



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

ANDERSON VALENTE AMARAL

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO BETA-
CARIOFILENO EM MODELO MURINO DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA**

Belém – PA

2019

ANDERSON VALENTE AMARAL

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO BETA-CARIOFILENO EM MODELO MURINO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção de título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular. Área de concentração: Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada

Belém – PA
Junho – 2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**

Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A485a Amaral, Anderson Valente
 Avaliação do potencial neuroprotetor do beta-cariofileno em
 modelo murino de doença de Parkinson induzido por
 6-hidroxiopamina / Anderson Valente Amaral. — 2019. 62 f. :
 il. color.

 Orientador(a): Prof^a. Dra. Elizabeth Sumi Yamada Dissertação
 (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
 Neurociências e Biologia celular, Instituto de Ciências Biológicas,
 Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

 1. Doença de Parkinson. 2. Neuroproteção. 3. Beta-
 Cariofileno. 4. 6-hidroxiopamina. I. Título.

CDD 574.0724



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA O MESTRADO



Programa: Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

Área de concentração: Neurociências.

Discente: ANDERSON VALENTE AMARAL.

Tema: "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO BETA-CARIOFILENO EM MODELO MURINO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA".

Data: 17 de junho, às 09h.

Local: Auditório do Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO), Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB).

Após o discente apresentar os resultados do seu estudo e responder às perguntas dos examinadores, a comissão examinadora reuniu-se e resolveu pela sua:

APROVAÇÃO

REPROVAÇÃO

A BANCA EXAMINADORA RECOMENDA APROVAÇÃO COM LODOVIL.

Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Banca Examinadora deu por encerrados os trabalhos e esta ata foi assinada por todos os membros da comissão examinadora.

Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada, UFPA.

(Presidente da banca examinadora e orientadora, sem direito a voto).

Profa. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos, UFPA.

(Membro titular)

Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa, UFPA.

(Membro Titular)

Profa. Dra. Lílian Lund Amado, UFPA.

(Membro suplente)

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio incondicional durante todos os momentos desta jornada.

À Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada pela orientação, confiança e ensinamentos que foram fundamentais à minha formação e que levarei para o resto de minha vida acadêmica.

À Prof. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos pelos momentos de discussões científicas dentro e fora do laboratório.

À Profa. Dra. Lílian Lund Amado e ao Laboratório de Ecotoxicologia pela parceria e colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto pela oportunidade de estágio no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Ao Dr. João Paulo Coimbra que, mesmo em um curto período conosco, proporcionou momentos de intenso aprendizado e contribuiu fortemente para este trabalho.

Aos amigos do LaNEx: Solimar Cardoso, Riky Gomes, Gabriel Santos, Maurício Gomes, Aline Bastos, Clarina Louis, Natália Meira, Leonardo Adson e Rayan Monteiro pelo apoio e por proporcionar um ambiente de trabalho muito mais agradável e pelas discussões científicas, além dos momentos de descontração.

À Hellen Cristina por todo apoio, paciência e companheirismo durante este período.

À minha família da capoeira, em especial meu mestre, Luiz Carlos, que sempre me incentivou e encorajou a seguir em frente em todos os momentos.

À minha família do Ilê, que me acolheu de braços abertos e sempre me deu forças para lutar e acreditar.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, incluindo o corpo docente, coordenação e administração que fomentaram os caminhos necessários à minha formação neurocientífica na Amazônia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“A geração do conhecimento pela vertente da ciência é capaz de mudar o mundo para melhor.”

Luiz Carlos de Lima Silveira

RESUMO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO BETA-CARIOFILENO EM MODELO MURINO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA

A doença de Parkinson (DP) é tradicionalmente classificada como uma desordem motora caracterizada por tremor em repouso, rigidez muscular, instabilidade postural e bradicinesia. Tais sintomas ocorrem em função da perda progressiva de neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra *pars compacta* (SNpc) e consequente diminuição de dopamina no estriado (STR). A busca por alternativas terapêuticas que possam interromper ou retardar o curso temporal de neurodegeneração na DP é essencial para promover uma melhor qualidade de vida aos pacientes. Assim, investigamos se o beta-cariofileno (BCP) possui efeitos neuroprotetores em modelo murino de DP induzido por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Para tal, realizamos testes comportamentais como teste de rotações induzidas por apomorfina e teste de exploração em campo aberto, mensuramos a densidade óptica de fibras estriatais, quantificamos neurônios e micróglias na SNpc por estereologia e avaliamos a capacidade antioxidante total do STR e mesencéfalo. Nossas evidências demonstram que o BCP: reduziu o grau de neurodegeneração induzido por 6-OHDA, melhorou o desempenho motor, protegeu fibras estriatais e neurônios dopaminérgicos, além de diminuir a ativação microglial na SNpc. Entretanto, não alterou a capacidade antioxidante total no STR e mesencéfalo. Dessa forma, o BCP demonstrou um potencial efeito neuroprotetor no modelo de DP induzido por 6-OHDA, que merece ser melhor caracterizado para futuras aplicações translacionais.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; Neuroproteção; Beta-Cariofileno; 6-hidroxi-dopamina.

ABSTRACT

EVALUATION OF BETA-CARYOPHYLLENE NEUROPROTECTIVE POTENTIAL IN THE 6-HYDROXYDOPAMINE MURINE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Parkinson's disease (PD) is classified as a motor disturbance characterized by resting tremor, muscular rigidity, postural instability and bradykinesia. These symptoms are caused by progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra *pars compacta* (SNpc) and consequently depletion of dopamine on striatum (STR). The search for new therapeutical approaches that may delay or interrupt the neurodegeneration in PD is essential to promote a better quality of life for patients. Thus, we investigated whether beta-caryophyllene (BCP) has neuroprotective effects in the 6-OHDA murine model of PD. Then, we performed behavioral tests such as apomorphine-induced rotations and exploration in the open field, we measured the optical density from STR fibers, quantified neurons and microglia in the SNpc through stereology and evaluated the total antioxidant capacity from STR and midbrain. Our evidence demonstrates that BCP reduced the degree of neurodegeneration induced by 6-OHDA, improved motor performance, protected striatal dopaminergic fibers, protected dopaminergic neurons and reduced microglial activation in the SNpc. But did not alter the antioxidant capacity in the STR and midbrain. Hence, BCP treatment has a potential neuroprotective effect in this mouse model of PD, which deserves to be better characterized for translational application.

Keywords: Parkinson's disease; Neuroprotection; Beta-Caryophyllene; 6-hydroxydopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Secção sagital do encéfalo de camundongo com dupla marcação	12
Figura 2: Ilustração esquemática do delineamento experimental	17
Figura 3: Ilustração esquemática do posicionamento do animal no equipamento estereotáxico	18
Figura 4: Ilustração esquemática do teste de rotações induzidas por apomorfina	20
Figura 5: Ilustração do teste de exploração em campo aberto	21
Figura 6: Interface do software ANY-maze Video Tracking System (<i>Stoeling Co</i> ®)	22
Figura 7: Representação das secções coronais utilizadas para mensuração de densitometria óptica das fibras TH ⁺ do estriado	25
Figura 8: Grau de degeneração da via nigroestriatal após injeção intraestriatal de 6-OHDA	29
Figura 9: Avaliação da atividade exploratória no teste de campo aberto	31
Figura 10: Avaliação de comportamento semelhante ao ansioso através do índice de contraste	32
Figura 11: Análise de densidade óptica dos terminais TH ⁺ no STR	33
Figura 12: Análise sistemática e aleatória do número de neurônios TH ⁺ na SNpc por estereologia	35
Figura 13: Análise sistemática e aleatória do número de micróglias na SNpc por estereologia	37
Figura 14: Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP).....	38
Figura 15: Representação esquemática dos efeitos promovidos pelo BCP através de CB2R	44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Tipos de tampões e variações de cromógenos empregados nas imunomarcações	52
Quadro 2: Sequência de desidratação e diafanização de secções montadas em lâminas gelatinizadas	53
Quadro 3: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do teste de rotações induzidas por apomorfina	53
Quadro 4: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão dos parâmetros avaliados no teste do campo aberto	54
Quadro 5: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do índice de contraste do tempo no teste de campo aberto	54
Quadro 6: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão de densitometria óptica do estriado.....	54
Quadro 7: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do número de neurônios presentes na SNpc.....	55
Quadro 8: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do número de micróglia presentes na SNpc.....	55
Quadro 9: Capacidade antioxidante total do estriado e mesencéfalo.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG - 2-araconilglicerol	iNOS - óxido nítrico sintase induzível
6-OHDA - 6-hidroxidopamina	L-DOPA - 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
ABAP - 2,2'-azobis-2-metilpropionamidina diidrocloreto	LPS - lipopolissacarídeo
ACAP - capacidade antioxidante total	MAO - B - monoamina oxidase B
Acb - núcleo acumbens	MFB - feixe prosencefálico medial
AEA - anandamida	ML - médio - lateral
ANOVA - análise de variância	MPP ⁺ - 1-metil-4-fenilpiridina
AP - anteroposterior	MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
ATP - trifosfato de adenosina	NeuN - núcleo neuronal
BCP - beta - cariofileno	NF-κB - fator nuclear kappa B
BHE - barreira hematoencefálica	OB - bulbo olfatório
CAT - catalase	OT - tubérculo olfatório
CB1R - receptor canabinóide do tipo I	PBS - tampão fosfato salina
CB2R - receptor canabinóide do tipo II	PFA - paraformaldeído
CBD - canabinol	PGL - camada periglomerular
CBN - canabigerol	PPAR - receptores ativados por proliferador de peroxissoma
cc - corpo caloso	ROT - rotenona
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais	RRF - zona retrorubral
COX-2 - ciclooxigenase 2	s.c. - subcutâneo
DAB - 3,3'-diaminobenzidina	SNJ - soro normal de jumento
DAT - transportador de dopamina	SNpc - substância negra pars compacta
DP - doença de Parkinson	STR - estriado
DV - dorsoventral	TH - tirosina hidroxilase
EROs - espécies reativas de oxigênio	THC - Δ-tetraidrocanabidiol
H ₂ O ₂ - peróxido de hidrogênio	TNF-α - fator de necrose tumoral alfa
i.p. - intraperitoneal	VTA - área tegmentar ventral
IL-1β - interleucina 1-beta	ZC - zona central
IL-6 - interleucina 6	ZP - zona periférica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 A DOENÇA DE PARKINSON	7
1.2 MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA DP	7
1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO “PADRÃO-OURO” PARA DP	9
1.5 MODELOS ANIMAIS QUE UTILIZAM TOXINAS	9
1.5.1 MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina).....	10
1.5.2 Rotenona.....	10
1.5.3 6-OHDA (6-hidroxidopamina).....	11
1.6 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E BETA-CARIOFILENO (BCP)	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. ANIMAIS	16
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	16
3.3. CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS	17
3.4. TRATAMENTO COM BCP	18
3.5. TESTES COMPORTAMENTAIS	19
3.5.1. ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA.....	19
3.5.2. EXPLORAÇÃO EM CAMPO ABERTO.....	20
3.6. OBTENÇÃO DE SECCÕES HISTOLÓGICAS.....	23
3.7. IMUNOMARCAÇÕES	23
3.8. DENSIDADE ÓPTICA DE FIBRAS ESTRIATAIS.....	24
3.9. ANÁLISE QUANTITATIVA POR ESTEREOLOGIA	25
3.10. ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DAS CONCENTRAÇÕES INTRACELULARES DE ERO	26
3.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1. ANÁLISE COMPORTAMENTAL	28
4.1.1. TESTE DE ROTAÇÕES INDUZIDAS POR 6-OHDA	28
4.1.2. ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM CAMPO ABERTO	29
4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	33
4.2.1. DENSITOMETRIA DE TERMINAIS TH ⁺ NO ESTRIADO	33

4.2.2.	ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NEURÔNIOS NA SNpc.....	34
4.2.3.	ESTIMATIVA DO NÚMERO DE MICRÓGLIAS NA SNpc.....	36
4.3.	ANÁLISE BIOQUÍMICA	38
4.3.1.	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL CONTRA RADICAIS PEROXIL 38	
5.	DISCUSSÃO	39
6.	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	APÊNDICES	52
	ANEXOS	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 A DOENÇA DE PARKINSON

Dois séculos se passaram desde que James Parkinson descreveu pela primeira vez uma das desordens neurodegenerativas mais comuns e, que compromete, principalmente, o controle do movimento (PARKINSON, 1817). A perda progressiva de neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra *pars compacta* (SNpc) é o principal fator responsável pelo aparecimento de sintomas como tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural, que compreendem a sintomatologia clássica da doença de Parkinson (DP).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, que acomete cerca de 2% da população mundial com idade acima de 70 anos (POEWE *et al.*, 2017). Tradicionalmente classificada como uma desordem do movimento, o diagnóstico ainda é baseado nas características clínicas apresentadas pelo paciente (PRZEDBORSKI, 2017). Contudo, o fenótipo motor não representa a complexidade que é a DP, pois sintomas não motores tais como hiposmia, distúrbios do sono, ansiedade, depressão, demência e outros declínios cognitivos podem aparecer, comprometendo ainda mais a qualidade de vida do paciente. Ademais, precedem por anos ou décadas o surgimento dos primeiros sintomas motores, de modo que são classificados como sintomas pré-motores, evidenciando que a DP é altamente complexa e a sintomatologia motora representa apenas um de seus aspectos (BRAAK *et al.*, 2003; LANGSTON, 2006; AARSLAND *et al.*, 2017; SCHAPIRA *et al.*, 2017).

Os mecanismos subjacentes à neurodegeneração do sistema nigroestriatal ainda possuem lacunas que necessitam de mais investigações quanto ao surgimento e desenvolvimento da DP. Contudo, mecanismos como deposição de α -sinucleína associadas à outras proteínas que formam os corpos de Lewy, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e neuroinflamação são alguns dos fatores comprovadamente envolvidos na fisiopatologia da doença (MICHEL *et al.*, 2016; POEWE *et al.*, 2017), como será tratado adiante.

1.2 MECANISMOS CELULARES ENVOLVIDOS NA DP

Inclusões citoplasmáticas ricas em α -sinucleína e ubiquitina, também denominadas de corpos de Lewy, são encontradas tanto no corpo celular quanto em neuritos de neurônios dopaminérgicos residentes na SNpc e sistema nervoso periférico na DP. Acredita-se que o

acúmulo de espécies de α -sinucleína mal enoveladas possa induzir alterações intracelulares que causam danos à homeostasia neuronal, como alteração no sistema de tráfego de vesículas intracelulares, disfunção mitocondrial, comprometimento dos mecanismos de autofagia, com a contribuição adicional de outros fatores como o envelhecimento, vulnerabilidade neuronal seletiva e ativação microglial (MICHEL *et al.*, 2016; WONG e KRAINIC, 2017; ROCHA *et al.*, 2018).

Nos terminais pré-sinápticos, onde ocorre maior expressão na regulação da liberação de vesículas sinápticas, a presença de espécies tóxicas de α -sinucleína compromete o tráfego de vesículas ao longo do neurônio, assim como reduz a quantidade de vesículas e interfere na liberação de neurotransmissores na fenda sináptica. Além de problemas na sinapse, disfunções do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi também são consequências da toxicidade da α -sinucleína (WONG e KRAINIC, 2017).

Considerando a neuropatologia evidenciada na DP através dos agregados de α -sinucleína, Braak e colaboradores (2003) analisaram histologicamente encéfalos de pacientes diagnosticados com DP e de indivíduos sem a doença, e propuseram seis estágios neuropatológicos de acordo com a deposição de agregados de α -sinucleína. Nos estágios 1 e 2 os agregados localizam-se predominantemente no bulbo olfatório e no núcleo dorsal dos nervos vago e glossofaríngeo, nos estágios 3 e 4 atinge a SNpc e região CA2 hipocampal; e com a progressão da doença alcança áreas neocorticais como o córtex temporal, insular e cíngulo anterior, caracterizando os estágios 5 e 6 (BRAAK *et al.*, 2003; POSTUMA e BERG, 2016).

A disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo também estão relacionados ao comprometimento da atividade da cadeia transportadora de elétrons, como o complexo mitocondrial I, que reduz as concentrações de trifosfato de adenosina (ATP), sendo uma alteração bioquímica restrita da SNpc de pacientes com DP (SCHAPIRA, 2007). Dessa forma, problemas na respiração celular ocasionam em aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), como radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, além de diminuição da capacidade antioxidante que culminam em dano celular ao reagirem com os componentes celulares (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003; BLESÁ *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015; PRZEDBORSKI, 2017).

Outro mecanismo importante na DP é a neuroinflamação, que está intimamente relacionada a danos neuronais através de estresse oxidativo exacerbado e ativação de células gliais como astrócitos e micróglia, que quando ativadas liberam fatores pró-inflamatórios e

neurotóxicos culminando em processos neurodegenerativos (LEE *et al.*, 2019). Ademais, as células gliais ativadas apresentam morfologia diferenciada durante os processos neuroinflamatórios (RANSOHOFF, 2016).

Além dos aspectos morfológicos apresentados pelas células microgлияis, há a produção e liberação de fatores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas e EROs, que atuam na manutenção do processo neuroinflamatório e ativam vias de sinalização para morte celular, sendo uma das principais características neuropatológicas na DP (LEE *et al.*, 2019).

1.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO “PADRÃO-OURO” PARA DP

Atualmente, o tratamento farmacológico para DP é paliativo e atua somente sobre os sintomas motores através da reposição de dopamina no estriado, que restaura a neurotransmissão perdida com o progresso da neurodegeneração. O principal fármaco utilizado no tratamento de sintomas motores da DP é um precursor da dopamina, a 3,4-diidroxil-L-fenilalanina (L-DOPA). A dopamina é sintetizada a partir da L-tirosina, que é metabolizada pela enzima tirosina hidroxilase (TH) em L-DOPA. Posteriormente a L-DOPA é convertida em dopamina através da enzima DOPA descarboxilase. Assim, com a administração de seu precursor, os níveis de dopamina são restaurados desde que haja terminais axonais dopaminérgicos ainda funcionantes. Essa ainda é a principal alternativa farmacológica para tratamento dos sintomas motores, melhorando a qualidade de vida dos pacientes no início da doença (MERCURI e BERNARDI, 2005; WHITFIELD *et al.*, 2014).

Embora o tratamento com a L-DOPA seja eficiente por um tempo, após 5-10 anos o tratamento deixa de ser efetivo e leva o paciente a um estado irreversível de discinesia, além de não retardar a progressão da neurodegeneração (LANE, 2019). Assim, a busca por novas estratégias terapêuticas que visem interromper a progressão da neurodegeneração na DP é de fundamental importância e, na busca por novas alternativas farmacológicas, os modelos animais de DP têm sido utilizados para investigações acerca de mecanismos neurodegenerativos intrínsecos da doença.

1.5 MODELOS ANIMAIS QUE UTILIZAM TOXINAS

Modelos animais de parkinsonismo são de fundamental importância tanto para investigação de mecanismos fisiopatogênicos da DP como para se testar novas abordagens terapêuticas. Entre os diversos metazoários utilizados experimentalmente, roedores e primatas

são os mais usados por compartilharem as mesmas bases neurobiológicas (BLANDINI e ARMENTERO, 2012; BOVE e PERIER, 2012; BLESA e PRZEDBORSKI, 2014). Dentre os modelos mais utilizados estão aqueles induzidos por toxinas, cujos principais serão descritos a seguir.

1.5.1 MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)

Um dos modelos experimentais clássicos de DP é baseado na administração sistêmica de MPTP que resulta em toxicidade seletiva aos neurônios dopaminérgicos (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

Devido à sua alta lipofilicidade, o MPTP é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e nos astrócitos é transformado em seu composto ativo, 1-metil-4-fenilpiridina (MPP^+) pela ação da enzima monoamina oxidase B (MAO-B). Uma vez liberado no meio extracelular, o MPP^+ é internalizado pelos neurônios dopaminérgicos através dos receptores de dopamina (DAT), que bloqueia o complexo mitocondrial I da cadeia transportadora de elétrons e ocasiona alterações metabólicas que culminam em morte celular por apoptose (BLANDINI e ARMENTERO, 2012; BOVE e PERIER, 2012).

O modelo que utiliza o MPTP ainda é um dos mais empregados para investigações de mecanismos característicos da DP, pois ele mimetiza o comprometimento severo e irreversível da via nigroestriatal, além de ser um modelo que possui resposta positiva ao tratamento com L-DOPA. Entretanto, limitações como espécie animal utilizada e vias de administração devem ser consideradas. Enquanto camundongos e primatas são apropriados quando se utiliza a via sistêmica, ratos não apresentam respostas consistentes frente à toxicidade do MPTP. A ausência de corpos de Lewy representa uma desvantagem do modelo, assim como os altos níveis de biossegurança que são imprescindíveis para intoxicação dos animais, visto que o MPTP é um composto extremamente tóxico para humanos (LANGSTON *et al.*, 1983; BLESA e PRZEDBORSKI, 2014).

1.5.2 Rotenona

A rotenona (ROT) é uma molécula altamente lipofílica encontrada na raiz de algumas espécies de plantas que são usadas como pesticidas naturais e não necessita de DAT para entrar em neurônios dopaminérgicos. Seu mecanismo de ação é através da inibição sistêmica da função mitocondrial pelo bloqueio da atividade do complexo mitocondrial I da cadeia

transportadora de elétrons, ocasionando uma depleção de ATP (BETARBET *et al.*, 2000; BLANDINI e ARMENTERO, 2012).

Betarbet e colaboradores (2000), administraram ROT em ratos da linhagem Lewis de maneira crônica (5 semanas) por via intravenosa e mostraram que ocorre alto grau de degeneração da via nigroestriatal, além da presença de inclusões citoplasmáticas semelhantes aos corpos de Lewy, contendo ubiquitina e α -sinucleína.

Entretanto, logo algumas críticas foram levantadas acerca da sua reprodutibilidade, à medida em que se constatou que havia grande variabilidade na resposta individual dos animais, com oscilações no grau de degeneração da via nigroestriatal e ausência de seletividade na morte neuronal, com prejuízo a outras populações neuronais de diferentes regiões encefálicas (HOGLINGER *et al.*, 2003; HOGLINGER *et al.*, 2006).

1.5.3 6-OHDA (6-hidroxidopamina)

Há mais de 50 anos a 6-OHDA é empregada para investigações dos mecanismos subjacentes à DP (UNGERSTEDT, 1968). É um modelo clássico de DP que provoca degeneração progressiva da via nigroestriatal, associada a alterações comportamentais (IANCU *et al.*, 2005), bioquímicas (ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2008; CARLSSON *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2013; STAYTE *et al.*, 2015), metabólicas (IM *et al.*, 2016) e celulares que representam diferentes aspectos da fisiopatologia da doença. Além da perda neuronal, representada pelas aferências dopaminérgicas no estriado (STR) e corpos celulares de neurônios dopaminérgicos na SNpc, podem ocorrer alterações quantitativas e morfológicas de células gliais, sendo astrócitos e micróglia protagonistas de tais alterações (STOTT e BARKER, 2014).

A 6-OHDA é um análogo hidrolisado da dopamina, é encontrada no encéfalo de pacientes *post mortem* e possui alta afinidade pelos DAT de neurônios dopaminérgicos presentes no STR e na SNpc. Uma vez que a 6-OHDA não ultrapassa a BHE, é necessário injeção diretamente no encéfalo através de cirurgia estereotáxica, onde podemos escolher a região encefálica na qual a neurotoxina será administrada, como a própria SNpc, STR, o feixe prosencefálico medial (MFB) ou o bulbo olfatório (OB). Contudo é imprescindível considerar o curso temporal de degeneração e a taxa de mortalidade para cada protocolo (SAUER e OERTEL, 1994; BLANDINI e ARMENTERO, 2012; HEUER *et al.*, 2012; HOGLINGER *et al.*, 2015). A **Figura 1** mostra uma secção sagital do encéfalo de camundongo com dupla

marcação para tirosina hidroxilase (TH) e núcleo neuronal (NeuN) para ilustrar a anatomia do sistema catecolaminérgico, evidenciando os locais onde a 6-OHDA pode ser injetada como a SNpc, STR, MFB e OB.

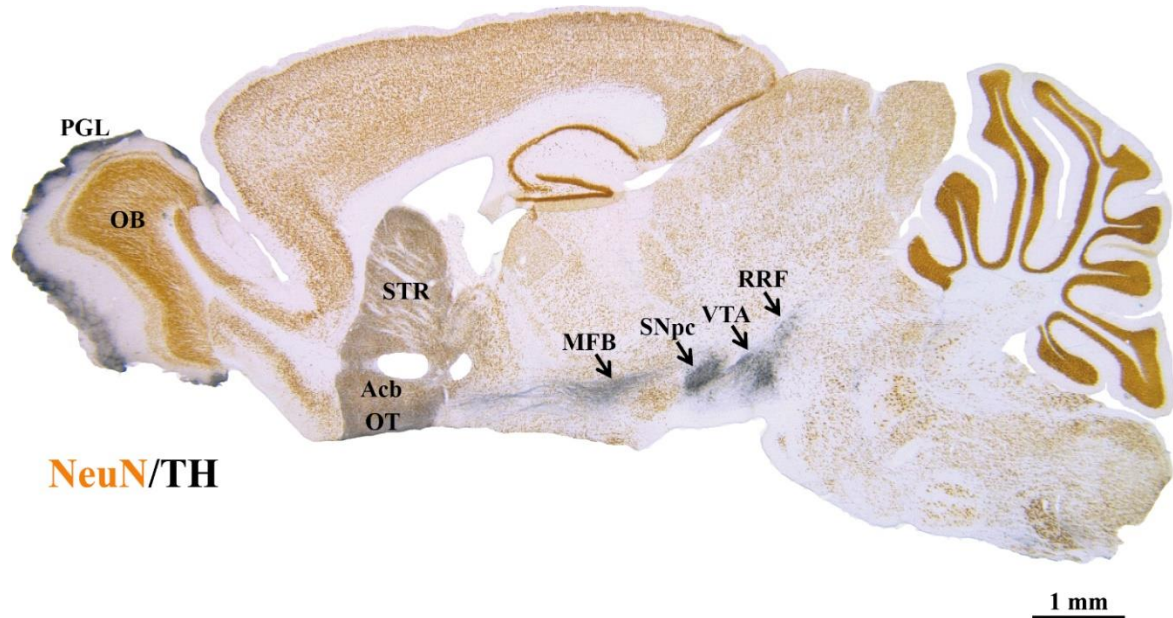


Figura 1: Secção sagital do encéfalo de camundongo com dupla marcação para tirosina hidroxilase (TH, púrpura) e núcleo neuronal (NeuN, marrom) evidenciando a localização de neurônios dopaminérgicos na SNpc e VTA no mesencéfalo, assim como suas projeções axonais através do MFB, STR, Acb e OT. PGL e OB também contém neurônios dopaminérgicos. Escala: 1 mm. Acb = núcleo acumbens; MFB = feixe prosencefálico medial; OB = bulbo olfatório; OT = tubérculo olfatório; PGL = camada periglomerular; RRF = zona retrorubral; SNpc = substância negra *pars compacta*; STR = estriado; VTA = área tegmentar ventral.

Fonte: Processamento histológico e fotomicrografia foram elaborados pelo autor.

O mecanismo de toxicidade da 6-OHDA inicia-se a partir de sua entrada nos neurônios dopaminérgicos através dos DAT. Uma vez no meio intracelular ocorre a auto-oxidação da 6-OHDA, onde há geração de EROs, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxido e radicais hidroxil (BLANDINI e ARMENTERO, 2012; BOVE e PERIER, 2012). Tais processos culminam em morte celular programada pela ativação de caspase-3 em modelos baseados em injeção de 6-OHDA no STR (STOTT e BARKER, 2014). Injeções no MFB ou na SNpc induzem maior taxa de mortalidade e causam maior debilidade aumentando o período necessário para a recuperação dos animais (HEUER *et al.*, 2012). A inibição do complexo mitocondrial também é um mecanismo intrínseco no modelo de 6-OHDA, ocasionando também morte celular a partir do comprometimento do funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e consequente alteração nos níveis de ATP e produção de EROs (CHOI *et al.*, 1999; SCHOBBER, 2004; BLANDINI e ARMENTERO, 2012).

Modelos que utilizam injeções unilaterais de 6-OHDA no encéfalo de roedores permitem, até certo ponto, o acompanhamento do grau de degeneração causado pela neurotoxina através do comportamento rotacional farmacologicamente induzido por apomorfina ou anfetamina, onde o número de rotações correlaciona-se diretamente ao grau de lesão da via nigroestriatal (UNGERSTEDT, 1976; SCHWARTING e HUSTON, 1996a).

Assim como o modelo que utiliza MPTP, o modelo de 6-OHDA não produz corpos de Lewy, sendo uma de suas desvantagens. Além disso, como a 6-OHDA oxida rapidamente, logo é necessário que ela seja diluída em solução contendo ácido ascórbico para que não seja oxidada de modo a garantir sua integridade molecular e a fidedignidade do modelo (BOVE e PERIER, 2012).

1.6 SISTEMA ENDOCANABINÓIDE E BETA-CARIOFILENO (BCP)

Há milênios que a planta *Cannabis sativa* é conhecida por seus efeitos psicotrópicos e medicinais. Atualmente já foram identificados mais de 120 compostos denominados de fitocanabinóides, e dentre os mais abundantes estão o Δ -tetraidrocanabinol (THC), canabidiol (CBD), canabinol (CBN), canabigerol (CBG), dentre outros. Destes, o THC e seu metabólito CBN, possuem atividade psicoativa, atuando em receptores específicos do sistema endocanabinóide (MORALES *et al.*, 2017).

O sistema endocanabinóide compreende uma rede de sinalização intracelular composta por receptores canabinóides do tipo I e II (CB1R e CB2R, respectivamente), que são receptores acoplados à proteína G e quando ativados por ligantes endógenos (endocanabinóides) como a N-aracdoniletanolamina (anandamida, AEA) e o 2-aracdonilglicerol (2-AG) desencadeiam diversas funções intracelulares (DI MARZO, 2008).

Particularmente, os CB2R estão distribuídos em diferentes áreas do encéfalo (ZHANG *et al.*, 2014; LI e KIM, 2015; SIERRA *et al.*, 2015) e a ativação deles por agonistas específicos é capaz de modular as atividades neuronais de modo a modificar comportamentos de locomoção, recompensa e motivação, constituindo novos alvos para o tratamento de distúrbios no SNC (ZHANG *et al.*, 2014).

Os CB2R têm sido investigados como um novo alvo terapêutico na DP devido à sua função de neutralização de estresse oxidativo, a partir do restabelecimento de enzimas antioxidantes, inibição de peroxidação lipídica e de neuroinflamação, através da redução na ativação microglial e astrocitária na SNpc e no STR de roedores. Assim, a ativação dos CB2R

tornou-se um potencial alvo anti-inflamatório, por inibir os ciclos de neuroinflamação e por preservar a homeostase neuronal (RAMIREZ *et al.*, 2005; PALAZUELOS *et al.*, 2009; PRICE *et al.*, 2009; SAGREDO *et al.*, 2009; GOMEZ-GALVEZ *et al.*, 2016; JAVED *et al.*, 2016; OJHA *et al.*, 2016).

Entre os diversos fitocanabinóides encontrados na *C. sativa* com afinidade pelo CB2R está o beta-cariofileno (BCP) (GERTSCH *et al.*, 2008). Além da *C. sativa*, o BCP está presente em diversas plantas aromáticas e comestíveis, como grãos de pimenta (*Piper nigrum*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*), cravinho (*Syzygium aromaticum*), lúpulo (*Humulus lupulus*) (RUSSO, 2016) e em abundância (40,9%) no óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke (VEIGA JUNIOR *et al.*, 2007; GUIMARAES-SANTOS *et al.*, 2012).

Considerando que ativação de CB2R modula atividades celulares e comportamentais, Guimarães-Santos e colaboradores (2012) utilizaram óleo-resina de *C. reticulata* Ducke em modelo de lesão excitotóxica no córtex motor de ratos e mostraram que o tratamento com óleo-resina foi capaz de reduzir ativação microglial, que é indicadora de processos inflamatórios, além de diminuir estresse oxidativo, diminuindo a área de lesão. Tais evidências foram atribuídas ao BCP.

Os efeitos mediados pelos CB2R foram investigados em modelo *in vivo* da DP induzido por rotenona, onde o tratamento com BCP reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios. Além de proteger neurônios dopaminérgicos na substância negra e subsequente redução na ativação microglial, demonstrando efeito terapêutico frente à neurodegeneração induzida por rotenona (JAVED *et al.*, 2016).

Embora os efeitos neuroprotetores do BCP estejam associados à modulação de CB2R, em modelo *in vitro* utilizando células de feocromocitoma (células PC12) mostrou que o BCP aumenta a sobrevivência celular, induz fatores tróficos e aumenta a neuritogênese por mecanismos independentes dos CB2R (SANTOS *et al.*, 2017).

Além disso, ainda são escassos na literatura evidências que demonstrem que o BCP e os CB2R possam ou não influenciar atividades em nível celular, assim como em níveis comportamentais em modelos de doenças neurodegenerativas. Considerando os mecanismos celulares subjacentes à DP, como neuroinflamação e estresse oxidativo, o BCP pode ser uma alternativa terapêutica promissora.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o BCP possui efeito neuroprotetor em modelo murino de DP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se o BCP diminui o grau de lesão provocado pela 6-OHDA;
- Avaliar se o BCP reverte o prejuízo motor ocasionado pela degeneração da via nigroestriatal provocado pela 6-OHDA;
- Avaliar se o BCP protege terminais dopaminérgicos no STR após injeção de 6-OHDA;
- Avaliar se o BCP protege neurônios presentes na SNpc;
- Avaliar se o BCP possui efeito anti-inflamatório mensurado a partir do número de micróglia na SNpc;
- Avaliar se o BCP altera a capacidade antioxidante total no STR e mesencéfalo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 40 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* machos com idade de 10 semanas e pesando entre 40-45 g, que foram provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (Ananindeua, Pará). Os animais permaneceram em caixas (5 animais por caixa) com microambiente isolado (ALESCO[®] AL21) com temperatura e umidade relativa do ar controlada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 60%), em ciclo claro/escuro de 12/12h, onde alimentação e água ficaram disponíveis *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) sob parecer N^o. 9287231117 (ANEXO A). Os animais foram manipulados segundo os “*Principles of Laboratory Animal Care*” (National Institutes of Health - NIH) nas dependências do Laboratório de Neuropatologia Experimental (LaNEx), Hospital Universitário João de Barros Barreto da UFPA.

Os animais foram divididos em 4 grupos, de acordo com o conteúdo injetado no estriado, assim como a forma de tratamento por via oral, por gavagem, administrada, como descrito abaixo:

(i) Veículo/Veículo (N = 7): recebeu injeção intraestriatal unilateral de solução contendo ácido ascórbico e foi tratado com azeite de oliva;

(ii) Veículo/BCP (N = 9): recebeu injeção intraestriatal unilateral de ácido ascórbico e foi tratado com BCP;

(iii) 6-OHDA/Veículo (N = 12): recebeu injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA e foi tratado com azeite de oliva;

(iv) 6-OHDA/BCP (N = 13): recebeu injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA e foi tratado com BCP.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os animais foram submetidos a cirurgias estereotáxicas para injeção de solução veículo ou 6-OHDA. Após as cirurgias estereotáxicas iniciou-se o tratamento com azeite oliva ou com BCP (50 mg/kg), ambos administrados por via oral, com duração de 7 dias. Os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação do grau de lesão provocada pela 6-

OHDA através do teste de rotações induzidas por apomorfina (14° e 27° dia) e teste para avaliação da capacidade motora como o teste de exploração em campo aberto (25° e 26° dia). O tempo de sobrevivência foi de 28 dias após as cirurgias estereotáxicas (**Figura 2**).

Delineamento experimental

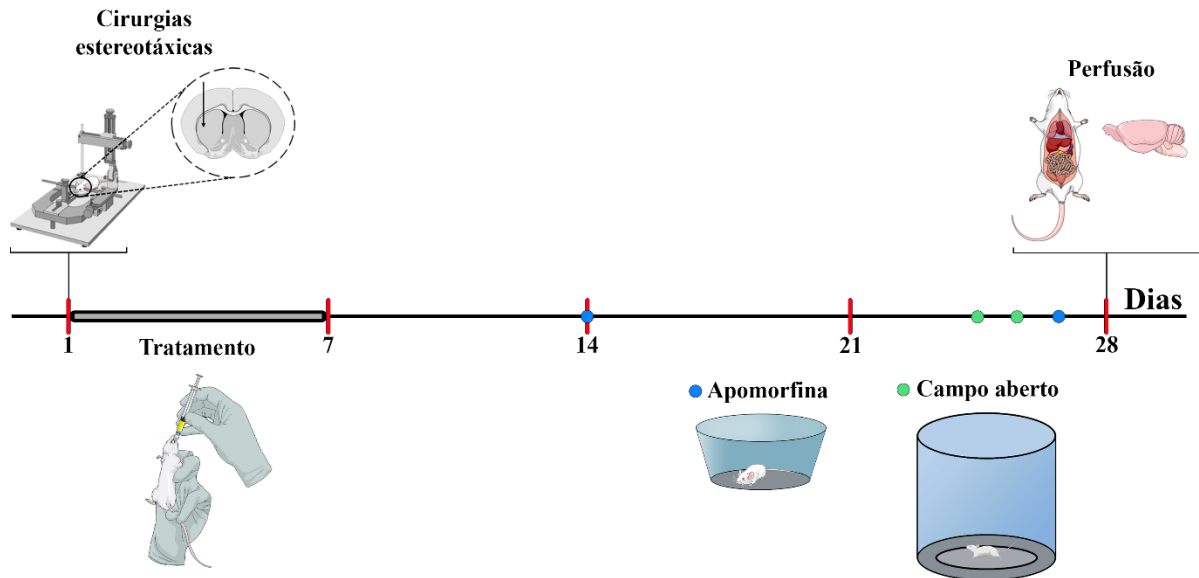


Figura 2: Ilustração esquemática do delineamento experimental. No primeiro dia, realizamos cirurgias estereotáxicas para injeção intraestriatal de solução veículo ou 6-OHDA. O tratamento iniciou ainda no mesmo dia da cirurgia e seguiu durante 7 dias (barra horizontal na cor cinza). No 14° e 27° dia, foi realizado o teste de rotações induzidas por apomorfina (círculo de cor azul). No 25° e 26° dia, realizamos o teste de exploração no campo aberto (círculos na cor verde). E no último dia (28° dia), fizemos os procedimentos de eutanásia através de perfusão intracardíaca.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Mind the Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Adobe Photoshop CC 2018*.

3.3. CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS

Todos os animais foram operados para injeção de solução veículo contendo ácido ascórbico (*Sigma-Aldrich*®/A4544) ou 6-OHDA (*Sigma-Aldrich*®/H4381) no estriado dorsal esquerdo. Previamente, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com solução contendo cloridrato de cetamina (*Dopalen*®) na dose de 100 mg/kg e cloridrato de xilazina (*Dopaser*®) na dose de 10 mg/kg diluídos em NaCl 0,9%. Após certificação de anestesia profunda, cada animal teve sua cabeça fixada em aparelho estereotáxico (*Insight*®/EFF-333). Posteriormente, foi realizada a tricotomia, seguida de higienização da pele na região da cabeça com álcool iodado, onde foi feita uma pequena incisão para expor o crânio. Para a localização do estriado foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas: anteroposterior (AP) + 0,8 mm e médio-lateral (ML) + 2,1 mm, ambas a partir do bregma e dorsoventral (DV) – 3,2 mm a partir da dura máter, baseadas no Atlas de Estereotaxia para camundongos (PAXINOS e

FRANKLIN, 2001). A solução veículo, ácido ascórbico 0,2 mg/mL, foi diluída em NaCl 0,9% e a 6-OHDA, na concentração de 10 µg, foi diluída na solução veículo. O volume injetado foi de 2 µL (5 µg/µL de 6-OHDA) na velocidade de 0,5 µL/min. A agulha foi mantida no local da injeção por 5 minutos e, após esse período, foi removida lentamente para evitar refluxo. Posteriormente, a incisão foi suturada e administramos pomada cicatrizante e epitelizante para auxiliar na cicatrização. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram transferidos de volta às suas gaiolas para recuperação.

Abaixo, a **Figura 3** mostra de maneira esquemática o local de injeção de solução veículo ou 6-OHDA no estriado dos camundongos.

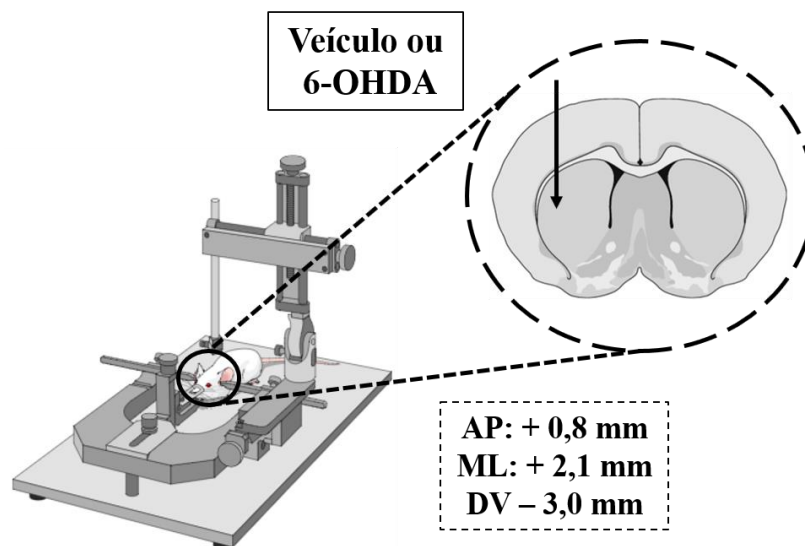


Figura 3: Ilustração esquemática do posicionamento do animal no equipamento estereotáxico e, em destaque, o local de injeção intraestriatal de solução veículo ou 6-OHDA através de cirurgia estereotáxica, seguidos das coordenadas utilizadas durante as cirurgias.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Mind the Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Adobe Photoshop CC 2018*.

3.4. TRATAMENTO COM BCP

O BCP (*Sigma-Aldrich*®/W225207) foi diluído em azeite de oliva e administrado por via oral (gavagem). A concentração de BCP empregada foi de 50 mg/kg, previamente descrita (GERTSCH *et al.*, 2008; AL MANSOURI *et al.*, 2014; BAHI *et al.*, 2014; JAVED *et al.*, 2016; OJHA *et al.*, 2016; ALBERTI *et al.*, 2017). O volume de solução contendo BCP, assim como veículo (azeite de oliva) foi administrado na relação de 0,05 mL a cada 10 g de massa corpórea do animal.

O tratamento (BCP ou veículo) foi iniciado 2 horas após a injeção intraestriatal unilateral de solução veículo ou 6-OHDA e teve duração de 7 dias, obedecendo o curso

temporal de degeneração da via nigroestriatal induzido pela 6-OHDA em camundongos, de modo que o tratamento se sobrepusesse à neurodegeneração que ocorre nos primeiros 7 dias após injeção intraestriatal de 6-OHDA (ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2008; STOTT e BARKER, 2014).

3.5. TESTES COMPORTAMENTAIS

Os testes comportamentais descritos a seguir foram empregados para avaliação de alguns aspectos comportamentais intrínsecos no modelo de lesão unilateral da via nigroestriatal por 6-OHDA. O primeiro foi o teste farmacológico de rotações induzidas por apomorfina, que foi realizado na 2^a e 4^a semanas após cirurgias estereotáxicas. Em seguida foi realizado o teste de exploração no campo aberto (26^o e 27^o dia) para avaliação da capacidade exploratória, motricidade e comportamento semelhante ao ansioso.

3.5.1. ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA

O teste de rotações induzidas por apomorfina foi realizado para avaliarmos o grau de degeneração da via nigroestriatal através do número de rotações contralaterais provocadas pelo fármaco. O teste foi realizado na 2^a e 4^a semanas após cirurgias estereotáxicas (14^o e 27^o dia), onde a apomorfina (*Sigma-Aldrich*[®]/A4393) foi administrada na concentração de 0,1 mg/kg por via subcutânea (s.c.). Logo após a administração de apomorfina, os animais foram colocados em aparatos circulares medindo 15 cm de diâmetro e 10 cm de altura. A duração do teste foi de 20 minutos, onde foi observado o número de rotações contralaterais que os animais realizaram em torno do próprio eixo (**Figura 4**). Todos os testes foram executados no ciclo claro, nos mesmos horários e sob as mesmas condições de iluminação (25-26 lux), medidos com fotômetro (*Instrutemp*[®]). Os aparatos foram higienizados com álcool etílico a 10% a cada animal para eliminação de pistas olfativas durante a execução dos demais testes. Todos os testes foram filmados e posteriormente analisados para a quantificação do número de rotações contralaterais, onde os resultados foram expressos em número de rotações contralaterais/minuto.

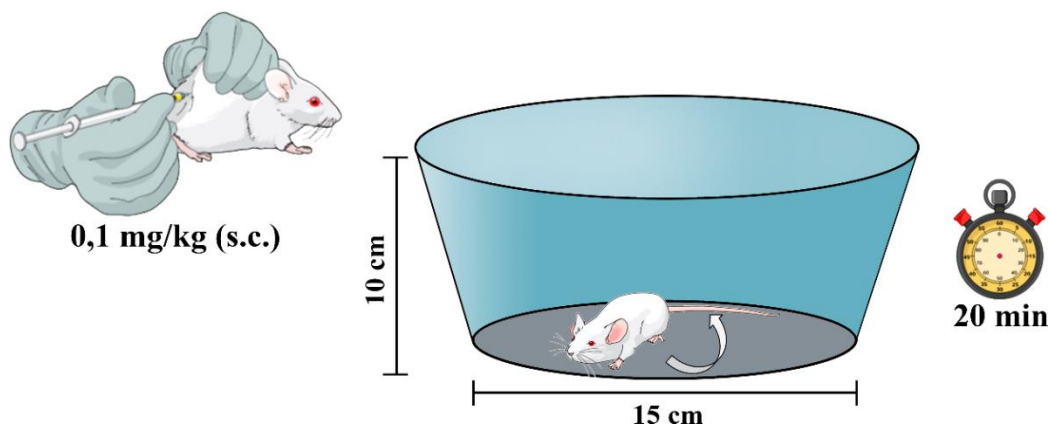


Figura 4: Ilustração esquemática do teste de rotações induzidas por apomorfina. No lado esquerdo da figura, a via de administração (s.c.) do fármaco (0,1 mg/kg). Ao centro, a representação do aparato utilizado para execução do teste durante o período estabelecido de 20 minutos (lado direito da figura).

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Mind the Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>) e *Adobe Photoshop CC 2018*.

3.5.2. EXPLORAÇÃO EM CAMPO ABERTO

O teste de exploração em campo aberto foi realizado para avaliação da capacidade exploratória, motricidade e comportamento semelhante ao ansioso. O aparato consistiu em uma caixa circular de acrílico com diâmetro de 30 cm e 30 cm de altura, com a parede na cor cinza e o fundo na cor preta. O teste foi executado em 2 dias (25° e 26° dia), onde o primeiro dia serviu como habituação no aparato e o segundo serviu para avaliação dos parâmetros comportamentais como distância total percorrida, velocidade média, tempo de imobilidade e análise de tigmotaxia.

A priori, os animais permaneceram durante 30 minutos na sala de testes comportamentais para ambientação antes de serem expostos ao aparato. Após o período de ambientação, cada animal foi gentilmente colocado no aparato do campo aberto e o teste teve duração de 5 minutos.

Os testes foram executados no ciclo claro, nos mesmos horários e sob as mesmas condições de iluminação (25-26 lux), medidos com fotômetro (*Instrutemp*®). O aparato foi higienizado com álcool etílico a 10% a cada animal para eliminação de pistas olfativas. Todos os testes foram filmados através de *software* de aquisição de vídeos e posteriormente analisados no *software ANY-maze Video Tracking System, Version 6.12 (Stoeling Co*®) para processamento e análise dos parâmetros comportamentais.

Com o auxílio do *software ANY-maze*, foram delineadas zonas dentro do aparato, como zona central (ZC) com área de 360,32 cm² e zona periférica (ZP) com área de 346,18 cm². Essa

divisão artificial corresponde áreas aproximadamente iguais dentro do aparato, onde a ZC corresponde à 51% e ZP à 49% da área total (706,5 cm²).

A seguir, uma ilustração esquemática do aparato do campo aberto e das divisões artificiais das zonas (**Figura 5**) e a interface do *software ANY-maze* que foi utilizado para as análises dos vídeos (**Figura 6**).

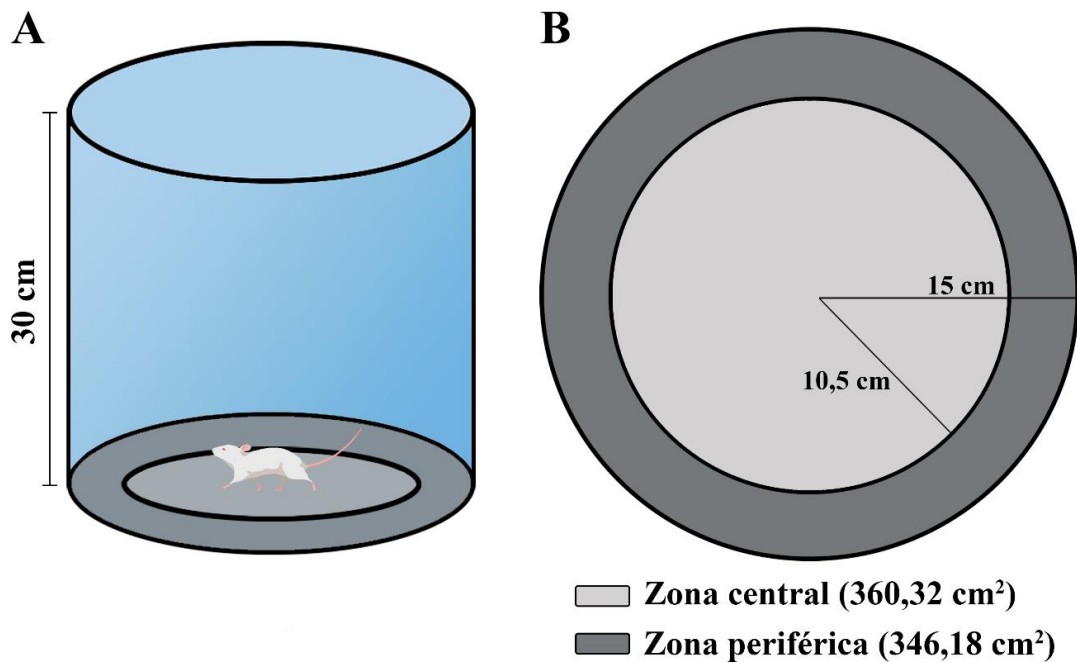


Figura 5: Ilustração do teste de exploração em campo aberto. (A) aparato utilizado para realização do teste. (B) representação esquemática das divisões artificiais feitas no software *ANY-maze*, evidenciando a área de cada zona dentro do aparato.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando *Adobe Photoshop CC 2018*.

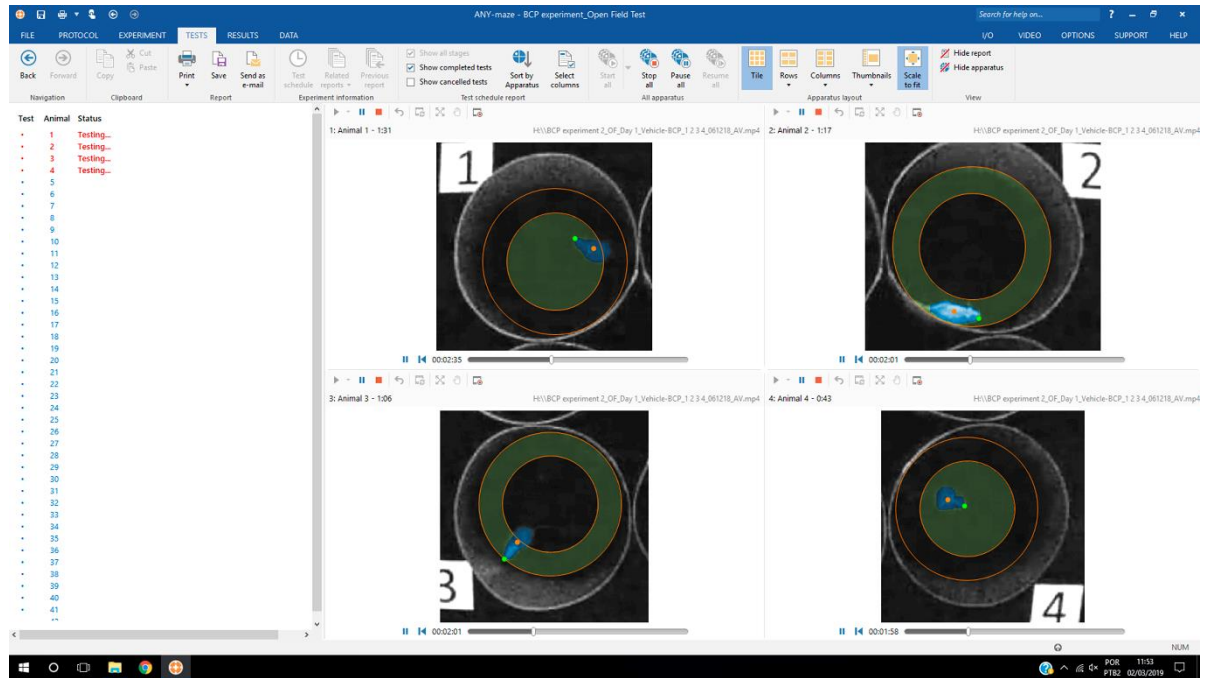


Figura 6: Interface do software ANY-maze Video Tracking System (*Stoeling Co*[®]). Os animais estão marcados digitalmente em azul para delimitação da área corporal. O ponto de cor laranja sinaliza a posição do centro do corpo e o ponto de cor verde sinaliza a posição da cabeça do animal durante o período de análise dos vídeos. As zonas do aparato estão delimitadas pelas circunferências na cor laranja e as zonas destacadas na cor verde demonstram a permanência em uma das zonas (ZC ou ZP).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A divisão do aparato em zonas com áreas aproximadamente iguais nos permitiu avaliar com maior precisão a diferença na atividade exploratória do animal em cada uma delas. Assim, utilizamos a equação do índice de contraste para estabelecer uma razão entre as zonas. Abaixo, a equação é descrita e a utilizamos para análise da distância e tempo preferencial em cada uma das zonas (SIQUEIRA-MENDES, 2014).

$$I_c = [(X_p - X_c) / (X_p + X_c)] * 100, \text{ onde:}$$

I_c = índice de contraste;

X = parâmetro que se deseja analisar (distância ou tempo) durante o período de teste;

p = referente à zona periférica;

c = referente à zona central.

O índice de contraste estabelece uma relação entre as zonas (central e periférica) e expressa um valor em percentual que representa a preferência pela zona periférica do aparato em relação a atividade exploratória durante todo o teste.

3.6. OBTENÇÃO DE SECÇÕES HISTOLÓGICAS

Ao término dos testes comportamentais os animais eutanasiados com uma dose letal de solução anestésica e, posteriormente, foi realizada a perfusão intracardíaca com tampão fosfato salina (PBS) 0,1% e paraformaldeído (PFA) 4%, ambas as soluções a 4-8°C e pH 7.2–7.4, que foram administradas através de bomba peristáltica. Após a perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente removidos por craniotomia e, em seguida, foram pós-fixados em PFA 4% (pH 7.2–7.4) por 48 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, passaram por crioproteção em sacarose 30% a 4-8°C por 72 horas. Ao término do período de crioproteção, os encéfalos foram seccionados em cortes coronais com 40 µm de espessura a –25°C no criostato (*Leica Microsystems Ltd., CM 1850, Nussloch, Germany*). Coletadas em 6 séries, as secções foram armazenadas em solução anticongelante a –20°C para posteriores processamentos adequados a cada investigação histológica.

3.7. IMUNOMARCAÇÕES

Para as marcações imunoistoquímicas, as secções foram incubadas *free-floating*, sob agitação suave por 1 hora em 5% de soro normal jumento (SNJ; *Millipore*®/S30) para bloqueio de sítios de ligações inespecíficas. Posteriormente foram incubadas em anticorpos primários, que estão listados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para marcações específicas de neurônios e células gliais por imunoistoquímica.

Antígeno	Fabricante, espécie, n° catálogo	Diluição
Tirosina hidroxilase (TH)	<i>Millipore</i> ®, policlonal, <i>rabbit</i> , AB152	1:5.000
Antígeno nuclear neuronal (NeuN)	<i>Millipore</i> ®, monoclonal, <i>mouse</i> , MAB377	1:10.000
Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (IBA-1)	<i>Wako Pure Chemical Industries Ltd.</i> , policlonal, <i>rabbit</i> , #019-19741	1:10.000

Após o período de incubação nos anticorpos primários, as secções foram incubadas em seus respectivos anticorpos secundários biotinizados: IgG anti-*rabbit*, 1:500 (*Jackson ImmunoResearch*®/711-065-152) ou IgG anti-*mouse*, 1:500 (*Jackson ImmunoResearch*®/715-065-150). O sinal do epítipo foi amplificado durante 1 hora com o complexo avidina-biotina (ABC; *VECTASTAIN*® *Elite ABC Kit*; 1:200; *Vector Laboratories*®). As ligações entre o epítipo e os anticorpos foram visualizadas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; *Sigma-Aldrich*®/D12384).

Ao término dos procedimentos imunoistoquímicos, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e após secagem a temperatura ambiente, foram desidratadas em sequências de álcoois e xilenos, e finalmente, foram seladas com *Entellan*[®] (Merck[®]) e devidamente armazenadas para posterior análises microscópicas.

Detalhamentos dos procedimentos descritos acima, como tipos de tampões utilizados, tempo de incubação em anticorpos, tipos de cromógenos e procedimentos de desidratação encontram-se na seção de apêndices ao final do trabalho (**Quadro 1 e 2**).

3.8. DENSIDADE ÓPTICA DE FIBRAS ESTRIATAIS

As mensurações de densidade óptica do estriado foram feitas para avaliarmos o grau de degeneração dos terminais imunorreativos para TH. Para tal, imagens de secções representativas do estriado foram capturadas em câmera digital de alta resolução (*Leica Microsystems Ltd., DFC450, Heerbrugg, Germany*) acoplada em estereomicroscópio (*Leica Microsystems Ltd., M205A, Heerbrugg, Germany*), utilizando *software* de aquisição de imagens (*Leica Application Suite, version 4.2.0, Switzerland*). As imagens foram transformadas para escala de cinza (8-bit) e a densidade óptica foi mensurada em 3 níveis seguindo as coordenadas: +0.12 mm, +0.5 mm e +1.34 mm, relativas ao bregma (adaptado de HEUER *et al.*, 2012). As secções utilizadas para as quantificações estão exemplificadas na **Figura 7**. Foi mensurada a densidade óptica do corpo caloso para servir como a região não-específica e para normalizar os valores de densidade obtidos. Utilizamos o *software ImageJ (Version 1.52e, National Institutes of Health, USA)* para quantificações. Os dados de densidade óptica foram expressos em percentual do lado contralateral.

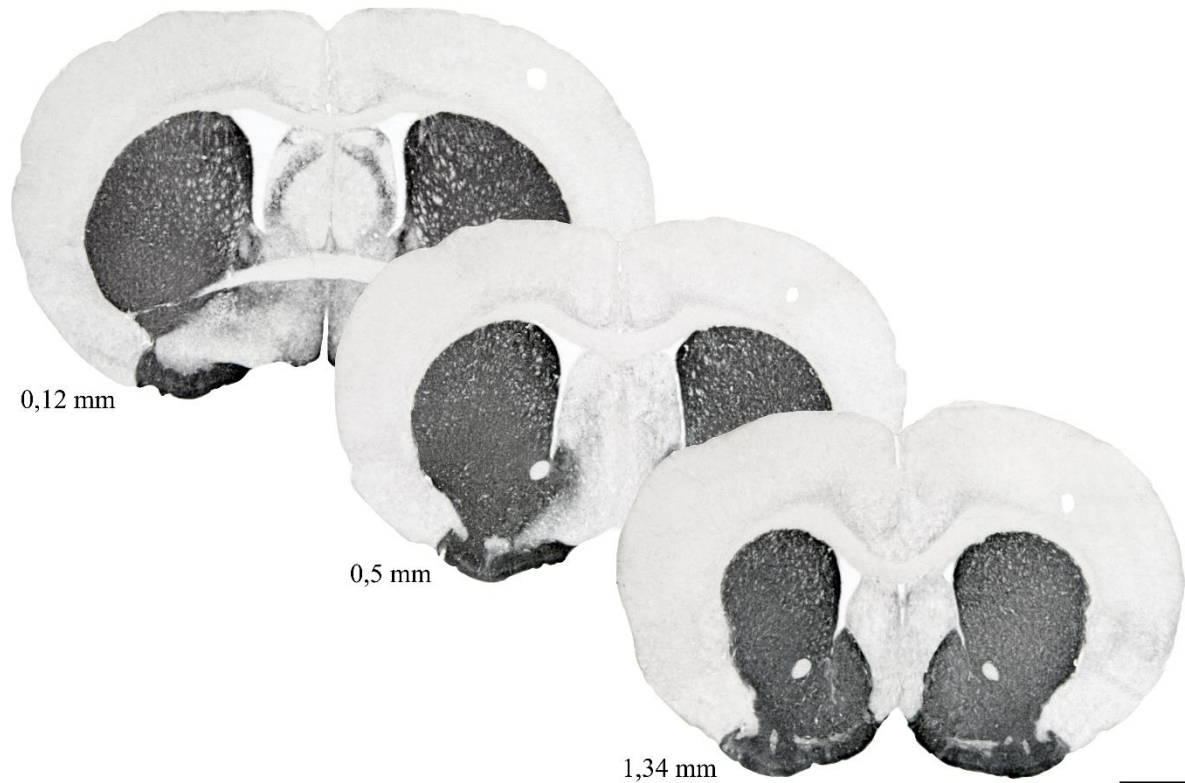


Figura 7: Representação das secções coronais utilizadas para mensuração de densitometria óptica das fibras TH⁺ do estriado. Ao lado esquerdo de cada secção, estão as distâncias relativas ao bregma (+0,12, +0,5 e +1,34 mm). Escala: 1 mm.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando *Adobe Photoshop CC 2018*.

3.9. ANÁLISE QUANTITATIVA POR ESTEREOLOGIA

A análise quantitativa, sistemática e aleatória por estereologia foi realizada para quantificarmos neurônios e células gliais presentes na SNpc. Para tal, utilizamos o *software STEREOLOGER (Stereology Resource Center, Inc., version 11.0)* acoplado ao microscópio *Nikon LABOPHOT-2*, equipado com plataforma motorizada para controle das coordenadas X, Y e Z (*PRIOR ES111US, PRIOR Scientific, Fulbourn, Cambridge, UK*). A contagem foi realizada utilizando o método do fracionador óptico, que é um método estereológico preciso empregado para estimativas do número de células em determinada região encefálica (WEST, 1999; 2002).

A contagem de neurônios TH⁺ e micróglia presentes na SNpc foi realizada em 6 secções correspondentes entre as coordenadas -2,54 e -3,8 mm relativas ao bregma, onde as delimitações anatômicas da SNpc foram inicialmente desenhadas sob ampliação de 2x e as células foram contadas sob ampliação de 40x ou de 100x. As caixas de contagens foram

definidas aleatória e sistematicamente, onde cada corpo celular presente no interior de cada caixa de contagem foi inserido ao número total de células. O coeficiente de erro estabelecido para as estimativas foi ≤ 0.1 (GUNDERSEN *et al.*, 1999).

Todas as estimativas foram realizadas a partir da equação descrita abaixo (WEST *et al.*, 1991).

$$N = \sum Q^- \cdot \frac{1}{tsf} \cdot \frac{1}{asf} \cdot \frac{1}{ssf}$$

N = número total de células;

$\sum Q^-$ = número de células contadas;

tsf = espessura da secção (*thickness sampling fraction*);

asf = área matriz (*area sampling fraction*);

ssf = total de secções contadas (*section sampling fraction*).

3.10. ANÁLISE DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DAS CONCENTRAÇÕES INTRACELULARES DE ERO

A avaliação da capacidade antioxidante através das concentrações intracelulares de EROs é um método rápido e eficaz para determinação da competência antioxidante frente a danos em determinados organismos. Para detecção de EROs e avaliação da capacidade antioxidante do BCP, utilizamos a técnica de determinação da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) (AMADO *et al.*, 2009).

Separamos aleatoriamente 3-4 animais de cada grupo experimental, que foram eutanasiados através de deslocamento cervical e o encéfalo foi removido rapidamente para dissecação do estriado e mesencéfalo, que foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a digestão mecânica em pistilo motorizado, seguidas de centrifugação a 10.000 g a 4°C durante 20 minutos. O sobrenadante foi retirado e as proteínas totais foram dosadas através da absorbância emitida pelo azul brilhante de *Coomassie* G-250 (BRADFORD, 1976). A concentração de proteína escolhida para os ensaios bioquímicos subsequentes foi de 1 mg/mL.

Em seguida, as amostras foram expostas ao diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína (H₂DCF-DA, *Molecular Probes/D399*) que na presença de EROs gera um fluorocromo

detectável por comprimentos de onda de 488 nm (excitação) e 525 nm (emissão). As leituras foram realizadas através de fluorímetro com leitora de microplacas (*Victor 2™, Perkin Elmer*), onde as amostras foram colocadas em meio contendo H₂DCF-DA, que foram expostas a radicais peróxil gerados por termólise (37°C) de 2,2'-azobis (2-metilpropionamida) diidroclorato (ABAP, *Sigma-Aldrich*®/440914) durante 30 minutos. A capacidade antioxidante total foi determinada pela diferença entre a fluorescência oriunda das ERO das amostras expostas ao ABAP em relação as mesmas amostras expostas somente a água *Milli-Q* (sem ABAP).

3.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Utilizamos análise de variância com um critério (ANOVA *One Way*), seguida de pós-teste de *Tukey* para o teste de exploração em campo aberto, análises bioquímicas, densidade óptica e estimativas por estereologia. Análise de variância com dois critérios (ANOVA *Two Way*), seguida de pós-teste de *Bonferroni* foi empregada para alterações no teste de rotações induzidas por apomorfina.

Todos os valores foram expressos como média \pm erro padrão e a significância estatística foi definida com 95% de confiabilidade, onde consideramos diferenças significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 6 (*GraphPad Software Inc. Version 6.01, 2012*).

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

4.1.1. TESTE DE ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA

Investigamos comportamentalmente a neurodegeneração da via nigroestriatal através do teste de rotações induzidas por apomorfina, onde o número de rotações contralaterais à lesão provocada por 6-OHDA possui uma boa correlação ao grau de neurodegeneração.

O comportamento rotacional contralateral à lesão esteve presente nos grupos injetados com 6-OHDA, em ambos os momentos em que o teste foi realizado, na 2ª e 4ª semanas após cirurgias estereotáxicas. Os grupos injetados com solução veículo contendo ácido ascórbico não apresentaram rotações, e por isso não estão ilustrados no gráfico.

O grupo 6-OHDA/Veículo apresentou elevado número de rotações contralaterais por minuto de teste na 2ª e na 4ª semana após injeções de 6-OHDA, não havendo diferença entre as semanas. O grupo 6-OHDA/BCP apresentou número significativamente reduzido de rotações contralaterais quando comparado ao grupo 6-OHDA/Veículo, não havendo diferença entre as semanas (**Figura 8**).

Tais evidências demonstram que o tratamento com BCP durante 7 dias após injeções de 6-OHDA teve influência direta na resposta motora induzida farmacologicamente por apomorfina, sendo um dos indicativos de interferência nos processos induzidos pela injeção de 6-OHDA no STR.

Os valores exatos de média, erro padrão e significâncias obtidas encontram-se na seção de apêndices (**Quadro 3**) ao final do trabalho.

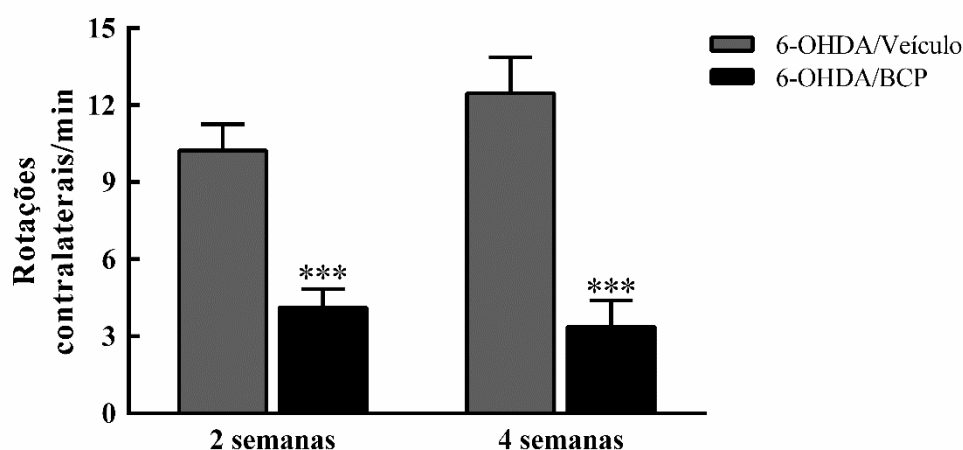


Figura 8: Grau de degeneração da via nigroestriatal após injeção intraestriatal de 6-OHDA. Número de rotações contralaterais/minuto em 2 e 4 semanas após injeções de 6-OHDA intraestriatal. Diferenças estatísticas estão simbolizadas com asteriscos, sendo *** $p < 0,0001$ vs 6-OHDA/Veículo nos dois momentos em que o teste foi realizado. ANOVA *Two Way*, pós-teste de *Bonferroni* e os dados representados como média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 7, Veículo/BCP N = 8, 6-OHDA/Veículo N = 12 e 6-OHDA/BCP N = 13.

4.1.2. ATIVIDADE EXPLORATÓRIA EM CAMPO ABERTO

O teste de exploração em campo aberto foi realizado para avaliarmos tanto a motricidade como parâmetros associados à emocionalidade do animal.

A trajetória representativa de cada grupo experimental foi acessada para se avaliar o perfil de exploração na arena. Assim, ficou evidente que o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou uma redução na motricidade em relação aos demais grupos, enquanto o grupo 6-OHDA/BCP apresentou trajetória semelhante aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP (**Figura 9A**).

Em relação às distâncias percorridas, o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou redução na atividade exploratória no teste de campo aberto quando comparado ao grupo Veículo/Veículo e Veículo/BCP. Em contrapartida, o grupo 6-OHDA/BCP apresentou redução na ambulação apenas na comparação com o grupo Veículo/BCP. Os dados das comparações entre o grupo 6-OHDA/Veículo e 6-OHDA/BCP evidenciam que houve efeito do tratamento com BCP, pois observamos aumento na atividade exploratória, onde o grupo 6-OHDA/BCP demonstrou comportamento exploratório semelhante ao grupo Veículo/Veículo (**Figura 9B**).

As análises de velocidade média para cada grupo demonstram que houve prejuízo na velocidade de locomoção do grupo 6-OHDA/Veículo quando comparado ao grupo Veículo/Veículo e Veículo/BCP. O grupo 6-OHDA/BCP também apresentou diminuição na

velocidade média quando comparado ao grupo Veículo/BCP. Ao compararmos os grupos injetados com 6-OHDA, o grupo tratado com BCP apresentou maior velocidade média do que o grupo tratado com veículo, demonstrando que o BCP teve efeito sobre a velocidade de deslocamento no aparato, além de reverter o comprometimento motor provocado pela 6-OHDA (**Figura 9C**).

À medida em que animais percorrem maiores distâncias e com maior velocidade no aparato, espera-se que eles passem a maior parte do tempo em movimento exploratório. Considerando este paradigma, o grupo 6-OHDA/Veículo ficou imóvel no aparato por mais tempo do que o grupo Veículo/BCP e o grupo 6-OHDA/BCP. O grupo Veículo/BCP ficou menos tempo imóvel no aparato do que o grupo Veículo/Veículo. Essas evidências demonstram o efeito sobre a atividade exploratória nos grupos tratados com BCP, sendo que o grupo injetado com 6-OHDA mostrou recuperação do comprometimento motor e no grupo injetado somente com solução veículo, o BCP pode estar exercendo seu efeito sobre a motricidade sem envolvimento da via nigroestriatal (**Figura 9D**).

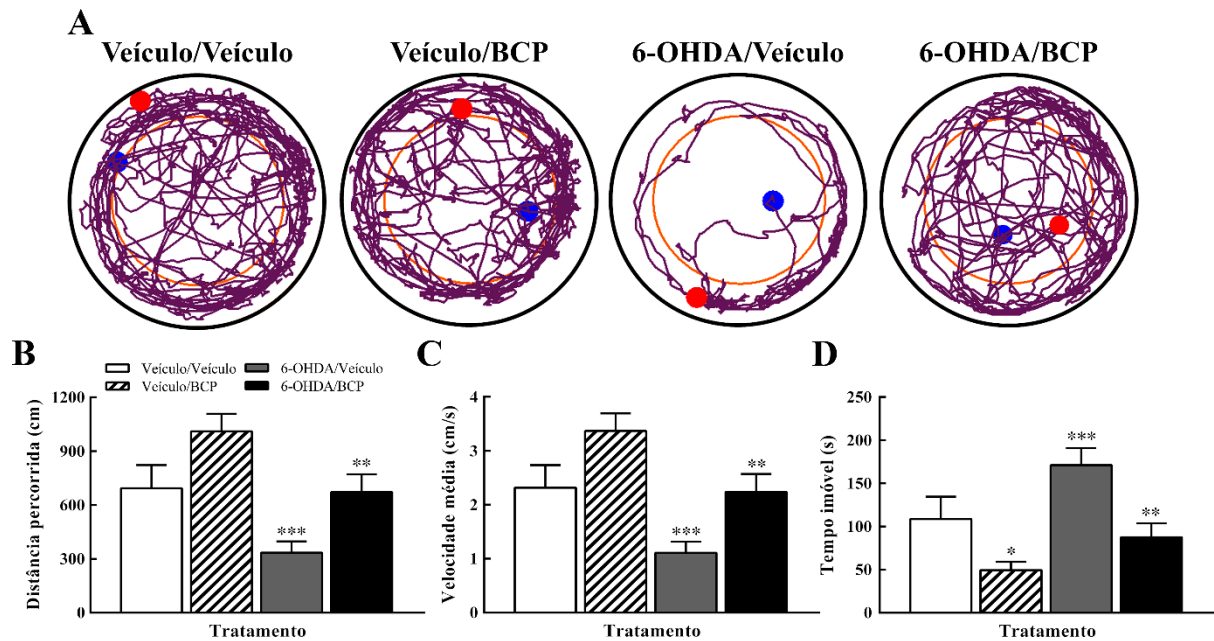


Figura 9: Avaliação da atividade exploratória no teste de campo aberto. **(A)** Representação das trajetórias percorridas, onde os pontos azuis e vermelhos representam o ponto inicial e final do teste, respectivamente. **(B)** Distância percorrida (cm), *** $p < 0,001$ vs Veículo/Veículo e Veículo/BCP; ** $p < 0,05$ vs Veículo/BCP e 6-OHDA/Veículo. **(C)** Velocidade média (cm/s), *** $p < 0,001$ vs Veículo/Veículo e Veículo/BCP; ** $p < 0,05$ vs Veículo/BCP e 6-OHDA/Veículo. **(D)** Tempo imóvel (s), * $p < 0,05$ vs Veículo/Veículo; *** $p < 0,001$ vs Veículo/BCP; ** $p < 0,001$ vs 6-OHDA/Veículo. ANOVA *One Way*, pós-teste de *Tukey*. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 7, Veículo/BCP N = 8, 6-OHDA/Veículo N = 12 e 6-OHDA/BCP N = 13.

Avaliamos os mapas de calor relativos ao tempo de permanência em diferentes regiões do campo aberto, correspondentes a todos os animais de cada grupo. A partir dessa análise, observou-se que o grupo 6-OHDA/Veículo passou a maior parte do tempo na zona periférica em detrimento à zona central do aparato, sendo esta, uma evidência de tigmotaxia, que é uma característica associada ao comportamento semelhante ao ansioso. Ao analisarmos o grupo 6-OHDA/BCP notamos que o tempo de permanência em diferentes regiões do campo aberto foi homogêneo, semelhante aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP (**Figura 10A**).

O aparato do campo aberto foi subdividido em zonas central e periférica onde utilizamos o índice de contraste para avaliar o tempo de permanência e a distância percorrida preferencialmente na periferia. Observamos que os grupos Veículo/Veículo e 6-OHDA/Veículo permaneceram mais tempo e percorreram maiores distâncias na periferia do aparato, em comparação com os grupos Veículo/BCP e 6-OHDA/BCP (**Figura 10B-C**).

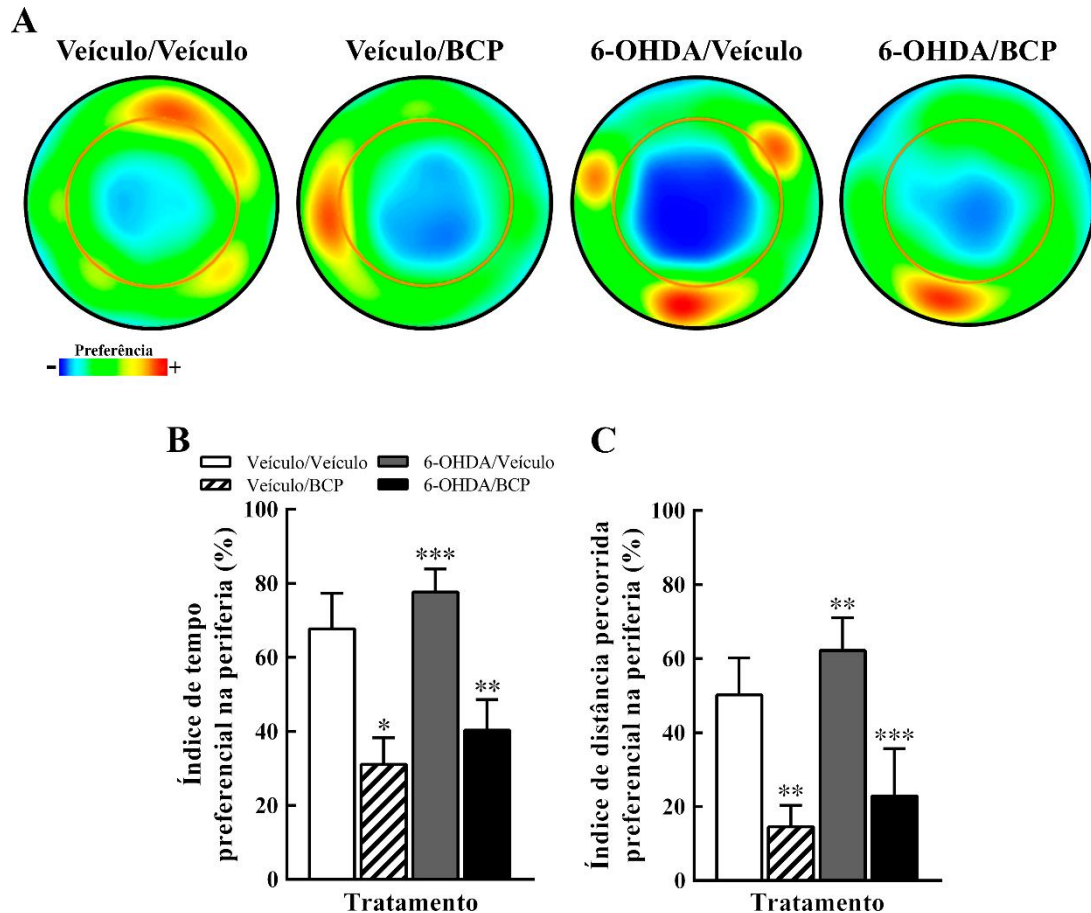


Figura 10: Avaliação de comportamento semelhante ao ansioso através do índice de contraste. **(A)** Mapa de calor referente ao tempo de permanência nas zonas campo aberto, de modo que as barras abaixo de cada mapa representam cores relativas ao tempo de permanência (cor azul = 0 segundos e cor vermelha > 35 segundos). **(B)** Índice de tempo preferencial (%) na zona periférica do aparato, * $p < 0,05$ vs Veículo/Veículo; *** $p < 0,001$ vs Veículo/BCP; ** $p < 0,01$ vs 6-OHDA/Veículo. **(C)** Índice de distância preferencial (%) na zona periférica do aparato, ** $p < 0,01$ vs Veículo/Veículo; ** $p < 0,01$ vs Veículo/BCP; *** $p < 0,001$ vs 6-OHDA/Veículo. ANOVA *One Way*, pós-teste de *Tukey*. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão. Veículo/Veículo $N = 7$, Veículo/BCP $N = 8$, 6-OHDA/Veículo $N = 12$ e 6-OHDA/BCP $N = 13$.

Considerando o tempo de permanência e a distância percorrida na zona periférica do aparato como indicativo de comportamento semelhante ao ansioso, os resultados oriundos dos índices de contraste mostram que os grupos tratados com BCP apresentaram menor intensidade de comportamento semelhante ao ansioso em relação aos grupos não tratados, independente de lesão da via nigroestriatal. Dessa forma, as análises do teste de campo aberto evidenciaram que o BCP modulou o comportamento semelhante ao ansioso, embora tenhamos realizado um ensaio de habituação ao aparato no dia anterior sob as mesmas condições.

Os valores exatos de média, erro padrão e significâncias obtidas encontram-se na seção de apêndices (**Quadros 4 e 5**) ao final do trabalho.

4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

4.2.1. DENSITOMETRIA DE TERMINAIS TH⁺ NO ESTRIADO

As análises de densidade óptica do STR nos permitiu investigar o grau de degeneração de fibras TH⁺. Os grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP não apresentaram diferenças, mas o grupo 6-OHDA/Veículo demonstrou perda acentuada das projeções dopaminérgicas estriatais no hemisfério injetado com 6-OHDA. Tal perda foi mitigada pelo tratamento de BCP ao observarmos as fotomicrografias do grupo 6-OHDA/BCP em relação ao grupo 6-OHDA/Veículo (**Figura 11A-D**).

Ao analisarmos quantitativamente os valores de densidade óptica, o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou perda de 85,8 e 84,2% em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP, respectivamente. O grupo 6-OHDA/BCP demonstrou perda de 52,8 e 51,2% em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP, respectivamente. Contudo, a densidade de fibras TH⁺ no grupo 6-OHDA/BCP foi 33% maior que o grupo 6-OHDA/Veículo (**Figura 11F**).

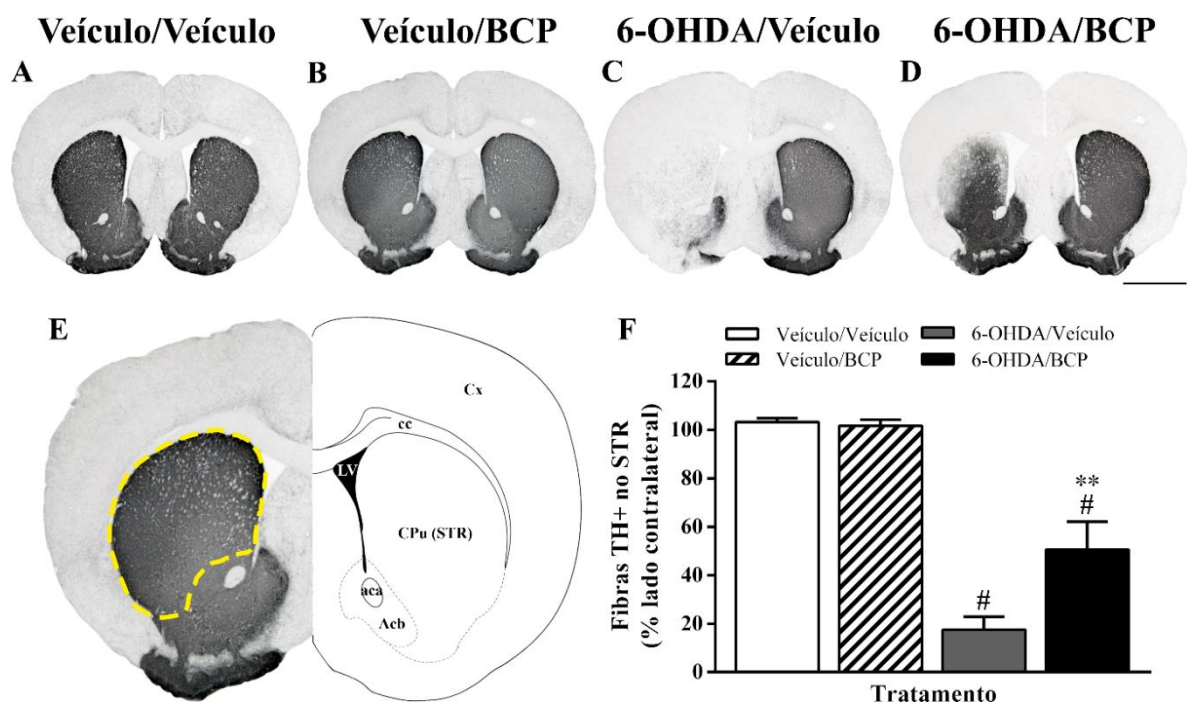


Figura 11: Análise de densidade óptica dos terminais TH⁺ no STR. (**A-D**) Secções coronais representativas (14,1x) de cada grupo. (**E**) Secção coronal evidenciando a área utilizada para quantificação de densidade óptica do STR (à esquerda) e desenho baseado no atlas de estereotaxia com delimitações das principais estruturas que foram utilizadas como parâmetros para delimitações do STR (à direita). (**F**) Representação quantitativa de densidade óptica do STR em relação ao hemisfério contralateral; # $p < 0,001$ vs Veículo/Veículo e Veículo/BCP; ** $p < 0,01$ vs 6-OHDA/Veículo. Escala: 1 mm (A-D). ANOVA *One Way*, pós-teste de *Tukey*. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 4, Veículo/BCP N = 4, 6-OHDA/Veículo N = 8 e 6-OHDA/BCP N = 9. Acb = núcleo acumbens; aca = comissura anterior; cc = corpo caloso; CPu (STR) = caudato putâmen (estriado); Cx = córtex cerebral; LV = ventrículo lateral.

Os resultados sugerem que o tratamento com BCP atenuou a perda de fibras TH⁺ no STR do grupo 6-OHDA/Veículo. Por outro lado, o mesmo tratamento não alterou a densidade de projeções dopaminérgicas do STR no grupo injetado somente com solução veículo.

Os valores exatos de média, erro padrão e significâncias obtidas encontram-se na seção de apêndices (**Quadro 6**) ao final do trabalho.

4.2.2. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE NEURÔNIOS NA SNpc

As análises quantitativas de neurônios foram realizadas por estereologia, onde quantificamos o número total de neurônios TH⁺ presentes na SNpc. As fotomicrografias representativas do mesencéfalo (**Figura 12A-D**) e SNpc (**Figura 12E-H**) de cada grupo demonstram visivelmente perda neuronal no grupo 6-OHDA/Veículo e considerável preservação de neurônios no grupo 6-OHDA/BCP em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP (**Figura 12I-L**).

As estimativas do número de neurônios TH⁺ na SNpc demonstraram que o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou diminuição de 54,7 e 59,2% em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP, respectivamente. Também encontramos diminuição de 25,5% no número de neurônios no grupo 6-OHDA/BCP em relação ao grupo Veículo/BCP. Entretanto, o grupo 6-OHDA/BCP apresentou 33,7% de neurônios a mais que o grupo 6-OHDA/Veículo (**Figura 12M**).

Tais evidências demonstraram que não houve alteração na quantidade de neurônios nos grupos injetados com solução veículo e que o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou perda acentuada na quantidade de neurônios na SNpc. Em contrapartida, o grupo injetado com 6-OHDA e tratado com BCP apresentou uma perda de neurônios menor que o grupo não tratado, evidenciando um efeito neuroprotetor do tratamento com BCP.

Os valores exatos de média, erro padrão e significâncias obtidas encontram-se na seção de apêndices (**Quadro 7**) ao final do trabalho.

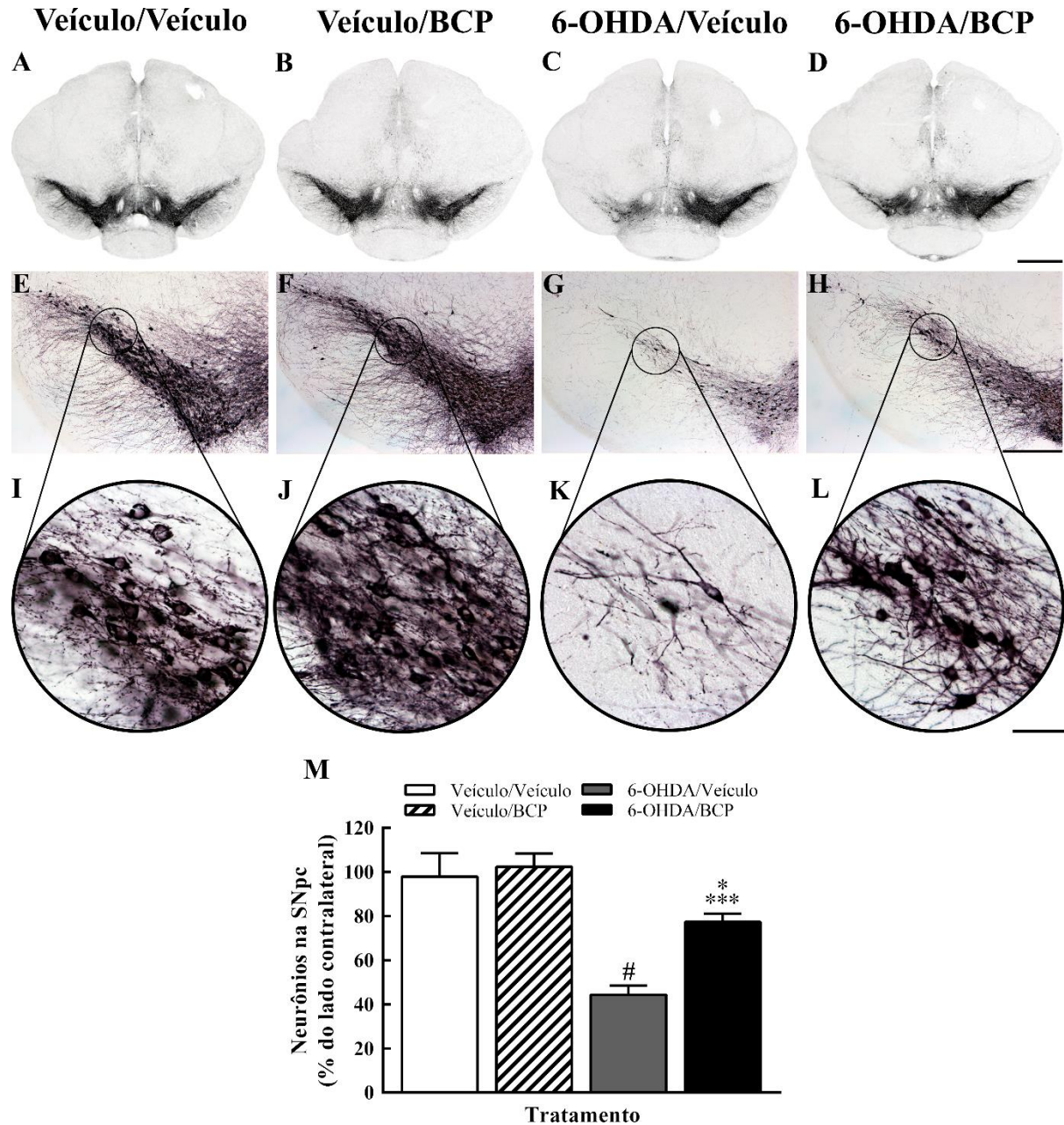


Figura 12: Análise sistemática e aleatória do número de neurônios TH+ na SNpc por estereologia. (A-D) Secções coronais representativas (14,1x) de cada grupo experimental. (E-H) Representações da SNpc (2x) de cada grupo. (I-L) Ampliação da SNpc (40x) evidenciando a quantidade de pericários e suas ramificações na SNpc em cada grupo. (M) Representação quantitativa do número de neurônios remanescentes na SNpc; # $p < 0,001$ vs Veículo/Veículo e Veículo/BCP; * $p < 0,05$ vs Veículo/BCP; *** $p < 0,0001$ vs 6-OHDA/Veículo. Escalas: 500 μm (A-D); 100 μm (E-H); 40 μm (I-L). ANOVA *One Way*, pós-teste de *Tukey*. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 4, Veículo/BCP N = 5, 6-OHDA/Veículo N = 8 e 6-OHDA/BCP N = 9.

Assim, as análises de densitometria dos terminais dopaminérgicos do STR e de estimativas por estereologia do número de neurônios remanescentes na SNpc demonstram que o tratamento com BCP foi eficaz em proteger a via nigroestriatal após injeções de 6-OHDA.

4.2.3. ESTIMATIVA DO NÚMERO DE MICRÓGLIAS NA SNpc

A quantificação de micróglia foi realizada utilizando-se o método da estereologia em secções imunomarcadas para detecção de IBA-1. Fotomicrografias de secções representativas contendo células microgliais na SNpc de cada grupo estão ilustradas na **Figura 13A-D**, onde podemos observar elevada quantidade de micróglia no grupo 6-OHDA/Veículo em relação aos demais grupos. Diferenças morfológicas de micróglia estão representadas em maior aumento na **Figura 13E-H**.

As estimativas por estereologia do número micróglia na SNpc evidenciaram que o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou aumento de 39,6 e 54,3% em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP, respectivamente. Entretanto, o grupo 6-OHDA/BCP demonstrou redução 34% na expressão microglial em relação ao grupo 6-OHDA/Veículo (**Figura 13I**).

Tais evidências demonstram que injeções de 6-OHDA intraestriatais foram capazes de induzir aumento significativo de micróglia na SNpc, sendo uma característica de processos neuroinflamatórios presentes da DP. Por outro lado, o tratamento com BCP foi capaz de atenuar a ativação microglial, demonstrando efeito anti-inflamatório do BCP frente à neurotoxicidade induzida por 6-OHDA.

Os valores exatos de média, erro padrão e significâncias obtidas encontram-se na seção de apêndices (**Quadro 8**) ao final do trabalho.

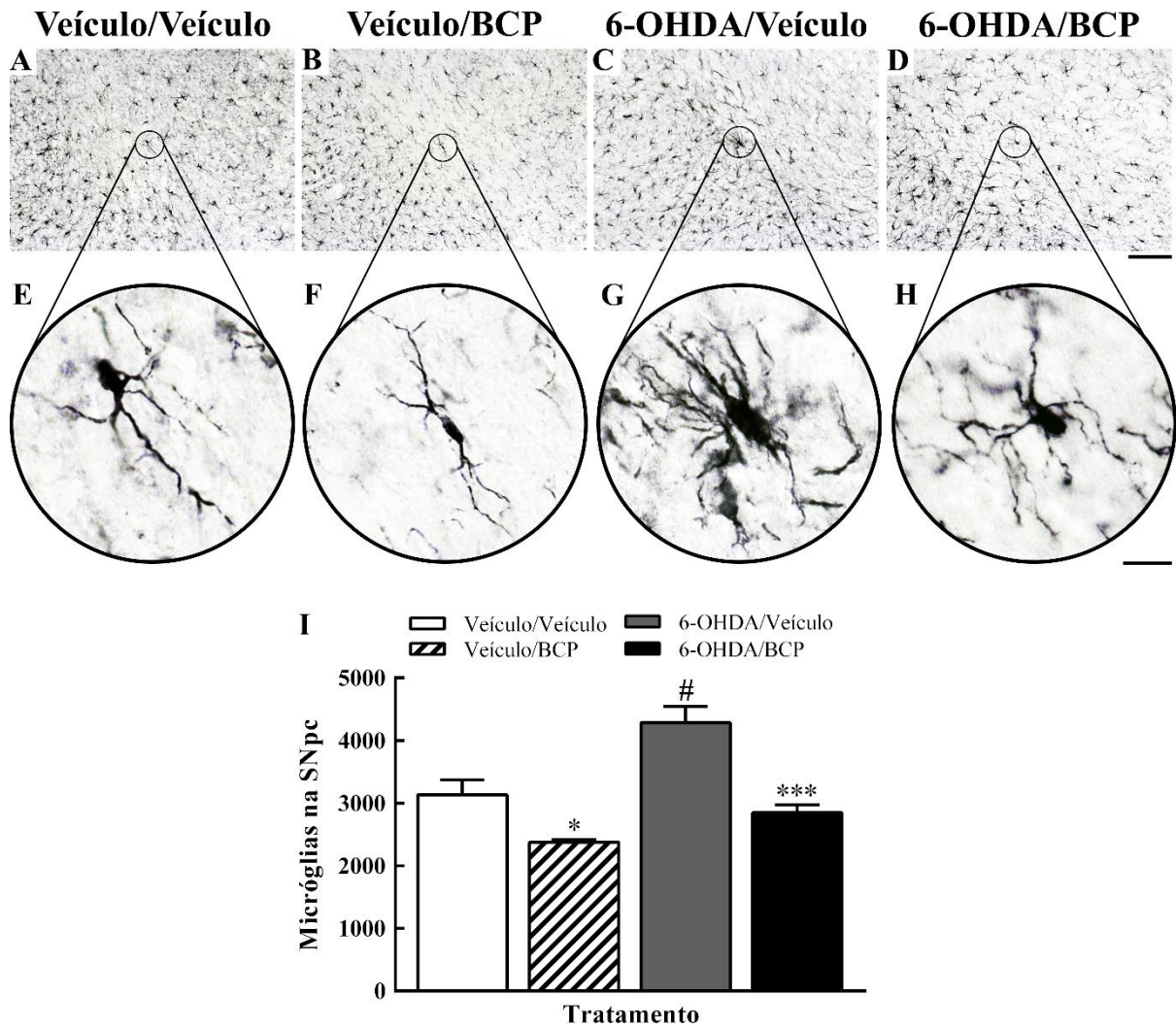


Figura 13: Análise sistemática e aleatória do número de micróglia na SNpc por estereologia. **(A-D)** Representação da distribuição de micróglia na SNpc (2x) de cada grupo. **(E-H)** Ampliação de micróglia da SNpc (100x) evidenciando a morfologia microglial para cada grupo. **(I)** Representação quantitativa de micróglia na SNpc; * $p < 0,05$ vs Veículo/Veículo; # $p < 0,001$ vs Veículo/Veículo e Veículo/BCP; *** $p < 0,001$ vs 6-OHDA/Veículo. Escalas: 30 μm (A-D); 20 μm (E-H). ANOVA *One Way*, pós-teste de *Tukey*. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 4, Veículo/BCP N = 4, 6-OHDA/Veículo N = 8 e 6-OHDA/BCP N = 9.

4.3. ANÁLISE BIOQUÍMICA

4.3.1. CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL CONTRA RADICAIS PEROXIL

As atividades antioxidantes totais do STR e do MES foram mensuradas através do produto da reação de homogeneizados das amostras expostas a radicais peroxil e a fluorescência obtida foi utilizada para inferirmos a capacidade antioxidante.

Ao avaliarmos a capacidade antioxidante da região estriatal (STR) e mesencefálica (MES), observamos que não houve diferença na capacidade antioxidante total na comparação entre os grupos (**Figura 14A-B**).

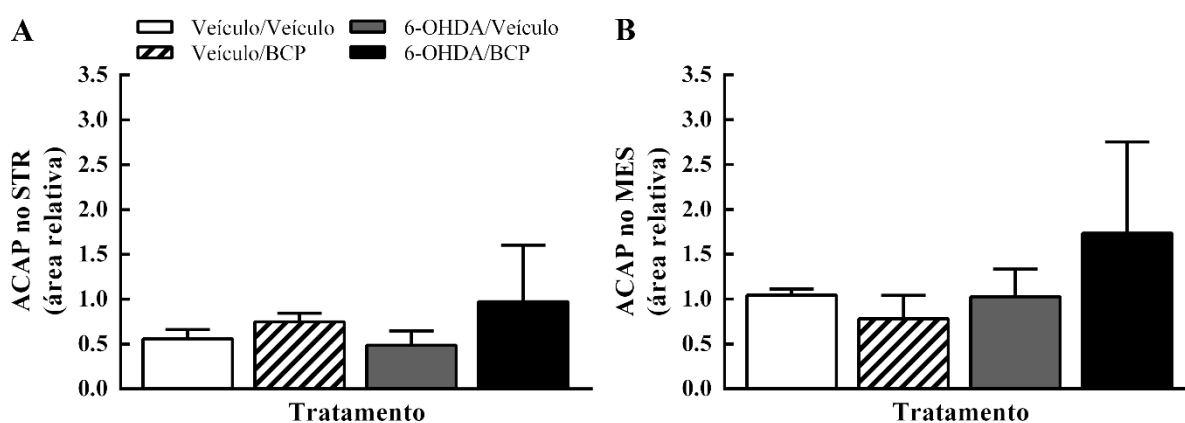


Figura 14: Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP). (A) ACAP da região estriatal (STR). (B) ACAP da região mesencefálica (MES). ANOVA *One Way*, pós-teste de *Tukey*. Todos os dados estão representados como média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 3, Veículo/BCP N = 4, 6-OHDA/Veículo N = 4 e 6-OHDA/BCP N = 4.

Os resultados dos ensaios bioquímicos descritos acima demonstraram que o tratamento com BCP não foi capaz de alterar a capacidade antioxidante total.

Os valores exatos de média, erro padrão e significâncias obtidas encontram-se na seção de apêndices (**Quadro 9**) ao final do trabalho.

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, testamos pela primeira vez a hipótese de que o tratamento com o beta-cariofileno (BCP), fitocanabinóide alimentar e não-psicotrópico, poderia exercer funções neuroprotetoras em modelo murino de DP induzido por 6-OHDA. Para tal, investigamos os efeitos do tratamento com BCP sobre o grau de degeneração da via nigroestriatal e a capacidade motora, além de investigarmos as alterações morfológicas da SNpc e a atividade antioxidante do estriado e mesencéfalo.

O BCP é um agonista seletivo e não psicoativo do receptor endocanabinóide tipo II (CB2R) (GERTSCH *et al.*, 2008). Recentemente, a ativação dos CB2R pelo BCP tem sido utilizada como alvos terapêuticos em diferentes modelos de neuropatologias experimentais, evidenciando efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores (JAVED *et al.*, 2016; VIVEROS-PAREDES *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017; VARGA *et al.*, 2018), além de efeitos sobre o comportamento semelhante ao de ansiedade e depressão que também foram evidenciados (AL MANSOURI *et al.*, 2014; BAHI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2017).

Dessa forma, vimos que o tratamento com BCP foi capaz de proteger a via nigroestriatal frente à toxicidade induzida pela 6-OHDA, onde o comportamento rotacional induzido farmacologicamente foi reduzido, assim como melhorou o desempenho motor, protegeu neurônios na SNpc e fibras TH⁺ no STR, e diminuiu a ativação de células microgлияis na SNpc. Contudo não foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante total do STR e MES.

O modelo de lesão da via nigroestriatal por 6-OHDA é comumente utilizado acerca da neuropatologia envolvida na DP, como alterações moleculares, celulares e comportamentais. Assim, utilizamos injeções intraestriatais de 6-OHDA por apresentar baixa taxa de mortalidade e possuir um curso de degeneração gradativo e retrógrado, sendo possível testar intervenções terapêuticas, na medida em que a morte neuronal e ativação glial ocorrem de maneira gradativa (ALVAREZ-FISCHER *et al.*, 2008; HEUER *et al.*, 2012; STOTT e BARKER, 2014).

Ao avaliarmos quantitativamente o grau de degeneração da via nigroestriatal ocasionado pela 6-OHDA através do teste de rotações induzidas por apomorfina, vimos que o grupo tratado com BCP apresentou redução significativa no número de rotações contralaterais, comportamento sugestivo de efeito neuroprotetor sobre as terminações dopaminérgicas estriatais.

Após o início da degeneração dopaminérgica provocada pela 6-OHDA, os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos do STR ficam hipersensibilizados em relação ao lado intacto e com a administração sistêmica de apomorfina, que é um agonista dopaminérgico, há a ativação dos respectivos receptores gerando uma resposta neurofisiológica semelhante à da dopamina, que por sua vez estimula vias motoras e culmina no comportamento rotacional involuntário contralateral à lesão (SCHWARTING e HUSTON, 1996b). A medida que a neurodegeneração progrediu e a homeostasia neural foi comprometida em nosso modelo, a resposta comportamental rotacional foi exacerbada. Contudo, ao inserimos o tratamento com BCP houve melhora no desempenho motor constatado pela importante redução no número de rotações contralaterais à lesão.

Tal evidência é de fundamental importância para o tratamento dos sintomas motores da DP, afinal a forma de tratamento “padrão-ouro” é baseada na reposição de dopamina no STR através da L-DOPA, que necessita das terminações dopaminérgicas intactas para que seja convertida em dopamina e exerça suas funções farmacológicas. Contudo, o progresso da neurodegeneração da via nigroestriatal inviabiliza a conversão da L-DOPA em dopamina, comprometendo o tratamento e levando o paciente a um estado irreversível de discinesia (PEZZOLI e ZINI, 2010). Considerando que o BCP foi capaz de minimizar o grau de degeneração estriatal provocado pela 6-OHDA, sugerimos que o BCP possa ser utilizado como adjuvante no tratamento com L-DOPA, com o objetivo de proteger as aferências dopaminérgicas estriatais, o que otimizaria e prolongaria a janela temporal para o tratamento com L-DOPA.

Considerando que houve proteção das fibras estriatais dopaminérgicas averiguadas farmacologicamente a partir do comportamento rotacional estereotipado induzido por apomorfina, hipotetizamos que o tratamento com BCP também melhorou a capacidade motora no teste de campo aberto.

O teste de campo aberto é amplamente utilizado para avaliação de uma variedade de comportamentos como a capacidade motora, ansiedade e memória, onde as variáveis podem ser coletadas e relacionadas a comportamentos característicos em diferentes neuropatologias (SEIBENHENER e WOOTEN, 2015). Levando em consideração as características intrínsecas do teste, avaliamos os principais parâmetros como distância percorrida, velocidade média e tempo de imobilidade.

Através dessas investigações, vimos que o grupo 6-OHDA/Veículo percorreu menores distâncias, assim como demonstrou menor velocidade de ambulação e, conseqüentemente, passou mais tempo imóvel. Entretanto, o tratamento com BCP promoveu maior capacidade exploratória nos grupos tratados com o fitocanabinóide (6-OHDA/BCP), visto que percorreram maiores distâncias e com maiores velocidades, além de passarem menos tempo imóvel.

Esses parâmetros foram avaliados devido às suas relações com vias distintas dos núcleos da base e por serem afetadas pelo comprometimento da via nigroestriatal (SCHWARTING e HUSTON, 1996b; BOLAM *et al.*, 2000). Logo, a motricidade avaliada pelo teste de campo aberto em nosso modelo experimental é coordenada por regiões dorsolaterais do estriado, que recebem aferências dopaminérgicas da SNpc, região onde o corre neurodegeneração na DP e está intimamente relacionada aos sintomas motores (BOLAM *et al.*, 2000).

Para comprovarmos que o comprometimento motor encontrado nos testes comportamentais é dependente do comprometimento da via nigroestriatal, averiguamos a densidade óptica das aferências dopaminérgicas estriatais e quantificamos o número de neurônios na SNpc por estereologia. À medida em que a densidade de aferências dopaminérgicas estriatais são diretamente impactadas pela administração de 6-OHDA intraestriatal e estão intimamente relacionadas ao desempenho motor (CARLSSON *et al.*, 2011; HEUER *et al.*, 2012), nossos resultados suportam a hipótese de que o tratamento com BCP foi capaz de proteger as aferências dopaminérgicas no estriado e, conseqüentemente, protegeu os neurônios presentes na SNpc. Tomadas em conjunto, essas evidências demonstram que o BCP preservou a via nigroestriatal, que culminou na melhoria do desempenho motor observados nos testes comportamentais.

Tomadas em conjunto, os efeitos oriundos dos testes comportamentais e análises morfológicas através das marcações para TH são devidos à ativação dos CB2R pelo BCP e que estão distribuídos em diferentes regiões encefálicas, incluindo os núcleos da base (LANCIEGO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014; SIERRA *et al.*, 2015; ALBERTI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017) e a ativação desses receptores é capaz de modular parâmetros comportamentais (AL MANSOURI *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014).

Os efeitos neuroprotetores do BCP sobre os CB2R foi investigado em roedores que foram intoxicados sistemicamente com rotenona ou MPTP e foram tratados com BCP. O tratamento com BCP foi capaz de melhorar a capacidade motora dos animais, assim como

protegeu neurônios na SNpc, reduziu a expressão de células gliais e citocinas pró-inflamatórias, fatores inerentes na DP. Todos esses efeitos foram revertidos quando foi administrado um antagonista de CB2R, evidenciando que os efeitos neuroprotetores observados foram devido a interação do BCP com os CB2R (JAVED *et al.*, 2016; VIVEROS-PAREDES *et al.*, 2017). Dessa forma, acreditamos que a melhora no desempenho motor e proteção de neurônios TH⁺ na SNpc foi devido à ativação dos CB2R pelo BCP, embora não tenhamos feito o tratamento com um fármaco antagonista de CB2R.

Outra característica encontrada na DP é a neuroinflamação e está intimamente associada a danos neuronais através de mecanismos como ativação glial (micróglia e astrócitos) e estresse oxidativo exacerbado. (LEE *et al.*, 2019). As micróglia são tidas como sensores de neuropatologias, onde alterações na homeostasia neural são capazes de ativar e recrutar essas células, além de modificar sua morfologia e receptores de membrana (PERRY *et al.*, 2010).

Gomez-Galvez e colaboradores (2016) mostraram que a ativação microglial em camundongos induzida por lipopolissacarídeo (LPS) está intimamente relacionada com o aumento na expressão de CB2R. Além disso, as análises histopatológicas do mesencéfalo *post mortem* de pacientes com DP mostraram que os CB2R também são expressos na SNpc, assim como a presença de ativação microglial (células IBA-1 positivas) e infiltração de macrófagos periféricos (células CD68 positivas).

Nossos resultados demonstraram que a administração de 6-OHDA intraestriatal ocasionou uma robusta resposta microglial na SNpc, assim como descrito em trabalhos anteriores que utilizaram o mesmo modelo experimental (VIRGONE-CARLOTTA *et al.*, 2013; STOTT e BARKER, 2014), evidenciando uma das características neuropatológicas intrínsecas da DP (TEISMANN *et al.*, 2003).

A 6-OHDA desencadeia processos neuroinflamatórios através de ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), que por sua vez desencadeia a transcrição de diversos fatores, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), ciclo-oxigenase 2 (COX-2), interleucina 1-beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Tomados em conjunto esses fatores são responsáveis pela ativação microglial, culminando nos processos neuroinflamatórios, que ocasionam danos à homeostasia neuronal (CEBRIAN *et al.*, 2015). Ao inserirmos o tratamento com o BCP, vimos que houve drástica redução na quantidade de micróglia na SNpc, assim como não observamos alterações na morfologia dessas células. Tais evidências sugerem que o BCP atuou sobre os CB2R presentes nas células microgliais e foi

capaz de inibir a ativação de NF- κ B, modulando a transcrição de fatores pró-inflamatórios (FERNANDEZ-RUIZ *et al.*, 2015).

Contudo, o efeito anti-inflamatório observado pela administração de BCP também pode ter sido independente de CB2R, onde a ativação de receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) podem estar envolvidos na regulação da sinalização de NF- κ B (STAHHEL *et al.*, 2008; FIDALEO *et al.*, 2014), portanto o BCP poderia controlar as respostas inflamatórias por, pelo menos, dois mecanismos moleculares distintos que dependam ou não de CB2R (FERNANDEZ-RUIZ *et al.*, 2015).

Dessa forma, vimos que o BCP diminuiu a ativação microglial e manteve a morfologia de micróglia residentes na SNpc, similares aos grupos não-injetados com 6-OHDA, evidenciando o efeito anti-inflamatório promovido pela administração de BCP. Entretanto, é de fundamental importância investigarmos as duas principais vias envolvidas nos processos neuroinflamatórios, a fim de elucidarmos os mecanismos desencadeados pelo BCP no modelo de DP induzido por 6-OHDA.

A oxidação de 6-OHDA produz altas concentrações de EROs, ocasionando em estresse oxidativo e disfunções mitocondriais (CEBRIAN *et al.*, 2015), que culminam em morte neuronal. Considerando esse paradigma, avaliamos a resposta antioxidante do encéfalo (estriado e mesencéfalo) frente a exposição a um agente pró-oxidante seguida de emissão de fluorescência. Assim, esse ensaio bioquímico nos permitiu quantificar a resposta antioxidante do encéfalo, onde a emissão de fluorescência é diretamente proporcional ao dano oxidativo (AMADO *et al.*, 2009).

Dessa forma, vimos que o BCP não foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante total. Entretanto, ainda é necessário investigarmos com mais detalhes as enzimas envolvidas nos processos antioxidantes, afinal focamos em analisar a atividade antioxidante total em detrimento das investigações de enzimas específicas como catalase (CAT) e glutathione.

6. CONCLUSÕES

As evidências do presente trabalho sugerem que o tratamento com o BCP frente à neurodegeneração unilateral induzida por 6-OHDA:

- Reduziu o número de rotações contralaterais à lesão;
- Melhorou o desempenho motor de animais injetados com 6-OHDA;
- Protegeu as fibras dopaminérgicas estriatais;
- Protegeu neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc;
- Diminuiu a ativação microglial na SNpc;
- Não alterou a capacidade antioxidante total.

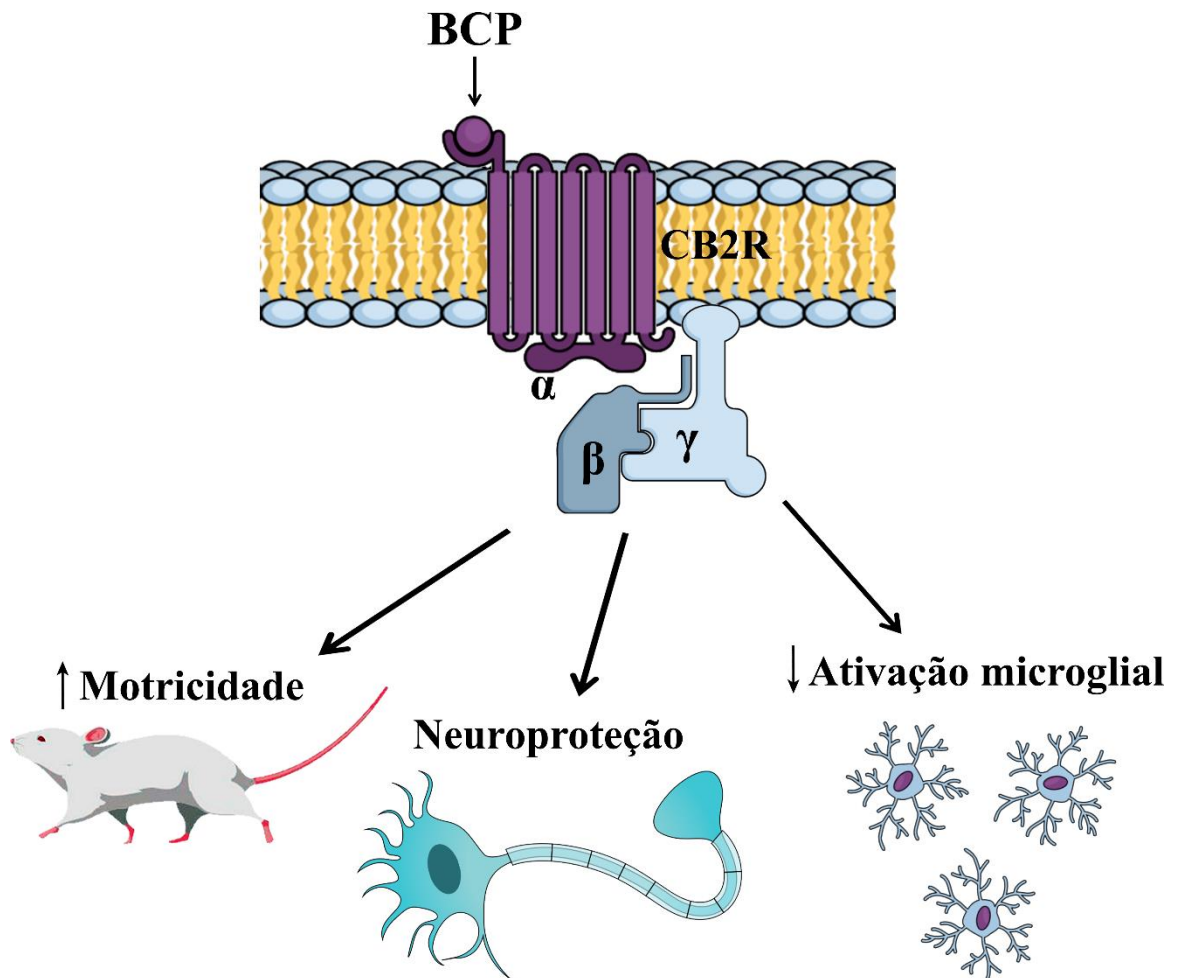


Figura 15: Representação esquemática dos efeitos promovidos pelo BCP através de CB2R

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSLAND, D. et al. Cognitive decline in Parkinson disease. **Nature reviews Neurology**, v. 13, n. 4, p. 217-231, 2017.

AL MANSOURI, S. et al. The cannabinoid receptor 2 agonist, beta-caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 124, p. 260-268, 2014.

ALBERTI, T. B. et al. (-)-beta-Caryophyllene, a CB2 Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 4, 2017.

ALVAREZ-FISCHER, D. et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. **Exp Neurol**, v. 210, n. 1, p. 182-193, 2008.

AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. **The Science of the total environment**, v. 407, n. 6, p. 2115-2123, 2009.

BAHI, A. et al. beta-Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & behavior**, v. 135, p. 119-124, 2014.

BETARBET, R. et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1301-1306, 2000.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS J**, v. 279, n. 7, p. 1156-1166, 2012.

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

BLESA, J. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in neuroanatomy**, v. 9, p. 91, 2015.

BOLAM, J. P. et al. Synaptic organisation of the basal ganglia. **Journal of anatomy**, v. 196 (Pt 4), p. 527-542, 2000.

BOVE, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, 2012.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of aging**, v. 24, n. 2, p. 197-211, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CARLSSON, T. et al. Systemic administration of neuregulin-1beta1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 117, n. 6, p. 1066-1074, 2011.

CEBRIAN, C.; LOIKE, J. D.; SULZER, D. Neuroinflammation in Parkinson's disease animal models: a cell stress response or a step in neurodegeneration? **Current topics in behavioral neurosciences**, v. 22, p. 237-270, 2015.

CHOI, W. S. et al. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. **Journal of neuroscience research**, v. 57, n. 1, p. 86-94, 1999.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, 2003.

DI MARZO, V. Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? **Nature reviews Drug discovery**, v. 7, n. 5, p. 438-455, 2008.

FERNANDEZ-RUIZ, J.; ROMERO, J.; RAMOS, J. A. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. **Handbook of experimental pharmacology**, v. 231, p. 233-259, 2015.

FIDALEO, M. et al. Neuroprotective properties of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and its lipid ligands. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 24, p. 2803-2821, 2014.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GOMEZ-GALVEZ, Y. et al. Potential of the cannabinoid CB(2) receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 64, p. 200-208, 2016.

GUIMARAES-SANTOS, A. et al. Copaiba oil-resin treatment is neuroprotective and reduces neutrophil recruitment and microglia activation after motor cortex excitotoxic injury. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2012, p. 918174, 2012.

GUNDERSEN, H. J. et al. The efficiency of systematic sampling in stereology--reconsidered. **Journal of microscopy**, v. 193, n. Pt 3, p. 199-211, 1999.

HEUER, A. et al. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 1, p. 30-43, 2012.

HOGLINGER, G. U. et al. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. **Acta neuropathologica**, v. 130, n. 3, p. 333-348, 2015.

HOGLINGER, G. U. et al. Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. **Journal of neurochemistry**, v. 86, n. 5, p. 1297-1307, 2003.

HOGLINGER, G. U.; OERTEL, W. H.; HIRSCH, E. C. The rotenone model of parkinsonism--the five years inspection. **Journal of neural transmission Supplementum**, n. 70, p. 269-272, 2006.

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

IM, H. J. et al. Disrupted brain metabolic connectivity in a 6-OHDA-induced mouse model of Parkinson's disease examined using persistent homology-based analysis. **Scientific reports**, v. 6, p. 33875, 2016.

JAVED, H. et al. Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone Model of Parkinson's Disease. **Front Neurosci**, v. 10, p. 321, 2016.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp Neurobiol**, v. 24, n. 4, p. 325-340, 2015.

LANCIEGO, J. L. et al. Expression of the mRNA coding the cannabinoid receptor 2 in the pallidal complex of *Macaca fascicularis*. **Journal of psychopharmacology**, v. 25, n. 1, p. 97-104, 2011.

LANE, E. L. L-DOPA for Parkinson's disease-a bittersweet pill. **Eur J Neurosci**, v. 49, n. 3, p. 384-398, 2019.

LANGSTON, J. W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Ann Neurol**, v. 59, n. 4, p. 591-596, 2006.

LANGSTON, J. W. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 979-980, 1983.

LEE, Y. et al. Significant roles of neuroinflammation in Parkinson's disease: therapeutic targets for PD prevention. **Archives of pharmacal research**, v. 42, n. 5, p. 416-425, 2019.

LI, Y.; KIM, J. Neuronal expression of CB2 cannabinoid receptor mRNAs in the mouse hippocampus. **Neuroscience**, v. 311, p. 253-267, 2015.

LIU, Q. R. et al. Cannabinoid type 2 receptors in dopamine neurons inhibits psychomotor behaviors, alters anxiety, depression and alcohol preference. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 17410, 2017.

MERCURI, N. B.; BERNARDI, G. The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? **Trends in pharmacological sciences**, v. 26, n. 7, p. 341-344, 2005.

MICHEL, P. P.; HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 675-691, 2016.

MORALES, P.; HURST, D. P.; REGGIO, P. H. Molecular Targets of the Phytocannabinoids: A Complex Picture. **Progress in the chemistry of organic natural products**, v. 103, p. 103-131, 2017.

OJHA, S. et al. beta-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Mol Cell Biochem**, v. 418, n. 1-2, p. 59-70, 2016.

PARKINSON, J. An essay on he shaking palsy. Sherwood, London, 1817.

PALAZUELOS, J. et al. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. **Brain**, v. 132, n. Pt 11, p. 3152-3164, 2009.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2nd. San Diego: Academic Press, 2001. ISBN a012547637X (deluxe ed. alk. paper)

0125476361 (spiral bound alk. paper).

PERRY, V. H.; NICOLL, J. A.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature reviews Neurology**, v. 6, n. 4, p. 193-201, 2010.

PEZZOLI, G.; ZINI, M. Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future. **Expert Opin Pharmacother**, v. 11, n. 4, p. 627-635, 2010.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, p. 17013, 2017.

POSTUMA, R. B.; BERG, D. Advances in markers of prodromal Parkinson disease. **Nature reviews Neurology**, v. 12, n. 11, p. 622-634, 2016.

PRICE, D. A. et al. WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 29, n. 11, p. 2177-2186, 2009.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature reviews Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 251-259, 2017.

RAMIREZ, B. G. et al. Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. **J Neurosci**, v. 25, n. 8, p. 1904-1913, 2005.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777-783, 2016.

RIBEIRO, R. P. et al. Probenecol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochemical research**, v. 38, n. 3, p. 660-668, 2013.

ROCHA, E. M.; DE MIRANDA, B.; SANDERS, L. H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 109, n. Pt B, p. 249-257, 2018.

RUSSO, E. B. Beyond Cannabis: Plants and the Endocannabinoid System. **Trends in pharmacological sciences**, v. 37, n. 7, p. 594-605, 2016.

SAGREDO, O. et al. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity: relevance for Huntington's disease. **Glia**, v. 57, n. 11, p. 1154-1167, 2009.

SANTOS, N. A. et al. The cannabinoid beta-caryophyllene (BCP) induces neuritogenesis in PC12 cells by a cannabinoid-receptor-independent mechanism. **Chemico-biological interactions**, v. 261, p. 86-95, 2017.

SAUER, H.; OERTEL, W. H. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. **Neuroscience**, v. 59, n. 2, p. 401-415, 1994.

SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature reviews Neuroscience**, v. 18, n. 8, p. 509, 2017.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell and tissue research**, v. 318, n. 1, p. 215-224, 2004.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 2-3, p. 275-331, 1996a.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Progress in neurobiology**, v. 49, n. 3, p. 215-266, 1996b.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 96, p. e52434, 2015.

SHU, S. Y.; JU, G.; FAN, L. Z. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. **Neuroscience letters**, v. 85, n. 2, p. 169-171, 1988.

SIERRA, S. et al. Detection of cannabinoid receptors CB1 and CB2 within basal ganglia output neurons in macaques: changes following experimental parkinsonism. **Brain structure & function**, v. 220, n. 5, p. 2721-2738, 2015.

SIQUEIRA-MENDES, F. Influência da atividade mastigatória e do ambiente sobre o aprendizado espacial e o padrão da atividade exploratória em modelo murino senil. [s.I.] Universidade Federal do Pará, 2014.

STAHEL, P. F. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors: "key" regulators of neuroinflammation after traumatic brain injury. **PPAR research**, v. 2008, p. 538141, 2008.

STAYTE, S. et al. Activin A protects midbrain neurons in the 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0124325, 2015.

STOTT, S. R.; BARKER, R. A. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 39, n. 6, p. 1042-1056, 2014.

TEISMANN, P. et al. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 18, n. 2, p. 121-129, 2003.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European journal of pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107-110, 1968.

UNGERSTEDT, U. 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. **Pharmacology & therapeutics Part B: General & systematic pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1976.

VARGA, Z. V. et al. beta-Caryophyllene protects against alcoholic steatohepatitis by attenuating inflammation and metabolic dysregulation in mice. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 320-334, 2018.

VEIGA JUNIOR, V. F. et al. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne--a comparative study. **J Ethnopharmacol**, v. 112, n. 2, p. 248-254, 2007.

VIRGONE-CARLOTTA, A. et al. Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease. **Glia**, v. 61, n. 10, p. 1645-1658, 2013.

VIVEROS-PAREDES, J. M. et al. Neuroprotective Effects of beta-Caryophyllene against Dopaminergic Neuron Injury in a Murine Model of Parkinson's Disease Induced by MPTP. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 3, 2017.

WEST, M. J. Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. **Trends in neurosciences**, v. 22, n. 2, p. 51-61, 1999.

WEST, M. J. Design-based stereological methods for counting neurons. **Progress in brain research**, v. 135, p. 43-51, 2002.

WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **The Anatomical record**, v. 231, n. 4, p. 482-497, 1991.

WHITFIELD, A. C.; MOORE, B. T.; DANIELS, R. N. Classics in chemical neuroscience: levodopa. **ACS chemical neuroscience**, v. 5, n. 12, p. 1192-1197, 2014.

WONG, Y. C.; KRAINIC, D. alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. **Nature medicine**, v. 23, n. 2, p. 1-13, 2017.

YANG, M. et al. Neuroprotective Effect of beta-Caryophyllene on Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of Necroptotic Neuronal Death and Inflammation: In Vivo and in Vitro. **Front Neurosci**, v. 11, p. 583, 2017.

ZHANG, H. Y. et al. Cannabinoid CB2 receptors modulate midbrain dopamine neuronal activity and dopamine-related behavior in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 46, p. E5007-5015, 2014.

APÊNDICES

Quadro 1: Anticorpos, tipos de tampões e variações de cromógenos empregados nas imunomarcações.

Antígeno	Tampão de lavagem, repetições e tempo	Tampão e tempo de incubação em anticorpo primário	Tampão e tempo de incubação em anticorpo secundário	Cromógeno
Tirosina hidroxilase (TH)	Tampão fosfato (TF) 0,1 M; 3 repetições de 5 minutos.	TF 0.1 M; 24 horas	TF 0.1 M; 2 horas	DAB-Níquel-Glicose oxidase*
Núcleo neuronal (NeuN)	Tampão fosfato (TF) 0,1 M; 3 repetições de 5 minutos.	TF 0.1 M; 24 horas	TF 0.1 M; 2 horas	DAB 0,05% + H ₂ O ₂ 0,3%
Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (IBA-1)	TRIS 0,1 M-NaCl 0,9%; 3 repetições de 2 minutos.	TRIS 0.1 M; 72 horas	TRIS 0.1 M; 12 horas	DAB-Níquel-Glicose oxidase*

* Método de revelação imunistoquímica descrito por (SHU *et al.*, 1988).

Quadro 2: Sequência de desidratação e diafanização de secções montadas em lâminas gelatinizadas.

Desidratação e diafanização de secções	
Etanol (ETOH) 90% ETOH 70% ETOH 50% Água destilada ETOH 70% ETOH 90% ETOH 100% I ETOH 100% II ETOH/Xileno (1:1) Xileno I Xileno II	3 minutos em cada cubeta.
Ao término da sequência acima, as lâminas foram seladas com <i>Entellan</i> [®] (Merck [©]).	

Quadro 3: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do teste de rotações induzidas por apomorfina.

Teste de rotações induzidas por apomorfina (rotações por minuto): média ± erro-padrão		
Grupos		
Semanas	6-OHDA/Veículo	6-OHDA/BCP
2	10,23 ± 1,028	4,115 ± 0,07283 ^{***}
4	12,47 ± 1,403	3,365 ± 1,023 ^{***}

(***) indica diferenças significativas com o grupo 6-OHDA/Veículo em 4 semanas após injeções intraestriatais.

Quadro 4: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão dos parâmetros avaliados no teste do campo aberto.

Campo aberto: média ± erro-padrão				
Grupos				
Parâmetro	Veículo/Veículo	Veículo/BCP	6-OHDA/Veículo	6-OHDA/BCP
Distância percorrida (cm)	639,1 ± 129,5	1010 ± 97,37*	334,7 ± 62,7***	671,8 ± 98,62**
Velocidade média (cm/s)	2,314 ± 0,4211	3,367 ± 0,3279	1,108 ± 0,2083***	2,238 ± 0,33*
Tempo imóvel (s)	108,6 ± 25,92	49,39 ± 9,778	171,1 ± 19,81***	87,55 ± 16,32**

Distância percorrida (cm): * indica diferença significativa no grupo Veículo/Veículo; ** indica diferenças significativas entre os grupos 6-OHDA/Veículo e Veículo/BCP; *** indica diferenças significativas entre os grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP.

Quadro 5: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão dos índices de contraste do tempo no teste de campo aberto.

Índices de contraste (%): média ± erro-padrão				
Grupos				
Parâmetro	Veículo/Veículo	Veículo/BCP	6-OHDA/Veículo	6-OHDA/BCP
Tempo na periferia (s)	67,72 ± 9,598	31,12 ± 7,191*	77,65 ± 6,250***	40,31 ± 8,254**
Distância na periferia (cm)	50,23 ± 9,921	14,60 ± 5,749**	62,18 ± 8,839**	22,92 ± 12,75***

Tempo preferencial na periferia (%): * indica diferença significativa entre o grupo Veículo/Veículo; *** indica diferença significativa entre o grupo Veículo/BCP; ** indica diferença significativa entre o grupo 6-OHDA/Veículo. Distância preferencial na periferia (%): ** indica diferença significativa entre o grupo Veículo/Veículo; * indica diferença significativa entre o grupo Veículo/BCP; *** indica diferença significativa entre o grupo 6-OHDA/Veículo.

Quadro 6: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão de densitometria óptica do estriado.

Densidade óptica do STR (% do lado contralateral): média ± erro-padrão			
Grupos			
Veículo/Veículo	Veículo/BCP	6-OHDA/Veículo	6-OHDA/BCP
103,3 ± 1,536	101,7 ± 2,553	17,52 ± 5,364 [#]	50,52 ± 11,64**

([#]) indica diferenças significativas em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP; (**) indica diferença significativa entre o grupo 6-OHDA/Veículo.

Quadro 7: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do número de neurônios presentes na SNpc.

Neurônios na SNpc: média ± erro-padrão			
Grupos			
Veículo/Veículo	Veículo/BCP	6-OHDA/Veículo	6-OHDA/BCP
97,95 ± 10,58	102,4 ± 5,964	44,39 ± 4,15 [#]	77,38 ± 3,742 ^{*,***}

([#]) indica diferenças significativas em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/BCP; (*) indica diferença significativa entre o grupo Veículo/BCP; (***) indica diferença significativa entre o grupo 6-OHDA/Veículo.

Quadro 8: Representação da média e respectivos valores de erro-padrão do número de micróglia presentes na SNpc.

Micróglia na SNpc: média ± erro-padrão			
Grupos			
Veículo/Veículo	Veículo/BCP	6-OHDA/Veículo	6-OHDA/BCP
3134 ± 236,5	2377 ± 37,09 [*]	4285 ± 260,2 [#]	2845 ± 130,7 ^{***}

(*) indica diferenças significativas em relação aos grupos Veículo/Veículo, (#) indica diferença significativa entre o grupo Veículo/Veículo e Veículo/BCP; (***) indica diferença significativa entre o grupo 6-OHDA/Veículo.

Quadro 9: Capacidade antioxidante total do estriado e mesencéfalo.

	ACAP no mesencéfalo: média ± erro-padrão			
	Grupos			
Região encefálica	Veículo/Veículo	Veículo/BCP	6-OHDA/Veículo	6-OHDA/BCP
Estriado	0,5590 ± 0,1029	0,7495 ± 0,09338	0,4870 ± 0,1609	0,9749 ± 0,6284
Mesencéfalo	1,045 ± 0,06816	0,7815 ± 0,2603	1,027 ± 0,3080	1,736 ± 1,016

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEUROPROTETOR DO BETA-CARIOFILENO EM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 9287231117, sob a responsabilidade de **Elizabeth Sumi Yamada** e equipe; *Dulcidéia da Conceição Palheta; Edmar Tavares da Costa; Wallace Gomes Leal; Dielly Catrina Favacho Lopes; Váldina Solimar Cardoso Lopes; Anderson Valente Amaral; Riky Douglas Melo Gomes* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 18/01/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF NEUROPROTECTIVE EFFECT OF BETA-CARYOPHYLLENE IN THE STRIATAL 6-HYDROXYDOPAMINE (6-OHDA) MOUSE MODEL OF PARKINSON'S DISEASE", utilizing 40 Heterogenics mice (40 males), protocol number CEUA 9287231117, under the responsibility of **Elizabeth Sumi Yamada** and team; *Dulcidéia da Conceição Palheta; Edmar Tavares da Costa; Wallace Gomes Leal; Dielly Catrina Favacho Lopes; Váldina Solimar Cardoso Lopes; Anderson Valente Amaral; Riky Douglas Melo Gomes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 01/18/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2018 a 02/2019** Área: **Fisiologia**

Origem: **Biotério Central ICB/UFPA**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **10 a 12 semanas** N: **40**

Linhagem: **Swiss (Suíço)**

Peso: **25 a 40 g**

Local do experimento: **Laboratório de Neuropatologia Experimental**

Belé, 31 de janeiro de 2018

M^a Viviana B. Monteiro

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa Joia de Mello

Profa. Dra. Vanessa Joia de Mello

Vice-Coodenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará