
5.2.2 Teste do Cilindro.....	59
5.2.3 Teste de Rotarod.....	59
5.2.4 Teste de rotação induzida por anfetamina.....	60
5.2.5 Imunohistoquímica para TH.....	61
5.2.5.1 Contagem de células TH+ .....	61
5.2.5.2 Densidade Óptica Relativa (DOR) para TH.....	63
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>8 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>78</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO A- Artigos publicados durante o período do doutorado.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO B- Artigo aceito para publicação .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO C- Comprovante de submissão do artigo para publicação.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO D- Carta do orientador do Doutorado Sanduíche (PDSE) .....</b>	<b>94</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento da expectativa de vida da população mundial resultando em um aumento no número de idosos. Em 2010, o número de idosos no Brasil era de 14 milhões de pessoas. Em 2050, estima-se que mais de 38 milhões de brasileiros terão mais de 65 anos. Associado ao processo de envelhecimento populacional, também observa-se um aumento da prevalência de doenças crônico-degenerativas (CHAIMOWICZ, 2013), como exemplo a Doença de Parkinson (DP).

A DP é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns na população de idosos, afetando mais de 1% das pessoas com mais de 60 anos de idade em todo o mundo. A incidência e prevalência da DP aumentam com a idade, caracterizando o envelhecimento como o fator de risco mais importante para esta doença. Nos últimos anos, o aumento da prevalência da DP tem gerado altos custos econômicos para os sistemas de saúde e para as famílias dos pacientes (LAU; BRETELER, 2006; PRINGSHEIM et al., 2014; REEVE; SIMCOX; TURNBULL, 2014).

A etiologia da DP ainda permanece desconhecida, porém vários estudos têm considerado que a causa da DP é multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais (DEXTER; JENNER, 2013). A principal característica patológica é a degeneração de neurônios dopaminérgicos da Substância Negra parte compacta (SNpc) e consequente redução da concentração de dopamina (DA) no estriado, o que tem sido associado aos sintomas cardinais da DP: rigidez muscular, bradicinesia, tremor de repouso e instabilidade postural (GOPALAKRISHNA; ALEXANDER, 2015; MILLER; O'CALLAGHAN, 2015; WU et al., 2012).

Nenhum dos tratamentos disponíveis é capaz de prevenir a progressão ou restaurar o dano neuronal característico da DP. Portanto, o tratamento dos pacientes com DP é apenas sintomático (DEXTER; JENNER, 2013). A terapia de reposição dopaminérgica através do uso da L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) permanece a opção de primeira escolha para o tratamento dos sintomas motores da DP. Contudo, a eficácia da terapia com L-DOPA declina ao longo do tempo e complicações motoras, tais como discinesias e flutuações motoras, têm sido associadas ao seu uso prolongado (DEXTER; JENNER, 2013; OLANOW, 2015).

A deficiência de terapias neuroprotetoras para a DP e as complicações associadas as mesmas têm incentivado o desenvolvimento de estudos com o objetivo de desvendar os

mecanismos fisiopatológicos desta doença, bem como formular estratégias terapêuticas capazes de prevenir a neurodegeneração (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016; TAGLIAFERRO; BURKE, 2016).

O estresse oxidativo e a inflamação estão entre os principais mecanismos envolvidos na neurodegeneração dopaminérgica característica da DP, exercendo um papel importante na fisiopatologia desta doença (HWANG, 2013; ROCHA; DE MIRANDA; TEIXEIRA, 2015; WANG; LIU; ZHOU, 2015). Nos últimos anos, os modelos animais de DP têm se mostrado úteis para estudar o papel do estresse oxidativo e da inflamação na fisiopatologia da DP, bem como têm indicado que a terapia com compostos antioxidantes e anti-inflamatórios pode ser uma alternativa para a prevenção ou tratamento da DP (JAGMAG et al., 2016; JOERS et al., 2016; KOPPULA et al., 2012; MACHADO-FILHO et al., 2014).

Vários estudos têm indicado que metabólitos secundários derivados de plantas medicinais apresentam efeitos protetores em modelos animais de DP, o que tem sido relacionado à capacidade destes compostos de atuarem sobre o estresse oxidativo e o processo inflamatório presente nos diferentes modelos de DP (GEED et al., 2014; KHURANA; GAJBHIYE, 2013; KOPPULA et al., 2012; PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016). Os terpenos são uma variedade de compostos encontrados nos óleos essenciais de plantas medicinais aromáticas. Alguns terpenos têm demonstrado efeito neuroprotetor em modelos animais de DP induzidos por neurotoxinas (PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; SONG et al., 2012). Os monoterpenos são uma importante classe dos terpenos, representando aproximadamente 90% das moléculas que constituem os óleos essenciais e possuem grande variedade estrutural, incluindo compostos de diferentes funções como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, ésteres e fenóis (BAKKALI et al., 2008). Entre os monoterpenos mais estudados, devido a sua variedade de propriedades farmacológicas, está o Carvacrol (CA).

O CA é um monoterpeno fenólico encontrado em óleos essenciais de plantas da família Labitae e é o principal constituinte do óleo essencial do orégano (BASER, 2008). O CA é considerado relativamente seguro para o consumo humano, sendo aprovado pela *Federal Drug Administration* (FDA) e pelo Conselho Europeu para ser utilizado como conservante de alimentos. O CA também é utilizado como fungicida e como ingrediente aromatizante em formulações cosméticas e em produtos de limpeza (DE VINCENZI et al., 2004; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).

Nos últimos anos, um número significativo de estudos pré-clínicos tem demonstrado que o CA possui uma variedade de atividades farmacológicas sobre o Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo atividade ansiolítica (MELO et al., 2010), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), antidepressiva (MELO et al., 2011), antinociceptiva (MELO et al., 2012), anti-inflamatória (LI et al., 2016), antioxidante (BALUCHNEJADMOJARAD; HASSANSHAHI; ROGHANI, 2014; SAMARGHANDIAN et al., 2016) e neuroprotetora (DENG; LU; TENG, 2013; LI et al., 2016; PETERS et al., 2012; YU et al., 2012). Além disso, o CA é capaz de modular sistemas de neurotransmissão no SNC, incluindo o sistema dopaminérgico (ZOTTI et al., 2013).

Neste contexto, o CA pode ser considerado um composto com potencial farmacológico promissor sobre o SNC, e que presumivelmente poderia apresentar um efeito protetor contra as alterações fisiopatológicas da DP.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita como uma síndrome neurológica em 1817 pelo médico inglês James Parkinson, em sua obra intitulada *Essay on the Shaking Palsy*, na qual foi nomeada como Paralisia Agitante (GOETZ, 2011). No entanto, relatos médicos indianos datados de 600 anos a.C. descrevem uma síndrome com sintomas semelhantes a DP, sugerindo que a DP já existia muitos anos antes de sua descrição por James Parkinson (OVALLATH; DEEPA, 2013). Aproximadamente seis décadas depois da publicação da obra de James Parkinson, o neurologista francês Jean-Martin Charcot descreveu mais precisamente os sintomas da DP e sugeriu o termo Doença de Parkinson, rejeitando a designação inicial de paralisia agitante. Seus estudos contribuíram para diferenciar a DP de outras doenças também caracterizadas por tremor, especialmente da esclerose múltipla (DONALDSON, 2015; GOETZ, 2011).

A DP é a uma doença crônica progressiva altamente prevalente, sendo considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum, após a Doença de Alzheimer. Sua prevalência é ligeiramente maior em homens do que em mulheres e a incidência aumenta com a idade (LAU; BRETELER, 2006; PRINGSHEIM et al., 2014; WIRDEFELDT et al., 2011).

Estima-se que mais de 10 milhões de pessoas são acometidas pela DP em todo o mundo. Na América do Sul, a prevalência da DP é de aproximadamente 600 casos por 100.000 pessoas em indivíduos com idade entre 60 e 69 anos (PRINGSHEIM et al., 2014). No Brasil, não existem dados oficiais do número de indivíduos com DP, porém estima-se que aproximadamente 200 mil indivíduos são acometidos pela DP e mais de 30 mil novos casos surgem por ano no país (SOUZA et al., 2011).

A DP é considerada uma doença de alto custo econômico, uma vez que gera gastos diretos (tratamento medicamentoso, serviços de saúde, exames diagnósticos) e indiretos (redução de produtividade). Geralmente, a utilização de serviços de saúde e os custos com pacientes com DP são significativamente mais altos comparados aos da população controle. Os custos econômicos relacionados a DP são dependentes da acessibilidade aos serviços de saúde e aos medicamentos, o que é variável em diferentes regiões do mundo. Nos Estados Unidos da

América, combinados os custos diretos e indiretos da DP, estima-se que são gastos aproximadamente 22.000 dólares por ano com cada paciente acometido pela DP. Desta forma, a DP pode ser considerada um problema de caráter econômico mundial, uma vez que sua prevalência tem aumentado ao longo dos últimos anos e os gastos decorrentes disto geram problemas para os pacientes, suas famílias e para a sociedade (BRIEN et al., 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

## **2.2 Características Clínicas da Doença de Parkinson**

Clinicamente, qualquer doença que inclui deficiência de DA estriatal ou dano direto sobre o estriado pode levar a um quadro chamado de parkinsonismo, caracterizado por tremor de repouso, rigidez, lentidão ou ausência de movimento voluntário, instabilidade postural e freezing. A DP é o tipo mais comum de parkinsonismo, atingindo aproximadamente 80% dos casos (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Apesar da procura incessante, não existe um biomarcador até o momento que possa ser utilizado como diagnóstico validado para a DP. Desta forma, o diagnóstico da DP ainda é baseado nas características clínicas e histórico do paciente, bem como na resposta dos sintomas a agentes dopaminérgicos (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016). Os sintomas motores cardinais da DP considerados para seu diagnóstico incluem tremor de repouso, bradicinesia, rigidez e instabilidade postural. Para um diagnóstico conclusivo é necessária uma autópsia para a confirmação da doença (KALIA; LANG; SHULMAN, 2015; MILLER; O'CALLAGHAN, 2015).

Um crescente número de evidências tem sugerido que sintomas não-motores, incluindo distúrbios olfatórios, desordens do sono, dor, ansiedade, depressão, déficits cognitivos e disfunção autonômica, estão presentes em pacientes com DP e podem preceder os sintomas motores em alguns anos (DEXTER; JENNER, 2013; PARKER et al., 2013). Portanto, a investigação de sintomas não-motores tem ganhado suporte, nos últimos anos, com o objetivo de possibilitar um diagnóstico precoce da DP (OBESO et al., 2010).

Os sintomas da DP tornam-se altamente incapacitantes com a evolução da doença. Pacientes com DP tendem a apresentar perda da funcionalidade e autonomia para exercer suas atividades da vida diária, levando-os a se tornarem dependentes de familiares e/ou cuidadores, o

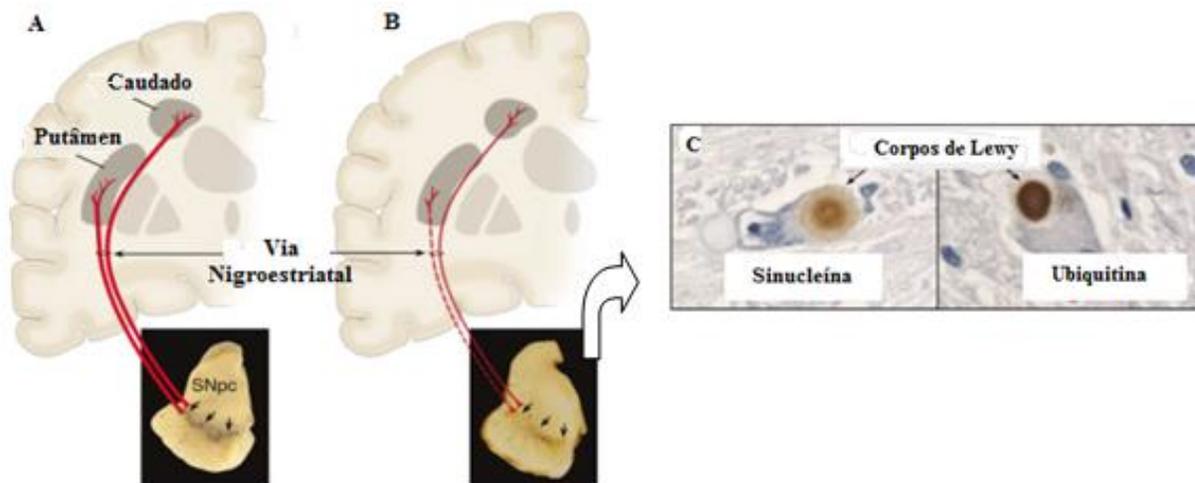
que leva a uma redução da sua qualidade de vida (FILIPPIN et al., 2014; TAKAHASHI et al., 2016).

### **2.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson**

A etiologia da DP ainda permanece desconhecida, porém é considerada um processo complexo que envolve vários mecanismos, tais como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, fatores genéticos, exposição a toxinas ambientais e processo inflamatório, porém o envelhecimento é considerado o principal fator de risco para a DP (DEXTER; JENNER, 2013; RIZEK; KUMAR; JOG, 2016; SCHAPIRA; JENNER, 2011).

Múltiplas mutações genéticas têm sido associadas a DP, incluindo mutações dos genes da  $\alpha$ -sinucleína (SNCA), parkina (PARK2, PARK7) e Quinase 2 repetida rica em leucina (LRRK2). A exposição a toxinas ambientais, tais como 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) e rotenona, também tem sido relacionada ao desenvolvimento dos sintomas da DP. No entanto, mutações genéticas e exposição a toxinas ambientais são responsáveis por menos de 10% de todos os casos de DP, sendo a maioria dos casos de etiologia desconhecida (GOPALAKRISHNA; ALEXANDER, 2015).

A DP é caracterizada histopatologicamente pela degeneração de neurônios pigmentados dopaminérgicos da Substância Negra parte compacta (SNpc) e consequente redução dos níveis de dopamina no estriado (núcleo caudado e putâmen). Também são observadas inclusões intracitoplasmáticas denominadas Corpos de Lewy, compostos principalmente por  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (Figura 1), nos neurônios remanescentes. No entanto, estudos imunohistoquímicos têm demonstrado que os Corpos de Lewy contêm mais de 90 moléculas (MILLER; O'CALLAGHAN, 2015; WAKABAYASHI et al., 2013).



**Figura 1.** Representação esquemática da neuropatologia da Doença de Parkinson (DP). Via nigroestriatal em condição normal (A) e na DP (B). Em (C), marcação imunohistoquímica demonstrando corpos de Lewy, contendo alfa sinucleína e ubiquitina, em neurônios dopaminérgicos da SNpc.

**Fonte:** Adaptada de Dauer e Przedborski (2003).

O estriado integra projeções do córtex e do tálamo e promove uma seleção de ações, o que permite a execução de movimentos de forma adequada. Na DP, a disfunção estriatal resultante da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc causa um desequilíbrio nas vias excitatórias e inibitórias do movimento, levando ao desenvolvimento dos sintomas motores relacionados a doença (CALABRESI et al., 2014).

A maioria dos neurônios estriatais consiste em neurônios espinhosos médios (MSNs), os quais são gabaérgicos e podem ser classificados em dois subtipos, estriado-nigrais com base em suas projeções axonais para a Substância Negra parte reticulata (SNpr) e Globo Pálido interno (GPi) através da via direta (estriatonigral) ou estriado-palidais com projeções para o Globo Pálido externo (GPe) através da via indireta (via estriado-palidal) (KREITZER, 2009).

MSNs da via direta liberam ácido gama-aminobutírico (GABA) e inibem os neurônios gabaérgicos da SNpr e GPi, os quais deixam de inibir os neurônios glutamatérgicos do tálamo. Uma vez desinibido, o tálamo envia projeções excitatórias para o córtex e libera o movimento. Em contraste, a ativação dos MSNs da via indireta resulta em uma inibição do movimento. Estes neurônios inibem os neurônios gabaérgicos do GPe, os quais deixam de inibir os neurônios glutamatérgicos do núcleo subtalâmico (NST), os quais por sua vez excitam os neurônios

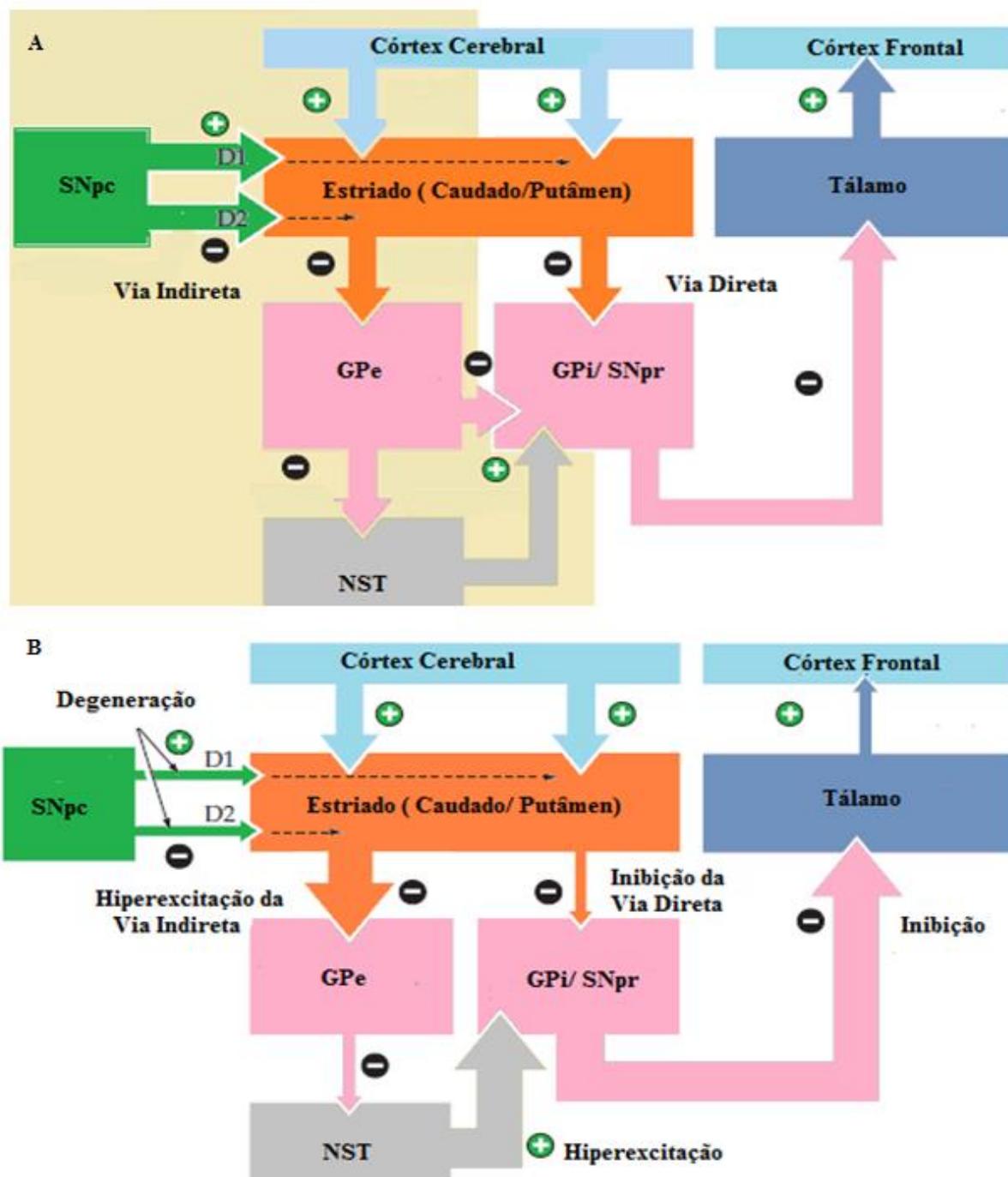
gabaérgicos da SNpr e do GPi que causam a inibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo, resultando em uma redução da transmissão tálamo-cortical (CALABRESI et al., 2014).

MSNs da via direta expressam altos níveis de receptores dopaminérgicos tipo D1 e receptores muscarínicos M4, e co-expressam dinorfina e substância P. Em contraste, os MSNs da via indireta expressam altos níveis de receptores dopaminérgicos tipo D2 e receptores de adenosina A<sub>2</sub>, e co-expressam encefalina (KREITZER, 2009; OBESO et al., 2008). Os receptores dopaminérgicos D1 e D2 são receptores metabotrópicos e estão ligados a diferentes vias de sinalização intracelular (diferentes tipos de proteína G). A dopamina exerce efeitos distintos sobre estes receptores, ao apresentar efeito excitatório sobre os receptores D1 na via direta e efeito inibitório sobre os receptores D2 na via indireta (Figura 2A). Desta forma, em condições fisiológicas, os efeitos da dopamina no sistema nigroestriatal resulta em uma facilitação da via tálamo-cortical e consequente liberação do movimento (GALVAN; DEVERGNAS; WICHMANN, 2015).

Os resultados do estudo de Kravitz et al. (2010) demonstraram a importância das influências opostas da dopamina nas vias direta e indireta sobre a atividade locomotora, bem como suportaram a principal hipótese da fisiopatologia dos sintomas motores da DP. Neste estudo, camundongos expressando Cre nos MSNs da via direta e indireta receberam uma injeção de Canal-rodopsina-2 (ChR2) no estriado dorsomedial e foram submetidos a estimulação optogenética e avaliação da atividade locomotora. A ChR2 é uma proteína que quando estimulada por luz causa a despolarização da membrana. A estimulação bilateral de receptores D2 da via indireta induziu *freezing*, bradicinesia e diminuiu a atividade locomotora dos animais, ao contrário da estimulação dos receptores D1 da via direta que produziu uma redução do *freezing* e aumentou a atividade locomotora dos animais. Além disto, os autores demonstraram que a estimulação bilateral da via direta restaurou os déficits motores causados pela injeção de 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial (MFB- *medial forebrain bundle*).

Na DP, os neurônios aferentes dopaminérgicos para o estriado são perdidos e o funcionamento das vias direta e indireta torna-se alterado (Figura 2 B). A depleção de dopamina no estriado causa uma hiperativação da via indireta e um hipoativação da via direta, o que promove uma hiperestimulação do NST e Gpi/SNr e uma inibição da via tálamo-cortical, resultando em uma redução da atividade lomotora e movimentos (CALABRESI et al., 2014).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que outras regiões cerebrais, tais como área tegumentar ventral (VTA- *ventral tegumentar area*), locus coeruleus e núcleos da rafe, também estão comprometidas em pacientes com DP. Todos estes núcleos também degeneram e apresentam corpos de Lewy, sugerindo um processo patogênico similar ao que ocorre na SNpc. Portanto, outros sistemas de neurotransmissão tais como o noradrenérgico e serotoninérgico também estão envolvidos na fisiopatologia da DP e tem sido relacionados ao sintomas não-motores da DP (BRAAK et al., 2004; DEXTER; JENNER, 2013; OBESO et al., 2010).



**Figura 2.** Esquema representativo do efeito da dopamina nas vias direta e indireta. Em condições fisiológicas (A) e na DP (B). (+) excitação, (-) inibição. GPe: globo pálido externo; GPI: globo pálido interno; NST: núcleo subtalâmico; SNpr: substância negra parte reticulada; SNpc: substância negra parte compacta.

**Fonte:** Adaptado de Purves et al. (2007).

## 2.4 Estresse Oxidativo e Doença de Parkinson

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização redox celular e consequentemente, dano celular (BISWAS, 2016). O estresse oxidativo é caracterizado pela presença de radicais livres, os quais são moléculas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados centrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, sendo denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), respectivamente. Os radicais livres podem reagir com substratos biológicos e causar danos a organelas e macromoléculas e, consequentemente, promover dano a saúde do organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os neurônios dopaminérgicos são particularmente susceptíveis ao estresse oxidativo, pois ERO são geradas durante o metabolismo da dopamina. Além disso, neurônios dopaminérgicos da substância nigra contêm ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o qual reage com peróxido de hidrogênio através da reação de Fenton, e produz o radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ). O  $\text{HO}\cdot$  é o radical mais deletério ao organismo, pois apresenta uma meia-vida curta e dificilmente é sequestrado *in vivo* pelas enzimas antioxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HWANG, 2013; UTTARA et al., 2009).

Na DP, a degeneração de neurônios dopaminérgicos leva a um aumento do metabolismo da dopamina pelos neurônios remanescentes e uma produção excessiva de ERO, resultando em aumento do estresse oxidativo (BLESA et al., 2015; SPINA; COHEN, 1989). Em casos idiopáticos e genéticos de DP, o estresse oxidativo exerce uma função crítica na fisiopatologia da doença, e tem sido implicado como um mecanismo que leva a disfunção celular e eventual morte neuronal (BLESA et al., 2015).

Análises pos-mortem mostram depleção dos níveis de enzimas antioxidantes e aumento do estresse oxidativo na substância nigra de pacientes com DP (HWANG, 2013; SOFIC et al., 1992). Níveis de superóxido dismutase foram significativamente menores em pacientes com DP sob tratamento com L-dopa quando comparados aos indivíduos controle (CRĂCIUN; DRONCA; LEACH, 2016). Um recente estudo demonstrou que os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), um marcador de estresse oxidativo, foram significativamente maiores no plasma de indivíduos com DP comparados aos indivíduos controles, enquanto marcadores antioxidantes, incluindo vitamina C, FRAP (*ferric-reducing ability of plasma*) e NSPG (*non-*

*protein thiols*), foram significativamente menores nos indivíduos com DP (MEDEIROS et al., 2016).

Evidências provenientes de modelos farmacológicos de DP induzidos pela 6-OHDA (BALUCHNEJADMOJARAD; HASSANSHAHI; ROGHANI, 2014; CHATTOPADHYAYA et al., 2015) e pela RES (ABÍLIO et al., 2003; BURGER et al., 2003; FERNANDES et al., 2012) também indicam que o estresse oxidativo é um dos mecanismos responsáveis pela disfunção e degeneração de neurônios do sistema nigroestriatal (BLESÁ et al., 2015; JANDA et al., 2012).

Sendo assim, agentes antioxidantes representam uma estratégia terapêutica atrativa para a prevenção ou tratamento da neurodegeneração observada na DP (KOPPULA et al., 2012; PÉREZ-HERNÁNDEZ et al., 2016; SHAHPURI et al., 2016).

## **2.5 Inflamação e Doença de Parkinson**

Evidências crescentes indicam que a neuroinflamação exerce um função crítica na patogênese da DP (WANG; LIU; ZHOU, 2015; ALCALY, 2016). A neuroinflamação consiste numa integração complexa de respostas de todas as células imunes presentes no SNC, incluindo microglia, astrócitos e linfócitos-T infiltradas (LE; WU; TANG, 2016).

McGeer et al. (1988) mostraram a presença de microglia reativa na SNpc de pacientes com DP. A microglia reativa foi observada próxima a neurônios dopaminérgicos contendo melanina e foi associada com a neurodegeneração destes neurônios. Imamura et al. (2003) demonstraram microglia reativa na SNpc e putamen de pacientes com DP, além de marcação positiva para as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 no putamen, sugerindo que a neuroinflamação está associada com o dano neuronal presente na DP. Esta hipótese é suportada pelos resultados de um estudo *in vivo* que utilizou tomografia por emissão de pósitrons em pacientes com DP e demonstrou um aumento na ativação microglial nos estágios iniciais da DP (pacientes em estágios I e II da DP). Esta ativação microglial foi correlacionada negativamente com a densidade dopaminérgica no putamen e positivamente ao comprometimento motor de pacientes com DP (OUCHI et al., 2005).

Resultados de estudos com modelos animais da DP também têm demonstrado ativação da microglia e seu envolvimento com a neurodegeneração após a injeção de neurotoxinas, tais como MPTP e 6-OHDA (JOERS et al., 2016). A injeção intraestriatal de 6-OHDA induziu um

aumento significativo dos níveis de N-acetilglucosaminidase (NAG), um marcador de ativação microglial, na SN e estriado de ratos após uma semana da lesão (SILVA et al., 2016).

Os astrócitos também exercem funções importantes no processo inflamatório da DP. Uma astrogliose reativa pode ser observada em tecidos post-mortem de pacientes com DP e em modelos animais da DP (RAPPOLD; TIEU, 2010; WANG; LIU; ZHOU, 2015). Os astrócitos são capazes de liberar citocinas pró-inflamatórias sob condições patológicas, e podem ser ativados por citocinas tais como TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  liberadas pela microglia, levando a produção de EROS (RAPPOLD; TIEU, 2010). Desta forma, os astrócitos podem atuar sinergicamente com a microglia e amplificar a resposta imune, aumentando a produção de fatores neurotóxicos e induzindo a morte de neurônios dopaminérgicos (SAIJO et al., 2009).

Um recente estudo demonstrou que a concentração de citocinas, incluindo interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-2, foi significativamente mais elevada no plasma de pacientes com DP comparados com os indivíduos controle (QIN et al, 2016). Estudos utilizando modelos animais da DP também demonstraram aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias nos animais tratados com neurotoxinas (MACHADO-FILHO et al., 2014; HAAS et al., 2016)

Considerando o processo inflamatório como um dos mecanismos que induzem a neurodegeneração na DP, fármacos anti-inflamatórios têm sido considerados para o tratamento de pacientes com DP (ROCHA; DE MIRANDA; TEIXEIRA, 2015).

## **2.6 Tratamento Farmacológico da Doença de Parkinson**

O tratamento da DP tem sido inteiramente sintomático, baseado em estratégias que visam restaurar ou aumentar os níveis de dopamina, principalmente através da administração da L-DOPA, um precursor deste neurotransmissor. A maioria dos pacientes com DP respondem bem a L-DOPA. Contudo, 40% a 50% dos pacientes desenvolvem flutuações motoras e discinesias dentro de 5 anos de tratamento crônico e 70% a 80% dos pacientes apresentam complicações motoras após 10 anos de tratamento (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016).

A dopamina produzida a partir da L-DOPA pode ser metabolizada em espécies reativas de oxigênio, produzindo estresse oxidativo. Desta forma, estudos tem sugerido que o uso prolongado de L-DOPA pode causar uma toxicidade aos neurônios dopaminérgicos e acelerar o

processo de neurodegeneração, além de causar efeitos colaterais (OLANOW, 2015; STAYTE; VISSEL, 2014).

Outros fármacos também são utilizados como coadjuvantes da L-DOPA. Destacam-se os agonistas dopaminérgicos, inibidores das enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol o-metil transferase (COMT), agentes anticolinérgicos, antagonistas do receptor A<sub>2A</sub> de adenosina e antagonistas glutamatérgicos. Todas estas drogas apresentam efeito sobre os sintomas motores, porém demonstram pouco ou nenhum efeito sobre os sintomas não-motores da DP, além de não serem capazes de retardar a progressão da doença (DEXTER; JENNER, 2013; FAHN, 2015; STAYTE; VISSEL, 2014).

Os tratamentos disponíveis não possuem efeito neuroprotetor comprovado, por isso, ao longo dos últimos anos, estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de identificar novas drogas com atividade neuroprotetora capazes de prevenir ou retardar a progressão da DP (STAYTE; VISSEL, 2014).

## **2.7 Modelos Animais da Doença de Parkinson**

Muito do conhecimento sobre a fisiopatologia e tratamento da DP é derivado de estudos realizados com animais submetidos a diferentes modelos experimentais, destacando a importância destes modelos para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos da DP e para o estudo de novas intervenções terapêuticas para esta doença (DUTY; JENNER, 2011; STAYTE; VISSEL, 2014).

Ao longo das últimas décadas, vários modelos animais da DP têm sido desenvolvidos. Tipicamente, eles são classificados em dois grupos: modelos tóxicos e modelos genéticos, e algumas vezes, ambos podem ser combinados. Os modelos tóxicos são induzidos através do uso de neurotoxinas sintéticas ou ambientais, enquanto que os modelos genéticos utilizam a expressão *in vivo* de mutações relacionadas a DP (BLESA et al., 2012).

Os modelos animais de DP induzidos por fármacos, tais como MPTP, 6-OHDA, reserpina e rotenona, são capazes de reproduzir algumas alterações na sinalização das vias direta e indireta dos núcleos da base, resultando em características fisiopatológicas e sintomáticas similares aquelas observadas em pacientes com DP (BLESA et al., 2012; PROU; PRZEDBORSKI, 2005). No entanto, nenhum dos modelos de DP, atualmente disponíveis,

reproduz todas as características da DP nos humanos, uma vez que, normalmente, alguma característica fisiopatológica e/ou comportamental da doença está ausente (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014).

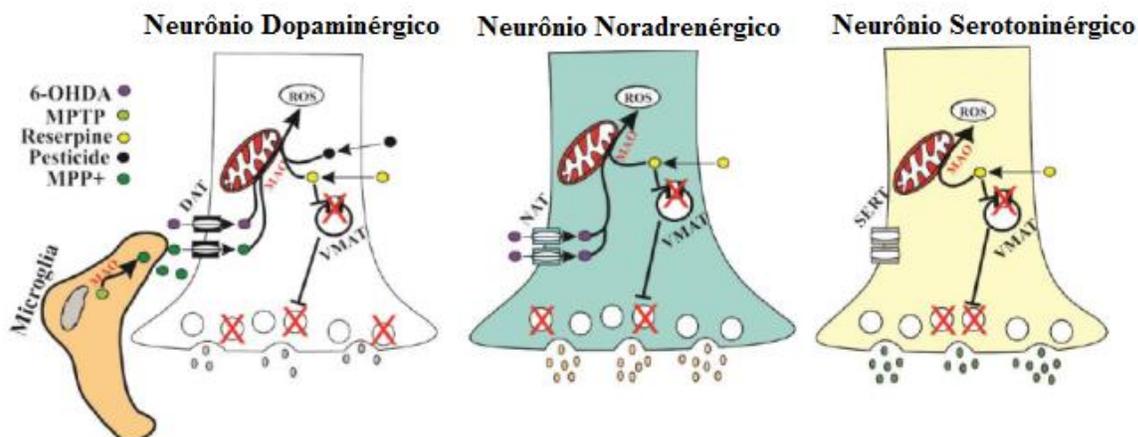
Apesar das limitações, os modelos tóxicos de DP são uma alternativa acessível e tem contribuído de forma significativa para a expansão do conhecimento sobre a etiologia, fisiopatologia e potenciais alvos terapêuticos da DP (DUTY; JENNER, 2011; JAGMAG et al., 2016; LEÃO et al., 2015).

### **2.7.1 Modelo da Doença de Parkinson induzido pela Reserpina (RES)**

O modelo da DP induzido pela RES foi um dos primeiros modelos empregados na pesquisa experimental da DP e foi essencial para a descoberta da eficácia da L-DOPA no tratamento desta doença (DUTY; JENNER, 2011). Na década de 50, Carlsson et al. descobriram que a RES era capaz de induzir um comportamento acinético em coelhos e depleção dos níveis de dopamina no cérebro dos animais e que o tratamento com L-DOPA revertia o efeito neuroléptico da RES nos animais. Estes achados contribuíram para estabelecer a relação entre a dopamina e os distúrbios motores, bem como incentivaram o desenvolvimento de modelos animais de DP induzidos pela RES (FAHN, 2015; LEÃO et al., 2015).

A RES é um alcalóide encontrado em plantas do gênero *Rauwolfia* (R.), incluindo *R. serpentina*, *R. vomitoria* e *R. micranta* (LEYDEN; POMERANTZ; BOUCHARD, 1956). A RES foi inicialmente utilizada como droga para tratar a hipertensão arterial, porém seu uso pode produzir efeitos colaterais, incluindo sintomas parkinsonianos (MAY; VOEGELE, 1956).

A RES inibe de forma irreversível os transportadores vesiculares de monoamina (*monoamine vesicular transporter* : VMAT-1 e 2), impedindo o transporte das monoaminas para o interior das vesículas sinápticas, o que reduz a concentração e estoque de neurotransmissores nas vesículas, resultando em uma diminuição dos níveis de monoaminas na fenda sináptica, (BERTLER, 1961; LEÃO et al., 2015), como pode ser observado na Figura 3.



**Figura 3.** Esquema representativo dos mecanismos de ação das principais toxinas nos neurônios do SNC usadas para induzir modelos animais de DP. A RES atua em neurônios dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos, bloqueando o VMAT e reduzindo os níveis de monoaminas na fenda sináptica.

**Fonte:** Adaptado de Leal et al (2016).

A depleção de monoaminas em ratos tratados com RES está associado com o aumento do estresse oxidativo e dano neuronal nos neurônios dopaminérgicos (FERNANDES e al., 2012; LEÃO et al., 2015). O bloqueio do VMAT pela RES produz um acúmulo de dopamina no citosol do terminal pré-sináptico, induzindo um aumento do seu metabolismo pela MAO, o que leva a formação de espécies reativas de oxigênio e consequente estresse oxidativo e peroxidação lipídica (LEÃO et al., 2015; SPINA; COHEN, 1989).

O estresse oxidativo associado a depleção de monoaminas na fenda sináptica resultante da administração de RES induz alterações comportamentais e neuroquímicas em humanos (MAY; VOEGELE, 1956) e em roedores (COLPAERT, 1987; FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013), similares aquelas observadas em pacientes com DP.

Desde sua descoberta do efeito da RES sobre o SNC, diferentes protocolos de administração e regimes de tratamentos em modelos animais, utilizando a RES, têm sido desenvolvidos com o objetivo de esclarecer os mecanismos envolvidos nas alterações observadas nos animais tratados com essa droga. Em ratos, a RES induz alterações motoras tais como catalepsia, hipocinesia, rigidez muscular, tremor, discinesia oral e postura em flexão (COLPAERT, 1987; FERNANDES et al., 2012; GOLDSTEIN; BARNETT; MALICK, 1975; PERES et al, 2016; SANTOS et al., 2013). Drogas atualmente utilizadas na clínica para o tratamento dos sintomas motores da DP, incluindo L-DOPA, amantadina, escopolamina e

apomorfina, são capazes de reverter as alterações motoras induzidas pela RES em ratos (GOLDSTEIN; BARNETT; MALICK, 1975; LEÃO et al., 2015). A administração de L-DOPA combinada com a carbidopa, tratamento primário para pacientes com DP, é capaz de bloquear o tremor, a rigidez e hipocinesia induzidos pela RES em ratos (COLPAERT, 1987).

Estudos prévios de Fernandes et al. (2012) e Santos et al. (2013), demonstraram que a administração repetida de uma dose baixa (0,1 mg/kg) de RES é capaz de induzir um comprometimento motor gradual em ratos, mimetizando a natureza progressiva da DP e funcionando como um modelo animal progressivo da DP. Além do comprometimento motor, a administração de RES também promove aumento da peroxidação lipídica no estriado e redução dos níveis de tirosina hidroxilase (TH) na SNpc e no estriado, principais áreas cerebrais envolvidas na fisiopatologia dos sintomas motores da DP. O modelo de DP induzido pela administração repetida de uma dose baixa de RES tem sido utilizado para identificar possíveis intervenções neuroprotetoras para a prevenção ou tratamento da DP (SARMENTO SILVA et al., 2015; LINS et al., 2017, no prelo).

Desta forma, os modelos da DP induzidos pela RES consistem em um meio útil e acessível para aprofundar o conhecimento sobre a DP, além de serem de fácil aplicação e baixo custo (LEÃO et al., 2015).

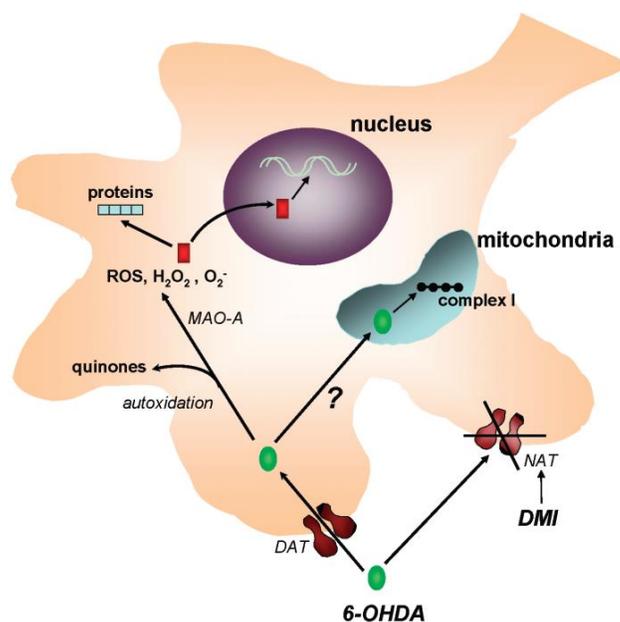
### **2.7.2 Modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA**

A 6-OHDA é um metabólito da dopamina que foi descoberto por Senoh et al. em 1959, enquanto eles estudavam as conversões enzimáticas da dopamina em noradrenalina utilizando homogeneizados de tecidos de ratos. Entretanto, o primeiro relato dos efeitos biológicos da 6-OHDA foi descrito por Porter et al. em 1963, quando eles demonstraram que a 6-OHDA foi capaz de produzir uma significativa e duradoura depleção de NE em corações de camundongos e cachorros (KOSTRZEWA; JACOBOWITZ, 1974).

Em 1968, Ungerstedt mostrou que a injeção de 6-OHDA na SNpc e no estriado dorsal foi capaz de destruir neurônios catecolaminérgicos e causar uma depleção de DA no sistema nigroestriatal, a qual foi associada com uma assimetria motora. Os resultados deste estudo contribuíram para o desenvolvimento do primeiro modelo animal de DP induzido por toxina (UNGERSTEDT, 1968).

A 6-OHDA é uma neurotoxina que compartilha similaridades estruturais com a dopamina e noradrenalina, exibindo uma alta afinidade pelos seus transportadores (*dopamine transporter*-DAT e *noradrenaline transporter* -NAT), respectivamente. Conseqüentemente, a 6-OHDA pode entrar nos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos e causar disfunção dos mesmos, levando a morte neuronal (KOSTRZEWA; JACOBOWITZ, 1974; PROU; PRZEDBORSKI, 2005).

O dano neuronal induzido pela 6-OHDA é principalmente associado ao estresse oxidativo causado pela toxina (Figura 4). Uma vez dentro do neurônio, a 6-OHDA acumula-se no citosol e promove a formação de espécies reativas de oxigênio, principalmente peróxido de oxigênio, causando citotoxicidade e conseqüente morte neuronal. A 6-OHDA também pode se acumular dentro das mitocôndrias e bloquear o complexo I da cadeia respiratória, interrompendo a transferência de elétrons, levando a subsequente inibição respiratória e intensificação do estresse oxidativo (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008).



**Figura 4.** Mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA. Após ser captada do espaço extracelular pelo DAT ou NAT, a 6-OHDA é estocada nos neurônios catecolaminérgicos. Dentro dos neurônios, a 6-OHDA é degradada pela MAO-A e sofre um processo de autooxidação, produzindo várias espécies citotóxicas, que comprometem a função celular e produzem dano neuronal. Além disso, a 6-OHDA também induz neurotoxicidade por comprometer a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Em experimentos animais, 6-OHDA é usualmente administrada em associação com um bloqueador do NAT, geralmente a desipramina (DMI).

**Fonte:** Simola et al. (2007).

Injeções de 6-OHDA também são capazes de induzir um processo inflamatório no local da lesão, o qual é caracterizado pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$  e IL- $\beta$  (HAAS et al., 2016; MACHADO-FILHO et al., 2014), aumento da expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), bem como aumento de marcadores de apoptose como a caspase-3 (HERNANDEZ-BALTAZAR; MENDOZA-GARRIDO; MARTINEZ-FONG, 2013).

A 6-OHDA é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, portanto, é classicamente injetada diretamente dentro da SNpc, MFB ou estriado. A injeção de 6-OHDA é geralmente realizada unilateralmente, com o hemisfério contralateral servindo como controle. Normalmente, injeções bilaterais de 6-OHDA são evitadas devido a alta taxa de mortalidade associada a significativa afagia e adipsia dos animais operados (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; JAGMAG et al., 2016).

Ao longo dos últimos anos, a 6-OHDA é umas das neurotoxinas mais utilizadas para modelar a DP em animais de experimentação. A versatilidade é uma característica típica do modelo induzido pela 6-OHDA. Lesões parcial ou completa do sistema nigroestriatal, desenvolvidas com diferentes perfis temporais, podem ser obtidas e exploradas para diferentes objetivos, incluindo a investigação de mecanismos patogênicos e fisiopatológicos da DP, bem como para a investigação de novas abordagens terapêuticas (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008).

O modelo animal de DP induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA no MFB tem contribuído de forma substancial para a pesquisa pré-clínica da DP. O MFB é formado por axônios provenientes de neurônios localizados na SNpc que terminam no estriado dorsal, bem como por axônios provenientes da VTA que se projetam para o núcleo accumbens. Assim, a injeção de 6-OHDA dentro do MFB causa lesão destas duas vias, promovendo um desequilíbrio nestes sistemas dopaminérgicos, o que resulta em alterações motoras e depleção dos níveis de dopamina nas áreas relacionadas (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).

A lesão unilateral do MFB induzida pela 6-OHDA causa assimetria no comportamento motor de roedores. Uma redução do uso da pata anterior contralateral à lesão pode ser observada em camundongos três semanas após a injeção de 6-OHDA no MFB (BOIX; PADEL; PAUL, 2015). Ratos tendem a apresentar rotações espontâneas ipsilaterais ao lado da lesão, três semanas após a injeção de 6-OHDA no MFB, as quais aumentam após a administração de anfetamina, um

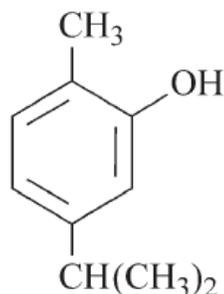
agonista dopaminérgico indireto (DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015). Um comportamento rotacional contralateral ao lado da lesão também pode ser observado após a administração de apomorfina, um agonista dopaminérgico direto. O comportamento rotacional tende a se intensificar em função do tempo e está correlacionado com o nível de desnervação dopaminérgica nigroestriatal (BOIX; PADEL; PAUL, 2015; YUAN et al., 2005).

Uma degeneração quase completa do estriado dorsal foi observada três semanas após a injeção de 6-OHDA no MFB em ratos, enquanto que a degeneração da SNpc foi mais gradual, atingindo > 90% somente cinco semanas após a lesão, sugerindo uma degeneração retrógrada presente nos estágios iniciais da DP (SARRE et al., 2004). No entanto, a injeção de 6-OHDA no MFB também pode causar uma degeneração quase completa dos neurônios da SNpc. Dados de imunohistoquímica para TH, indicam que 99% de degeneração nigral pode ser observada após cinco semanas da lesão, mimetizando a neurodegeneração observada nos estágios avançados da DP (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002).

Além de reproduzir algumas alterações fisiopatológicas da DP, o modelo de DP induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA no MFB também tem sido utilizado para investigar possíveis estratégias neuroprotetoras para DP, demonstrando ser um modelo útil para a pesquisa pré-clínica da DP (DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).

## 2.8 Carvacrol

O Carvacrol (CA; 2-Methyl-5-1-methylethyl; C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O) é um monoterpreno fenólico (Figura 3) com peso molecular 150, 21 g/mol, presente em óleos essenciais de plantas pertencentes a família Lamiaceae, incluindo os gêneros *Origanum*, *Thymbra*, *Thymus*, *Satureja*, *Coridothymus*, sendo o constituinte majoritário dos óleos essenciais do orégano (BASER, 2008; DE VINCENZI et al., 2004). O CA apresenta-se em forma líquida, possui um odor aromático e tem sido amplamente utilizado como conservante na indústria de alimentos e cosméticos (DE VINCENZI et al., 2004; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015). O CA é considerado relativamente seguro para consumo humano (DE VINCENZI et al., 2004; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015).



**Figura 5.** Estrutura química do Carvacrol.

**Fonte:** De Vincenzi et al., 2004

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado que o CA apresenta uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, tais como atividade antifúngica, antibacteriana, acaricida, inseticida, antiplaquetária, antitumoral, antiinflamatória e antioxidante (BASER, 2008; GUIMARÃES et al., 2010; KARA et al., 2014; SUNTRES; COCCIMIGLIO; ALIPOUR, 2015)

Um considerável número de estudos pré-clínicos tem providenciado evidências que o CA apresenta várias atividades farmacológicas sobre o SNC, incluindo atividade antinociceptiva (CAVALCANTE MELO et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2014), anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010), ansiolítica (MELO et al., 2010), antidepressiva (MELO et al., 2011), antiinflamatória (LI et al., 2016), antioxidante (BALUCHNEJADMOJARAD; HASSANSHAHI; ROGHANI, 2014; SAMARGHANDIAN et al., 2016) e neuroprotetora (BALUCHNEJADMOJARAD; HASSANSHAHI; ROGHANI, 2014; DENG; LU; TENG, 2013; PETERS et al., 2012; YU et al., 2012).

Evidências que o CA possui efeito neuroprotetor foram demonstradas em um modelo de isquemia/reperfusão cerebral em camundongos. A administração intraperitoneal de CA na dose de 50 mg/kg reduziu significativamente o volume de infarto e melhorou os déficits neurológicos dos animais, além disso, reduziu os níveis de caspase-3, um marcador de apoptose, sugerindo um efeito antiapoptótico (YU et al., 2012). Um outro estudo demonstrou um efeito neuroprotetor do CA em ratos submetidos a um modelo de isquemia/reperfusão da artéria cerebral média. O CA preveniu o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) e atividade da enzima mieloperoxidase, bem como inibiu a expressão das enzimas óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), ciclooxigenase-2 (COX-2) e fator nuclear-kB (NF-kB) no tecido cortical isquêmico. Além disso, o tratamento com CA aumentou a atividade da enzima antioxidante

superóxido dismutase e reduziu os níveis de malonaldeído no tecido isquêmico, indicando um efeito anti-inflamatório e antioxidante (LI et al., 2016).

O tratamento crônico, por sete semanas, com CA nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, preveniu os déficits cognitivos e reduziu o estresse oxidativo no córtex cerebral e hipocampo de ratos diabéticos. Além disso, reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , bem como atenuou a expressão da caspase-3 nestas áreas cerebrais (DENG; LU; TENG, 2013). A administração única de CA (73 mg/kg, i.p.) diminuiu os níveis de marcadores de estresse oxidativo e os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em extratos de tecido do nervo ciático de ratos tratados com metotrexato, sugerindo um efeito neuroprotetor (CELIK et al., 2013).

O efeito antioxidante do CA foi associado ao seu efeito protetor observado em ratos submetidos a injeção intraestriatal de 6-OHDA. Os ratos lesionados com 6-OHDA e tratados com CA apresentaram uma redução do número de rotações induzidas pela apomorfina e uma redução dos níveis malondialdeído (marcador de peroxidação lipídica) e do conteúdo de nitrito no mesencéfalo, além de uma tendência de aumento da atividade da enzima antioxidante catalase, sugerindo um efeito neuroprotetor (BALUCHNEJADMOJARAD; HASSANSHAH; ROGHANI, 2014).

Em um recente estudo, o CA demonstrou efeito antioxidante no cérebro de ratos submetidos à estresse crônico por contenção. Os animais submetidos ao estresse e tratados com CA apresentaram uma redução dos níveis de malonaldeído e um aumento dos níveis das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e catalase, quando comparado aos animais controle (SAMARGHANDIAN et al., 2016).

Devido a seu baixo peso molecular e sua lipofilicidade, o CA é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e interagir com receptores de membrana no SNC, atuando como agente modulatório de alguns sistemas de neurotransmissão (REINER; LABUCKAS; GARCÍA, 2009; ZOTTI et al., 2013).

O CA apresenta efeito modulatório sobre o sistema gabaérgico, especialmente sobre os receptores GABA<sub>A</sub>. O efeito ansiolítico do CA em camundongos avaliados no labirinto em cruz elevado foi revertido pelo flumazenil, um antagonista do sítio dos benzodiazepínicos no receptor GABA<sub>A</sub> (MELO et al., 2010). Kessler et al. (2014) demonstraram que o CA induziu um aumento nas correntes de GABA em células transfectadas HEK293 e óocitos de *Xenopus* que expressavam receptores GABA<sub>A</sub>. Um outro estudo demonstrou através do método de *docking*

molecular que o CA atua como um ligante do receptor GABA<sub>A</sub>, apresentando uma maior energia de interação com o receptor que o muscimol, um agonista seletivo deste receptor (GUIMARÃES et al., 2014).

Alguns estudos têm sugerido que o CA é capaz de interagir com o sistema dopaminérgico no SNC. Melo et al. (2011) demonstraram que o efeito antidepressivo do CA em camundongos avaliados no teste de nado forçado foi revertido por antagonistas dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, sugerindo que este efeito pode ter sido mediado por uma interação do CA com o sistema dopaminérgico. Um outro estudo demonstrou que a administração oral subcrônica de CA aumentou os níveis de dopamina no hipocampo e córtex pré-frontal de ratos, indicando que o CA é capaz de modular os níveis de dopamina no SNC (ZOTTI et al., 2013).

Sendo assim, podemos observar que os estudos desenvolvidos com o CA demonstraram resultados promissores sobre sua eficácia terapêutica em diferentes aspectos e mecanismos. Assim, o desenvolvimento de estudos sobre a eficácia neuroprotetora do CA em modelos animais da DP pode contribuir de forma significativa para a produção de uma nova formulação terapêutica para a prevenção ou tratamento desta doença.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o potencial efeito neuroprotetor do carvacrol (CA) em ratos submetidos a dois modelos experimentais da Doença de Parkinson (DP) induzidos por fármacos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito do tratamento com CA sobre o desenvolvimento das alterações motoras induzidas pela administração repetida de uma dose baixa de reserpina (RES);
- Avaliar o efeito do tratamento com CA sobre as alterações motoras induzidas pela injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial (MFB);
- Avaliar os efeitos do CA sobre as alterações induzidas pela RES ou 6-OHDA nos neurônios dopaminérgicos da Substância Negra parte compacta (SNpc) e fibras dopaminérgicas do estriado dorsal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados ratos machos das linhagens Wistar (350- 550 g, com 6 a 7 meses de idade) e Long-Evans (250-350 g, com 3 a 4 meses de idade). Os animais foram alojados em número de 4 ou 5 em gaiolas plásticas, sob ventilação e temperatura controladas ( $22 \pm 2$  °C), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e comida. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com protocolo aprovado previamente pelo Comitê de Ética e Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe (Protocolo 33/2014) e pelo Comitê de Cuidado e Uso Animal da Universidade de Iowa (Protocolo 5031330). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

### 4.2 Drogas

Foram utilizados ácido acético glacial (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol,  $\geq 98\%$  de pureza, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Cloridrato de bupivacaine (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União e Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União e Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), d-anfetamina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), Reserpina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), 6-OHDA (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) e solução salina (NaCl 0,9%).

Carvacrol (CA) foi emulsificado em Tween 80 a 0,2% e dissolvido em salina nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 mg/ml. O veículo do CA (VC) consistiu de Tween 80 a 0,2% dissolvido em salina. Reserpina (RES) foi dissolvida em ácido acético glacial e posteriormente diluída em água destilada na concentração de 0,1 mg/ml. O veículo da RES (VR) consistiu de ácido acético dissolvido em água destilada. A 6-OHDA foi dissolvida na concentração de  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  em salina estéril contendo 0,01% de ácido ascórbico. Os animais SHAM receberam o veículo da 6-OHDA (salina estéril contendo 0,01% de ácido ascórbico). CA, VC e 6-OHDA e o veículo da 6-OHDA foram preparados antes da administração; e RES e VR foram preparados a cada 48 horas e estocados a 4°C entre as administrações.

### 4.3 Delineamento Experimental

O presente estudo foi dividido em dois experimentos. O experimento I teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento com CA em ratos submetidos a um modelo progressivo de DP induzido pela administração repetida de uma dose baixa de RES. No experimento II, o objetivo foi avaliar o efeito do tratamento com CA no modelo de DP induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA no MFB.

#### 4.3.1 Experimento I – Efeito do CA no modelo da DP induzido pela RES

Antes do início dos procedimentos experimentais, todos os animais foram submetidos a um período de manipulação diária por 5 minutos durante cinco dias consecutivos. Após o período de manipulação, os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos: Veículo do Carvacrol + Veículo da Reserpina (VC+VR, n = 9); Veículo do Carvacrol + Reserpina (VC+RES, n = 9); Carvacrol (12,5 mg/kg) + Veículo da Reserpina (CA12,5+VR, n= 7); Carvacrol (25 mg/kg) + Veículo da Reserpina (CA25+VR, n = 7); Carvacrol (12,5 mg/kg) + Reserpina (CA12,5+RES, n=7) e Carvacrol (25 mg/kg) + Reserpina (CA25+RES, n=7). CA e VC foram administrados diariamente por via i.p., uma vez ao dia. RES e VR foram administrados por via s.c. a cada 48 horas. O volume da injeção foi 1 ml/kg de peso corporal em todos os casos. O dia da primeira injeção foi considerado como dia 0.

Ao longo do tratamento, todos os animais foram avaliados através dos seguintes testes comportamentais (de 8:00 a.m. a 4:00 p.m.): (1) teste de catalepsia, realizado diariamente; (2) teste do campo aberto no dia 7 (24 horas após a 4ª injeção de RES ou VR); (3) avaliação dos movimentos orais nos dias 12, 20 e 30 (48 horas após a 6ª, 10ª e 15ª injeções de RES ou VR, respectivamente). Todos os aparatos foram limpos com álcool a 10% antes da submissão de cada animal para evitar interferência de sinais odoríferos. Ao fim dos testes comportamentais (dia 30, 48 horas após a última injeção de RES ou VR), os animais foram anestesiados e perfundidos de forma intracardíaca e seus cérebros processados para imunohistoquímica para TH, conforme o delineamento experimental demonstrado na figura 6.



#### 4.3.1.1.3 Avaliação dos movimentos orais

O animal foi colocado em uma gaiola (40 cm × 40,5 cm × 20 cm) com espelhos posicionados sob e atrás da gaiola, a fim de permitir que o observador visualizasse o animal em qualquer posição. O número de movimentos de mastigação no vácuo (movimento rápido da mandíbula que se assemelha ao movimento de mastigação, porém não direcionado a um estímulo particular) foi quantificado durante 10 minutos. Estes movimentos não foram considerados quando ocorreram durante um período de *grooming* (FERNANDES et al., 2012; SALAMONE et al., 1998).

#### 4.3.2 Experimento II – Efeito do CA no modelo da DP induzido pela 6-OHDA

Ratos Long Evans foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Veículo do Carvacrol + SHAM (VC+SHAM; n =9), Veículo do Carvacrol + 6-OHDA (VC+6-OHDA; n=7), Carvacrol 50 mg/kg + 6-OHDA (CA50+6-OHDA; n=7) e Carvacrol 100 mg/kg (CA100+6-OHDA; n=7). Os animais foram pré-tratados diariamente com uma injeção i.p. de CA (50 ou 100 mg/kg) ou VC, ao volume de 1 ml/ kg de peso corporal, durante uma semana antes da injeção de 6-OHDA. Após sete dias de pré-tratamento com CA ou VC, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para a injeção de 6-OHDA ou veículo da 6-OHDA no MFB direito. As injeções de CA ou VC continuaram sendo administradas por três semanas após a cirurgia, incluindo o dia da cirurgia. Após três semanas da cirurgia, os animais foram submetidos aos seguintes testes comportamentais (de 8:00 a.m. a 4:00 p.m.): (1) campo aberto (realizado 21 dias após a cirurgia estereotáxica); (2) teste do cilindro (realizado 21 dias após a cirurgia estereotáxica); (3) teste do Rotarod (realizado 23 dias após a cirurgia estereotáxica); (4) rotações induzidas pela d-anfetamina (realizado 24 dias após a cirurgia estereotáxica). Todos os aparatos foram limpos com solução de etanol a 10% entre os testes para evitar interferência de sinais odoríferos. Ao fim de todos os testes comportamentais (25 dias após a cirurgia estereotáxica), os animais foram anestesiados e perfundidos de forma intracardíaca e seu cérebro processado para imunofluorescência para TH, como esquematizado na Figura 7.



**Figura 7.** Ilustração esquemática do delineamento experimental do Experimento II.

#### 4.3.2.1 Cirurgia Estereotáxica

Após uma semana de pré-tratamento, os animais foram anestesiados com cloridato de cetamina (100 mg/kg, i.p.) e cloridato de xilazina (10 mg/kg, i.p.). Os ratos anestesiados foram submetidos à tricotomia da parte superior da cabeça e posicionados em um aparelho estereotáxico, com o crânio e incisivos superiores fixados no aparelho. A assepsia do local foi realizada com uma solução de álcool iodado e uma injeção s.c. de cloridato de bupivacaina a 0,5% foi administrada para anestesia local. Em seguida, uma incisão na região superior da cabeça foi realizada com o auxílio de um bisturi, músculos e demais tecidos foram afastados e os ossos do crânio foram expostos. As seguintes coordenadas estereotáxicas foram determinadas utilizando-se o bregma como ponto de referência: anteroposterior (AP), -2.2 mm; mediolateral (ML): -1.5 mm; dorsoventral (DV), -8.0 mm (PAXINOS; WATSON, 2005). Após a localização das coordenadas, o crânio foi perfurado com uma broca odontológica, e uma injeção de 6-OHDA foi administrada no MFB direito utilizando-se uma agulha de 28 gauge acoplada a uma microseringa de 5  $\mu$ l (Hamilton Syringe, Sigma, St Louis, MO, USA). Cada rato recebeu uma injeção unilateral de 5  $\mu$ l de 6-OHDA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l de 6-OHDA dissolvido em salina estéril contendo 0,01% ácido ascórbico) dentro do MFB direito. A injeção de 6-OHDA foi realizada com um fluxo de 1  $\mu$ l/min. A seringa foi mantida imóvel por 5 minutos após a injeção para evitar o refluxo da substância injetada. Em seguida, a seringa foi retirada lentamente, o escalpo foi suturado e os animais foram retirados do estereotáxico. Os animais do grupo VC + SHAM foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos anteriormente, porém receberam 5  $\mu$ l de salina estéril contendo 0,01% ácido ascórbico. Os animais foram colocados individualmente em caixas plásticas e monitorados por 2 horas após a cirurgia, antes de retornarem para o biotério.

### 4.3.2.2 Testes Comportamentais

#### 4.3.2.2.1 Atividade locomotora no Campo Aberto

O campo aberto utilizado neste experimento consistiu em uma arena de formato quadrado com as paredes feitas de acrílico (45 x 45 cm), sem teto e com assoalho branco. Uma câmera foi posicionada acima do campo aberto e conectada a um computador. Os ratos foram colocados individualmente no centro da arena e tiveram seu comportamento avaliado durante 10 minutos, utilizando o programa de rastreamento animal Omniplex (Plexon, Dallas, TX, USA) para registro dos seguintes parâmetros comportamentais: distância total percorrida (em metros) e número de *rearing* (DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015).

#### 4.3.2.2.2 Teste do Cilindro

Os animais foram colocados individualmente em um cilindro de vidro transparente (16 cm de diâmetro e 25 cm de altura) e tiveram seu comportamento filmado por uma câmera digital durante 5 minutos. Um espelho foi colocado atrás do cilindro para permitir a visualização dos movimentos do animal quando o mesmo assumisse uma posição contrária a câmera. O primeiro contato na parede do cilindro durante o comportamento de *rearing* utilizando a pata anterior direita (membro ipsilateral, não afetado) ou esquerda (membro contralateral, afetado) e o primeiro contato com ambas as patas anteriores foram quantificadas. Animais com lesão no MFB apresentam uma redução do uso da pata anterior contralateral à lesão. No presente estudo, a preferência de uso da pata anterior esquerda (contralateral a lesão) foi calculada pela fórmula [ (contralateral/ total) x 100 ] e foi expressa em porcentagem do total de eventos (BOIX; PADEL; PAUL, 2015; SCHALLERT et al., 2000; YUAN et al., 2005).

#### 4.3.2.2.3 Teste do Rotarod

Todos os animais foram treinados em um aparato de Rotarod por dois dias consecutivos. Os animais foram colocados individualmente sobre o aparato de Rotarod e treinados a permanecer sobre o eixo de rotação durante 5 minutos, sob um protocolo de aceleração que

iniciava a uma frequência de 4rpm e aumentava lentamente até atingir 40 rpm. Cada animal foi submetido a três sessões diárias, com pelo menos 15 minutos de intervalo entre as sessões, com o objetivo de evitar fadiga e estresse. Após dois dias de treinamento, os animais foram submetidos as mesmas condições do treinamento e o tempo de permanência do animal sobre o eixo foi quantificado (CAMPOS et al., 2013; MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006).

#### *4.3.2.2.4 Teste de rotações induzidas por anfetamina*

No 25º dia após a injeção de 6-OHDA, os animais receberam uma injeção i.p. de d-anfetamina (3 mg/kg) dissolvida em salina estéril. Após 30 minutos da injeção de d-anfetamina, os ratos foram colocados individualmente em um campo aberto (descrito no item 4.3.1.2.1) e tiveram sua atividade locomotora filmada por uma câmera digital durante 10 minutos. A anfetamina é um agonista indireto dopaminérgico que induz um comportamento rotacional ipsilateral à lesão em animais submetidos a injeção de 6-OHDA no MFB. Através da análise dos vídeos em câmera lenta, o número de rotações (giros de 360º) ipsilateral ao lado da injeção de 6-OHDA (rotações para o lado direito) foi quantificado e considerado para análise (DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015).

### **4.4 Perfusão dos animais e processamento dos cérebros**

Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e perfundidos de forma intracardíaca com tampão fosfato salina (PBS; pH 7,2-7,4) para a lavagem dos vasos, por 5 minutos, e, posteriormente, com paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão fosfato (PB; pH 7,4; 100mM), por 10 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os cérebros foram cuidadosamente removidos e pós-fixados em PFA a 4%, a 4°C por 24 horas. Em seguida, os cérebros foram colocados em uma solução de sacarose a 30% para crioproteção por 48 horas. Após este período, cada cérebro foi cortado em secções coronais de 40 µm usando um criostato a -20°C (Leica, Germany). As secções foram colocadas sequencialmente em compartimentos, contendo uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e PB, e conservadas a 4°C até serem processadas para imunohistoquímica para TH.

#### 4.5 Imunohistoquímica para TH

No experimento I, as secções foram inicialmente pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB a 0,1M / pH 7,4 por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena. As secções foram incubadas por 1 hora em uma solução de PB contendo Triton-X 100 (ICN Biomedicals) a 0,4% e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2%. Em seguida, foram incubadas overnight em uma solução com o anticorpo primário monoclonal anti-TH produzido em coelho (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A) diluído em PB contendo Triton-X 100 (ICN Biomedicals) a 0,4% e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2%. Em seguida, as secções foram colocadas em contato com o anticorpo secundário biotilado (cabra anti-coelho), na concentração de 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A), diluído em PB contendo Triton-X 100 a 0,4%, por 2 horas. Após esta etapa, os cortes foram incubados numa solução contendo PB e o complexo avidina biotina (ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, USA) por 90 minutos. Para visualizar a reação, os cortes foram colocados em contato com um cromógeno, diaminobenzidina-DAB (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5%, diluído em uma solução contendo PB e 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entre cada uma das etapas descritas previamente, as secções foram submetidas a três lavagens, de 5 minutos cada, com Triton-X 100 a 0,4% diluído em PB. As secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas e em seguida desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de alcóois, clareadas com xilol e as lâminulas fixadas com Entellan (Merck). As imagens foram capturadas utilizando-se uma camera digital (Nikon, DXM-1200) acoplada a um microscópio óptico (Olympus, BX-41).

No experimento II, as secções foram incubadas por 1 hora em uma solução de bloqueio contendo PBS a 0,1M / pH 7,4, Triton-X 100 a 0,3% (ICN Biomedicals) e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 5%. Em seguida, foram incubadas overnight em uma solução com o anticorpo primário monoclonal anti-TH produzido em coelho (1:1000; AB152, Chemicon, USA) diluído em solução de bloqueio e mantidas a temperatura ambiente sob agitação automática. Após esta etapa, as secções foram incubadas por 2 horas em uma solução com o anticorpo secundário Alexa Flour 568 cabra anti-coelho (1:1000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluído em solução de bloqueio. Entre cada uma das etapas descritas previamente, as secções foram submetidas a três lavagens, de 5 minutos cada, utilizando uma solução de PBS a 0,1M / pH 7,4 e Triton-X 100 a 0,3%. Ao final das lavagens, as secções foram

montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lâminulas usando Prolong Gold com ou sem 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As secções foram analisadas através de um microscópio confocal Leica DM 6000 CFS e as imagens foram capturadas utilizando o software Leica's Advanced Application Suite Advanced Fluorescence (Leica Microsystems, Buffalo Grove, IL).

#### **4.6 Contagem de células TH+**

Para cada animal analisado, imagens dos cortes foram feitas em aumento de 5x ou 10x, nas quais foi possível observar em detalhes a presença ou a ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem de células foi realizada em 4 secções da SNpc de cada animal e o número de células para cada um deles correspondeu a média entre as 4 secções analisadas. Todas as células TH+ na SNpc foram contadas usando a versão 1.46i do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Todas as contagens foram realizadas de forma cega. Os valores de cada animal foram normalizados considerando a média do grupo controle (no experimento I) ou a média do lado contralateral à injeção de 6-OHDA (no experimento II).

#### **4.7 Avaliação da Densidade Óptica Relativa (DOR) para TH**

As imagens foram obtidas utilizando a mesma intensidade de luz e nenhuma modificação de brilho e contraste foi realizada. Cada animal foi representado por 4 secções do estriado dorsal e os níveis de TH foram avaliados através da análise de densidade óptica relativa (DOR). Imagens do estriado dorsal bilateral foram feitas e o número de pixels de cada imagem foi calculado usando a versão 1.46i do software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Na mesma imagem, foi selecionada uma área controle (córtex) e o número de pixels foi calculado. A média de pixels das 4 secções analisadas do estriado dorsal foi subtraída da média de pixels das 4 imagens da área controle no mesmo tecido. Assim como na contagem de células TH+, os valores de cada animal foram normalizados considerando a média do grupo controle (no experimento I) ou a média do lado contralateral à injeção de 6-OHDA (no experimento II).

#### **4.8 Análise estatística**

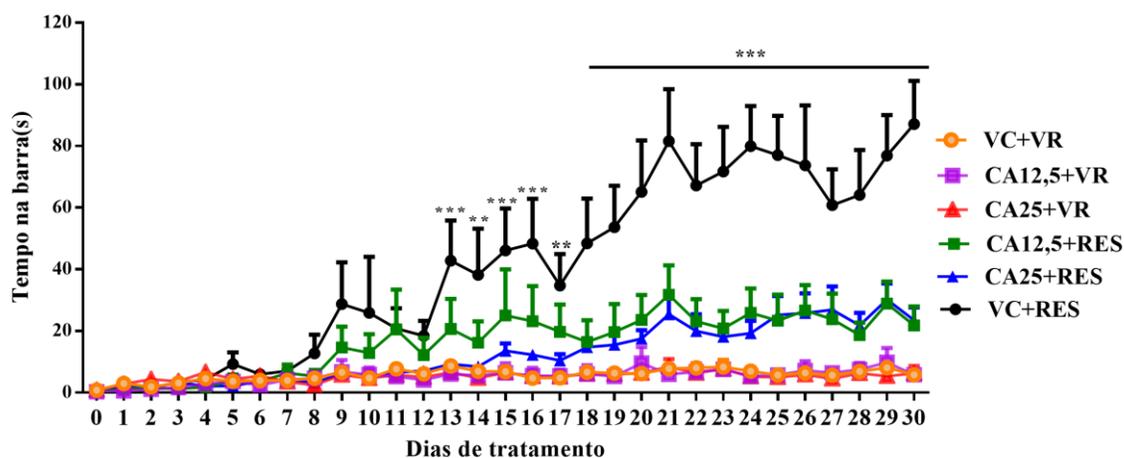
Os dados foram primeiramente analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov para distribuição normal e pelo teste de Bartlett para homogeneidade de variâncias. Os resultados do teste de catalepsia e movimentos orais foram analisados através de Análise de Variância (ANOVA) de duas vias de medidas repetidas seguida do teste de Tukey. Os resultados do teste do campo aberto, teste do cilindro, teste de rotarod, rotações induzidas por d-anfetamina e os dados da imunohistoquímica foram avaliados através da ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises foram realizadas através da versão 6.0 do Graph Pad Prism software (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Experimento I: Efeito do CA no modelo de DP induzido pela RES

#### 5.1.1 Teste de catalepsia

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito significativo do tempo (dias de tratamento) [F(30,1200)=17,63;  $p<0,001$ ], do tratamento [F(5,40)=10,88;  $p<0,001$ ] e interação tempo x tratamento [F(150,1200) =5,51;  $p<0,001$ ]. O pós-teste de Tukey revelou um aumento significativo na duração do comportamento de catalepsia no grupo VC+RES quando comparado ao grupo controle (VC+VR), que iniciou no dia 13 (24 horas após a 6ª injeção de RES) e progrediu de forma gradual até o dia 30 (48 horas após a 15ª injeção de RES), como pode ser observado na figura 13. Em contraste, o CA isoladamente (grupos CA12,5+VR e CA25+VR) ou concomitante com a RES (grupos CA12,5+RES e CA25+RES) não induziu nenhuma diferença significativa na duração do comportamento de catalepsia ao longo do tratamento (Figura 8).

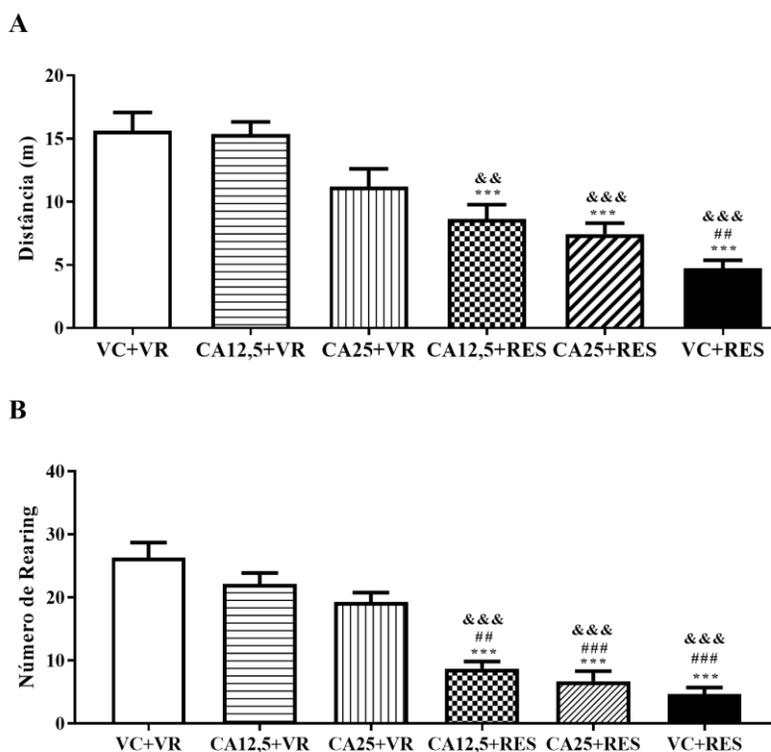


**Figura 8.** Efeito do Carvacrol sobre o comportamento de catalepsia de ratos submetidos ao modelo de Doença da Parkinson induzido pela reserpina. Grupos VC+VR (n= 9), CA12,5+VR (n=7), CA25+VR (n=7), CA12,5+RES (n=7), CA25+RES (n=7), VC+RES (n=9). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*\* $p<0,01$  e \*\*\* $p<0,001$  comparado ao grupo VC+VR (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; RES=

reserpina; VC= veículo do carvacrol; VR= veículo da reserpina; CA12,5= CA 12,5 mg/kg; CA25= CA 25 mg/kg.

### 5.1.2 Atividade Locomotora no Campo Aberto

A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas na distância total percorrida [ $F(5, 40) = 16,24$ ;  $p < 0,001$ ] e no número de rearing [ $F(5,40)=30,68$ ;  $p < 0,001$ ]. O pós-teste de Tukey revelou que os grupos tratados com RES mostraram uma redução significativa na distância total percorrida [VC+RES ( $p < 0,001$ ), CA12,5+RES ( $p < 0,001$ ) e CA25+RES ( $p < 0,001$ )] e no número de rearing [VC+RES ( $p < 0,001$ ), CA12,5+RES ( $p < 0,001$ ) e CA25+RES ( $p < 0,001$ )] quando comparados ao grupo controle total (VC+VR). Os grupos tratados com CA sozinho (grupos CA12,5+VR e CA25+VR) não apresentaram diferença significativa na distância total percorrida [CA12,5+VR ( $p > 0,999$ ) e CA25+VR ( $p = 0,075$ )] e no número de rearing [CA12,5+VR ( $p = 0,491$ ) e CA25+VR ( $p = 0,051$ )] quando comparados ao grupo controle total. Os dados da atividade locomotora no campo aberto estão sumarizados na Figura 9.

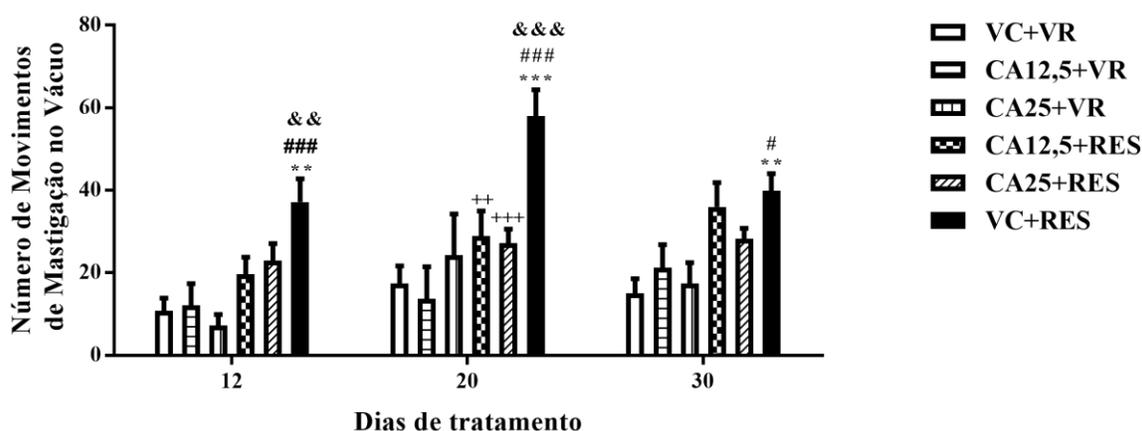


**Figura 9.** Efeito do Carvacrol sobre a atividade locomotora no teste do campo aberto de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina. (A) Distância total

percorrida. (B) Número de rearing. Grupos VC+VR (n= 9), CA12,5+VR (n=7), CA25+VR (n=7), CA12,5+RES (n=7), CA25+RES (n=7), VC+RES (n=9). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*\* $p$ <0,001 comparado ao grupo VC+VR; ## $p$ <0,01 e ### $p$ <0,001 comparado ao grupo CA25+VR; && $p$ <0,01 e &&& $p$ <0,001 comparado ao grupo CA12,5+VR (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; RES= reserpina; VC= veículo do carvacrol; VR= veículo da reserpina; CA12,5= CA 12,5 mg/kg; CA25= CA 25 mg/kg.

### 5.1.3 Avaliação dos movimentos orais

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeitos do tempo (dias de tratamento) [F(2,80)=12,27;  $p$ <0,001], tratamento [F(5,40)=8,25;  $p$ <0,001) e interação tempo x tratamento [F(10,80)=2,29;  $p$ =0,019]. Após teste de Tukey revelou que o grupo VC+ RES mostrou um aumento significativo no número de movimentos de mastigação no vácuo nos dias 12 (48 horas após 6<sup>a</sup> injeção de RES;  $p$ =0,002), 20 (48 horas após a 10<sup>a</sup> injeção de RES;  $p$ <0,001) e 30 (48 horas após 15<sup>a</sup> injeção de RES;  $p$ =0,005) quando comparado ao grupo controle total (grupo VC+VR). No dia 20, o número de movimentos de mastigação no vácuo foi significativamente menor nos grupos CA12,5+RES ( $p$ =0,001) e CA25+RES ( $p$ <0,001) quando comparados ao grupo VC+RES. O CA administrado sozinho (grupos CA12,5+VR e CA25+VR) ou concomitante com a RES (grupos CA12,5+RES e CA25+RES) não induziu nenhuma mudança significativa no número de movimentos de mastigação no vácuo ao longo do tratamento, como pode ser observado na Figura 10.



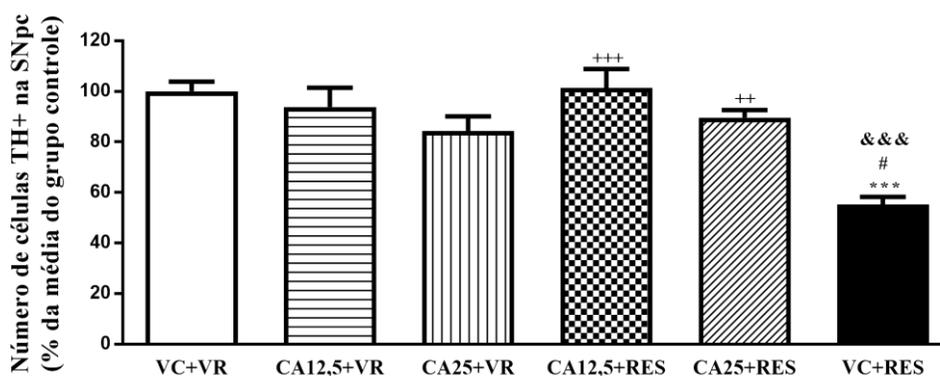
**Figura 10.** Efeito do Carvacrol sobre o número de movimentos de mastigações no vácuo de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina. Grupos VC+VR (n= 9), CA12,5 + VR (n=7), CA25 + VR (n=7), CA12,5 + RES (n=7), CA25 + RES (n=7), VC + RES

(n=9). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM. \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001 comparado ao grupo VC+VR; #p<0,05 e ### p<0,001 comparado ao grupo CA25+VR; &&p<0,01 e &&&p<0,001 comparado ao grupo CA12,5+VR; ++p<0,01 e +++p<0,001 comparado ao grupo VC+RES (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey). CA= carvacrol; RES= reserpina; VC= veículo do carvacrol; VR= veículo da reserpina; CA12,5= CA 12,5 mg/kg; CA25= CA 25 mg/kg.

## 5.1.4 Imunohistoquímica para TH

### 5.1.4.1 Contagem de células TH+

A ANOVA de um via revelou diferença significativa do número de células TH+ na SNpc [F (5, 24)=9,44; p<0,001] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Tukey revelou que a administração repetida de RES causou uma redução significativa no número de células TH+ no grupo VC+RES quando comparado aos grupos controle [VC+VR (p<0,001), CA12,5+VC (p<0,001) e CA25+VR (p=0,012) ]. Em contraste, os grupos CA12,5+RES e CA25+RES não demonstraram nenhuma diferença significativa quando comparados aos grupos controle e apresentaram um número maior de células TH+ quando comparados ao grupo VC+RES [CA12,5+RES (p<0,001) e CA25+RES (p=0,002) ]. O CA administrado sozinho (grupos CA12,5+VR e CA25+VR) não induziu nenhuma diferença significativa do número de células TH+ (Figura 11).

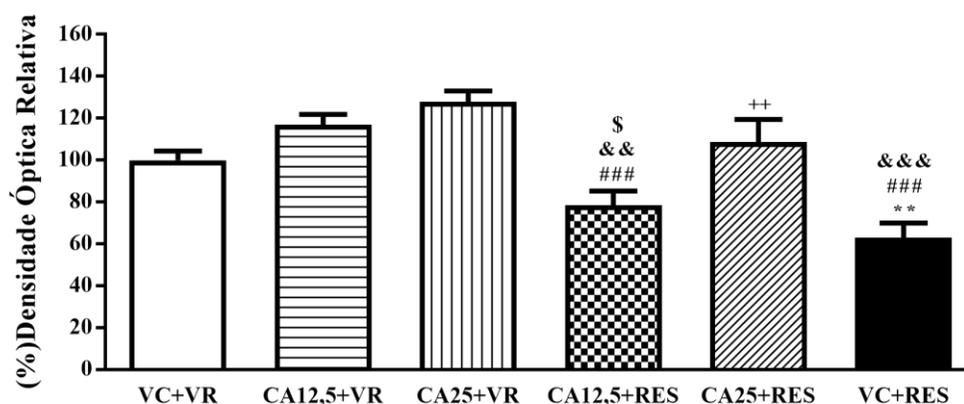


**Figura 11.** Efeito do Carvacrol sobre o número de células TH + na SNpc de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina. Os valores de cada animal foram normalizados pela média do grupo controle total (VC+VR). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n = 5, por grupo). \*\*\*p<0,001 comparado ao grupo VC+VR; #p<0,05 comparado ao grupo CA25+VR; &&&p<0,001 comparado ao grupo CA12,5+VR; ++p<0,01 e +++p<0,001

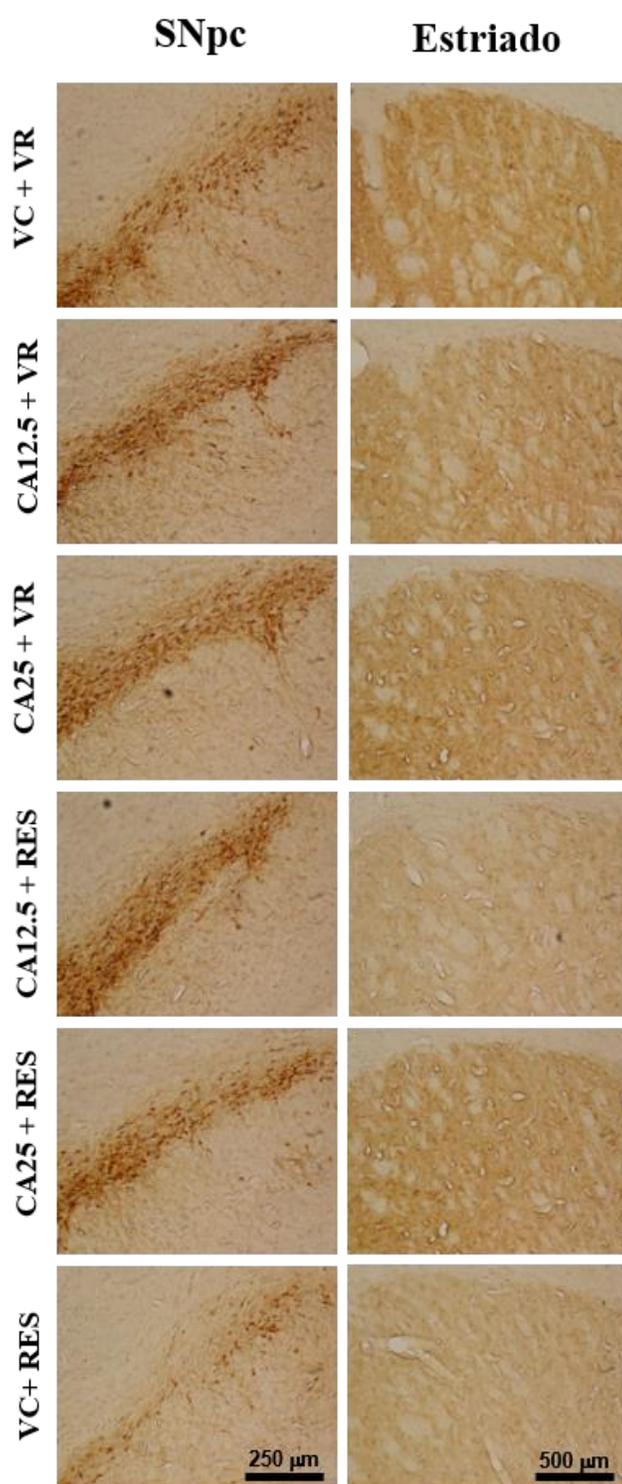
comparado ao grupo VC+RES (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; RES= reserpina; VC= veículo do carvacrol; VR= veículo da reserpina; CA12,5= CA 12,5 mg/kg; CA25= CA 25 mg/kg.

#### 5.1.4.2 Densidade Óptica Relativa (DOR) para TH

A ANOVA de uma via revelou uma diferença significativa da DOR para TH no estriado dorsal [F(5, 24)=12,57;  $p<0,001$ ]. O pós-teste de Tukey revelou que a administração repetida de RES causou uma redução significativa da DOR no grupo VC+RES quando comparado aos grupos controle [VC+VR ( $p=0,009$ ), CA12,5+ VC ( $p<0,001$ ) e CA25+VR ( $p<0,001$ )]. O grupo CA12,5+RES também apresentou uma redução significativa quando comparado aos grupos CA12,5+VR ( $p=0,006$ ), CA25+VR ( $p<0,001$ ) e CA25+RES ( $p=0,048$ ), porém nenhuma diferença significativa foi observada quando comparado ao grupo VC+VR ( $p=0,263$ ). O grupo CA25+RES não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos controle, porém apresentou um valor de DOR maior do que o grupo VC+RES ( $p=0,001$ ). O CA administrado sozinho (grupos CA12,5+VR e CA25+VR) não induziu nenhuma diferença significativa no valor da DOR para TH no estriado dorsal (Figura 12).



**Figura 12.** Efeito do Carvacrol sobre a densidade óptica relativa para TH no estriado dorsal de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina. Os valores de cada animal foram normalizados pela média do grupo controle total (VC + VR). Os dados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n=5$ , por grupo). \*\* $p<0,01$  comparado ao grupo VC+VR; ### $p<0,001$  comparado ao grupo CA25+VR; &&  $p<0,01$  e &&&  $p<0,001$  comparado ao grupo CA12,5+VR; ++ $p<0,01$  comparado ao grupo VC+RES, \$ $p<0,05$  comparado ao grupo CA25+RES (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; RES= reserpina; VC= veículo do carvacrol; VR= veículo da reserpina; CA12,5= CA 12,5 mg/kg; CA25= CA 25 mg/kg.



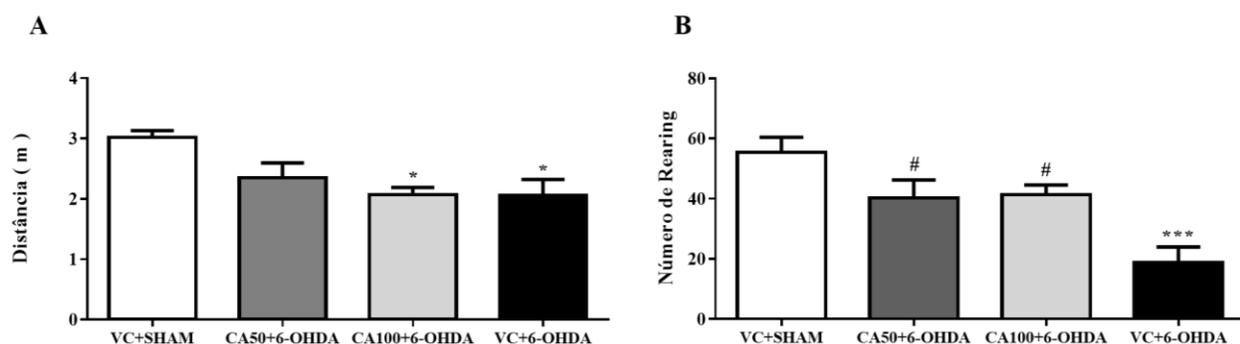
**Figura 13.** Imagens representativas da marcação para TH na SNpc e estriado dorsal de animais

submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela reserpina. CA= carvacrol; RES= reserpina; VC= veículo do carvacrol; VR= veículo da reserpina; CA12,5= CA 12,5 mg/kg; CA25= CA 25 mg/kg; SNpc= Substância Negra parte compacta.

## 5.2 Experimento II- Efeito do CA no modelo de DP induzido pela 6-OHDA

### 5.2.1 Atividade locomotora no Campo Aberto

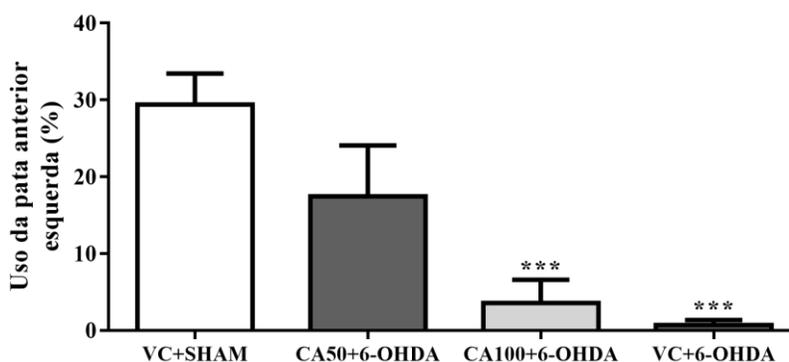
A ANOVA de uma via revelou diferenças significativas entre os grupos para a distância total percorrida [ $F(3,26)=6,18$ ;  $p=0,002$ ] e para o número de rearing [ $F(3,26)=9,43$ ;  $p<0,001$ ]. O pós teste de Tukey revelou uma redução significativa da distância total percorrida ( $p=0,005$ ) e do número de rearing ( $p<0,001$ ) do grupo VC+6-OHDA quando comparado ao grupo controle (VC+SHAM), como pode ser observado na Figura 15. O grupo tratado com CA na dose de 100 mg/kg (CA100+6-OHDA) exibiu uma redução significativa na distância total percorrida ( $p=0,006$ ) quando comparado ao grupo controle, enquanto nenhuma mudança significativa deste parâmetro foi observada no grupo tratado com CA na dose de 50 mg/kg (CA50+6-OHDA;  $p=0,074$ ) (Figura 14A). Em relação ao número de rearing, um aumento significativo foi observado nos grupos CA50+6-OHDA ( $p=0,032$ ) e CA100+6-OHDA ( $p=0,023$ ) quando comparados ao grupo VC+6-OHDA (Figura 14B).



**Figura 14.** Efeito do Carvacrol sobre a atividade locomotora no campo aberto de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. (A) Distância total percorrida. (B) Número de rearing. Grupos VC+SHAM (n=9), VC+6-OHDA (n=7), CA50+6-OHDA (n=7) e CA100+6-OHDA (n=7). Os valores são expressos em média ± EPM. \* $p<0,05$  e \*\*\* $p<0,001$  comparado ao grupo VC+ SHAM; # $p<0,05$  comparado ao grupo VC + 6-OHDA (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA50= CA 50 mg/kg; CA100= CA 100 mg/kg.

### 5.2.2 Teste do Cilindro

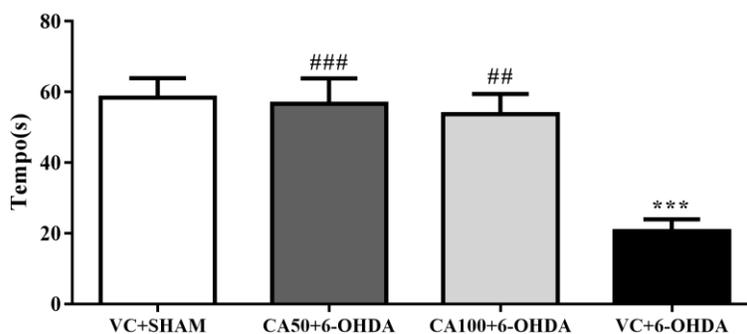
ANOVA de uma via mostrou diferença significativa [ $F(3,26)=10,21$ ;  $p < 0,001$ ] na porcentagem de uso da pata anterior esquerda (membro contralateral à injeção de 6-OHDA) entre os grupos. O pós teste de Tukey revelou uma redução significativa nos grupos VC+6-OHDA ( $p < 0,001$ ) e CA100+6-OHDA ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo controle (VC+SHAM). Nenhuma diferença significativa foi observada no grupo CA50+6-OHDA ( $p=0,211$ ) quando comparado ao grupo controle (Figura 15).



**Figura 15.** Efeito do Carvacrol sobre a porcentagem de uso da pata anterior esquerda de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. Grupos VC+SHAM ( $n=9$ ), VC+6-OHDA ( $n=7$ ), CA50+6-OHDA ( $n=7$ ) e CA100+6-OHDA ( $n=7$ ). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo VC+SHAM (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA12,5= CA 12,5 mg/kg; CA25= CA 25 mg/kg.

### 5.2.3 Teste de Rotarod

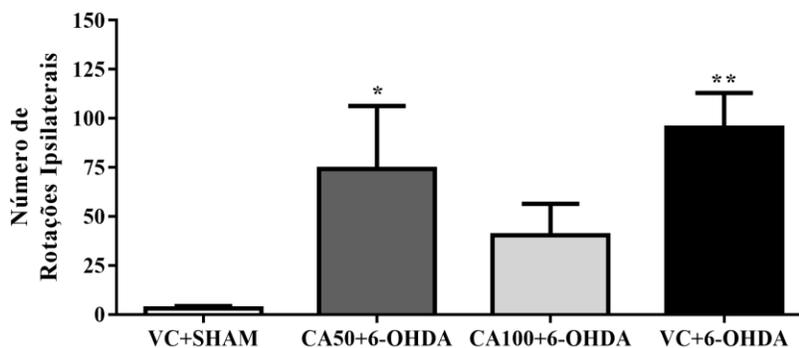
ANOVA de uma via mostrou diferença significativa entre os grupos no tempo de permanência sobre o rotarod [ $F(3, 26)=9,78$ ;  $p < 0,001$ ]. O pós teste de Tukey revelou que os animais do grupo VC+6-OHDA apresentaram uma redução significativa no tempo de permanência sobre o rotarod quando comparado ao grupo VC+SHAM ( $p < 0,001$ ). Os animais de ambos os grupos tratados com CA não apresentaram alteração significativa da do tempo quando comparados ao grupo VC+SHAM (CA50+6-OHDA,  $p= 0,996$ ; CA100+6-OHDA,  $p=0,931$ ). No entanto, um aumento significativo da latência foi observado nestes grupos (CA50+6-OHDA,  $p < 0,001$ ; CA100+6-OHDA;  $p=0,002$ ) quando comparados ao grupo VC+6-OHDA (Figura 16).



**Figura 16.** Efeito do Carvacrol sobre o tempo de permanência sobre o eixo do rotarod de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. Grupos VC+SHAM (n=9), VC+6-OHDA (n=7), CA50+6-OHDA (n=7) e CA100+6-OHDA (n=7). Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo VC+SHAM; ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  comparado ao grupo VC+6-OHDA (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA50= CA 50 mg/kg; CA100= CA 100 mg/kg.

#### 5.2.4 Teste de rotação induzida por amfetamina

A ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos no número de rotações ipsilaterais [F (3, 26)=4,99;  $p=0,007$ ]. O pós teste de Tukey revelou que a injeção de d-amfetamina causou um aumento significativo do número de rotações nos grupos VC+6-OHDA ( $p=0,006$ ) e CA50+6-OHDA ( $p=0,047$ ) quando comparados ao grupo VC+SHAM. O grupo CA100+6-OHDA mostrou uma tendência para o aumento das rotações, porém não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo VC+SHAM ( $p=0,483$ ) (Figura 17).



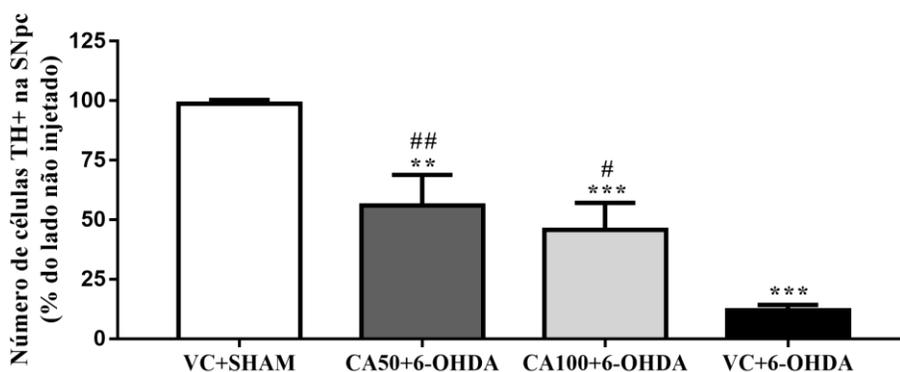
**Figura 17.** Efeito do Carvacrol no teste de rotação induzida por amfetamina de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. Grupos VC + SHAM (n=9), VC + 6-OHDA (n=7), CA50 + 6-OHDA (n=7) e CA100 + 6-OHDA (n=7). Os valores são expressos

em média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  comparado ao grupo VC + SHAM (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA50= CA 50 mg/kg; CA100= CA 100 mg/kg.

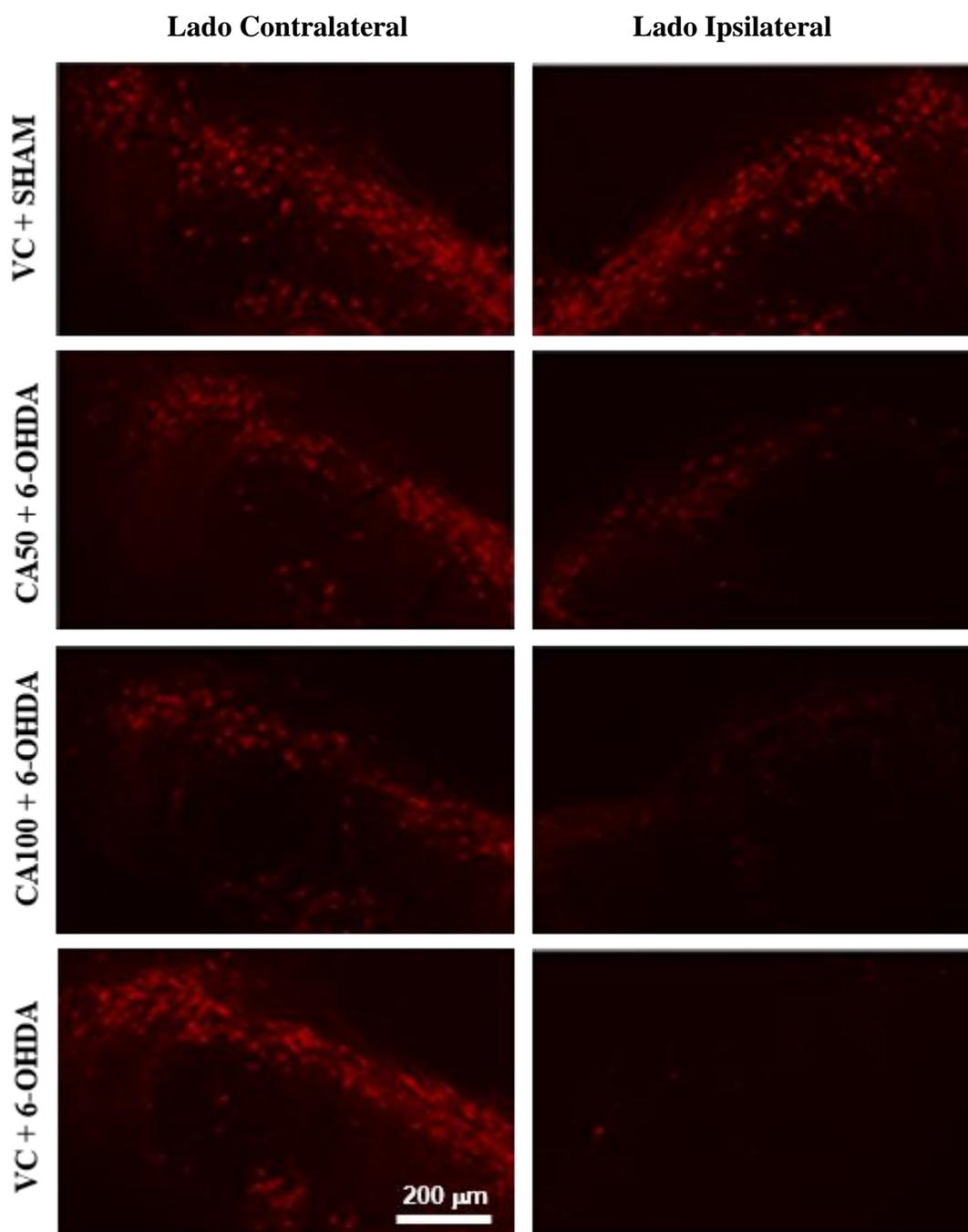
## 5.2.5 Imunohistoquímica para TH

### 5.2.5.1 Contagem de células TH+

A ANOVA de um via revelou diferença significativa do número de células TH+ na SNpc entre os grupos [F(3,26)=21,  $p < 0,001$ ]. O pós-teste de Tukey revelou que a injeção de 6-OHDA causou uma redução significativa do número de células TH+ nos grupos VC+6-OHDA ( $p < 0,001$ ), CA50+6-OHDA ( $p = 0,003$ ) e CA100+6-OHDA ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo VC+SHAM. Os grupos tratados com CA apresentaram um número maior de células TH+, CA50+6-OHDA ( $p = 0,004$ ) e CA100+6-OHDA ( $p = 0,038$ ), comparados ao grupo VC+6-OHDA (Figuras 18).



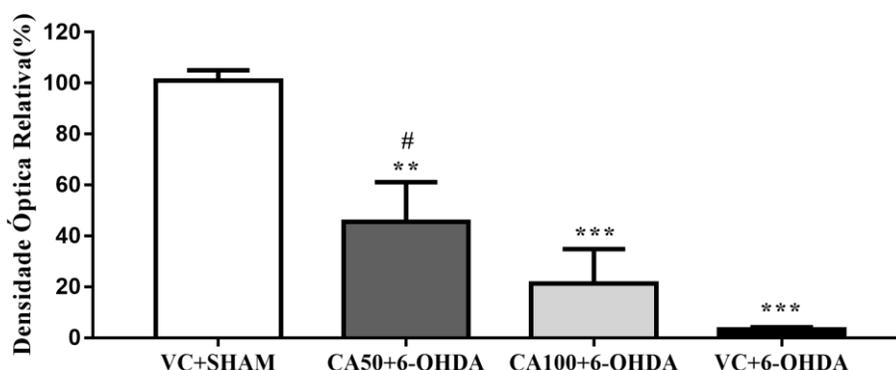
**Figura 18.** Efeito do Carvacrol sobre o número de células TH+ na SNpc de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. Grupos VC+SHAM (n=9), VC+6-OHDA (n=7), CA50+6-OHDA (n=7) e CA100+6-OHDA (n=7). Os valores de cada animal foram normalizados considerando a média do lado contralateral à injeção de 6-OHDA. Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  comparado ao grupo VC+SHAM; # $p < 0,05$  e ### $p < 0,01$  comparado ao grupo VC+6-OHDA (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA50= CA 50 mg/kg; CA100= CA 100 mg/kg.



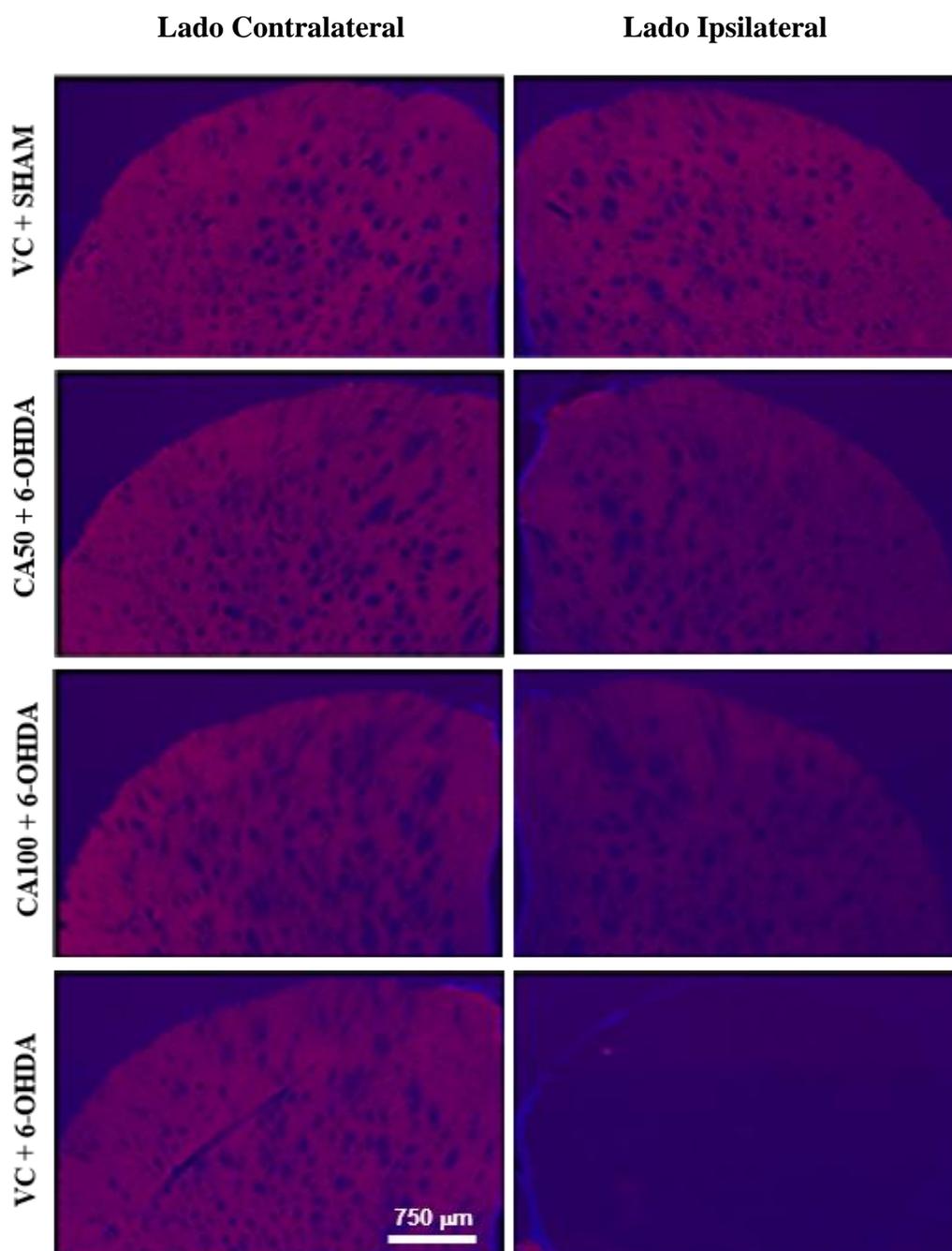
**Figura 19.** Imagens representativas da marcação para TH na SNpc de animais submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA50= CA 50 mg/kg; CA100= CA 100 mg/kg.

### 5.2.5.2 Densidade Óptica Relativa (DOR) para TH

A ANOVA de uma via revelou diferença significativa entre os grupos [  $F(3,26)=19,89$ ,  $p < 0,001$ ] na análise da DOR para TH no estriado dorsal. O pós teste de Tukey revelou que a injeção de 6-OHDA causou uma redução significativa da DOR nos grupos VC+6-OHDA ( $p < 0,001$ ), CA50+6-OHDA ( $p=0,002$ ) e CA100+6-OHDA ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo VC+SHAM. Um aumento significativo da DOR foi observado nos animais do grupo CA50+6-OHDA ( $p=0,034$ ) quando comparados ao grupo VC+6-OHDA (Figura 20).



**Figura 20.** Efeito do Carvacrol sobre a densidade óptica relativa dos níveis de TH no estriado dorsal de ratos submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. Grupos VC + SHAM (n=9), VC + 6-OHDA (n=7), CA50 + 6-OHDA (n=7) e CA100 + 6-OHDA (n=7). Os valores de cada animal foram normalizados considerando a média do lado contralateral à injeção de 6-OHDA. Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparado ao grupo VC + SHAM; # $p < 0,05$  comparado ao VC + 6-OHDA (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey). CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA50= CA 50 mg/kg; CA100= CA 100 mg/kg.



**Figura 21.** Imagens representativas do estriado dorsal de animais submetidos ao modelo da Doença de Parkinson induzido pela 6-OHDA. Foi utilizado DAPI como marcador nuclear para facilitar a delimitação da região durante as análises. CA= carvacrol; VC= veículo do carvacrol; CA50= CA 50 mg/kg; CA100= CA 100 mg/kg.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, nós investigamos o possível efeito neuroprotetor do CA em dois modelos animais farmacológicos da DP. No experimento I, os resultados demonstraram que o CA nas doses de 12,5 e 25 mg/kg protegeu os ratos das alterações motoras induzidas pela RES, observadas no teste de catalepsia e avaliação dos movimentos orais, porém não foi capaz de prevenir os déficits motores avaliados no teste do campo aberto. Além disso, o CA preveniu a redução da marcação de TH na SNpc e estriado dorsal induzida pela RES. No experimento II, nós observamos que o CA na dose de 50 mg/kg preveniu os déficits motores induzidos pela 6-OHDA observados no teste do campo aberto, teste de rotarod e teste do cilindro, e aumentou o número de rotações induzidas pela d-anfetamina. Além disso, o CA reduziu o dano provocado pela injeção de 6-OHDA nos neurônios dopaminérgicos da SNpc e estriado dorsal, uma vez que os ratos tratados com CA apresentaram uma menor redução da marcação de TH nestas áreas comparados aos animais lesionados não tratados.

Ao longo dos últimos anos, vários modelos animais de DP têm sido desenvolvidos e têm contribuído extensivamente para a expansão do conhecimento da DP. O uso de drogas como a RES e 6-OHDA tem se mostrado eficaz para modelar diferentes aspectos da DP em roedores (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014).

No presente estudo, nós utilizamos o modelo progressivo da DP induzido pela administração repetida de uma dose baixa de RES (0,1 mg/kg), o qual tem se mostrado eficaz para reproduzir diferentes características da DP. Uma das principais vantagens deste modelo é a sua capacidade de induzir o desenvolvimento gradual de sintomas motores em ratos, mimetizando a natureza progressiva dos sintomas da DP (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LEAL et al. 2016). Além disso, este modelo também pode ser utilizado para investigar possíveis tratamentos para DP (SARMENTO SILVA et al., 2015; LINS et al, 2017, no prelo).

O comportamento de catalepsia é definido como a incapacidade do animal de corrigir uma postura previamente imposta e tem sido comparado a incapacidade dos pacientes com DP para iniciar o movimento. A catalepsia tem sido relacionada à disfunção de algumas áreas envolvidas na fisiopatologia da DP, tais como estriado e globo pálido, além de ter sido associada a mudanças dos níveis de dopamina no sistema nigroestriatal. Portanto, o teste de catalepsia é

considerado uma ferramenta útil para investigar alterações comportamentais e neuroquímicas relacionadas a DP (COSTALL; NAYLOR, 1974; SANBERG et al., 1988; SANTOS et al., 2013). O teste de catalepsia é de fácil aplicação e tem sido utilizado para avaliar o desenvolvimento de alterações motoras no modelo de DP induzido pela administração repetida de RES, bem como tem se mostrado útil na investigação do potencial terapêutico de novos compostos para o tratamento da DP (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SARMENTO SILVA et al., 2015; LINS et al. 2017, no prelo).

Os resultados do experimento I demonstraram que a administração repetida de uma dose baixa de RES induziu um aumento gradual na duração do comportamento de catalepsia nos animais do grupo VC+RES, corroborando estudos prévios que utilizaram a mesma dose de RES (0,1 mg/kg) em ratos (FERNANDES et al., 2012; SANTOS et al., 2013; SARMENTO SILVA et al., 2015; LINS et al. 2017, no prelo). Em contraste, o tratamento com CA nas doses de 12,5 e 25 mg/kg preveniu este aumento nos animais dos grupos CA12,5+RES e CA25+RES, respectivamente, sugerindo um efeito protetor do CA sobre este parâmetro (Figura 8).

O comportamento de catalepsia pode ser induzido por antagonistas dos receptores dopaminérgicos D1 e D2, e tem provado ser um método útil para investigar diferenças e interações funcionais entre estes receptores (COSTALL; NAYLOR, 1974; SANBERG et al., 1988). Isto nos permite sugerir que agonistas dos receptores dopaminérgicos poderiam prevenir o comportamento de catalepsia induzido pela RES, considerando que agonistas dopaminérgicos são capazes de antagonizar a rigidez e hipocinesia induzidas por esta neurotoxina em ratos (COLPAERT, 1987). No presente estudo não avaliamos a interação do CA com os receptores dopaminérgicos. No entanto, um estudo prévio demonstrou que o CA administrado por via oral na dose de 25 mg/kg produziu um efeito antidepressivo em camundongos avaliados no teste de nado forçado e que o pré-tratamento com antagonistas de receptores dopaminérgicos D1(SCH23990) e D2 (sulpirida) bloqueou completamente o efeito antidepressivo do CA, sugerindo que o mecanismo de ação do CA neste teste foi dependente de sua interação com os receptores dopaminérgicos (MELO et al., 2011). Desta forma, é possível que o efeito protetor do CA no teste de catalepsia observado no presente estudo esteja envolvido com sua capacidade de atuar como agonista dos receptores dopaminérgicos, porém experimentos futuros são necessários para investigar esta interação.

Estudos tem demonstrado que a administração aguda ou crônica de RES pode induzir o desenvolvimento de movimentos orais em ratos. Entre os movimentos orais mais comuns, podemos citar os movimentos de mastigação no vácuo (ABÍLIO et al., 2003; FERNANDES et al., 2012; NEISEWANDER; CASTAÑEDA; DAVIS, 1994). Estes movimentos são involuntários e caracterizados por uma rápida deflexão vertical da mandíbula, porém não direcionada a um estímulo particular. Os movimentos de mastigação no vácuo induzidos por neurolépticos compartilham algumas características farmacológicas e neuroquímicas com o tremor de repouso presente em pacientes com DP (SALAMONE et al., 1998).

Um dos sintomas clássicos da DP é o tremor de repouso, tipicamente envolvendo a mão, no entanto, evidências indicam que o tremor apresentado por pacientes com DP também pode envolver o queixo, lábios e língua. Os movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela RES e uma dose baixa de apomorfina apresentaram uma frequência entre 3-7 Hz, a qual é característica do tremor observado em pacientes com DP. Além disso, várias drogas com efeito antiparkinsoniano em humanos são capazes de reduzir ou prevenir os movimentos de mastigação no vácuo induzidos por toxinas em animais. Essas características reforçam a utilidade da avaliação dos movimentos de mastigação no vácuo em modelos animais de DP para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DP e para a busca de novas drogas anti-parkinsonianas (SALAMONE; BASKIN, 1996; SALAMONE et al., 1998).

No experimento I, demonstramos que administração de RES induziu um aumento significativo no número de movimentos de mastigação no vácuo nos animais do grupo VC+RES e o tratamento com CA nas doses de 12,5 e 25 mg/kg (grupos CA12,5+RES e CA25+RES) foi capaz de prevenir os movimentos induzidos pela RES (Figura 10). Embora os mecanismos envolvidos com o efeito protetor do CA sobre o desenvolvimento de movimentos de mastigação no vácuo induzido pela RES permaneçam desconhecidos, é possível que este monoterpene atue sobre os sistemas de neurotransmissão envolvidos na fisiopatologia destes movimentos.

Alguns estudos têm sugerido que os movimentos de mastigação no vácuo são induzidos por um desequilíbrio da interação entre a dopamina e a acetilcolina no estriado, o que resulta em uma hipofunção gabaérgica na via estriatonigral. Embora os mecanismos desta interação ainda não estejam totalmente esclarecidos, acredita-se que a depleção de dopamina na SNpc causaria uma hiperestimulação de receptores muscarínicos no estriado, resultando em um desequilíbrio na liberação de GABA nas vias estriatonigral e estriadopalidal e no aparecimento dos movimentos

orais. Portanto, drogas antiparkinsonianas, incluindo agonistas dopaminérgicos e gabaérgicos, bem como antagonistas colinérgicos são capazes de bloquear os movimentos orais induzidos por drogas em roedores (SALAMONE; BASKIN, 1996; SALAMONE et al., 1998).

A administração de escopolamina, um antagonista muscarínico, reduziu o número de movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela coadministração de RES e apomorfina em ratos (SALAMONE; BASKIN, 1996). Embora não exista evidência que o CA pode modular receptores muscarínicos no cérebro, um estudo realizado com guínea pigs demonstrou um efeito inibitório do CA sobre os receptores muscarínicos da traquéia (BOSKABADY; JAFARI; POURABOLI, 2011). Assim, não podemos descartar a possibilidade que o efeito protetor do CA sobre o desenvolvimento dos movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela RES, observado no experimento I, possa estar relacionado a sua capacidade de atuar como um antagonista muscarínico.

A hipofunção gabaérgica no estriado também tem sido associada ao desenvolvimento de movimentos de mastigação no vácuo induzidos por drogas e pode estar envolvido na fisiopatologia do tremor dos indivíduos com DP. A injeção de muscimol, um agonista do receptor  $GABA_A$ , dentro da substância negra parte reticulata (SNpr) de ratos, bloqueou os movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela tacrina, um inibidor irreversível da acetilcolinesterase. Estes resultados são consistentes com a teoria que assume que neurônios da SNpr são hiperativos durante os movimentos de mastigação no vácuo, e que a inibição destes neurônios induzida pelo agonista gabaérgico reverte a hiperatividade neuronal e consequentemente bloqueia o desenvolvimento dos movimentos orais (FINN et al., 1997).

O estudo de Peixoto et al. (2005) demonstrou que o agonista  $GABA_A$  THIP (tetrahydroisoxazolopiridina) foi capaz de bloquear o desenvolvimento dos movimentos orais induzidos pela RES em ratos. Sendo assim, a estimulação de receptores  $GABA_A$  também pode ser um dos mecanismos reponsáveis pelo efeito protetor do CA sobre o desenvolvimento dos movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela RES, considerando que estudos prévios sugeriram que o CA pode atuar como um agonista destes receptores. Um estudo *in vitro* demonstrou que o CA aumentou as correntes de GABA em células HEK293 e óocitos *Xenopus* expressando receptores  $GABA_A$  (KESSLER et al., 2014). Melo et al. (2010) mostraram que o efeito ansiolítico do CA em camundongos foi revertido pelo flumazenil, um reconhecido antagonista do sítio benzodiazepínico no receptor  $GABA_A$ . Um outro estudo

demonstrou que o CA foi capaz de proteger camundongos de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ), cujo mecanismo de ação está associado ao antagonismo não-competitivo do receptor GABA<sub>A</sub> (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2010).

O aumento da incidência de movimentos orais em ratos tratados com neurolépticos pode estar relacionado a uma redução da atividade locomotora espontânea (ANDREASSEN; JORGENSEN, 2000). No entanto, é importante notar que nossos resultados mostraram que o tratamento com CA, nas doses de 12,5 e 25 mg/kg, foi capaz de prevenir o aumento do número de movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela RES (Figura 10), porém não teve efeito protetor sobre a redução da atividade locomotora espontânea induzida pela RES, avaliada no campo aberto (Figura 9). Resultados similares foram observados por Abílio et al. (2003) que demonstraram que o tratamento com vitamina E foi capaz de atenuar o aumento do número de movimentos orais induzidos pela RES, porém não afetou a hipolocomoção induzida pela RES. Estes resultados contrariam a teoria que a redução da atividade locomotora pode causar o aumento do movimentos orais induzidos pela RES, sugerindo ausência de correlação entre estes parâmetros e o envolvimento de mecanismos distintos no desenvolvimentos dos mesmos.

Estudos tem demonstrado que os movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela RES estão intimamente relacionados ao processo de estresse oxidativo (ABÍLIO et al., 2004; CALVENTE et al., 2002; FERNANDES et al., 2012) e que agentes antioxidantes podem atenuar ou inibir estes movimentos (ABÍLIO et al., 2003; BURGER et al., 2003; CHATURVEDI et al., 2006; FARIA et al., 2005).

O CA tem demonstrado uma potente atividade antioxidante em estudos *in vitro* (AAZZA; LYOUSSEI; MIGUEL, 2011; COCCIMIGLIO et al., 2016; GUIMARÃES et al., 2010) e *in vivo* (BALUCHNEJADMOJARAD; HASSANSHAHI; ROGHANI, 2014; CELIK et al., 2013; SAMARGHANDIAN et al., 2016). Embora nenhum ensaio para avaliação da atividade antioxidante do CA tenha sido realizado no presente estudo, não podemos descartar a possibilidade que o efeito protetor do CA sobre o desenvolvimento dos movimentos de mastigação no vácuo induzidos pela RES possa estar relacionado a seu potencial antioxidante.

A atividade antioxidante do CA poderia explicar também o seu efeito neuroprotetor sobre a redução da marcação de TH induzida pela RES na SNpc e estriado dorsal (Figuras 11 e 12). A enzima TH é responsável pela conversão da L-DOPA em dopamina, exercendo uma função essencial na síntese de dopamina. A marcação de TH tem sido muito utilizada como um meio

indireto para estimar os níveis de dopamina no cérebro de roedores e investigar o dano neuronal em modelos animais de DP (LEÃO et al., 2015; SANTOS et al., 2013).

A degeneração dos neurônios da SNpc e a resultante depleção de dopamina no estriado têm sido associados com os sintomas motores presentes na DP. Vários estudos têm sugerido que o estresse oxidativo exerce uma importante função na neurodegeneração e fisiopatologia da DP, indicando que agentes antioxidantes podem ser uma alternativa para a prevenção ou tratamento da DP (HWANG, 2013; KOPPULA et al., 2012; SOFIC et al., 1992; UTTARA et al., 2009).

A RES é capaz de induzir estresse oxidativo no cérebro de roedores (ABÍLIO et al., 2003; BURGER et al., 2003; FERNANDES et al., 2012; SPINA; COHEN, 1989), resultando em dano neuronal e diminuição da marcação de TH na SNpc e estriado dorsal (LEÃO et al., 2015; SANTOS et al., 2013). Os resultados do experimento I, demonstraram que a administração repetida de uma dose baixa de RES induziu uma redução significativa da marcação de TH na SNpc e estriado dorsal e que o tratamento com CA na dose de 25 mg/kg teve um efeito neuroprotetor, prevenindo esta redução. É possível que este efeito possa estar relacionado a capacidade do CA de combater o estresse oxidativo induzido pela RES, porém mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese, uma vez que não avaliamos parâmetros de estresse oxidativo no presente estudo.

Até o momento, não existe relatos na literatura que o modelo de DP induzido pela RES utilizado no presente estudo é capaz de causar a degeneração de neurônios dopaminérgicos, característica da DP. Desta forma, realizamos o experimento II com o objetivo de avaliar o possível efeito neuroprotetor do pré e pós-tratamento com CA em ratos submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA, uma neurotoxina com capacidade reconhecida de causar degeneração de neurônios dopaminérgicos (KOSTRZEWA; JACOBOWITZ, 1974; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007; UNGERSTEDT, 1968).

A 6-OHDA é um análogo estrutural da dopamina e noradrenalina que é captado pelos transportadores DAT ou NAT. Uma vez dentro dos neurônios, a 6-OHDA desencadeia uma cascata de eventos que resulta em aumento do estresse oxidativo e anormalidades em toda a estrutura celular e metabolismo, resultando em dano neuronal e consequente degeneração dos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014; TIEU, 2011).

Em geral, os modelos de DP induzidos pela injeção de 6-OHDA mimetizam a doença humana com relação a parâmetros comportamentais e neuroquímicos, e têm sido utilizados para

investigar mecanismos fisiopatológicos da DP, bem como para buscar novas estratégias terapêuticas com efeitos neuroprotetores (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008).

No experimento II, nós utilizamos o modelo de DP induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA dentro do MFB. Neste modelo, as alterações motoras e neuroquímicas geralmente aparecem três semanas após a injeção de 6-OHDA (CARVALHO et al., 2013; DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015; YUAN et al., 2005). Desta forma, todos os testes comportamentais foram realizados considerando este período após a injeção de 6-OHDA.

Nossos resultados demonstraram que a injeção de 6-OHDA induziu uma redução da atividade locomotora no campo aberto, considerando que os animais do grupo VC+6-OHDA apresentaram uma redução significativa da distância total percorrida e do número de rearing quando comparados ao grupo controle (grupo VC+SHAM). O CA na dose de 50 mg/kg foi capaz de prevenir estas alterações, uma vez que os animais do grupo CA50+6-OHDA não demonstraram diferença significativa nos parâmetros avaliados quando comparados ao grupo controle (Figura 14).

O campo aberto é um dos testes mais utilizados para mensurar a atividade locomotora espontânea em roedores. Diferentes formas e tamanhos de campo aberto podem ser utilizados para atingir este objetivo (WALSH; CUMMINS, 1976). No presente estudo, dois tipos diferentes de campo aberto foram utilizados no experimento I e II, uma arena circular e uma quadrada, respectivamente. No experimento I, observamos que o CA não foi capaz de prevenir a redução da atividade locomotora induzida pela RES, diferentemente do seu efeito no experimento II, no qual foi capaz de prevenir a alteração induzida pela 6-OHDA. O uso de diferentes formas e tamanhos do campo aberto, diferentes linhagens de ratos, bem como os mecanismos de ação distintos das toxinas utilizadas nos experimentos, poderiam explicar os efeitos distintos do CA neste teste.

O teste do cilindro é um dos testes comportamentais mais utilizados para identificar lesão unilateral do MFB induzida pela 6-OHDA em roedores. Este teste é baseado no comportamento inato do animal de explorar o ambiente novo através do comportamento de rearing, no qual o animal toca as paredes do cilindro com as patas anteriores (SCHALLERT et al., 2000; TILLERSON et al., 2001). Animais com lesão no MFB apresentam uma redução do uso da pata anterior contralateral à lesão, caracterizando uma assimetria motora (BOIX; PADEL; PAUL, 2015; YUAN et al., 2005). A porcentagem do uso da pata anterior contralateral à lesão está

correlacionada negativamente com o dano neuronal dopaminérgico na SNpc causado pela injeção unilateral de 6-OHDA no MFB (DECRESSAC; MATTSSON; BJÖRKLUND, 2012) sugerindo que compostos capazes de reduzir a assimetria motora no teste do cilindro podem também reduzir a degeneração neuronal na SNpc. Desta forma, este parâmetro comportamental pode ser utilizado para investigar o efeito neuroprotetor de novas abordagens terapêuticas em modelos de DP (BJÖRKLUND et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que o grupo VC+6-OHDA apresentou uma redução significativa na porcentagem de uso da pata anterior esquerda (contralateral ao lado da injeção de 6-OHDA), o que não foi observado no grupo CA50+6-OHDA, indicando que o CA na dose de 50 mg/kg reduziu a assimetria motora causada pela injeção de 6-OHDA, sugerindo um efeito protetor (Figura 15).

O teste do rotarod é também bastante utilizado para avaliar os déficits comportamentais e o grau da lesão induzidos pela 6-OHDA em modelos animais de DP, e tem se mostrado uma ferramenta útil para investigar a eficácia de novas drogas para o tratamento da DP (ROZAS; GARCIA, 1997). Este teste é utilizado para avaliar a coordenação motora e o equilíbrio de roedores quando os mesmos são colocados sobre um eixo de rotação com um protocolo de frequência fixa ou de aceleração. No presente estudo, utilizamos um protocolo de aceleração, de 4rpm a 40rpm, que tem demonstrado ser eficaz para identificar ratos lesionados após a injeção unilateral no MFB (MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006). Animais com lesão tendem a apresentar uma dificuldade de permanecer sobre o aparato a medida que a frequência do eixo de rotação aumenta, e, desta forma, eles apresentam uma latência menor para a queda comparado aos animais controles sem lesão. Esta dificuldade apresentada pelos animais lesionados tem sido comparada a instabilidade postural apresentada por pacientes com DP quando os mesmos são estimulados a realizarem movimentos mais rápidos (ROZAS; GARCIA, 1997). Nossos resultados demonstraram que os animais do grupo VC+6-OHDA apresentaram um menor período de tempo sobre o eixo de rotação do rotarod comparados aos outros grupos, enquanto que os animais tratados com CA (grupos CA50+6-OHDA e CA100+6-OHDA) apresentaram um período de tempo similar ao grupo controle (grupo VC+SHAM), sugerindo que o tratamento com o CA foi capaz de proteger os animais da alteração induzida pela 6-OHDA (Figura 16).

Estudos prévios demonstraram que o tempo de permanência do animal sobre o eixo de rotação do rotarod é correlacionado negativamente com a perda de células TH+ na SNpc, semelhante ao que ocorre no teste do cilindro (BOIX et al., 2015; DECRESSAC; MATTSSON;

BJÖRKLUND, 2012; IANCU et al., 2005; MONVILLE; TORRES; DUNNETT, 2006). Sendo assim, nós utilizamos a técnica de imunofluorescência para quantificar as células TH<sup>+</sup> e observamos que os animais do grupo VC+6-OHDA apresentaram uma redução significativa das células TH<sup>+</sup> na SNpc, enquanto que o tratamento com o CA, em ambas as doses, foi capaz de atenuar a redução da marcação induzida pela 6-OHDA. Desta forma, o efeito protetor do CA nos testes do cilindro e no rotarod poderia estar associado à sua capacidade de reduzir o dano neuronal das células dopaminérgicas da SNpc (Figura 18).

A injeção de 6-OHDA também promoveu uma redução significativa da DOR para TH no estriado dorsal. O tratamento com CA na dose de 50 mg/kg propiciou uma atenuação do dano causado pela 6-OHDA, uma vez que os animais do grupo CA50+6-OHDA apresentaram um valor de DOR maior comparados aos animais do grupo VC+6-OHDA. Os animais que receberam o CA na dose de 100 mg/kg apresentaram uma tendência de aumento da DOR, porém nenhuma diferença significativa foi observada quando comparados ao grupo VC+6-OHDA (Figura 20).

O dano neuronal induzido pela 6-OHDA é principalmente associado ao aumento do estresse oxidativo, o qual tem sido associado a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (AFSHIN-MAJD et al., 2015; CHATTOPADHYAYA et al., 2015; REZAEI; ALIREZAEI, 2014). Desta forma, a injeção de 6-OHDA na via nigroestriatal tem sido utilizada para avaliar o efeito neuroprotetor de compostos antioxidantes em modelos animais de DP (BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; CHATTOPADHYAYA et al., 2015; HRITCU et al., 2011).

Um estudo prévio demonstrou um efeito antioxidante do CA em ratos submetidos a um modelo de DP induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA no estriado. Neste estudo, os animais receberam injeções i.p. diárias de CA por três dias antes da injeção de 6-OHDA e duas semanas após a cirurgia foram avaliados no teste de rotação induzida pela apomorfina. O tratamento com CA causou uma redução do número de rotações induzidas pela apomorfina e uma atenuação da peroxidação lipídica e dos níveis de nitrito no mesencéfalo dos ratos, indicando que o efeito benéfico do CA observado no teste comportamental poderia estar relacionado com sua atividade antioxidante (BALUCHNEJADMOJARAD; HASSANSHAH; ROGHANI, 2014). Desta forma, o efeito antioxidante do CA pode estar envolvido com o efeito protetor do CA observado no presente estudo.

Além do estresse oxidativo, um processo de neuroinflamação, caracterizado por uma microglia reativa e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, também tem sido observado após a injeção de 6-OHDA na via nigroestriatal em roedores (JOERS et al., 2016; MARINOVA-MUTAFCHIEVA et al., 2009; SILVA et al., 2016). A injeção de 6-OHDA no estriado (MACHADO-FILHO et al., 2014) e no MFB (HAAS et al., 2016) aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias e reduziu a imunoreatividade da TH no estriado e substância negra do lado lesionado, sugerindo que o processo inflamatório induzido pela 6-OHDA é um dos mecanismos responsáveis pela neurodegeneração causada por esta toxina. Considerando que o CA é capaz de reduzir ou prevenir o aumento de citocinas pró-inflamatórias no SNC após diferentes estímulos (DENG; LU; TENG, 2013; LI et al., 2016), é possível que o CA tenha reduzido o processo inflamatório induzido pela injeção de 6-OHDA, o que pode ter contribuído para a neuroproteção observada nos animais lesionados e tratados com CA. Sendo assim, o efeito do CA sobre a marcação de TH na SNpc e estriado dorsal observado no presente estudo (Figuras 18 e 20) poderia estar associado a sua capacidade de prevenir a degeneração neuronal através de sua atividade antioxidante e/ou anti-inflamatória. Porém mais estudos são necessários para investigar marcadores de estresse oxidativo e inflamação em ratos tratados com o CA e submetidos ao modelo de DP induzido pela 6-OHDA.

Ratos com lesões unilaterais do sistema nigroestriatal apresentam um comportamento estereotipado de rotação que tem sido associado a um desequilíbrio neuroquímico, especialmente dos níveis de dopamina, entre os sistemas nigroestriatal do lado ipsilateral e contralateral à lesão. Este comportamento rotacional pode ser potencializado por agonistas dopaminérgicos, tais como a anfetamina (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). A resposta rotacional induzida pela administração de anfetamina é um teste comportamental bastante utilizado para identificar a lesão induzida pela 6-OHDA em modelos animais de DP (BAGGA; DUNNETT; FRICKER, 2015; BOIX; PADEL; PAUL, 2015; TRONCI et al., 2012).

A anfetamina é um agonista indireto dopaminérgico que aumenta os níveis de dopamina extracelular. O efeito rotacional induzido por anfetamina está relacionado a sua capacidade de estimular o sistema nigroestriatal intacto a liberar dopamina, o que intensifica a assimetria dopaminérgica entre os lados contra e ipsilateral à lesão. Desta forma, os animais tendem a apresentar rotações para o lado ipsilateral à lesão (CALIPARI; FERRIS, 2013; JERUSSI; GLICK, 1974; UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970).

Ratos submetidos ao modelo de DP induzido pela injeção unilateral de 6-OHDA no MFB apresentam um aumento do número de rotações ipsilaterais ao lado da injeção após a administração de anfetamina (DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015; TORRES et al., 2011). No presente estudo, observamos que o grupo VC+6-OHDA apresentou um aumento do número de rotações induzidas por anfetamina comparado ao grupo controle (grupo VC+SHAM), corroborando resultados de estudos prévios que utilizaram o mesmo modelo de DP (DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015; TRONCI et al., 2012).

Compostos capazes de reduzir a degeneração de células TH+ na SNpc induzida pela 6-OHDA demonstram capacidade de diminuir o número de rotações induzidas por anfetamina, possivelmente pelo fato de que ao preservar os neurônios dopaminérgicos, estes compostos também reduzem a assimetria dopaminérgica associada ao comportamento rotacional (DE JESÚS-CORTÉS et al., 2015). No presente estudo, o CA na dose de 50 mg/kg foi capaz de atenuar a depleção de células TH+ na SNpc induzida pela 6-OHDA, o que nos permite inferir que o CA também seria capaz de reduzir o número de rotações induzidas por anfetamina. Porém, ao contrário do esperado, nossos resultados demonstraram que os animais do grupo CA50+6-OHDA apresentaram um número maior de rotações induzidas por anfetamina quando comparados ao grupo controle (grupo VC+SHAM) (Figura 17). Este efeito poderia ser explicado pela capacidade do CA de aumentar a liberação de dopamina pelo sistema nigroestriatal intacto e desta forma, potencializar a assimetria dopaminérgica induzida pela 6-OHDA entre os lados ipsilateral e contralateral à lesão. Embora nenhum experimento capaz de comprovar esta hipótese tenha sido realizado no presente estudo, resultados de estudos prévios indicaram que o CA é capaz de modular os níveis de monoaminas no SNC (MECHAN et al., 2011; TRABACE et al., 2011; ZOTTI et al., 2013).

Evidência indireta da capacidade do CA de modular os níveis de monoaminas foi demonstrado em um estudo *in vitro*, o qual revelou que a administração aguda do extrato de orégano, que tem o CA como seu principal constituinte, causou uma redução da recaptação e degradação de monoaminas. Este efeito foi associado a ação do CA sobre o SNC, uma vez que níveis detectáveis de CA foram observados no cérebro de camundongos tratados agudamente com o extrato, indicando que o CA é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e atuar como agente modulador. Além disso, a adição do CA ao extrato potencializou a inibição da recaptação de serotonina, demonstrando a influência do CA no processo de inibição de

recaptação de monoaminas (MECHAN et al., 2011). Uma evidência direta da capacidade do CA modular os níveis de dopamina no SNC foi demonstrada em um estudo com ratos, que revelou que administração aguda ou subcrônica de CA causou um aumento significativo dos níveis de dopamina no córtex pré-frontal de ratos (ZOTTI et al., 2013). Em conjunto, esses resultados poderiam explicar o efeito do CA no teste de rotação induzida por anfetamina, porém mais estudos são necessários para estabelecer o potencial do CA de aumentar os níveis de dopamina no sistema nigroestriatal.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem um efeito neuroprotetor do CA sobre as alterações motoras e imunohistoquímicas de ratos submetidos a dois modelos animais de DP induzidos pela RES e 6-OHDA. Portanto, o CA parece ser um agente farmacológico promissor e que pode ser considerado um candidato com potencial terapêutico para pacientes com DP. No entanto, futuros experimentos são necessários para elucidar os mecanismos de ação do CA envolvidos no seu efeito protetor, como também para estabelecer seu potencial tóxico.

## **8 PERSPECTIVAS**

Com base em nossos resultados, pretendemos investigar os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito neuroprotetor do CA observado nos dois modelos animais de DP utilizados no presente estudo. Para isto, pretendemos avaliar parâmetros de estresse oxidativo e inflamação em ratos submetidos aos modelos descritos e o efeito do CA sobre os mesmos. Além disso, objetivamos investigar se a administração de CA é capaz de aumentar os níveis de monoaminas, principalmente dopamina, no sistema nigroestriatal destes animais. Estudos futuros para avaliar a farmacocinética e toxicidade do CA também são considerados, bem como a avaliação do efeito do tratamento do CA associado a L-DOPA, droga primária utilizada no tratamento da DP. Com isto, objetivamos aprofundar o conhecimento sobre o potencial neuroprotetor do CA em modelos animais da DP, bem como adicionar evidências científicas do potencial terapêutico deste monoterpeno, as quais podem ser de relevância para o estudo da DP.

## REFERÊNCIAS

- AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7672–7690, 2011.
- ABÍLIO, V. C. et al. Vitamin E attenuates reserpine-induced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, n. 1, p. 109–114, 2003.
- ABÍLIO, V. C. et al. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 2, p. 263–272, 2004.
- AFSHIN-MAJD, S. et al. Carnosine Exerts Neuroprotective Effect Against 6-Hydroxydopamine Toxicity in Hemiparkinsonian Rat. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 3, p. 1064–1070, 2015.
- ALCALY, R. N. Cytokines as Potential Biomarkers of Parkinson Disease. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 11, p. 1282–1284, 2016.
- ANDREASSEN, O. A.; JORGENSEN, H. A. Neurotoxicity associated with neuroleptic-induced oral dyskinesias in rats: Implications for tardive dyskinesia? **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 5, p. 525–541, 2000.
- BAGGA, V.; DUNNETT, S. B.; FRICKER, R. A. The 6-OHDA mouse model of Parkinson ' s disease – Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. **Behavioural Brain Research**, v. 288, p. 107–117, 2015.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. v. 46, p. 446–475, 2008.
- BALUCHNEJADMOJARAD, T.; HASSANSHAHI, J.; ROGHANI, M. Protective Effect of Carvacrol in 6-hydroxydopamine Hemi-parkinsonian Rat Model. v. 2, n. 2, p. 29–34, 2014.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BASER, K. H. C. Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. **Current pharmaceutical design**, v. 14, n. 29, p. 3106–3119, 2008.
- BERTLER, A. Effect of Reserpine on the Storage of Catechol Amines in Brain and Other Tissues. **Acts physiol.** **8C-d. 1961.**, n. 1 956, p. 75–83, 1961.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016.
- BJORKLUND, T. et al. Optimized adeno-associated viral vector-mediated striatal DOPA

delivery restores sensorimotor function and prevents dyskinesias in a model of advanced Parkinson's disease. **Brain**, v. 133, p. 496–511, 2010.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model : News from the past. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 14, p. 124–129, 2008.

BLESA, J. et al. Classic and new animal models of Parkinson's disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

BLESA, J. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. July, p. 1–9, 2015.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease : animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n 155, p. 1–12, 2014.

BOIX, J.; PADEL, T.; PAUL, G. A partial lesion model of Parkinson's disease in mice - Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. **Behavioural Brain Research**, v. 284, p. 196–206, 2015.

BOSKABADY, M. H.; JAFARI, Z.; POURABOLI, I. The effect of carvedilol on muscarinic receptors of guinea-pig tracheal chains. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 4, p. 530–535, 2011.

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, 2004.

BRIEN, B. J. A. O. et al. Economic Burden Associated With Parkinson Disease. **Psychiatry Times**, p. 1–10, 2009.

BURGER, M. E. et al. Ebselen attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 27, p. 135–140, 2003.

CALABRESI, P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1022–1030, 2014.

CALIPARI, E. S.; FERRIS, M. J. Amphetamine Mechanisms and Actions at the Dopamine Terminal Revisited. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 21, p. 8923–8925, 2013.

CALVENTE, P. R. V et al. The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid aggravates reserpine-induced oral dyskinesia in rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, n. 2, p. 401–405, 2002.

CAMPOS, F. L. et al. Rodent models of Parkinson ' s disease : beyond the motor symptomatology. **Frontiers in Behavioral Neuroscienc**, v. 7, n. November, p. 1–11, 2013.

CARVALHO, M. M. et al. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of

Parkinson ' s disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular Neurodegeneration**, v. 8, n. 14, p. 1–11, 2013.

CELIK, F. et al. Neuroprotective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-. p. 2988–2993, 2013.

CHAIMOWICZ, F. **Saúde do Idoso**. 2ed. Belo Horizonte: NESCON, UFMG, 2013. 169p.

CHATTOPADHYAYA, I. et al. Neuroprotective effect of Spirulina fusiform and amantadine in the 6-OHDA induced Parkinsonism in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 296, p. 1–11, 2015.

CHATURVEDI, R. K. et al. Neuroprotective and neurorescue effect of black tea extract in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 22, n. 2, p. 421–434, 2006.

COCCIMIGLIO, J. et al. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

COLPAERT, F. C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. **Neuropharmacology**, v. 26, n. 9, p. 1431–1440, 1987.

COSTALL, B.; NAYLOR, R. J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. **Psychopharmacologia**, v. 34, n. 3, p. 233–241, 1974.

CRĂCIUN, E. C.; DRONCA, E.; LEACH, N. V. Antioxidant enzymes activity in subjects with Parkinson ' s disease under L-DOPA therapy. **Human & Veterinary Medicine - International Journal of the Bioflux Society**, v. 8, n. 2, p. 124–127, 2016.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DE JESÚS-CORTÉS, H. et al. Protective efficacy of P7C3-S243 in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 1, n. April, p. 15010, 2015.

DE VINCENZI, M. et al. Constituents of aromatic plants: Carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7–8, p. 801–804, 2004.

DECRESSAC, M.; MATTSSON, B.; BJÖRKLUND, A. Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and  $\alpha$ -synuclein rat models of Parkinson  $\hat{\text{a}}^{\text{TM}}$  s disease. **Experimental Neurology**, v. 235, n. 1, p. 306–315, 2012.

DENG, W.; LU, H.; TENG, J. Carvacrol attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 813–819, 2013.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an

evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental neurology**, v. 175, n. 2, p. 303–317, 2002.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132–144, 2013.

DONALDSON, I. James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. **J R Coll Physicians Edinb** **2015**; v. 45, p. 84–86, 2015.

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

FAHN, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 4–18, 2015.

FARIA, R. R. et al. Beneficial effects of vitamin C and vitamin E on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: Critical role of striatal catalase activity. **Neuropharmacology**, v. 48, n. 7, p. 993–1001, 2005.

FERNANDES, V. S. et al. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 154–163, 2012.

FILIPPIN, N. T. et al. Qualidade de vida de sujeitos com doença de Parkinson e seus cuidadores. **Fisioterapia em Movimento**, v. 27, n. 1, p. 57–66, 2014.

FINN, M. et al. Involvement of pallidal and nigral gaba mechanisms in the generation of tremulous jaw movements in rats. **Neuroscience**, v. 80, n. 2, p. 535–544, 1997.

GALVAN, A.; DEVERGNAS, A.; WICHMANN, T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. February, p. 5, 2015.

GEED, M. et al. Silibinin pretreatment attenuates biochemical and behavioral changes induced by intrastriatal MPP+ injection in rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 117, p. 92–103, 2014.

GOETZ, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1–16, 2011.

GOLDSTEIN, J. M.; BARNETT, A.; MALICK, J. B. The evaluation of anti-parkinson drugs on reserpine-induced rigidity in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 183–188, 1975.

GOPALAKRISHNA, A.; ALEXANDER, S. A. Understanding Parkinson Disease: a complex and multifaceted disease. **Journal of Neuroscience Nursing**, v. 47, n. 6, p. 320–326, 2015.

GUIMARÃES, A. G. et al. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949–957, 2010.

GUIMARÃES, A. G. et al. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study. **Life Sciences**, v. 116, n. 1, p. 8–15, 2014.

HAAS, S. J.-P. et al. Expression of Tgf $\beta$ 1 and Inflammatory Markers in the 6-hydroxydopamine Mouse Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 9, p. 7, 2016.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; MENDOZA-GARRIDO, M. E.; MARTINEZ-FONG, D. Activation of GSK-3 $\beta$  and Caspase-3 Occurs in Nigral Dopamine Neurons during the Development of Apoptosis Activated by a Striatal Injection of 6-Hydroxydopamine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 1–13, 2013.

HRITCU, L. et al. Neuroprotective effect of the methanolic extract of Hibiscus asper leaves in 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 585–591, 2011.

HWANG, O. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 11–17, 2013.

IANCU, R. et al. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. v. 162, p. 1–10, 2005.

JAGMAG, S. A. et al. Evaluation of models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. JAN, 2016.

JANDA, E. et al. Defective autophagy in Parkinson's disease: Role of oxidative stress. **Molecular Neurobiology**, v. 46, n. 3, p. 639–661, 2012.

JERUSSI, T. P.; GLICK, S. D. Amphetamine-induced rotation in rats without lesions. **Neuropharmacology**, v. 13, p. 283–286, 1974.

JOERS, V. et al. Microglial phenotypes in Parkinson's disease and animal models of the disease. **Progress in Neurobiology**, 2016.

KALIA, L. V; LANG, A. E.; SHULMAN, G. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, p. 896–912, 2015.

KARA, M. et al. Supplemental Carvacrol Can Reduce the Severity of Inflammation by Influencing the Production of Mediators of Inflammation. **Inflammation**, v. 38, n. 3, p. 1020–7, 2014.

KESSLER, A. et al. GABA A receptor modulation by terpenoids from *Sideritis* extracts. **Molecular Nutrition and Food Research**, v 58, n 4, p. 851–862, 2014.

KHURANA, N.; GAJBHIYE, A. Ameliorative effect of *Sida cordifolia* in rotenone induced oxidative stress model of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 39, p. 57–64, 2013.

KOPPULA, S. et al. Recent Advances on the Neuroprotective Potential of Antioxidants in Experimental Models of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 10608–10629, 2012.

KOSTRZEWA, R. M.; JACOBOWITZ, D. M. Pharmacological Actions of 6-Hydroxydopamine. **Pharmacological Reviews**, v. 26, n. 3, p. 199–288, 1974.

KRAVITZ, A. V et al. Regulation of parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of basal ganglia circuitry. **Nature**, v. 466, n. 7306, p. 622–626, 2010.

KREITZER, A. C. Physiology and pharmacology of striatal neurons. **Annual review of neuroscience**, v. 32, p. 127–47, 2009.

LAU, L. M. L. DE; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurology**, v. 5, p. 525–535, 2006.

LE, W.; WU, J.; TANG, Y. Protective Microglia and Their Regulation in Parkinson's Disease. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 9, n. September, p. 89, 2016.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Molecular, neurochemical, and behavioral hallmarks of reserpine as a model for parkinson's disease: New perspectives to a long-standing model. **Brain Pathology**, v. 25, n. 4, p. 377–90, 2015.

LEYDEN, A. F.; POMERANTZ, E.; BOUCHARD, E. F. Pharmaceutical Aspects of Reserpine. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, v. 45, n. 12, p. 771–775, 1956.

LI, Z. et al. Carvacrol Exerts Neuroprotective Effects Via Suppression of the Inflammatory Response in Middle Cerebral Artery Occlusion Rats. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1566–1572, 2016.

LINS, L. C. R. F. et al. Attenuation of motor deficits by hydroethanolic extract of *Poinciana pyramidalis* in Parkinson's disease model. **Boletim Lationamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. No prelo 2017.

MACHADO-FILHO, J. A. et al. Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 116–125, 2014.

MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L. et al. Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: A time course study in a 6-hydroxydopamine

- model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, n. 3, p. 966–975, 2009.
- MAY, R. H.; VOEGELE, G. E. Parkinsonian Reactions Following Chlorpromazine and Reserpine. **AMA Arch Neurol Psychiatry**, v. 75, n. 5, p. 522–524, 1956.
- MCGEER, P.L. et al. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v.38, n.8, p-1285-91, 1988.
- MECHAN, A. O. et al. Monoamine reuptake inhibition and mood-enhancing potential of a specified oregano extract. **The British journal of nutrition**, v. 105, n. 8, p. 1150–1163, 2011.
- MEDEIROS, M. S. et al. Iron and oxidative stress in Parkinson's disease: An observational study of injury biomarkers. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2016.
- MELO, F. H. C. et al. Antidepressant-like effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement of dopaminergic system. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 3, p. 362–367, 2011.
- MELO, F. H. C. et al. Antinociceptive activity of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 12, p. 1722–1729, 2012.
- MELO, F. H. C. et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: Involvement with GABAergic transmission. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 4, p. 437–443, 2010.
- MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. **Metabolism**, v. 64, n. 3, p. S40–S46, 2015.
- MONVILLE, C.; TORRES, E. M.; DUNNETT, S. B. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 158, p. 219–223, 2006.
- NEISEWANDER, J. L.; CASTAÑEDA, E.; DAVIS, D. A. Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: support for a model of tardive dyskinesia. **Psychopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 79–84, 1994.
- OBESO, J. A. et al. Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23, n. S3, p. S548–S559, 2008.
- OBESO, J. A et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010.
- OLANOW, C. W. Levodopa: Effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 37–44, 2015.
- OUCHI, Y. et al. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 2, p. 168–175, 2005.

OVALATH, S.; DEEPA, P. The history of parkinsonism: Descriptions in ancient Indian medical literature. **Movement Disorders**, v. 28, n. 5, p. 566–568, 2013.

PARKER, K. L. et al. Executive dysfunction in Parkinson's disease and timing deficits. **Frontiers in integrative neuroscience**, v. 7, n. OCT, p. 75, 2013.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **SanDiego: Academic Press**, v. 5th ed, 2005.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, J. et al. A Potential Alternative against Neurodegenerative Diseases : Phytodrugs. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-19, 2016.

PETERS, M. et al. Carvacrol Together With TRPC1 Elimination Improve Functional Recovery After Traumatic Brain Injury in Mice. **Journal of Neurotrauma**, v. 29, p. 2831–2834, 2012.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 2014.

PROU, D.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-Induced Models of Parkinson ' s Disease. **NeuroRx**, v. 2, n. 3, p. 484–494, 2005.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Carvacrol, (–)-borneol and citral reduce convulsant activity in rodents. **Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 39, p. 6566–6572, 2010.

QIN, X-Y. et al. Aberrations in peripheral inflammatory cytokine levels in Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. **JAMA Neurology**, v.73, n.11, p- 1316-1324, 2016.

RAPPOLD, P. M.; TIEU, K. Astrocytes and Therapeutics for Parkinson's Disease. **Neurotherapeutics**, v. 7, n. October, p. 413–423, 2010.

REEVE, A.; SIMCOX, E.; TURNBULL, D. Ageing and Parkinson ' s disease : Why is advancing age the biggest risk factor ? **Ageing Research Reviews**, v. 14, p. 19–30, 2014.

REINER, G. N.; LABUCKAS, D. O.; GARCÍA, D. A. Lipophilicity of some GABAergic phenols and related compounds determined by HPLC and partition coefficients in different systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49, n. 3, p. 686–691, 2009.

REZAEI, M.; ALIREZAEI, M. Protective effects of *Althaea officinalis* L. extract in 6-hydroxydopamine-induced hemi-Parkinsonism model: Behavioral, biochemical and histochemical evidence. **Journal of Physiological Sciences**, v. 64, n. 3, p. 171–176, 2014.

RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M. S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **CMAJ**, p. 1–9, 2016.

ROCHA, N. P.; DE MIRANDA, A. S.; TEIXEIRA, A. L. Insights into Neuroinflammation in

Parkinson's Disease: From Biomarkers to Anti-Inflammatory Based Therapies. **BioMed research international**, v. 2015, p. 628192, 2015.

ROZAS, G.; GARCIA, J. L. L. Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod test. **Brain Research**, v. 749, p. 188–199, 1997.

SAIJO, K. et al. A Nurr1/CoREST transexpression pathway attenuates neurotoxic inflammation in activated microglia and astrocytes. **Cell**, v. 137, n. 1, p. 47–59, 2009.

SALAMONE, J.; BASKIN, P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: Possible model of parkinsonian tremor. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 1, p. 179–183, 1996.

SALAMONE, J. D. et al. Tremulous jaw movements in rats: A model of parkinsonian tremor. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 6, p. 591–611, 1998.

SAMARGHANDIAN, S. et al. Protective Effects of Carvacrol against Oxidative Stress Induced by Chronic Stress in Rat's Brain, Liver, and Kidney. **Biochemistry research international**, v. 2016, p. 2645237, 2016.

SANBERG, P. R. et al. The catalepsy test: its ups and downs. **Behavioral neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748–759, 1988.

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

SARMENTO SILVA, A. J. et al. Alpha-Tocopherol Counteracts Cognitive and Motor Deficits Induced by Repeated Treatment with Reserpine. **Biochemistry & Pharmacology: Open Access**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2015.

SARRE, S. et al. In vivo characterization of somatodendritic dopamine release in the substantia nigra of 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, p. 29–39, 2004.

SCHALLERT, T. et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 777–787, 2000.

SCHAPIRA, A. H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, n. 6, p. 1049–1055, 2011.

SHAHPIRI, Z. et al. Phytochemicals as future drugs for Parkinson's disease: A comprehensive review. **Reviews in the Neurosciences**, v. 27, n. 6, p. 651–668, 2016.

SILVA, T. P. DA et al. Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Neuroscience Letters**, v. 622, p. 83–87, 2016.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 11, n. 3–4, p. 151–167, 2007.

SOFIC, E. et al. Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 142, n. 2, p. 128–130, 1992.

SONG, J. X. et al. Anti-Parkinsonian drug discovery from herbal medicines: What have we got from neurotoxic models? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 698–711, 2012.

SOUZA, C. F. M. et al. A Doença de Parkinson e o processo de envelhecimento motor: Uma revisão de literatura. **Revista Neurociencias**, v. 19, n. 4, p. 718–723, 2011.

SPINA, M. B.; COHEN, G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 4, p. 1398–400, 1989.

STAYTE, S.; VISSEL, B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 8, n. 8 MAY, p. 1–29, 2014.

SUNTRES, Z. E.; COCCIMIGLIO, J.; ALIPOUR, M. The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. v. 318, p. 304–318, 2015.

TAGLIAFERRO, P.; BURKE, R. E. Retrograde Axonal Degeneration in Parkinson Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2016.

TAKAHASHI, K. et al. Quality of life in people with Parkinson's disease: the relevance of social relationships and communication. **Journal of physical therapy science**, v. 28, n. 2, p. 541–6, 2016.

TIEU, K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson ' s Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1–20, 2011.

TILLERSON, J. L. et al. Forced Limb-Use Effects on the Behavioral and Neurochemical Effects of 6-Hydroxydopamine. **The Journal of nutrition**, v. 21, n. 12, p. 4427–4435, 2001.

TORRES, E. M. et al. Increased efficacy of the 6-hydroxydopamine lesion of the median forebrain bundle in small rats , by modification of the stereotaxic coordinates. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 200, n. 1, p. 29–35, 2011.

TRONCI, E. et al. Amphetamine-induced rotation and 1 -DOPA-induced dyskinesia in the rat 6-OHDA model : A correlation study. **Neuroscience Research**, v. 73, n. 2, p. 168–172, 2012.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Europena Jorunal of Pharmacology**, v. 5, p. 107–110, 1968.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in

rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Research**, v. 24, p. 485–493, 1970.

UTTARA, B. et al. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65–74, 2009.

WAKABAYASHI, K. et al. The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 47, p. 495–508, 2013.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field. **Psychological Bulletin**, v. 83, p. 482–504, 1976.

WANG, M. et al. (–) Epigallocatechin-3-gallate attenuates reserpine-induced orofacial dyskinesia and oxidative stress in rat striatum. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 131, p. 71–76, 2015.

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. **Translational neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 19, 2015.

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European journal of epidemiology**, v. 26 Suppl 1, p. S1–S58, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neurological Disorders: Public Health Challenges**. Geneva: World Health Organization, 2006.

WU, T. et al. Basal ganglia circuits changes in Parkinson's disease patients. **Neuroscience Letters**, v. 524, n. 1, p. 55–59, 2012.

YU, H. et al. Carvacrol, a food-additive, provides neuroprotection on focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 3–10, 2012.

YUAN, H. et al. Histological, behavioural and neurochemical evaluation of medial forebrain bundle and striatal 6-OHDA lesions as rat models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 144, n. 1, p. 35–45, 2005.

ZOTTI, M. et al. Carvacrol: From ancient flavoring to neuromodulatory agent. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6161–6172, 2013.

## ANEXO A- Artigos publicados durante o período do doutorado



## Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease

Pollyana C. Leal<sup>1</sup>, Livia C. R. F. Lins<sup>1</sup>, Aulerlan M. de Gois<sup>1</sup>, Murilo Marchioro<sup>1</sup> and José R. Santos<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil, <sup>2</sup>Behavioral and Evolutionary Neurobiology Laboratory, Department of Biosciences, Federal University of Sergipe, Itabasilina, Brazil

**Keywords:** MPTP, 6-OHDA, reserpine, serotonin, neurodegeneration, Parkinson disease

### A commentary on

#### Evaluation of Models of Parkinson's Disease

by Jagmag, S. A., Tripathi, N., Shukla, S. D., Maiti, S., and Khurana, S. (2016). *Front. Neurosci.* 9:503. doi: 10.3389/fnins.2015.00503

In the recently published review article by Jagmag et al. (2016), some currently available neurotoxin based and genetic models of Parkinson's disease (PD) were described, highlighting the advantages and disadvantages of preclinical models use to knowledge of PD. The aim of this commentary is to shed light and to make a reflection on some fundamental issues involving the pathophysiology of PD and additionally bring to the discussion the animal model of PD based on the administration of reserpine (RES).

The pathological hallmark of PD involves the progressive loss of neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) (Politis and Niccolini, 2015). However, a large body of evidences implies that the PD pathology is a multisystemic degenerative process that involves other neurotransmitters such as serotonin (5-HT) and norepinephrine (NE) (Deusser et al., 2015; Liu et al., 2015; Politis and Niccolini, 2015). It has been demonstrated that the serotonergic system may be the most critical neurochemical system involved in the pathology of PD, after the dopaminergic system (Huot and Fox, 2013; Liguori et al., 2015). Changes in serotonin levels may be a contributing factor to PD symptomatology, in particular, non-motor disturbances (Loane et al., 2013). Patients with PD show loss of serotonergic neurons in the brainstem raphe nuclei (Braak et al., 2003) and reduced expression of tryptophan hydroxylase type 2 (TPH2) in the median raphe nucleus (MnR) (Kovacs et al., 2003). According to Braak staging of PD pathology, serotonergic cell loss in the raphe nuclei is evident prior to nigrostriatal dopaminergic degeneration. Interestingly, the pattern of serotonergic loss also seems to be different from that observed in the dopaminergic system (Politis and Loane, 2011). Additionally, other neuronal systems, including noradrenergic locus coeruleus, are also affected in PD (see review in Jellinger, 1999) and they have been linked to non-motor symptoms of PD as well. Thereby, these evidences of alterations in the raphe nuclei and catecholaminergic nuclei highlight the importance of looking beyond the nigrostriatal system in the PD study, in order to elucidate the underlying mechanisms of deficits of other neurotransmitter systems in the physiopathology of PD and provide useful information for the development of therapeutic strategies for this disease.

In the paper, Jagmag et al. (2016) highlight toxins widely used as animal models of PD. The toxin 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), active metabolite of MPTP, is taken up into dopaminergic terminals by the dopamine transporter (DAT) showing the high affinity for dopaminergic vesicles (Tipton and Singer, 1993; Dauer and Przedborski, 2003). According Andrew et al. (1993), 6-hydroxydopamine (6-OHDA) is elevated in the urine and striatum of L-DOPA treated PD patients, suggesting that 6-OHDA may be an endogenous neurotoxin. This toxin is

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Mark R. Cookson,  
National Institutes of Health, USA

#### Reviewed by:

Fredric P. Manfredsson,  
Michigan State University, USA  
Juan Saguna-Aguilar,  
University of Chile, Chile

#### \*Correspondence:

José R. Santos  
jsanzonaldosantos@gmail.com

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Neurodegeneration,  
a section of the journal  
*Frontiers in Neuroscience*

Received: 17 April 2016

Accepted: 07 June 2016

Published: 21 June 2016

#### Citation:

Leal PC, Lins LCRF, de Gois AM,  
Marchioro M and Santos JR (2016)  
Commentary: Evaluation of Models of  
Parkinson's Disease.  
*Front. Neurosci.* 10:283.  
doi: 10.3389/fnins.2016.00283



© 2017

Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 16 (2): 150 - 161

ISSN 0717 7917

[www.blacpma.usach.cl](http://www.blacpma.usach.cl)

Artículo Original | Original Article

## Attenuation of motor deficits by hydroethanolic extract of *Poincianella pyramidalis* in a Parkinson's disease model

[Atenuación de deficiencias motoras por el extracto hidroalcohólico de *Poincianella pyramidalis* en un modelo de la enfermedad de Parkinson]

Livia Cristina R. F. Lins<sup>1</sup>, Marina F. Souza<sup>1</sup>, Rachel R. Cintra<sup>1</sup>, Katty Anne A. L. Medeiros<sup>1</sup>,  
Matheus Macêdo-Lima<sup>2,3</sup>, Sabrina Z. C. Moraes<sup>1</sup>, Charles S. Stevam<sup>1</sup>, Grace Kelly M. Almeida<sup>1</sup>,  
Sandra L. Santos<sup>1</sup>, Alessandra M. Ribeiro<sup>4</sup>, Regina H. Silva<sup>5</sup>, José Ronaldo dos Santos<sup>6</sup> & Murilo Marchioro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

<sup>2</sup>Neuroscience and Behavior Program, University of Massachusetts Amherst, Amherst, MA 01003, USA

<sup>3</sup>CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, DF 70040-020, Brazil

<sup>4</sup>Department of Biosciences, Universidade Federal de São Paulo, Santos, SP, Brazil

<sup>5</sup>Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>6</sup>Department of Biosciences, Universidade Federal de Sergipe, Itabaiana, SE, Brazil

Contacts | Contacts: José Ronaldo dos SANTOS - E-mail address: [joseronaldosantos@gmail.com](mailto:joseronaldosantos@gmail.com)

**Abstract:** The present study aimed to evaluate the possible neuroprotective effect of the hydroethanolic extract of *Poincianella pyramidalis* (EHPp) (Tul.) L. P. Queiroz (Fabaceae), an endemic plant found in Northeastern Brazil, commonly used in folk medicine, on the motor deficits induced by repeated treatment with reserpine (RES) in rats. Adult male Wistar rats received 10 s.c. injections of 0.1 mg/kg RES or vehicle (VR), every 48 h, and daily i.p. injections daily of HEPp (25 mg/kg) or vehicle (VE). Throughout treatment, catalepsy behavior and oral movements were scored. After behavioral tests, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were evaluated in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum. RES treatment induced a progressive increase of catalepsy time in the treated group compared to control groups starting at day 15. RES also increased the number of vacuous chewing movements, tongue protrusions and duration of facial twitching. Treatment with HEPp attenuated the motor deficit in the catalepsy test and delayed the onset of oral movements induced by RES. No significant changes were observed in the antioxidant assay. Taken together, these results show a beneficial effect of HEPp on motor deficits induced by reserpine, suggesting a neuroprotective effect in a rat model of PD.

**Keywords:** Natural Products; Oxidative stress; Motor symptoms; reserpine; Parkinson's disease.

**Resumen:** El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el posible efecto neuroprotector del extracto hidroalcohólico de *Poincianella pyramidalis* (EHPp) (Tul.) L. P. Queiroz (Fabaceae), en los déficits motores inducidos por el tratamiento repetido con reserpina (RES) en ratas. Ratas Wistar machos adultos recibieron 10 inyecciones (s.c.) de 0,1 mg/kg de RES o vehículo (VR) a cada 48 h, e inyecciones (i.p.) diarias de EHPp (25 mg/kg) o vehículo (VE). Durante todo el tratamiento se observó el comportamiento de la catalepsia y movimientos orales. Después de análisis de comportamientos, fueron evaluados el superóxido dismutasa (SOD) y las actividades de catalasa (CAT) en la corteza prefrontal, el hipocampo y el cuerpo estriado. El tratamiento con EHPp atenuó el déficit motor en el ensayo de catalepsia y el retraso en el comienzo de los movimientos orales inducidos por RES. No se observaron cambios significativos en el ensayo antioxidante. Estos resultados muestran un efecto beneficioso de EHPp en déficits motores inducidos por RES, sugiriendo un efecto neuroprotector en un modelo de enfermedad de Parkinson.

**Palabras clave:** Productos Naturales; Estrés oxidativo; Síntomas motores; Reserpina; Enfermedad de Parkinson.

Recibido | Received: July 14, 2016

Aceptado | Accepted: September 13, 2016

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: September 14, 2016

Publicado en línea | Published online: March 30, 2017

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** The research was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC) and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (POSGRAP/UFS).

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** LCRF Lins, MF Souza, RR Cintra, KAAL Medeiros, M Macêdo-Lima, SZC Moraes, CS Stevam, GKM Almeida, SL Santos, AM Ribeiro, RH Silva, JR Santos, M Marchioro. 2017. Attenuation of motor deficits by hydroethanolic extract of *Poincianella pyramidalis* in a Parkinson's disease model. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 16 (2): 150 - 161.

## ANEXO B- Artigo aceito para publicação



### RNA-interference of human alpha-synuclein in mouse

Young-Cho Kim<sup>1</sup>, Adam Miller<sup>1</sup>, Livia C. Lins<sup>1,4</sup>, Sang-Woo Han<sup>1</sup>, Megan S. Keiser<sup>2</sup>, Ryan L. Boudreau<sup>3</sup>, Beverly L. Davidson<sup>2,3</sup>, Nandakumar Narayanan<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Neurology, University of Iowa, USA, <sup>2</sup>Children's Hospital of Philadelphia, USA, <sup>3</sup>Internal Medicine, University of Iowa, USA, <sup>4</sup>Physiology, Federal University of Sergipe, Brazil, <sup>5</sup>Aging Mind and Brain Initiative, University of Iowa, USA

**Submitted to Journal:**  
Frontiers in Neurology

**Specialty Section:**  
Neurodegeneration

**ISSN:**  
1664-2295

**Article type:**  
Original Research Article

**Received on:**  
10 Oct 2016

**Accepted on:**  
11 Jan 2017

**Provisional PDF published on:**  
11 Jan 2017

**Frontiers website link:**  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

**Citation:**  
Kim Y, Miller A, Lins LC, Han S, Keiser MS, Boudreau RL, Davidson BL and Narayanan N(2017)  
RNA-interference of human alpha-synuclein in mouse. *Front. Neurol.* 8:13.  
doi:10.3389/fneur.2017.00013

**Copyright statement:**  
© 2017 Kim, Miller, Lins, Han, Keiser, Boudreau, Davidson and Narayanan. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## ANEXO C- Comprovante de submissão do artigo para publicação



## Carvacrol Prevents Motor and Neurochemical Impairments in a Model of Progressive Parkinsonism Induced by Reserpine

Livia C. Lins<sup>1</sup>, Mariana F. Souza<sup>1</sup>, José Marcos M. Bitpo<sup>1</sup>, Aulerian M. De Gots<sup>1</sup>, Thays C. Melo<sup>1</sup>, Rayr A. Andrade<sup>2</sup>, Luciano J. Júnior<sup>1</sup>, Alessandra M. Ribetto<sup>3</sup>, Regina H. Silva<sup>4</sup>, José Ronaldo d. Santos<sup>2</sup>, Murilo Marchioro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Federal University of Sergipe, Brazil, <sup>2</sup>Bioquímica, Federal University of Sergipe, Brazil, <sup>3</sup>Bioquímica, Escola Paulista De Medicina, Federal University of São Paulo, Brazil, <sup>4</sup>Department of Pharmacology, Escola Paulista De Medicina, Federal University of São Paulo, Brazil

*Submitted to Journal:*  
Frontiers in Pharmacology

*Specialty Section:*  
Neuropharmacology

*Article type:*  
Original Research Article

*Manuscript ID:*  
252517

*Received on:*  
05 Jan 2017

*Frontiers website link:*  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

## Carta do Orientador do Doutorado Sanduíche (PDSE) - 2015/2016



*Nandakumar Narayanan MD PhD  
Assistant Professor, Neurology  
Aging Mind and Brain Initiative*

*Department of Neurology  
University of Iowa Health Care  
200 Hawkins Drive  
Iowa City, IA 52242  
319-353-5698 Tel  
319-384-7199 Fax*

CAPES, Brazil

September 2016

Dear Sir/Madam,

I worked with Livia Lins for the last year in my laboratory, beginning in the fall of 2015. During her tenure in my laboratory, she learned a variety of behavioral tests, stereotaxic surgery, western blot technique and microdialysis in rat and mouse models of PD. She contributed to at least 2 papers and will continue analysis for at least 1 more paper.

She did an outstanding job in the laboratory both in terms of learning new methodologies and being productive. At a personal level, it was a pleasure for me and members of my laboratory to interact with her.

Sincerely,

  
[nandakumar-narayanan@uiowa.edu](mailto:nandakumar-narayanan@uiowa.edu)  
Assistant Professor, Neurology  
University of Iowa  
319-353-5698