

ANDERSON VALENTE AMARAL

AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO-RESINA DE
Copaifera reticulata Ducke (COPAÍBA) EM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA EM CAMUNDONGOS

Belém

2017

ANDERSON VALENTE AMARAL

AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO-RESINA DE
Copaifera reticulata Ducke (COPAÍBA) EM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Sumi Yamada.
Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFPA.

Belém

2017

ANDERSON VALENTE AMARAL

AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO-RESINA DE
Copaifera reticulata Ducke (COPAÍBA) EM MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON INDUZIDO POR 6-OHDA EM CAMUNDONGOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Sumi Yamada

Avaliadora: Prof^ª Dr^ª. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Avaliador: Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém
2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ser meu abrigo, paz e refúgio em todos os momentos.

À minha família por todo apoio e incentivo durante a graduação, especialmente minha mãe, Andréa Valente, que me incentivou incondicionalmente nos momentos de aflição e quando o cansaço falava mais alto em alguns momentos; e minha tia, Maria Olívia por acreditar em mim e por não medir esforços para ajudar-me.

À Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Sumi Yamada pela orientação, confiança, aconselhamentos e ensinamentos que levarei para o resto de minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa por ter aberto as portas do laboratório no estágio rotatório em 2012.

À Prof^ª. Dr^ª. Dielly Catrina Favacho Lopes pela ajuda no início do experimento com óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke.

Ao Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE) por conceder o óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke à realização dos experimentos.

Aos amigos de laboratório que foram essenciais em diversos momentos durante a graduação e no desenvolvimento de pesquisa, especialmente ao meu grande amigo Riky Gomes que esteve presente desde o primeiro dia no Laboratório de Neuropatologia Experimental (LaNEx); Gabriela Sampaio por ajudar-me a dar os primeiros passos no longo caminho da pesquisa científica e ser praticamente uma “mãe de laboratório”; a minha grande amiga e parceira de ciência (como ela gosta de dizer), Solimar Cardoso por compartilhar um pouco de suas experiências científicas comigo, as quais foram imprescindíveis na realização dos experimentos; e minha amiga Suellen Gales que ajudou-me imensamente nos últimos meses no laboratório, sem você não teria conseguido terminar a tempo os experimentos, valeu Suh! E a todos os colegas do LaNEx pelos momentos de descontração como pizzas após seminários, churrascos, banhos de piscina, jogos de bilhar e as cervejinhas nas sextas-feiras para relaxarmos depois de uma semana de trabalho árduo. Muito obrigado por tudo Leonardo, Maurício, Gabriel (zão), Aline, Rafael, Vitória, Gabriel (zinho), Susy, Gerson e Caio.

A FAPESPA pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração esquemática do delineamento experimental.....	7
Figura 2: Ilustração esquemática do local exato de injeção de 6-OHDA ou solução veículo através de cirurgia estereotáxica.....	9
Figura 3: Ilustração esquemática do cenário da sala de testes comportamentais.....	11
Figura 4: Interface do software ANY-maze Video Tracking System (Stoeling Co [®]).....	11
Figura 5: Ilustração esquemática do teste de rotações induzidas por apomorfina.....	13
Figura 6: Avaliação da massa corporal durante os dias de experimento.	17
Figura 7: Fotomicrografias de secções representativas imunomarcadas por TH.....	18
Figura 8: Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto (ambulação).....	21
Figura 9: Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto (tigmotaxia)	23
Figura 10: Teste de rotações induzidas por apomorfina	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. OBJETIVO GERAL.....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
3.1. ANIMAIS.....	6
3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	6
3.3. ÓLEO-RESINA DE <i>Copaifera reticulata</i> Ducke.....	7
3.4. TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE <i>Copaifera reticulata</i> Ducke.....	8
3.5. CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS.....	8
3.6. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	9
3.6.1. TESTE DO CAMPO ABERTO.....	10
3.6.2. TESTE DE ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA.....	12
3.7. OBTENÇÃO DE SECÇÕES HISTOLÓGICAS.....	13
3.8. IMUNOISTOQUÍMICA.....	14
3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. INJEÇÕES INTRAESTRIATAIS UNILATERAIS DE 6-OHDA.....	15
4.2. TAXA DE MORTALIDADE E VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL.....	16
4.3. HISTOLOGIA.....	17
4.4. AVALIAÇÃO DA MOTRICIDADE A PARTIR DO TESTE DO CAMPO ABERTO	19
4.5. GRAU DA LESÃO GERADA PELA 6-OHDA E EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO-RESINA DE <i>Copaifera reticulata</i> Ducke NO TESTE DE ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA.....	25
5. CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é tradicionalmente classificada como um distúrbio motor caracterizado pelos sinais cardinais (tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural e bradicinesia). Contudo, a ocorrência de sintomas não motores, como problemas de memória, depressão, ansiedade, déficit olfativo, distúrbios autonômicos, transtornos do sono e alterações sensoriais são frequentes, sendo na maioria das vezes mais debilitantes aos pacientes. Os sintomas motores são decorrentes da morte de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc) e consequente depleção do neurotransmissor dopamina no estriado. A causa exata da morte celular na DP ainda permanece uma incógnita, porém estresse oxidativo e neuroinflamação estão envolvidas em processos subjacentes à neurodegeneração dopaminérgica. Modelos animais da DP utilizando 6-OHDA em camundongos têm sido ferramentas úteis à compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DP, assim como para investigações de possíveis estratégias de neuroproteção. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito neuroprotetor do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke em modelo da DP induzida por 6-OHDA em camundongos. Para isso, foram usados 48 camundongos da linhagem *Swiss*, os quais foram divididos em 4 grupos: (i) Veículo/Veículo (N = 8), (ii) Veículo/Copaíba (N = 8), (iii) 6-OHDA/Veículo (N = 15) e (iv) 6-OHDA/Copaíba (N = 17). Todos os animais passaram por cirurgias estereotáxicas para injeção intraestriatal unilateral de solução veículo contendo ácido ascórbico (0,2 mg/mL) ou 6-OHDA 10 µg. O tratamento com Copaíba (50 mg/kg) foi realizado durante 7 dias, logo após as cirurgias estereotáxicas. Testes comportamentais foram realizados para avaliação do desempenho motor no teste do campo aberto e para mensuração do grau de lesão provocada pela 6-OHDA no teste de rotações induzidas por apomorfina. Após o período de sobrevivência (28 dias) todos os animais foram eutanasiados para remoção do encéfalo e obtenção de secções histológicas, as quais foram imunomarcadas com anticorpo Anti-TH (1:1000). A análise das secções histológicas mostrou que o tratamento com óleo-resina de *C. reticulata* Ducke protegeu as fibras TH⁺ no estriado, assim como neurônios presentes na SNpc. Este resultado pode ser comprovado no teste de rotações induzidas por apomorfina no 14º dia, onde o grupo 6-OHDA/Copaíba apresentou redução significativa de 54,6% em relação ao grupo 6-OHDA/Veículo. A ambulação no campo aberto dos grupos 6-OHDA/Veículo e 6-OHDA/Copaíba foi reduzida no 14º (59,5%) e 28º dia (56,2%) em relação ao dia 0, mostrando que o tratamento com óleo-resina de *C. reticulata* Ducke não melhorou o desempenho motor nesse teste. Ademais, os grupos 6-OHDA/Veículo e 6-OHDA/Copaíba permaneceram menos tempo na zona periférica do campo aberto em relação aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/Copaíba, não demonstrando comportamento de tigmotaxia. A taxa de mortalidade foi de 13,3% para 6-OHDA/Veículo, 5,8% para 6-OHDA/Copaíba, não havendo morte no grupo Veículo/Veículo e Veículo/Copaíba. Este trabalho mostrou que injeções unilaterais intraestriatais de 6-OHDA 10 µg foram suficientes para induzir lesão no sistema nigroestriatal; o tratamento com óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke diminuiu a perda de fibras TH⁺ no estriado, o que se refletiu no número de rotações induzidas por apomorfina no 14º dia.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; 6-OHDA; Neuroproteção; *Copaifera reticulata* Ducke.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is traditionally classified as a motor disorder characterized by the cardinal signs resting tremor, muscular rigidity, postural instability and bradykinesia. Nevertheless, non-motor symptoms, such as memory impairment, depression, anxiety, olfactory deficit, autonomic disturbances, sleep disorders and sensory alterations are frequently reported. The motor symptoms result from the dopaminergic neurons death in the substantia nigra pars compacta (SNpc) and consequently decrease of dopamine in the striatum. The exact reason of the cell death in PD remains unknown, but oxidative stress and neuroinflammation are involved in mechanism underlying the dopaminergic neurodegeneration. The 6-OHDA mouse models of PD have been useful tools to the comprehension of the biologic process involved on pathophysiology of PD, as well as to investigate neuroprotection strategies. In this context, the aim of this work was to evaluate the neuroprotective effect of oil-resin from *Copaifera reticulata* Ducke in the 6-OHDA striatal mouse model of PD. Forty-Eight Swiss mice were used, which were divided in 4 groups: (i) Vehicle/Vehicle (N = 8), (ii) Vehicle/Copaíba (N = 8), (iii) 6-OHDA/Vehicle (N = 15) and (iv) 6-OHDA/Copaíba (N = 17). Stereotaxic surgeries were performed in all animals; vehicle solution (ascorbic acid 0,2 mg/mL) or 6-OHDA 10 µg was infused into the striatum. Copaíba oil-resin treatment, at 50 mg/kg, was performed for 7 days after stereotaxic surgeries. Behavioral tests were performed to assess the motor performance in the open field test and to assess the lesion impairment caused by 6-OHDA in the apomorphine-induced rotation test. After a survival period of 28 days all animals were killed and the brain was removed to obtain histological sections, which were immunostained with anti-TH antibody (1:1000). Histological analyses showed that the Copaíba oil-resin treatment was preserved TH⁺-fibers in the striatum, as well as neurons in the SNpc. This result was consistent with the apomorphine-induced rotational test at the 14^o day, where 6-OHDA/Vehicle group presented significant decrease of 54,6% in relation to 6-OHDA/Vehicle group (** p < 0,0001). The analyses from open field test showed that 6-OHDA/Vehicle and 6-OHDA/Copaíba was reduced at 14^o (59,5%) and 28^o day (56,2%) in relation to day 0 (* p < 0,0001), suggesting that Copaíba oil-resin treatment did not improve the motor performance at this test. Moreover, 6-OHDA/Vehicle and 6-OHDA/Copaíba groups remained less time in the peripheral zone in open field test in relation to Vehicle/Vehicle and Vehicle/Copaíba groups, which did not display thigmotaxis behavior (†† p < 0,001; + p < 0,001). The mortality rate was 13,3% in the 6-OHDA/Vehicle group, 5,8% in the 6-OHDA/Copaíba; no animal from Vehicle/Vehicle and Vehicle/Copaíba groups died. This work showed that unilateral striatal injections of 10 µg 6-OHDA were sufficient to induce lesion in the nigrostriatal system; Copaíba oil-resin treatment decreased the loss of TH⁺-fibers in the striatum, which is reflected in y the number of rotations induced by apomorphine at the 14^o day.

Keywords: Parkinson's disease; 6-OHDA; Neuroprotection; *Copaifera reticulata* Ducke.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é tradicionalmente classificada como um distúrbio motor devido à riqueza do quadro motor apresentado pelo paciente, caracterizado por tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural e diminuição de movimentos (ANTONY et al., 2013). Esses sintomas são devido à progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra *pars compacta* (SNpc) e consequente perda das projeções dopaminérgicas no estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Entretanto, a ocorrência de sintomas não motores é frequente, podendo ser até mais debilitante para o paciente. Pacientes com DP podem apresentar diversos sintomas não motores como problemas de memória, depressão, ansiedade, déficit olfativo, distúrbios autonômicos, transtornos no sono e alterações sensoriais (CHAUDHURI et al., 2006; LANGSTON, 2006; MARTINEZ-MARTIN et al., 2007; PARK; STACY, 2009). Além disso, alguns autores defendem que os sintomas não motores precedem as alterações motoras da DP, podendo dessa forma ser descritos como pré-motores (BRAAK et al., 2003; LANGSTON, 2006). Tais sintomas ocorrem anos ou décadas antes do surgimento das alterações motoras, de modo que apenas os sintomas motores, não representam a DP em sua totalidade, mas apenas um dos aspectos dessa doença complexa (LANGSTON, 2006).

As causas da neurodegeneração na DP ainda não foram estabelecidas concisamente, entretanto estresse oxidativo, inflamação e disfunção mitocondrial foram sugeridos como mecanismos que podem mediar a morte celular na doença, sendo a apoptose o principal mecanismo da morte neuronal (MORRONI et al., 2013; ZHAO, 2009).

As principais características neuropatológicas da DP são a depleção de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais e a presença de inclusões citoplasmáticas ricas em α -sinucleína, denominadas de Corpos de Lewy (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Essas inclusões são formadas por falhas no sistema de degradação celular e são compostas por agregados de proteínas defeituosas (FERRER, 2009; LICKER et al., 2009). Disfunções sinápticas, comprometimento mitocondrial, defeitos subjacentes às funções do retículo endoplasmático e mecanismos de autofagia estão envolvidos na formação de agregados citotóxicos de α -sinucleína, além de fatores como o envelhecimento, vulnerabilidade neuronal seletiva e fatores não-neuronais, como ativação de microglia (WONG; KRAINIC, 2017).

Dentre os fatores implicados na fisiopatogenia da DP, atualmente é consenso que processos inflamatórios sistêmicos contribuem consideravelmente a um fenótipo neurodegenerativo em humanos (CUNNINGHAM, 2013; RANSOHOFF, 2016).

Alternativas que visem retardar, interromper, ou reverter a progressão da neurodegeneração ocorrida na DP vêm sendo estudadas e são conhecidas como terapias neuroprotetoras, neurorestaurativas, ou modificadoras da doença (OLANOW, 2009; OLANOW; KIEBURTZ; SCHAPIRA, 2008).

Atualmente, a forma terapêutica para a DP ainda consiste na estratégia de reposição do neurotransmissor dopamina, sendo a droga mais utilizada a levodopa. O uso desse fármaco melhora a qualidade de vida dos pacientes no início da doença. Entretanto, após 5-10 anos de uso, esta terapia deixa de funcionar, levando o paciente a um estado irreversível de discinesia. Dessa maneira, a utilização da levodopa torna-se uma terapia desvantajosa a longo prazo pelos efeitos adversos e por não retardar a progressão da neurodegeneração (PEZZOLI; ZINI, 2010).

Sendo assim, pesquisas por novas formas terapêuticas, assim como por tratamentos que sejam eficazes no alívio de sintomas e retardo na progressão da neurodegeneração ainda são os principais desafios na terapia da DP.

Diversas alternativas têm sido desenvolvidas e alguns fármacos têm sido testados com o objetivo de retardar a degeneração neuronal como antioxidantes, agonistas dopaminérgicos e anti-apoptóticos (SIMPKINS; JANKOVIC, 2003; STOCCHI; OLANOW, 2003), além de estudos com transplantes de tecidos capazes de sintetizar e reestabelecer os níveis de catecolaminas (GROW; MCCARREY; NAVARA, 2016; NISHIMURA et al., 2003). A utilização de modelos animais utilizando neurotoxinas que mimetizam fenômenos fisiológicos subjacentes à DP vêm sendo utilizados, afim de investigar os mecanismos envolvidos na DP e desenvolver novos mecanismos terapêuticos para auxiliar no tratamento ou alívio da sintomatologia motora da doença, onde os modelos utilizando roedores são amplamente investigados (BLANDINI; ARMENTERO, 2012).

Diversos modelos experimentais tentam mimetizar a fisiopatologia e os sintomas da DP em animais. A maioria dos modelos usa neurotoxinas que destroem ou alteraram o sistema catecolaminérgico, como por exemplo, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridino (MPTP) e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Pesticidas como rotenona, paraquat e maneb também induzem algumas características da DP, quando administrados na circulação sistêmica de roedores. Tais

modelos foram elaborados visando mimetizar a lesão neural tida como a principal responsável pelo quadro motor (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; BOVE; PERIER, 2012).

Um dos modelos de DP mais utilizados é aquele baseado da administração da toxina 6-OHDA, que é um análogo hidrolisado da dopamina e noradrenalina. Agindo como um “falso substrato”, a 6-OHDA é rapidamente acumulada em neurônios catecolaminérgicos.

A vantagem do uso da 6-OHDA é devido à sua alta afinidade por transportadores catecolaminérgicos por sua similaridade bioquímica com catecolaminas, sendo captada por esses transportadores. A 6-OHDA não ultrapassa a barreira hematoencefálica, dessa maneira faz-se necessário a injeção estereotáxica intracerebral em animais. Tais características conferem à 6-OHDA vantagens em relação a outros modelos animais da DP, pois além de possuir especificidade, pode ser injetada diretamente na região do estriado, no feixe prosencefálico medial ou na substância negra (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; BOVE; PERIER, 2012; HEUER et al., 2012).

O mecanismo de toxicidade DA 6-OHDA envolve o estresse oxidativo e a inibição mitocondrial, levando a morte celular e necrose de células dopaminérgicas (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; BLANDINI; ARMENTERO; MARTIGNONI, 2008; BOVE; PERIER, 2012; CHOI et al., 1999; SCHOBER, 2004).

Modelos baseados em lesão por 6-OHDA são usados há quase 50 anos (UNGERSTEDT, 1968), para estudos focados no distúrbio motor devido ao comportamento rotacional característico induzido farmacologicamente (BOVE; PERIER, 2012; SCHWARTING; HUSTON, 1996; UNGERSTEDT, 1976). Além disso, injeções unilaterais de 6-OHDA permitem o acompanhamento do curso temporal de neurodegeneração, através da depleção progressiva de neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc, ativação microglial e astrocítica (CARLSSON et al., 2011; STOTT; BARKER, 2014), além de alterações bioquímicas (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008; RIBEIRO et al., 2013; STAYTE et al., 2015).

O bioma amazônico possui umas das maiores biodiversidades do planeta, sendo alvo de investigações na busca de novos fármacos obtidos a partir de produtos naturais oriundos de plantas amazônicas. Na busca por novas formas de terapia para diversas enfermidades que acometem o sistema nervoso central (SNC), a *Copaifera reticulata* Ducke (Leguminosae), popularmente conhecida como copaíba e muito utilizada na medicina popular, mostra-se como uma planta com grande potencial terapêutico na DP, pois do óleo-resina extraído do tronco da

árvore de copaíba é composto por diversos sesquiterpenos com propriedades farmacológicas (SANTIAGO et al., 2015; VEIGA JUNIOR et al., 2007).

O uso do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke em modelos de lesão excitotóxica no córtex motor de ratos mostrou um efeito neuroprotetor, a partir da redução da área da lesão provocada no modelo utilizado e pela redução na ativação de microglia, que é indicativo de processos neuroinflamatórios (GUIMARAES-SANTOS et al., 2012).

Considerando os mecanismos celulares subjacentes à DP, como neuroinflamação e estresse oxidativo, o óleo-resina de *C. reticulata* Ducke pode ser uma alternativa terapêutica promissora. Assim, o presente trabalho foi realizado afim de investigar os efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores de *C. reticulata* Ducke, além de ser um trabalho pioneiro na investigação dos efeitos subjacentes à neurodegeneração induzida por 6-OHDA em camundongos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito neuroprotetor do óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke em modelo animal de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir lesão na via nigroestriatal com injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA.

- Avaliar o efeito neuroprotetor do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke no teste do campo aberto e no teste de rotações induzidas por apomorfina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Foram utilizados 48 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* machos com idade de 10 semanas e pesando entre 35-40 g, os quais foram provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (Levilândia, Pará). Os animais foram separados em grupos de 5 animais por caixa e mantidos em cabines para biotério (Insight[®], Ribeirão Preto) com temperatura e umidade relativa do ar controlada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$; 60%), em um ciclo claro/escuro 12/12h. Alimentação e água ficaram disponíveis *ad libitum* e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação (CEPAE-UFPA) sob o parecer N°. 6743170716 (Anexo A).

Os animais foram divididos em quatro grupos: (i) Veículo/Veículo (N = 8), que recebeu injeção intraestriatal unilateral de solução contendo ácido ascórbico 0,2 mg/mL (*Sigma-Aldrich/A4544*) e tratado com solução de *Tween*[®] 20 à 5% (*Sigma-Aldrich/P2287*) via intraperitoneal (i.p.); (ii) Veículo/Copaíba (N = 8), que recebeu injeção intraestriatal unilateral de ácido ascórbico 0,2 mg/mL e foi tratado com óleo-resina de Copaíba (50 mg/kg) via i.p.; (iii) 6-OHDA/Veículo (N = 15), o qual recebeu injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA 10 µg (*Sigma-Aldrich/H4381*) e foi tratado com solução de *Tween* 20[®] à 5% via i.p.; (iv) 6-OHDA/Copaíba (N = 17), o qual recebeu injeção intraestriatal unilateral de 6-OHDA 10 µg e foi tratado com óleo-resina de Copaíba (50 mg/kg) via i.p.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os animais foram submetidos a cirurgias estereotáxicas para injeção de 6-OHDA ou solução veículo e foram tratados durante 7 dias, do 1° ao 7° dia após as cirurgias, com óleo-resina de *C. reticulata* Ducke (50 mg/kg) ou solução veículo (*Tween*[®] 20 a 5%), ambos administrados por via i.p. Os animais foram submetidos a testes comportamentais para avaliação de motricidade e do grau da lesão gerada pela 6-OHDA. Para avaliação da motricidade, foi realizado o teste do campo aberto, que foi executado uma vez antes das cirurgias estereotáxicas (dia 0) e após as cirurgias e tratamento, no 14° e 28° dia. Para avaliação do grau da lesão provocada pela 6-OHDA, foi realizado o teste de rotações induzidas por apomorfina, sendo executado no 14° e 28° dia. A massa corporal foi mensurada a cada 7 dias e o tempo de sobrevivência foi de 28 dias após as cirurgias estereotáxicas (Figura 1).

Delineamento experimental

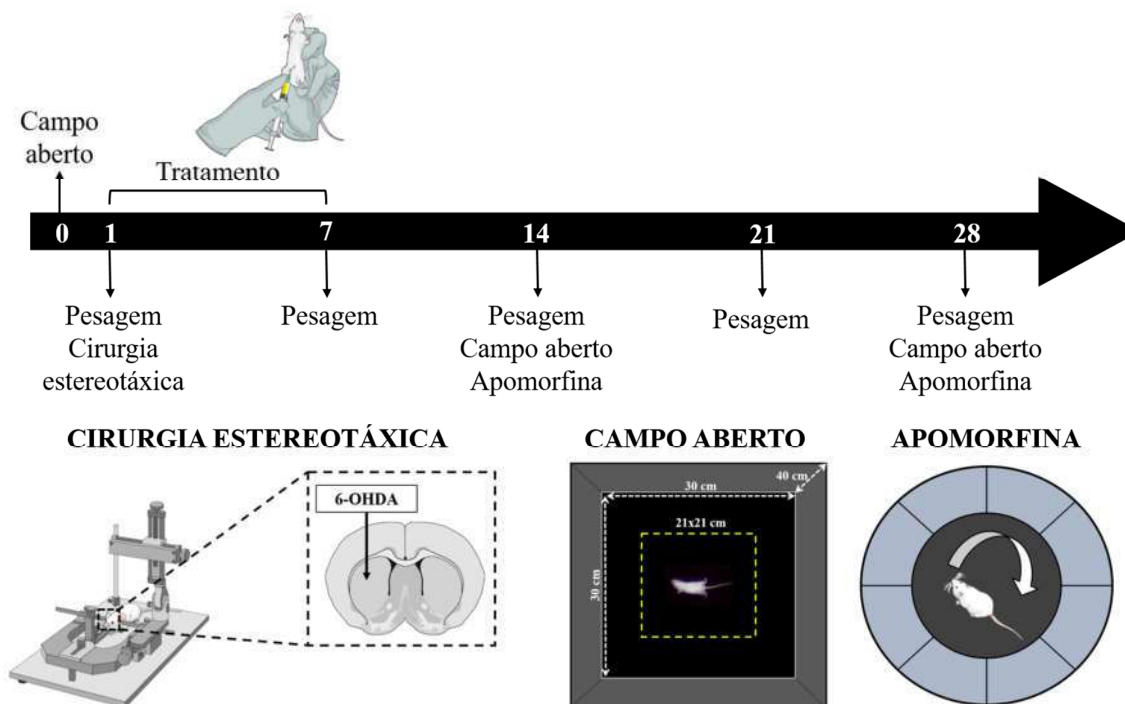


Figura 1: Ilustração esquemática do delineamento experimental.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Mind The Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>) e na plataforma *Microsoft Office Power Point 2016*.

3.3. ÓLEO-RESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke

A amostra do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental (LNNE) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

O óleo-resina de *C. reticulata* Ducke é um exsudato obtido do tronco da árvore de *C. reticulata* Ducke, que está localizada no campus experimental da EMBRAPA, no distrito de Belterra, Pará, Brasil. O óleo-resina de Copaíba foi obtido por pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), seguindo as diretrizes internacionais da Organização Mundial da Saúde (OMS) e exsicata da árvore está armazenada no herbário da EMBRAPA Amazônia Oriental (Belém, Pará, Brasil) com o número 183939, como descrito por Guimarães-Santos e colaboradores (2012).

3.4. TRATAMENTO COM ÓLEO-RESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke

O óleo-resina de *C. reticulata* Ducke foi diluído em *Tween*[®] 20 a 5% diluído em NaCl 0,9%. A via de administração do óleo-resina foi intraperitoneal (i.p.) e dose utilizada foi de 50 mg/kg. O tratamento foi iniciado 2 horas após a injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA ou de solução veículo contendo ácido ascórbico, tendo duração total de 7 dias, obedecendo o curso temporal de degeneração do sistema nigroestriatal induzido pela 6-OHDA em camundongos para que o tratamento se sobrepusesse à neurodegeneração nigroestriatal que ocorre nos primeiros 7 dias após injeção de 6-OHDA intraestriatal (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008; STOTT; BARKER, 2014).

3.5. CIRURGIAS ESTEREOTÁXICAS

Todos os animais foram operados para injeção de 6-OHDA (*Sigma-Aldrich*[®]/H4381) ou solução veículo contendo ácido ascórbico (*Sigma-Aldrich*/A4544) no estriado dorsal esquerdo. Previamente, os animais foram anestesiados por via i.p. com uma mistura de cloridrato de cetamina (*Dopalen*[®]) na dose de 100 mg/kg e cloridrato de xilazina (*Dopaser*[®]) na dose de 10 mg/kg. Após certificação de anestesia profunda, cada animal teve sua cabeça fixada em aparelho estereotáxico (*Insight*[®]). Posteriormente, foi realizada a tricotomia, seguida de higienização da pele na região da cabeça com álcool iodado, na qual foi feito um pequeno corte para expor o crânio. Para a localização do estriado foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas: 1) Anteroposterior (AP) + 0,8 mm a partir do bregma; 2) Médio-Lateral (ML) + 2,1 mm a partir da linha média; 3) Dorsoventral (DV) – 3,2 mm a partir da calota craniana, baseadas no Atlas de Estereotaxia para camundongos (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Foi utilizada uma seringa *Hamilton*[®] de 10 µL para as injeções de 6-OHDA (6-OHDA 10 µg diluída em ácido ascórbico 0,2 mg/mL em NaCl 0,9%) ou solução veículo (ácido ascórbico 0,2 mg/mL diluído em NaCl 0,9%). O volume injetado foi de 2 µL (5 µg/µL) 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 pele foi suturada e foi administrada uma pomada cicatrizante e epitelizante para auxiliar a recuperação após a cirurgia. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram transferidos de volta às suas gaiolas para recuperação.

Abaixo, a Figura 2 mostra de maneira esquemática o local de injeção de 6-OHDA ou solução veículo no estriado dos camundongos.

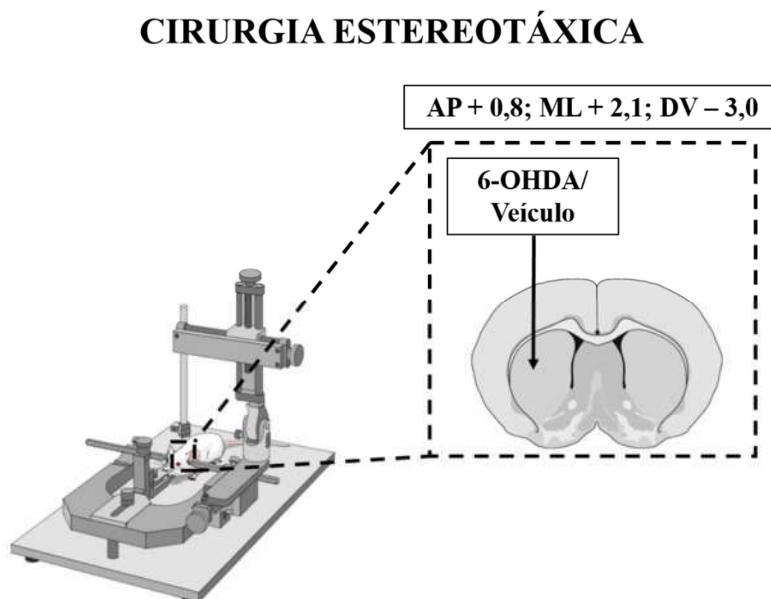


Figura 2: Ilustração esquemática do local exato de injeção de 6-OHDA ou solução veículo através de cirurgia estereotáxica.

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Mind The Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>) e na plataforma *Microsoft Office Power Point 2016*.

3.6. TESTES COMPORTAMENTAIS

Foram utilizados os seguintes testes comportamentais para a avaliação motora e para avaliação do grau da lesão provocada pela 6-OHDA. O primeiro foi o teste do campo aberto, o qual foi executado durante 3 vezes ao longo do experimento, onde a primeira vez foi no dia 0, momento em que nenhum animal havia passado por procedimentos cirúrgicos, o qual serviu como linha de base para comparações com os demais dias de teste; e a segunda e a terceira vez foi no 14° e 28° dia, respectivamente.

O teste de rotações induzidas por apomorfina foi realizado para avaliação do grau da lesão provocada pela 6-OHDA, que foi executado no 14° e 28° dia após as cirurgias estereotáxicas.

3.6.1. TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto foi realizado para avaliação da motricidade, que foi realizado 3 vezes durante o experimento (0, 14° e 28° dia). O aparato consistiu em uma caixa de acrílico medindo 30 x 30 x 40 cm, revestida com adesivo cinza e fundo preto. Cada animal foi gentilmente colocado no aparato e o teste teve a duração de 5 minutos. 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*®). O aparato foi higienizado com álcool etílico a 10% a cada animal para eliminação de pistas olfativas durante a execução dos demais testes. Todos os testes foram filmados através de *software* de aquisição de vídeos e posteriormente analisados através do *software ANY-maze Video Tracking System (Stoeling Co*®) para processamento e análise de parâmetros comportamentais como: distância percorrida, tempo de imobilidade e análise da tigmotaxia no aparato. Com o auxílio do *software ANY-maze*, foram delineadas zonas dentro de cada aparato, como zona periférica (ZP) com área de 459 cm² e zona central (ZC) com área de 441 cm². Essa divisão artificial, corresponde a áreas aproximadamente iguais dentro do aparato, onde a ZP corresponde à 51% e a ZC à 49% da área total do aparato.

A seguir, uma ilustração esquemática do cenário da sala de testes comportamentais e das divisões artificiais das zonas dentro do aparato (Figura 3) e a interface do *software ANY-maze* que foi utilizado para as análises dos vídeos (Figura 4).

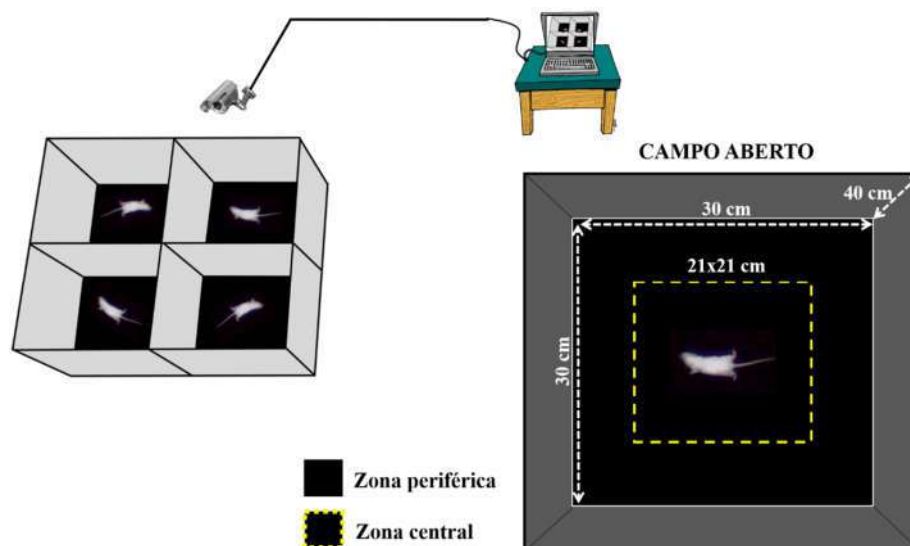


Figura 3: Ilustração esquemática do cenário da sala de testes comportamentais (parte superior) e detalhamento de cada aparato, evidenciando as dimensões e zonas de cada um (parte inferior).

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Microsoft Office Power Point 2016*.

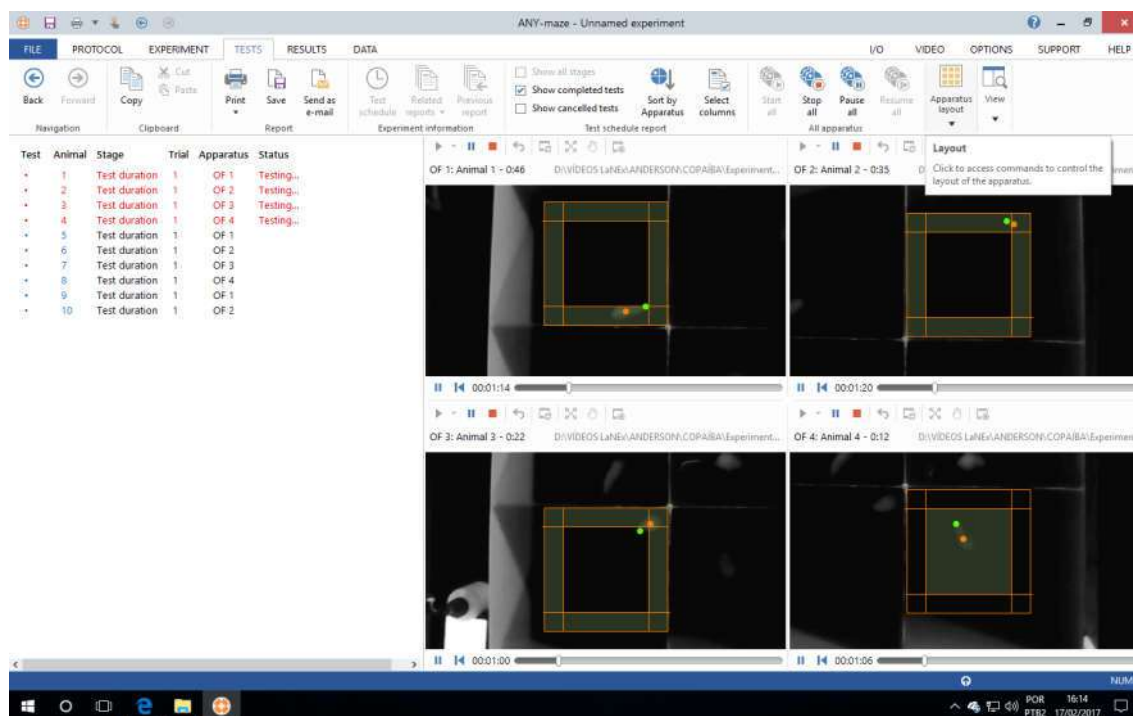


Figura 4: Interface do *software ANY-maze Video Tracking System (Stoeling Co[®])*. O ponto de cor laranja sinaliza a posição do centro do animal e o ponto de cor verde sinaliza a posição da cabeça do animal durante a análise dos vídeos. As zonas destacadas em verde

mostram a ambulação dos animais no aparato, onde no canto superior esquerdo o animal está ocupando a ZP e no canto inferior direito o animal está ocupando a ZC.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6.2. TESTE DE ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA

O teste rotações induzidas por apomorfina foi realizado no 14º e 28º dia após as cirurgias estereotáxicas, onde a apomorfina (*Sigma-Aldrich/A4393*) foi administrada na dose de 0,6 mg/kg por via subcutânea (s.c.). Logo após a administração de apomorfina, os animais foram colocados em aparatos circulares medindo 12 cm de diâmetro e 9 cm de altura. O teste teve duração de 20 minutos, onde foi observado o número de rotações contralaterais que os animais realizaram em torno do próprio eixo. 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. Assim como no teste do campo aberto, todos os testes foram filmados e posteriormente analisados para a quantificação do número de rotações contralaterais. A quantificação do número de rotações contralaterais foi quantificada por um pesquisador externo ao experimento.

A Figura 5 abaixo mostra de maneira esquemática a administração do fármaco e o aparato em que o teste foi executado.

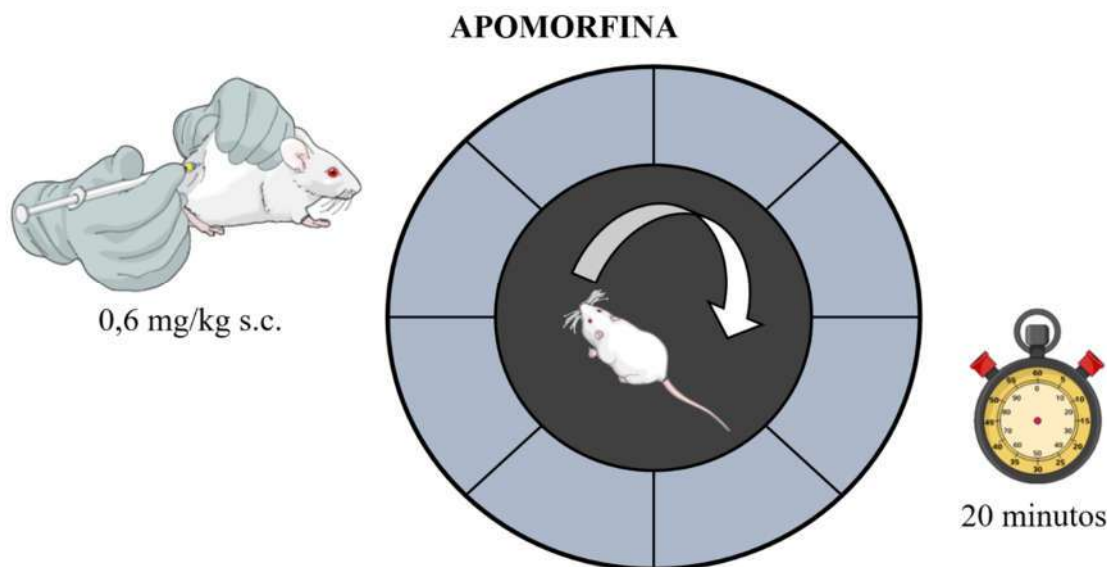


Figura 5: Ilustração esquemática do teste de rotações induzidas por apomorfina. No canto superior esquerdo, a via de administração subcutânea (s.c.) de 0,6 mg de apomorfina. Ao centro, o animal no aparato executando o teste de rotações induzidas pelo fármaco durante o período estabelecido de 20 minutos (canto inferior direito).

Fonte: Elaborada pelo autor utilizando a plataforma *Mind The Graph* (versão livre - <https://mindthegraph.com/>) e na plataforma *Microsoft Office Power Point 2016*.

3.7. OBTENÇÃO DE SECÇÕES HISTOLÓGICAS

Ao término dos testes comportamentais os animais foram novamente anestesiados e após certificação de profunda anestesia, os animais foram eutanasiados através de perfusão intracardíaca com tampão fosfato salina (PBS) 1% gelado e paraformaldeído (PFA) 4%, ambas as soluções medindo pH 7.2 – 7.4, que foram administradas através de bomba peristáltica durante 2 minutos para cada solução. Após a perfusão, os encéfalos foram cuidadosamente removidos do crânio, onde os mesmos foram pós-fixados em PFA 4% (pH 7.2 – 7.4) por 48 horas em temperatura ambiente e, posteriormente, crioprottegidos em sacarose 30% a -8°C por 72 horas. Ao término do período de crioproteção, os encéfalos foram seccionados em cortes coronais com $40\ \mu\text{m}$ de espessura a -25°C no criostato (*Leica*® *CM 1850*, *Nussloch*, *Germany*). As secções foram armazenadas em solução anticongelante (300 mL de glicerol, 300 mL de etilenoglicol, 100 mL de tampão fosfato 0,2M e 300 mL de água destilada) a -20°C .

3.8. IMUNOISTOQUÍMICA

As secções foram incubadas *free-floating* por 15 minutos em 0,1 % de H₂O₂ e 0,1% de metanol diluídos em tampão fosfato 0,1M (TF 0,1M, pH 7.4) para inativação da atividade da peroxidase endógena, por 1 hora em 5% de soro normal jumento (SNJ; *Millipore*®/S30) em TF 0,1M para inibição de sítios de ligação inespecíficos, e por 24 horas em anticorpo primário contra epítomos de tirosina hidroxilase (Anti-TH, policlonal, coelho, 1:1000; *Millipore*®/AB152), diluído em TF 0,1M com 5% de SNJ e 0,2% de Triton™ X-100 (*Sigma-Aldrich*®/T8787). Posteriormente, as secções foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho (IgG anti-coelho, 1:200; *Jackson ImmunoResearch*®/711-065-152) em TF 0,1M. O sinal do epítomo foi amplificado durante 1 hora com o complexo avidina-biotina (ABC; *VECTASTAIN*® *Elite ABC Kit*; 1:200; *Vector Laboratories*®). As ligações entre o epítomo e os anticorpos foram visualizadas com 0,5 mg/mL de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; *Sigma-Aldrich*®/D12384). Entre cada etapa, as secções foram lavadas durante 10 minutos em TF 0,1M com 3 repetições e todos os procedimentos foram realizados a temperatura ambiente.

3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Utilizamos análises de variância com dois critérios (ANOVA *Two Way*), seguida pelo teste Bonferroni com múltiplas comparações para as análises de massa corporal e o teste do campo aberto. Análises de variância com um critério (ANOVA *One Way*) foi utilizada no teste de rotações induzidas por apomorfina, seguida pelo teste Tukey para múltiplas comparações. Todos os valores foram expressos como média ± erro padrão e a significância estatística foi definida com 95% de confiabilidade ($P < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc. Version 6.01, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. INJEÇÕES INTRAESTRIATAIS UNILATERAIS DE 6-OHDA

Todos os animais passaram por processos cirúrgicos para injeção de 2 μ L de solução veículo contendo ácido ascórbico (0,2 mg/mL) ou de 6-OHDA 10 μ g (5 μ g/ μ L). A dose de 6-OHDA escolhida neste trabalho foi a que proporcionou as características inerentes do modelo proposto (CARLSSON et al., 2011; STOTT; BARKER, 2014), e o local de injeção foi o estriado por causar menor taxa de mortalidade em comparação a outros sítios de injeção, como o feixe prosencefálico medial e a substância negra *pars compacta* (HEUER et al., 2012).

O modelo de injeções intraestriatais unilaterais de 6-OHDA é o modelo de doença de Parkinson mais comumente utilizado, pois possibilita a investigação de alternativas neuroprotetoras, afinal nesse modelo a degeneração dos terminais dopaminérgicos estriatais ocorre de maneira progressiva e retrógrada em direção aos neurônios dopaminérgicos presentes na substância negra *pars compacta* (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008; MORRONI et al., 2013; UNGERSTEDT, 1968). Além disso, a injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA permite que cada animal sirva como seu próprio controle através da avaliação do comportamento rotacional à lesão induzido farmacologicamente por apomorfina ou anfetamina (HEUER et al., 2012; SCHWARTING; HUSTON, 1996; UNGERSTEDT, 1976).

Após a recuperação da cirurgia, os animais injetados com 6-OHDA apresentaram rotações espontâneas ipsilaterais à injeção da neurotoxina; essas rotações permaneceram durante alguns dias depois da cirurgia. Essa característica também foi observada quando a mesma dose de 6-OHDA foi injetada unilateralmente no estriado de camundongos da linhagem C57Bl/6 para caracterização do curso temporal de degeneração dopaminérgica e alterações não-neuronais em modelo de doença de Parkinson (STOTT; BARKER, 2014). Depois da primeira semana após a injeção de 6-OHDA o comportamento rotacional ipsilateral espontâneo não foi observado. Os mesmos procedimentos cirúrgicos foram utilizados para a injeção intraestriatal de solução veículo, entretanto nenhum animal apresentou o comportamento de rotações espontâneas ipsilaterais após as cirurgias.

4.2. TAXA DE MORTALIDADE E VARIAÇÃO DE MASSA CORPORAL

Não houve mortalidade nos grupos Veículo/Veículo e Veículo/Copaíba, entretanto a taxa de mortalidade foi de 13,3% no grupo 6-OHDA/Veículo e de 5,8% no grupo 6-OHDA/Copaíba. As taxas de mortalidade encontradas neste trabalho estão de acordo com resultados da literatura, onde a taxa de mortalidade em estudos utilizando injeções intraestriatais unilaterais de 6-OHDA é de aproximadamente 10% (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008).

A massa corporal de todos os animais foi avaliada a cada 7 dias durante o experimento, onde consideramos o dia 0 (antes da cirurgia) como linha de base às comparações nos demais dias, sendo 100% de massa corporal.

A figura 6 mostra o resultado da análise de massa corporal de todos os grupos ao longo do experimento, na qual as análises dos dias de experimento, o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou redução significativa de 15% no 7º dia em relação ao grupo Veículo/Veículo (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Veículo/Veículo = $99,22 \pm 2,87\%$; 6-OHDA/Veículo = $85,47 \pm 4,46\%$; † $p < 0,0001$; média \pm erro padrão). No 28º dia, os grupos 6-OHDA/Veículo e 6-OHDA/Copaíba apresentaram diminuição na massa corporal de 16 e 12%, respectivamente, em relação ao grupo Veículo/Copaíba (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Veículo/Copaíba = $116,1 \pm 2,47\%$; 6-OHDA/Veículo = $100,9 \pm 2,80\%$; 6-OHDA/Copaíba = $104,5 \pm 1,94\%$; †† $p < 0,0001$; média \pm erro padrão).

Na análise intragrupo, o grupo Veículo/Veículo apresentou ganho de massa corporal no 21º e 28º dia, em relação ao dia 0 e 7º dia (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0 = $99,99 \pm 2,70\%$; 7º dia = $99,22 \pm 2,87\%$; 21º dia = $107,7 \pm 2,84\%$; 28º dia = $109 \pm 2,97\%$; * $p < 0,0001$; média \pm erro padrão). O grupo Veículo/Copaíba apresentou ganho de 9% na massa corporal no 14º dia em relação ao 7º; e no 21º e 28º dia apresentou ganho de massa de 16% e 12%, em relação ao 7º e 14º dia, respectivamente (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; 7º dia = $95,79 \pm 2,28\%$; 14º = $104,2 \pm 2,09\%$; 21º dia = $95,79 \pm 2,28\%$; 28º dia = $104,2 \pm 2,09\%$; ** $p < 0,0001$; + $p < 0,0001$; média \pm erro padrão). O grupo 6-OHDA/Veículo apresentou redução de 15% na massa corporal no 7º dia em relação ao dia 0, mas a partir do 14º dia, mostrou ganho de 13% em relação ao 7º dia, além de aumentar esse ganho de peso em 15% no 21º e 28º dia em relação ao 7º (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0 = $100 \pm 2,25\%$; 7º dia = $85,47 \pm 4,46\%$; 14º dia = $98,91 \pm 3,17\%$; 21º dia = $100,9 \pm 2,97\%$; 28º dia = $100,9 \pm 2,80\%$; * $p < 0,0001$; ** $p < 0,0001$; média \pm erro padrão). O grupo 6-OHDA/Copaíba também apresentou redução de 12% na massa corpórea no 7º dia em relação ao dia 0, mas no 21º dia apresentou

ganho de 5,4% em relação ao dia 0 e aumentou esse ganho em aproximadamente 16-17% no 14º, 21º e 28º dia em relação ao 7º dia (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0 = $100 \pm 1,85\%$; 7º dia = $88,82 \pm 3,30\%$; 14º dia = $104,5 \pm 1,93\%$; 21º dia = $105,4 \pm 1,74\%$; 28º dia = $104,5 \pm 1,94\%$; * $p < 0,0001$; ** $p < 0,0001$; média \pm erro padrão).

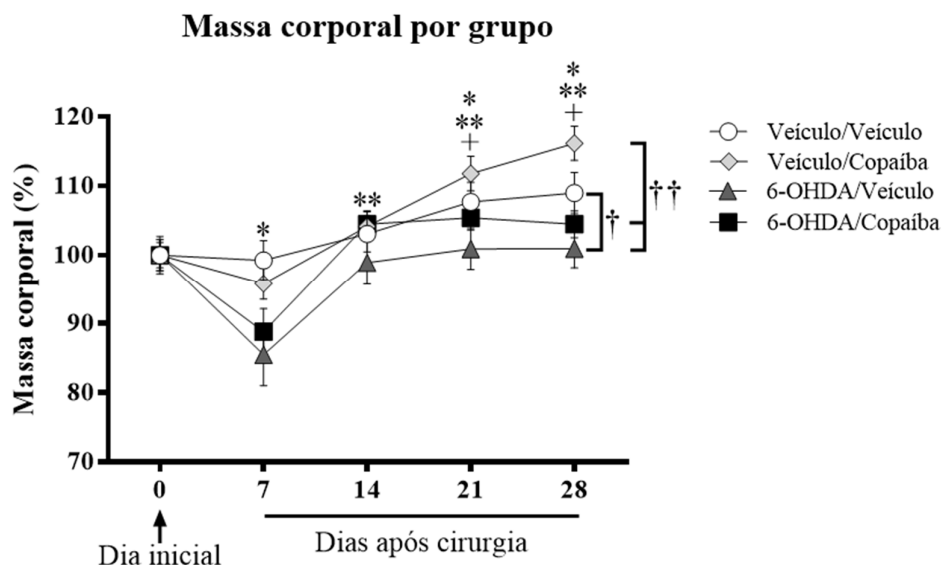


Figura 6: Avaliação da massa corporal durante os dias de experimento. Diferenças entre os grupos estão indicadas pelos símbolos: * $p < 0,0001$ versus Dia 0; ** $p < 0,0001$ versus Dia 7; + $p < 0,0001$ versus Dia 14; e diferenças entre os dias indicadas pelos símbolos: † $p < 0,0001$ versus Veículo/Veículo; †† $p < 0,0001$ versus Veículo/Copaíba. ANOVA *Two Way*, pós-teste Bonferroni. Dados expressos em média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 8; Veículo/Copaíba N = 8; 6-OHDA/Veículo N = 13; e 6-OHDA/Copaíba N = 16.

Esses resultados demonstram que os grupos submetidos à lesão com 6-OHDA mostraram menor ganho de massa corporal no 14º, 21º e 28º dia em comparação com os grupos Veículo/Veículo e Veículo/Copaíba, independente do tratamento com óleo resina de copaíba.

4.3. HISTOLOGIA

As marcações TH⁺ do estriado e da SN estão representadas na Figura 7 para cada grupo. Os grupos injetados com solução veículo não apresentaram perdas de terminações dopaminérgicas estriatais e conseqüentemente não houve perda na SN (Figura 7A – B). O grupo 6-OHDA/Veículo apresentou perda acentuada das terminações no estriado, além de clara redução na quantidade de neurônios na SN (Figura 7C). Em contrapartida, o grupo 6-

OHDA/Copaíba apresentou menor perda na quantidade fibras TH+ no estriado e na SN em relação ao grupo 6-OHDA/Veículo (Figura 7D).

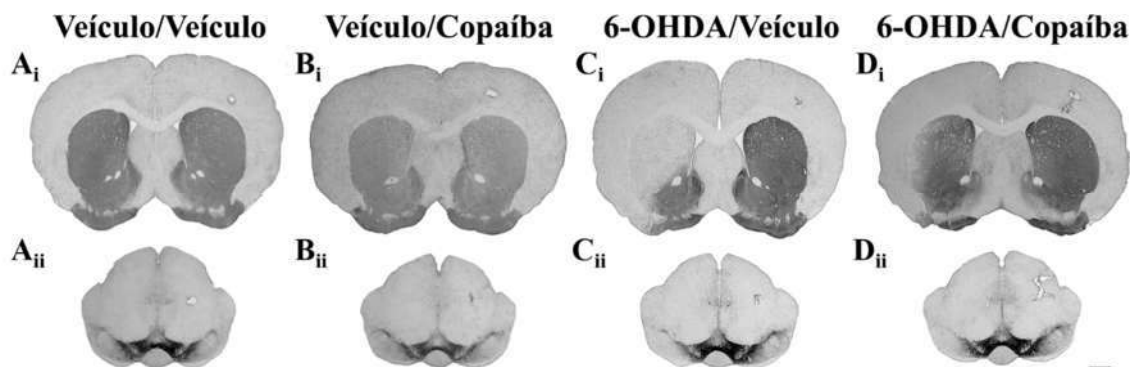


Figura 7: Fotomicrografias de seções representativas de cada grupo imunomarcadas por TH (A – D). As seções são referentes a aproximadamente (i) + 1,2 mm e (ii) – 5,2 mm a partir do Bregma. A barra de escala representa 1 mm.

Uma das principais características histológicas inerentes ao modelo de 6-OHDA em roedores é a perda de fibras TH+ no estriado e consequentemente a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc (ALVAREZ-FISCHER et al., 2008; CARLSSON et al., 2011; HEUER et al., 2012; STAYTE et al., 2015).

O tratamento com óleo-resina de *C. reticulata* Ducke mostrou-se promissor no modelo experimental utilizado em nosso trabalho visto que fibras TH+ do estriado foram protegidas em relação ao grupo não tratado, evidenciando que o óleo-resina possui efeitos neuroprotetores no modelo de 6-OHDA da DP em camundongos.

4.4. AVALIAÇÃO DA MOTRICIDADE A PARTIR DO TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto é amplamente utilizado para avaliação da atividade exploratória, assim como comportamento semelhante ao ansioso dos animais (CHRISTAKIS; RAMIREZ; RAMIREZ, 2012; MENDES FDE et al., 2013).

Neste trabalho, o teste do campo aberto foi realizado três vezes durante o experimento (dia 0, 14° e 28°) para avaliação da atividade exploratória dos animais no aparato no período de 5 minutos. A média da distância percorrida pelos animais antes dos procedimentos cirúrgicos (dia 0) foi considerado como 100% de atividade exploratória e os demais dias de teste foram comparados ao dia 0 para averiguarmos as possíveis alterações comportamentais ao longo do período de sobrevivência dos animais.

Os resultados das análises no teste do campo aberto puderam ser mensurados e visualizados a partir da análise das trajetórias percorridas pelos animais durante o teste (Figura 8A), assim como pela análise de variância de dois critérios (ANOVA *Two Way*) seguidas do teste Bonferroni para múltiplas comparações (Figura 8B).

Em relação ao dia 0, a ambulação no grupo Veículo/Veículo não foi alterada no 14° e 28° dia de teste (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0 = 100 ± 10,08%; 14° dia = 85,36 ± 14,74%; 28° dia = 88,05 ± 20,69%; p = 0,0525; média ± erro padrão), assim como o grupo Veículo/Copaíba (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0 = 100 ± 10,08%; 14° dia = 68,74 ± 9,08%; 28° dia = 70,75 ± 7,96; p = 0,0525; média ± erro padrão). Entretanto, o grupo 6-OHDA/Veículo apresentou redução significativa de 59,5% na ambulação no 14° dia e de 56,2% no 28° dia (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0 = 99,99 ± 11,89%; 14° dia = 40,4 ± 7,66%; 28° dia = 43,71 ± 8,09%; * p < 0,0001; média ± erro padrão). Da mesma maneira, grupo 6-OHDA/Copaíba mostrou redução na atividade locomotora de 63% no 14° dia e de 61,8% no 28° dia (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0 = 100 ± 5,94%; 14° dia = 37,19 ± 6,33%; 28° dia = 38,47 ± 6,06%; * p < 0,0001; média ± erro padrão).

Nas análises intragrupo durante os dias de teste, no 14° dia, os grupos 6-OHDA/Veículo e 6-OHDA/Copaíba apresentaram diminuições na ambulação de 44,6% e 48,1%, respectivamente, em relação grupo Veículo/Veículo (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Veículo/Veículo = 85,36 ± 14,74%; 6-OHDA/Veículo = 40,4 ± 7,66%; 6-OHDA/Copaíba = 37,19 ± 6,33%; ** p < 0,0001; média ± erro padrão). No 28° dia, a mesma resposta comportamental foi observada, onde os mesmos grupos apresentaram redução na ambulação de

44,3% e 49,5%, respectivamente, em relação ao grupo Veículo/Veículo (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Veículo/Veículo = $88,05 \pm 20,69\%$; 6-OHDA/Veículo = $43,71 \pm 8,09\%$; 6-OHDA/Copaíba = $38,47 \pm 6,06\%$; ** $p < 0,0001$; média \pm erro padrão).

Esses resultados demonstram que injeções intraestriatais de 6-OHDA ocasionou um comprometimento na atividade locomotora no teste do campo aberto, além de mostrar que o tratamento com copaíba não melhorou o desempenho motor dos animais do grupo 6-OHDA/Veículo no teste (Figura 8B).

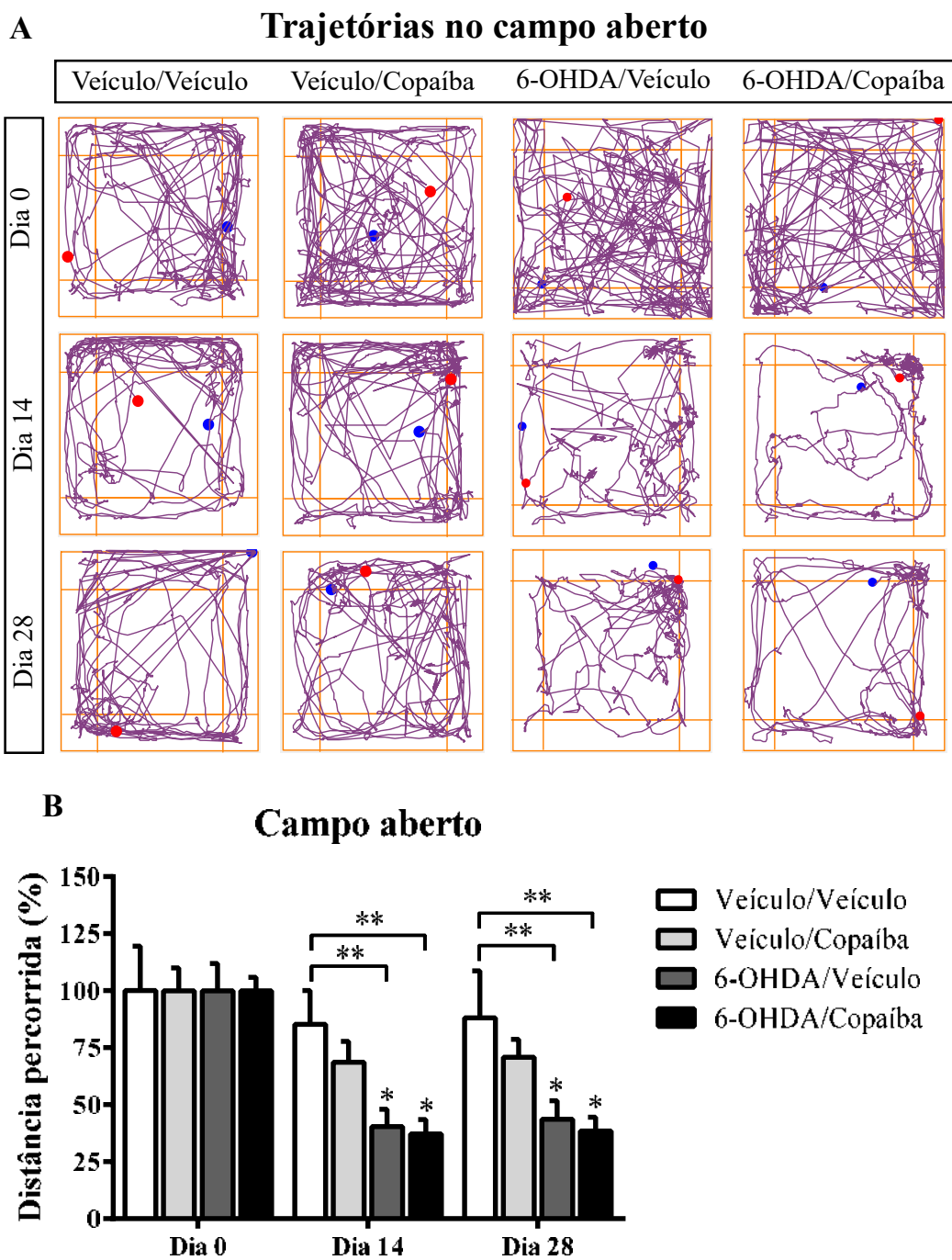


Figura 8: Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto. (A) Representação das trajetórias percorridas durante os testes. (B) Distância percorrida (%) durante os dias de teste. * $p < 0,0001$ versus Dia 0; ** $p < 0,0001$ versus Veículo/Veículo. Dados expressos em média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 8; Veículo/Copaíba N = 8; 6-OHDA/Veículo N = 13; e 6-OHDA/Copaíba N = 16

A fim de averiguar se a redução na ambulação dos grupos injetados com 6-OHDA foi exclusivamente devida ao fator de comprometimento da atividade locomotora ou se outro fator (não motor) esteve presente, analisamos o tempo em que os animais permaneceram imóveis durante o teste. Também averiguamos o comportamento de tigmotaxia, no qual é mensurado o tempo em que os animais permaneceram na ZP do aparato, sendo indicativo de comportamento ansioso.

A figura abaixo representa a trajetória dos grupos durante os 3 dias em que o teste do campo aberto foi realizado. Considerando o parâmetro de tigmotaxia, a imagem nos permite observar que alguns animais apresentaram um padrão comportamental característico de tigmotaxia (Figura 9A).

A Figura 9B, demonstra que em relação ao dia 0, os grupos 6-OHDA/Veículo e 6-OHDA/Copaíba permaneceram imóveis por mais tempo, tanto no 14° quanto no 28° dia (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0: 6-OHDA/Veículo = $91,15 \pm 17,58$; 6-OHDA/Copaíba = $49,50 \pm 9,84$; 14° dia: 6-OHDA/Veículo = $180,1 \pm 21,25$; 6-OHDA/Copaíba = $144,5 \pm 21,13$; 28° dia: 6-OHDA/Veículo = $151,8 \pm 23,26$; 6-OHDA/Copaíba = $151,3 \pm 20,25$; ** $p < 0,001$; média \pm erro padrão). No dia 0, o grupo 6-OHDA/Copaíba apresentou menor tempo de imobilidade em relação aos demais grupos, sendo significativamente diferente em relação ao grupo Veículo/Veículo (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Veículo/Veículo = $135,6 \pm 20,90$; 6-OHDA/Copaíba = $49,50 \pm 9,846$; * $p < 0,05$; média \pm erro padrão).

A análise do comportamento de tigmotaxia no 14° dia mostrou que os grupos 6-OHDA/Veículo e 6-OHDA/Copaíba permaneceram mais tempo na ZP do aparato em relação e aos grupos Veículo/Veículo e Veículo/Copaíba, respectivamente. O mesmo fenômeno também foi observado no 28° dia (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Dia 0: Veículo/Veículo = $237,9 \pm 6,49$; Veículo/Copaíba = $205,2 \pm 6,07$; 6-OHDA/Veículo = $178,6 \pm 18,43$; 6-OHDA/Copaíba = $193,2 \pm 7,31$; 14° dia: Veículo/Veículo = $236,4 \pm 9,46$; Veículo/Copaíba = $229 \pm 12,64$; 6-OHDA/Veículo = $180,5 \pm 16,93$; 6-OHDA/Copaíba = $180,3 \pm 16,11$; †† $p < 0,001$; 28° dia: Veículo/Veículo = $266,3 \pm 9,46$; Veículo/Copaíba = $266,3 \pm 9,46$; 6-OHDA/Veículo = $200,1 \pm 10,55$; 6-OHDA/Copaíba = $202,3 \pm 13,33$; + $p < 0,001$; média \pm erro padrão). No dia 0, o grupo 6-OHDA/Veículo ficou menos tempo na ZP em relação aos demais grupos, sendo significativamente diferente em relação ao grupo Veículo/Veículo (ANOVA *Two Way*; teste Bonferroni; Veículo/Veículo = $237,9 \pm 6,499$; 6-OHDA/Veículo = $193,2 \pm 7,318$; * $p < 0,05$; média \pm erro padrão) – Figura 9C).

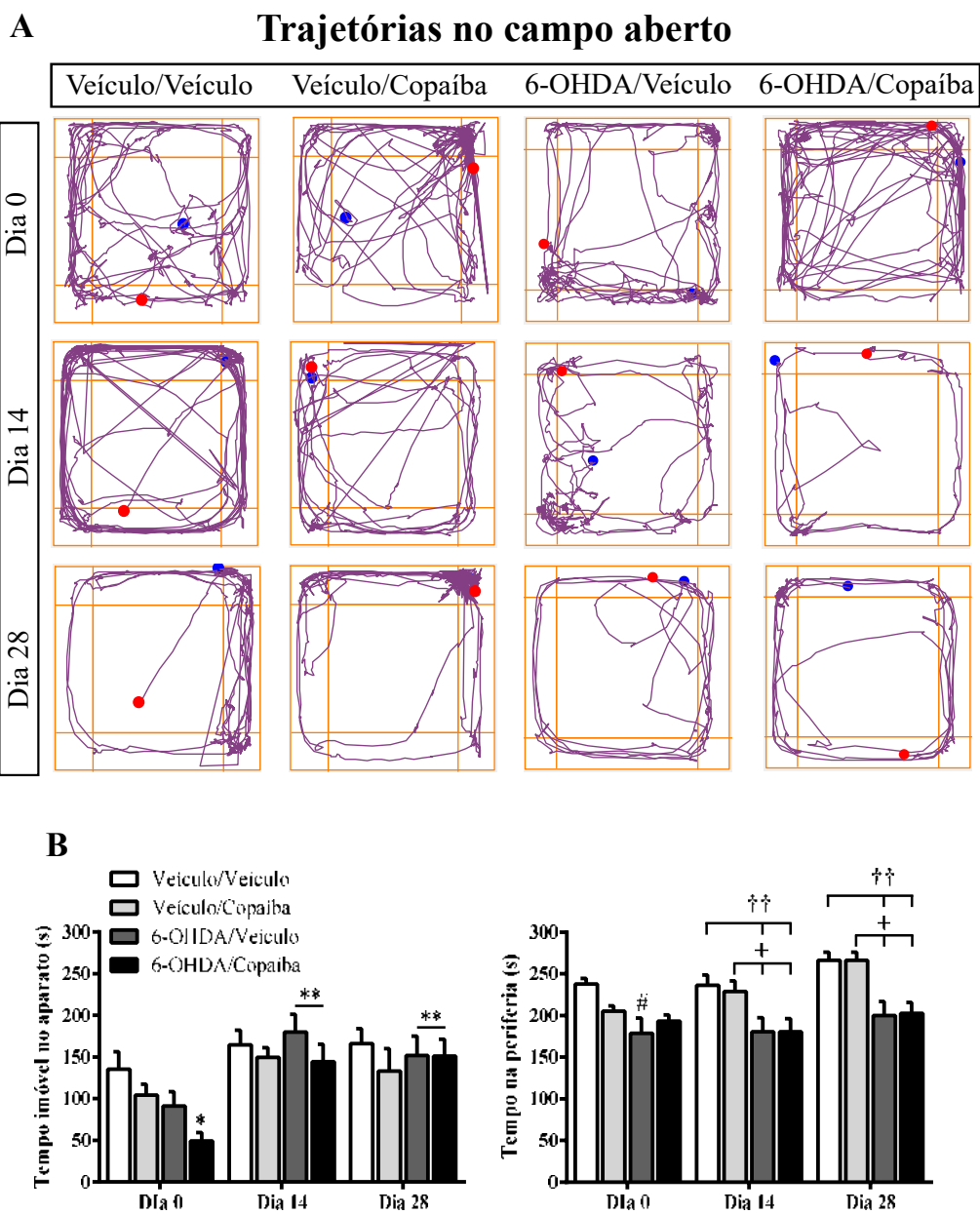


Figura 9: Avaliação da atividade locomotora no teste do campo aberto. (A) Representação das trajetórias percorridas durante os testes. (B) Distância percorrida (%) durante os dias de teste. * $p < 0,0001$ versus Dia 0; ** $p < 0,0001$ versus Veículo/Veículo. Dados expressos em média \pm erro padrão. Veículo/Veículo N = 8; Veículo/Copaíba N = 8; 6-OHDA/Veículo N = 13; e 6-OHDA/Copaíba N = 16.

Esses resultados sugerem que nos grupos injetados com 6-OHDA, os animais permaneceram por mais tempo imóveis, além de dispendem mais tempo na ZP do aparato em relação aos demais grupos, sendo característicos de ansiedade. Tais circunstâncias, nos mostram que ao tratamento com óleo-resina de *C. reticulata* Ducke não teve efeito nesse parâmetro comportamental.

Contudo, o teste do campo aberto não é suficiente para inferirmos que somente o comportamento de tigmotaxia represente uma resposta de ansiedade no modelo de DP realizado neste trabalho, pois seria necessário a realização de outros testes comportamentais como os testes: labirinto em cruz elevado, caixa claro-escuro, labirinto em zero e exposição ao objeto novo (BONITO-OLIVA; MASINI; FISONE, 2014; CARVALHO et al., 2013; CRYAN; HOLMES, 2005).

4.5. GRAU DA LESÃO GERADA PELA 6-OHDA E EFEITO NEUROPROTETOR DO ÓLEO-RESINA DE *Copaifera reticulata* Ducke NO TESTE DE ROTAÇÕES INDUZIDAS POR APOMORFINA

A apomorfina é um agonista dopaminérgico que é utilizada para avaliação do grau da lesão provocada pela 6-OHDA injetada unilateralmente no estriado, pois após o estabelecimento da lesão nigroestriatal é possível avaliar a assimetria dopaminérgica entre o hemisfério cerebral lesionado pela neurotoxina em relação ao hemisfério intacto (SCHWARTING; HUSTON, 1996).

A explicação para as rotações contralaterais é que quando há degeneração dopaminérgica provocada pela 6-OHDA, os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos no estriado ficam hipersensibilizados em relação ao lado intacto e com administração sistêmica de apomorfina, que é um agonista dopaminérgico, liga-se ao respectivos receptores gerando uma resposta neurofisiológica semelhante ao do neurotransmissor dopamina, que por sua vez estimula vias motoras descendentes, que finalmente culmina no comportamento rotacional involuntário contralateral à lesão (SCHWARTING; HUSTON, 1996).

Tal característica é importante para a avaliação de possíveis estratégias neuroprotetoras, pois é possível mensurar se a estratégia de tratamento está sendo efetiva frente à neurodegeneração dopaminérgica provocada por neurotoxinas em modelos animais, a partir do número de rotações contralaterais, que são indicativos de degeneração da via nigroestriatal. Nesse contexto, a presença da lesão intraestriatal unilateral provocada pela 6-OHDA foi averiguada pelo teste farmacológico da apomorfina, que foi realizado no 14° e 28° dia após injeção de 6-OHDA.

O comportamento rotacional contralateral à lesão esteve presente em ambos os grupos injetados com 6-OHDA, onde no 14° e 28° dia, esses grupos apresentaram rotações contralaterais elevadas em relação aos grupos injetados com solução veículo (ANOVA *One Way*; teste Tukey; 14° dia: Veículo/Veículo = 0 ± 0 ; Veículo/Copaíba = 0 ± 0 ; 6-OHDA/Veículo = $203,2 \pm 35,15$; 6-OHDA/Copaíba = $92,19 \pm 17,17$; * $p < 0,0001$; 28° dia: Veículo/Veículo = 0 ± 0 ; Veículo/Copaíba = 0 ± 0 ; 6-OHDA/Veículo = $193,9 \pm 39,86$; 6-OHDA/Copaíba = $119,7 \pm 25,38$; * $p < 0,0001$; média \pm erro padrão). A análise dos grupos injetados com 6-OHDA mostrou redução de 54,6% no número de rotações contralaterais no grupo tratado com Copaíba em relação ao grupo não tratado no 14° dia (ANOVA *One Way*; teste Tukey; Veículo/Veículo = 0 ± 0 ; Veículo/Copaíba = 0 ± 0 ; 6-OHDA/Veículo = $203,2 \pm 35,15$; 6-OHDA/Copaíba =

92,19 ± 17,17; ** p < 0,0001). Entretanto, essa diferença não se manteve no 28° dia (ANOVA *One Way*; teste Tukey; Veículo/Veículo = 0 ± 0; Veículo/Copaíba = 0 ± 0; 6-OHDA/Veículo = 193,9 ± 39,86; 6-OHDA/Copaíba = 119,7 ± 25,38; p = 0,1291; média ± erro padrão) – Figura 10.

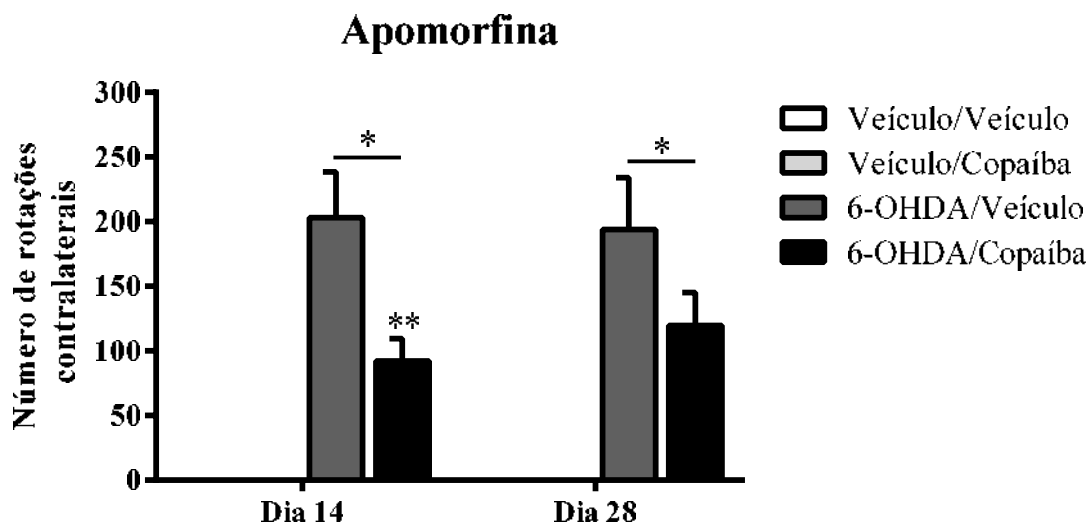


Figura 10: Teste de rotações induzidas por apomorfina. * p < 0,0001 versus Veículo/Veículo e Veículo/Copaíba; ** p < 0,0001 versus 6-OHDA/Veículo. Dados expressos em média ± erro padrão. Veículo/Veículo N = 8; Veículo/Copaíba N = 8; 6-OHDA/Veículo N = 13; e 6-OHDA/Copaíba N = 16.

Popularmente conhecida como copaíba, o óleo-resina de *Copaifera reticulata* Ducke é amplamente utilizado na medicina popular. Guimarães-Santos e colaboradores (2012) avaliaram o potencial neuroprotetor e antiinflamatório do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke em modelo de lesão excitotóxica no córtex motor de ratos. Esse trabalho pôde corroborar a hipótese do efeito neuroprotetor do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke, a partir da redução de 60% na ativação de microglia, a qual é indicadora de processos neuroinflamatórios e espécies reativas de oxigênio, diminuindo, assim, a área da lesão. Tal evidência, pode estar relacionada ao beta-cariofileno (BCP), que é um sesquiterpeno presente em maior quantidade (40,9%) no óleo-resina da *C. reticulata* Ducke (VEIGA JUNIOR et al., 2007).

Dentre os diversos fitocannabinóides, o BCP é um canabinóide dietético extensamente disponível e comumente utilizado como conservante, aditivo, aromatizante em alimentos e cosméticos. Farmacologicamente, ele é um ligante do receptor endocanabinóide tipo II (CB2)

não psicoativo, possuindo propriedades anti-inflamatórias (GERTSCH et al., 2008) e antioxidantes (SINGH et al., 2006).

Recentemente, os receptores CB2 são tidos como novos alvos terapêuticos na DP devido às suas funções de neutralização de estresse oxidativo, a partir do restabelecimento de enzimas antioxidantes e inibição de peroxidação lipídica, e de neuroinflamação, através da redução na ativação de microglia e de astrócitos na substância negra *pars compacta* e no estriado de roedores (BENTO et al., 2008; CONCANNON et al., 2015). Sendo assim, a ativação dos receptores CB2 mostra-se como um potencial alvo terapêutico por inibir os ciclos de neuroinflamação e por preservar a homeostase neuronal em desordens neurodegenerativas, incluindo a DP (GOMEZ-GALVEZ et al., 2016; JAVED et al., 2016; OJHA et al., 2016; PALAZUELOS et al., 2009; PRICE et al., 2009; RAMIREZ et al., 2005; SAGREDO et al., 2009).

O efeito neuroprotetor mediado pelo receptor CB2 foi investigado 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 disso, houve proteção dos neurônios dopaminérgicos na substância negra e subsequente redução na ativação de microglia, demonstrando efeito terapêutico frente à neurodegeneração induzida por rotenona (JAVED et al., 2016). Outro estudo foi realizado para avaliar o efeito neuroprotetor do BCP em modelo da DP induzido por rotenona, onde o tratamento com o BCP protegeu os neurônios dopaminérgicos e reduziu a ativação de microglia e astrócitos, os quais são indicativos de neuroinflamação. Ademais, o BCP atenuou citocinas pró-inflamatórias e mediadores inflamatórios, restabeleceu enzimas antioxidantes e inibiu a peroxidação lipídica (OJHA et al., 2016).

A partir dessas evidências presentes na literatura, objetivamos avaliar o efeito neuroprotetor do óleo-resina de *C. reticulata* em modelo *in vivo* da DP induzido por 6-OHDA. Os resultados preliminares desse experimento foram apresentados no presente trabalho (avaliação de sobrevivência, massa corporal, histologia e parâmetros comportamentais), sendo a redução de 54,6% no número de rotações induzidas por apomorfina no grupo 6-OHDA/Copaíba (no 14º dia), o principal resultado, o qual mostrou um efeito neuroprotetor. Ademais, a redução no número de fibras TH⁺ no estriado mostrou-se reduzida em relação ao grupo 6-OHDA/Veículo, corroborando, assim, os resultados obtidos no teste de rotações.

Contudo, não podemos afirmar categoricamente que o efeito observado no teste de rotações por apomorfina está relacionado exclusivamente ao BCP, afinal a composição do óleo-resina de *C. reticulata* Ducke é heterogênea, contendo cerca de 37 sesquiterpenos com propriedades químicas diferentes (VEIGA JUNIOR et al., 2007), podendo exercer funções farmacológicas diversificadas no SNC. Mesmo assim, o tratamento com óleo-resina se mostrou neuroprotetor e nossos resultados sugerem que sejam feitas investigações mais detalhadas acerca dos sesquiterpenos presentes no óleo-resina de *C. reticulata* Ducke, sendo o BCP a molécula de maior interesse como alternativa terapêutica.

5. CONCLUSÕES

- Injeções unilaterais intraestriatais utilizando 10 µg de 6-OHDA são suficientes para induzir lesão no sistema nigroestriatal.

- O tratamento com óleo-resina de *Copaifera reticulara* Ducke demonstrou efeito neuroprotetor no 14º dia a partir da redução no número de rotações induzidas por apomorfina, porém o mesmo efeito não foi observado no 28º dia de teste.

- O tratamento com óleo-resina de *C. reticulara* Ducke não melhorou o quadro motor de camundongos injetados com 6-OHDA no teste do campo aberto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 182-93, Mar 2008.

ANTONY, P. M. et al. The hallmarks of Parkinson's disease. **FEBS J**, v. 280, n. 23, p. 5981-93, Dec 2013.

BENTO, A. F. et al. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. **J Leukoc Biol**, v. 84, n. 4, p. 1213-21, Oct 2008.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS J**, v. 279, n. 7, p. 1156-66, Apr 2012.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 14 Suppl 2, p. S124-9, 2008.

BONITO-OLIVA, A.; MASINI, D.; FISONE, G. A mouse model of non-motor symptoms in Parkinson's disease: focus on pharmacological interventions targeting affective dysfunctions. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 290, 2014.

BOVE, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51-76, Jun 01 2012.

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

CARLSSON, T. et al. Systemic administration of neuregulin-1beta1 protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 117, n. 6, p. 1066-74, Jun 2011.

CARVALHO, M. M. et al. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Mol Neurodegener**, v. 8, p. 14, Apr 26 2013.

CHAUDHURI, K. R. et al. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 3, p. 235-45, Mar 2006.

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. **J Neurosci Res**, v. 57, n. 1, p. 86-94, Jul 01 1999.

CHRISTAKIS, D. A.; RAMIREZ, J. S.; RAMIREZ, J. M. Overstimulation of newborn mice leads to behavioral differences and deficits in cognitive performance. **Sci Rep**, v. 2, p. 546, 2012.

CONCANNON, R. M. et al. Differential upregulation of the cannabinoid CB(2) receptor in neurotoxic and inflammation-driven rat models of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 269, p. 133-41, Jul 2015.

CRYAN, J. F.; HOLMES, A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 9, p. 775-90, Sep 2005.

CUNNINGHAM, C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 71-90, Jan 2013.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889-909, Sep 11 2003.

FERRER, I. Early involvement of the cerebral cortex in Parkinson's disease: convergence of multiple metabolic defects. **Prog Neurobiol**, v. 88, n. 2, p. 89-103, Jun 2009.

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 26, p. 9099-104, Jul 1 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. 200-8, Jan 4 2016.

GROW, D. A.; MCCARREY, J. R.; NAVARA, C. S. Advantages of nonhuman primates as preclinical models for evaluating stem cell-based therapies for Parkinson's disease. **Stem Cell Res**, v. 17, n. 2, p. 352-366, Sep 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.

HEUER, A. et al. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behav Brain Res**, v. 228, n. 1, p. 30-43, Mar 01 2012.

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.

LANGSTON, J. W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Ann Neurol**, v. 59, n. 4, p. 591-6, Apr 2006.

LICKER, V. et al. Proteomics in human Parkinson's disease research. **J Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 10-29, Nov 02 2009.

MARTINEZ-MARTIN, P. et al. Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. **Mov Disord**, v. 22, n. 11, p. 1623-9, Aug 15 2007.

MENDES FDE, C. et al. Enriched environment and masticatory activity rehabilitation recover spatial memory decline in aged mice. **BMC Neurosci**, v. 14, p. 63, Jun 28 2013.

MORRONI, F. et al. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 36, p. 63-71, May 2013.

NISHIMURA, F. et al. Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 21, n. 2, p. 171-80, 2003.

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, Jul 2016.

OLANOW, C. W. Can we achieve neuroprotection with currently available anti-parkinsonian interventions? **Neurology**, v. 72, n. 7 Suppl, p. S59-64, Feb 17 2009.

OLANOW, C. W.; KIEBURTZ, K.; SCHAPIRA, A. H. Why have we failed to achieve neuroprotection in Parkinson's disease? **Ann Neurol**, v. 64 Suppl 2, p. S101-10, Dec 2008.

PALAZUELOS, J. et al. Microglial CB2 cannabinoid receptors are neuroprotective in Huntington's disease excitotoxicity. **Brain**, v. 132, n. Pt 11, p. 3152-64, Nov 2009.

PARK, A.; STACY, M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **J Neurol**, v. 256 Suppl 3, p. 293-8, Aug 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).

PEZZOLI, G.; ZINI, M. Levodopa in Parkinson's disease: from the past to the future. **Expert Opin Pharmacother**, v. 11, n. 4, p. 627-35, Mar 2010.

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. 2177-86, Jun 2009.

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. 1904-13, Feb 23 2005.

RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777-83, Aug 19 2016.

RIBEIRO, R. P. et al. Probucol affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 38, n. 3, p. 660-8, Mar 2013.

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. 1154-67, Aug 15 2009.

SANTIAGO, K. B. et al. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomed Pharmacother**, v. 70, p. 12-8, Mar 2015.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 215-24, Oct 2004.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Prog Neurobiol**, v. 49, n. 3, p. 215-66, Jun 1996.

SIMPKINS, N.; JANKOVIC, J. Neuroprotection in Parkinson disease. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 14, p. 1650-4, Jul 28 2003.

SINGH, G. et al. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. **J Agric Food Chem**, v. 54, n. 1, p. 174-81, Jan 11 2006.

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.

STOCCHI, F.; OLANOW, C. W. Neuroprotection in Parkinson's disease: clinical trials. **Ann Neurol**, v. 53 Suppl 3, p. S87-97; discussion S97-9, 2003.

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. 1042-56, Mar 2014.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 107-10, Dec 1968.

_____. 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. **Pharmacol Ther B**, v. 2, n. 1, p. 37-40, 1976.

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. 248-54, Jun 13 2007.

WONG, Y. C.; KRAINIC, D. alpha-synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. **Nat Med**, v. 23, n. 2, p. 1-13, Feb 07 2017.

ZHAO, B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Neurochem Res**, v. 34, n. 4, p. 630-8, Apr 2009.

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 o Projeto intitulado "BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS AMAZÔNICAS COM POTENCIAL NEUROMODULADOR EM MODELOS EXPERIMENTAIS DA DOENÇA DE PARKINSON", protocolado sob o CEUA nº 6743170716, sob a responsabilidade de Elizabeth Sumi Yamada e equipe; Anderson Valente Amaral; Arnaldo Jorge Martins Filho; Dielly Catrina Favacho Lopes; Edmar Tavares Da Costa; Milton Nascimento Silva; Riky Douglas Melo Gomes; Váldina Solimar Cardoso Lopes; Wallace Gomes Leal - 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) - encontra-se 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, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 28/07/2016.

We certify that the proposal "BIOPROSPECTING FROM AMAZON PLANTS WITH NEUROMODULATOR POTENTIALS IN EXPERIMENTAL MODELS OF PARKINSON'S DISEASE", utilizing 240 Heterogenic mice (240 males), protocol number CEUA 6743170716, under the responsibility of Elizabeth Sumi Yamada and team; Anderson Valente Amaral; Arnaldo Jorge Martins Filho; Dielly Catrina Favacho Lopes; Edmar Tavares Da Costa; Milton Nascimento Silva; Riky Douglas Melo Gomes; Váldina Solimar Cardoso Lopes; Wallace Gomes Leal - 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) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, 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 07/28/2016.

Vigência da Proposta: de 01/2014 a 06/2017

Área: Departamento De Fisiologia

Procedência: Biotério do Laboratório de neuropatologia experimental

Espécie:	Camundongos heterogênicos	Gênero:	Machos	idade:	10 a 12 semanas	N:	120
Linhagem:	Mus musculus/C57Bl6			Peso:	30 a 45 g		

Procedência: Biotério do Laboratório de neuropatologia experimental

Espécie:	Camundongos heterogênicos	Gênero:	Machos	idade:	10 a 12 semanas	N:	120
Linhagem:	Mus musculus/Swiss			Peso:	30 a 45 g		

Resumo: O bioma Amazônia representa uma das maiores fontes de biodiversidade do planeta. A preservação e o uso sustentável desta riqueza requer a aquisição e o domínio de conhecimento científico nas mais diversas áreas. Em 2010, o período entre 2011-2020 foi proclamado como "a década da biodiversidade" pela Assembleia Geral da ONU, numa tentativa de estimular ações futuras mais concretas mediante o fracasso dos países em atingir as metas traçadas em 2002 visando diminuir a perda da biodiversidade global. Além das consequências negativas para o meio ambiente? desde alterações climáticas até o comprometimento das fontes de água potável? a diminuição da biodiversidade implica na perda de potenciais fontes de novos fármacos. Entretanto, a preservação da biodiversidade de nada adiantará se não soubermos como usá-la de modo correto e em prol da sociedade, não havendo outro caminho senão o investimento maciço de recursos financeiros para fomentar a busca desse conhecimento. A presente proposta visa contribuir em uma dentre as inúmeras áreas do conhecimento necessárias para se explorar os potenciais benéficos da biodiversidade amazônica: a descoberta de novos fármacos. Estudos prévios resultantes da parceria entre o Laboratório de Neuropatologia Experimental (LaNEEx) e o Laboratório de Cromatografia Líquida de Alta Performance (LaNEEx/LabCrol) da Universidade Federal do Pará indicaram propriedades neuroprotetoras no extrato de folhas de *Swietenia macrophylla* em modelo in vivo de doença de Parkinson. Portanto, valendo-se da experiência do grupo em estudos na área de neurodegeneração, pretende-se rastrear propriedades neuromoduladoras em extratos adicionais de plantas da flora amazônica, assim como aprofundar a investigação dos efeitos neuroprotetores da *Swietenia macrophylla*. Para tanto, serão utilizados modelos experimentais in vitro e in vivo da doença de Parkinson, a mais comum das desordens motoras, e ainda sem terapias que interrompam sua progressão. A proposta pretende contribuir com a produção de conhecimento científico de qualidade assim como com a formação de recursos humanos na região, que possam contribuir para incrementar o uso sustentável da biodiversidade amazônica.

Belém do Pará, 01 de agosto de 2016



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

Moisés Hamoy

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará