



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

HYAGO ANDREYSON PEREIRA TEIXEIRA

EFEITO DO METILEUGENOL SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
INDUZIDAS PELA NEUROTOXINA ROTENONA NO MODELO EXPERIMENTAL
DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS WISTAR

RECIFE

2017

HYAGO ANDREYSON PEREIRA TEIXIERA

EFEITO DO METILEUGENOL, SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS
INDUZIDAS PELA NEUROTOXINA ROTENONA NO MODELO EXPERIMENTAL
DE DOENÇA DE PARKINSON EM RATOS WISTAR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na área de Obtenção e Avaliação de Produtos Naturais e Compostos Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley

RECIFE

2017

T266e Teixeira, Hyago Andreyson Pereira.
Efeito do metileugenol sobre as alterações comportamentais induzidas pela neurotoxina rotenona no modelo experimental de doença de Parkinson em ratos wistar / Hyago Andreyson Pereira Teixeira.– 2017.
89 f. il.; quad.; 30 cm.

Orientador: Almir Gonçalves Wanderley.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2017.
Inclui referências e anexos.

1. Neuroproteção. 2. Doença de Parkinson. 3. Rotenona. 4. Metileugenol. 5. Avaliação comportamental. I. Wanderley, Almir Gonçalves (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-326)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Aprovada em: 05/10/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley
(Presidente e Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade
(Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Filipe S. Duarte
(Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais Francisco das Chagas e Maralvina Batista e aos meus irmãos Hygo e Hyany Teixeira, que sempre foram a base para as minhas conquistas e me deram todo o apoio, os ensinamentos e o incentivo para seguir meus sonhos. Vocês são as minhas fontes de inspiração, sucesso e exemplos. Obrigado por tudo. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus; o Deus em que acredito; Deus do universo, no qual sempre confiei, que sempre foi o meu apoio, sempre me deu forças e me guiou pelo melhor caminho até quando estava mais perdido. Obrigado, Pai.

Ao Professor Almir Wanderley, pelo voto de confiança. Por ter me aceito em seu laboratório e em sua equipe. Por ter aceitado um projeto que não vinha seguindo a linha de raciocínio dos outros colegas. Pela paciência, dedicação e pelos ensinamentos. A estada no laboratório foi de suma importância para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

A Jamilka Silva, Samara Brito, Glaucia Dal Santo e Lady Kalline que, mesmo no meio de toda a correria, disponibilizavam do seu tempo para tirar dúvidas, ensinar, ajudar e, até mesmo, “puxar a orelha” quando necessário. Pelos sorrisos, momentos de descontração e pela troca de conhecimentos.

A Dailo Augusto, pelo apoio e pela ajuda fundamental. Sem você esta pesquisa, com certeza, não seria a mesma. Pela paciência, pelos ensinamentos, pelas caronas e pela companhia nas madrugadas e finais de semana de trabalho e pesquisa. Mesmo com algumas desavenças, no final, sempre conseguíamos nos entender.

A Anne Marinho, pelo apoio moral, pela motivação e pelos bons conselhos. Como também pela companhia, pelo carinho, pelos abraços apertados e pelas conversas inteligentes. E pelas discussões bem elaboradas a caminho do restaurante universitário.

A Alisson Rodrigo, um amigo e irmão, que sempre me ajudou e me aconselhou da melhor forma possível. Pelos ensinamentos, pelos sorrisos, pelo amadurecimento pessoal e, principalmente, por ter me dado forças para entrar nesse mestrado.

A Victor Sales, que entrou junto comigo nesse laboratório e pode acompanhar todo o meu crescimento de perto. Pela sua paciência, pelo apoio, pelas conversas, pelo carinho e pela amizade. A Mariana Pontes, que sempre chegava alegrando o dia com toda a sua energia fora do comum; você, realmente, sabe animar as pessoas.

A todos os outros membros do laboratório que, mesmo indiretamente, estavam me ajudando no processo de amadurecimento com experiências, doutrinas, sorrisos e sermões.

Ao professor Filipe Duarte, por todos os ensinamentos, conselhos, pela paciência, animação e por ceder seu laboratório para a realização de alguns experimentos. Sempre me dando uma alternativa e mostrando o melhor caminho, ajudando-me sempre a não esquecer o meu objetivo. Agradeço a toda sua equipe também; nunca me senti tão bem acolhido em um outro laboratório.

A Ricielle Lopes, pelos sorrisos, pelo apoio, pelas dicas, instruções e pela paciência. A veterinária Claudia Paiva de Oliveira e toda a equipe do biotério, por sempre me receber tão bem, estar disposta a ajudar e tirar as dúvidas.

A toda a equipe da secretaria da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e, principalmente, a Nerilin Trajano, que sempre me recebeu com sorrisos, sempre me acalmou e compartilhou dos momentos de dificuldades e alegrias.

A FACEPE, pelo apoio financeiro, que contribuiu para o bom desenvolvimento desta pesquisa. À PROPESQ pelo apoio na Pós-Graduação.

A Charles Wilames, pelo companheirismo, pela paciência, torcida, pelo ombro amigo para as horas de desespero e palavras sempre sábias com o dom de acalmar. A Weverton Ricardo, um colega de apartamento sem igual. Pela amizade, pelas dicas, pelos desabafos, pela paciência e por toda a ajuda.

A Dema Filho, um exemplo de profissional no qual me inspiro. Pelos sorrisos, ensinamentos, pelo apoio e pela motivação. A Walmi Moraes, um conselheiro. Pelos momentos de alegria, pelos “puxões de orelha”, pela inspiração e pela ajuda paternal.

A Jailton Dutra, que sempre tentou me acalmar, mesmo não entendendo nada do que falava, às vezes. Pelos conselhos, pelas conversas e pela força.

A Thiago Medis, que sempre acreditou em mim. Pelo carinho, pelo amadurecimento, pelas discussões, pela torcida, pela força na reta final, pelas conversas inteligentes, pela inspiração e motivação. Sou teu fã.

E a todos os que, estando bem próximos ou distantes, pessoalmente ou virtualmente, desempenharam um papel fundamental na minha formação. E que sei que estavam na torcida por mais esta conquista.

O meu muito obrigado.

RESUMO

O metileugenol é uma substância encontrada nos óleos essenciais de várias plantas aromáticas e que possui atividade antioxidante e neuroprotetora. Logo, pareceu-nos atraente investigar o possível efeito dessa substância em aspectos comportamentais (motores e cognitivos) em um modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona. Para isso, seis grupos de ratos Wistar (n=8-13/grupo) foram pré-tratados por gavagem durante 5 dias consecutivos com veículo (tween 80 a 2%), levodopa + carbidopa (0,75 + 7,5 mg/kg) ou metileugenol (ME 5, 15 ou 37 mg/kg). Dez minutos depois, foi administrada a neurotoxina rotenona (1,5 mg/kg durante três dias + 1 mg/kg por dois dias, s.c). Vinte e quatro horas após o último tratamento, foram realizadas avaliações comportamentais nos animais, por meio dos testes de catalepsia, campo aberto, rotarod e labirinto T elevado. Os resultados demonstraram que a melhor dose de rotenona, para indução do parkinsonismo com maior taxa de sobrevivência, foi de 1,5 mg/kg (por três dias) + 1 mg/kg (por mais dois dias). Com isso a administração de rotenona produziu perda de massa corporal ($-36,00 \pm 8,20$ g); diminuição no consumo de ração (variação de $18,85 \pm 1,33$ para $0,58 \pm 0,34$ g); acinesia (6,00 s) no teste da catalepsia; hipolocomoção (1,50 quadrantes) e aumento da imobilidade ($260,70 \pm 12,81$ s) no campo aberto; incoordenação motora (1,00 s) no teste do rotarod e déficit de memória (0,00 %) no teste do labirinto T elevado. Enquanto que a administração previa de levodopa + carbidopa conseguiu reverter esses sintomas, exceto o déficit de memória. E o pré-tratamento com metileugenol na dose de 5 mg/kg conseguiu reverter a diminuição no consumo de ração (variação de $9,90 \pm 1,39$ para $10,38 \pm 0,23$ g), a acinesia (1,00 s), a hipolocomoção (17,00 quadrantes), a imobilidade ($186,30 \pm 16,60$ s) e a incoordenação motora (54,00 s), porém não reverteu a perda de massa corporal ($-32,62 \pm 5,83$ g) e o déficit de memória (40,20 %). Dessa forma, sugerimos que o ME na dose de 5 mg/kg apresenta um efeito antiparkinsoniano que pode estar relacionado possivelmente a sua atividade antioxidante e neuroprotetora, indicando um possível benefício terapêutico para a doença de Parkinson.

Palavras-chave: Neuroproteção. Doença de Parkinson. Rotenona. Metileugenol. Avaliação comportamental.

ABSTRACT

Methyleugenol is a substance found in essential oils of various aromatic plants and has antioxidant and neuroprotective activity. Therefore, it appeared to us attractive to investigate the possible effect of this substance on behavioral (motor and cognitive) aspects in an experimental model of Parkinson's disease induced by rotenone. For this, six groups of Wistar rats ($n = 8-13$ / group) were pretreated by gavage for 5 consecutive days with vehicle (tween 80 and 2%), levodopa + carbidopa ($0.75 + 7.5$ mg / a), or methyleugenol (ME 5, 15 or 37 mg / kg). Ten minutes later, a neurotoxin rotenone (1.5 mg / kg for three days + 1 mg / kg for two days, s.c.) was administered. Twenty-four hours after the last treatment, through catalepsy, open field, rotarod, and high T labyrinth tests. The results show that the best dose of rotenone for induction of parkinsonism with higher survival rates was 1.5 mg / kg (for three days) + 1 mg / kg (for two days). With this administration of rotenone it produces loss of body mass (-36.00 ± 8.20 g); reduction in feed intake (variation from 18.85 ± 1.33 to 0.58 ± 0.34 g); akinesia (6.00 s) without catalepsy test; hypolocomotion (1.05 quadrants) and increased immobility (260.70 ± 12.81 s) in the open field; motor incoordination (1.00 s) in the rotarod and memory deficit (0.00 %) in the high T labyrinth. While prior administration of levodopa + carbidopa has been able to reverse these symptoms, except for memory deficit. Pretreatment with methyleugenol at a dose of 5 mg / kg was able to reverse the reduction in feed intake (variation of 9.90 ± 1.39 to 10.38 ± 0.23 g), akinesia (1.00 s), immobility (186.30 ± 16.60 s) and motor incoordination (54.00 s), but did not reversed the loss of body mass (-32.62 ± 5.83 g) and memory deficit (40.20 %). Thus, we suggest that ME at a dose of 5 mg / kg has an antiparkinsonian effect that may be related possibly its antioxidant and neuroprotective activity, indicating a possible therapeutic benefit for Parkinson's disease.

Keywords: Neuroprotection. Parkinson's disease. Rotenone. Methyleugenol. Behavioral assessment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da rotenona.	28
Figura 2 - Teste da catalepsia.	31
Figura 3 – Teste do campo aberto.....	32
Figura 4 – Teste do rotarod.	33
Figura 5 – Teste do labirinto T elevado.	34
Figura 6 – Fórmula estrutural do metileugenol.	37
Figura 7- Possível biossíntese do metileugenol.	38
Figura 8 -Delineamento experimental.....	47
Figura 9 - Curva de sobrevivência de ratos submetidos a diferentes doses de rotenona, avaliados durante seis dias. R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias, s.c. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=15/grupo). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). *** $p < 0,001$ vs grupo veículo (óleo de girassol).	49
Figura 10 - Curva de sobrevivência de ratos no modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias, s.c.) após tratamento por via oral com metileugenol (ME por 5 dias consecutivos) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg). Os resultados foram expressos como $\pm$ E.P.M. (n=15/grupo). O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).	50
Figura 11 - Efeito do metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre o consumo de ração de ratos com doença de Parkinson induzida por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=8/grupo). A diferença entre grupos foi determinada por ANOVA, seguida pelo pós-teste de Dunnett's. **** $p < 0,0001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).	51
Figura 12 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a massa corporal de ratos no modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). (A) massa corporal absoluta (g). (B) massa corporal relativa (%). Os valores foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ $p < 0,05$ vs grupo	

C+L. $\Psi\Psi$ $p < 0,01$ vs grupo C+L. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).53

Figura 13 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a latência no teste da catalepsia de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de teste Mann Whitney. * $p < 0,05$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c). ..54

Figura 14 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a ambulação (A), autolimpeza (B) e levantar (C) no teste do campo aberto de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ $p < 0,05$ vs grupo C+L-DOPA. *** $p < 0,001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).56

Figura 15 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre o tempo de latência para sair do primeiro quadrante no teste do campo aberto em ratos com doença de Parkinson induzida por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. *** $p < 0,001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).57

Figura 16 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do campo aberto de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como $\pm$ E.P.M (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada por ANOVA, seguida, pelo pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ 0,05 vs grupo C+L, ** $p < 0,01$ vs grupo controle. $\Psi\Psi$ $p < 0,01$ vs grupo C+L-DOPA. $\Psi\Psi\Psi$ $p < 0,001$ vs grupo C+L. **** $p < 0,0001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).58

Figura 17 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre o tempo na latência para a primeira queda (A), o tempo de permanência (B) e nº de quedas (C), no rotarod de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ $p < 0,05$ vs grupo C+L. ** $p < 0,01$ vs grupo controle. $\Psi\Psi$ $p < 0,05$ vs grupo C+L *** $p < 0,001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c). ..60

Figura 18 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a retenção de memória em ratos com doença de Parkinson induzida por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Substâncias que possuem em comum o núcleo fenólico e são utilizadas em estudos com atividade antiparkinsoniana, antioxidante e/ou neuroprotetora.	25
Quadro 2 - Modelos experimentais utilizando a rotenona.	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

ACh: Acetilcolina

AChE: acetilcolinesterase

ATP: adenosina trifosfato

BR: Brasil

CE: Corpo estriado

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DA: dopamina

DNA: ácido Desoxirribonucléico

DP: Doença de Parkinson

DPPH: Método de Captura de Radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil

ERNs: Espécies Reativas de Nitrogênio

EROs: Espécies Reativas do Oxigênio

E.P.M.: Erro Padrão da Média

GABA: ácido gama aminobutírico

GP: Globo Pálido

GPx: glutational peroxidase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC₅₀: Concentração inibitória mínima

i.p.: Via Intraperitoneal

LPS: lipopolissacarídeo

MAO: monoamina oxidase

ME: metileugenol

MPDP⁺: 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina

MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridina

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NB: Núcleos da base

O²⁻: superóxido

OH⁻: radical hidroxila

REM: Rapid Eye Movement

rpm: Rotações por Minuto

s.c.: via subcutânea

SN: Substância Negra

ST: Núcleo Subtalâmico

SOD: superóxido dismutase

UFPE: Universidade Federal Pernambuco

USA: United States of America

v.o.: via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Doença de Parkinson.....	17
1.1.1 Incidência e Prevalência.....	17
1.1.2 Etiologia.....	18
1.1.3 Fisiopatologia.....	20
1.1.4 Quadro Clínico.....	21
1.1.5 Terapêutica.....	22
1.2 Modelos Animais de Doença de Parkinson.....	26
1.2.1 Rotenona.....	27
1.3 Testes Utilizados no Estudo da Doença de Parkinson.....	30
1.4 Estresse Oxidativo.....	34
1.5 Metileugenol.....	36
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 Objetivo Geral.....	40
2.1 Objetivos Específicos.....	40
3 METODOLOGIA.....	41
3.1 Animais	41
3.2 Drogas e Reagentes.....	41
3.3 Análise de Sobrevivência	42
3.4 Grupos Experimentais	42
3.5 Determinação do Consumo de Ração e Evolução da Massa Corporal (Absoluta e Relativa)	43
3.6 Testes Comportamentais.....	43
3.6.1 Teste da Catalepsia.....	43
3.6.2 Teste do Campo Aberto.....	45
3.6.3 Teste do Rotarod.....	45
3.6.4 Teste do Labirinto em T elevado.....	46

3.7 Eutanásia.....	47
3.8 Análise Estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Análise de Sobrevivência	49
4.2 Determinação do Consumo de Ração.....	51
4.3 Evolução da Massa Corporal (Absoluta e Relativa)	52
4.4 Testes Comportamentais.....	54
4.4.1 Teste da Catalepsia.....	54
4.4.2 Teste do Campo Aberto.....	55
4.4.3 Teste do Rotarod.....	59
4.4.4 Teste do Labirinto em T elevado.....	61
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO.....	73
6.1 Perspectivas.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXO A -COMITÊ DE ÉTICA.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

O envelhecimento da população mundial é um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea. No Brasil, que já foi considerado um país de jovens, o número de idosos (≥ 65 anos de idade) deverá quadruplicar até 2060, ou seja, será de 58,4 milhões (26,7% do total) segundo censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2013). E evidências demonstram que o envelhecimento e doenças crônicas degenerativas que acometem a população idosa são causadas em parte pelos danos gerados por radicais livres (BHATTI et al., 2017; KEHRER e KLOTZ, 2015; KRAUSE, 2007).

De fato, doenças típicas do envelhecimento como cardiopatias, acidente vascular cerebral, catarata, osteomalacia, osteoporose, câncer, declínio cognitivo e doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson) estão relacionadas com a produção excessiva de radicais livres (KRAUSE, 2007).

A doença de Parkinson é uma neuropatologia, que possui duas características principais: a primeira é a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos que se projetam da substância negra para o estriado. E a segunda é a presença de inclusões intracitoplasmáticas conhecidas como corpúsculo de Lewy nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes (DICKSON et al., 2017).

As manifestações clínicas da doença de Parkinson surgem quando, pelo menos, 80 – 85% do teor de dopamina no estriado diminui e 50 - 60% dos neurônios da substância negra são destruídos. Logo, a degeneração progressiva da via nigroestriatal é o mediador predominante para as manifestações clínicas dessa doença (BRAAK et al., 2004; FERNANDEZ, 2012).

1.1.1 Incidência e Prevalência

A doença de Parkinson (DP) possui a segunda maior prevalência das doenças neurodegenerativas, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer. Tanto a incidência como a prevalência da DP aumentam com a idade e a taxa de incidência geralmente ocorre na faixa entre 1,5 a 22 em 100.000 habitantes/ano. Quando os estudos ocorrem

apenas em populações acima dos 55 anos, essa incidência aumenta para 410 a 529 em 100.000 habitantes/ano (WIRDEFELDT et al., 2011).

A incidência da DP está proporcionalmente ligada à idade, e é mais elevada nos homens em relação às mulheres. As possíveis causas que justificam a maior incidência em homens incluem: maior exposição a toxinas ocupacionais do campo (pesticidas como a rotenona), menores níveis de estrogênio (um hormônio neuroprotetor) e genes de suscetibilidade recessiva sobre o cromossomo X (TAYLOR et al., 2007; WOOTEN et al., 2004).

Essa incidência acaba gerando uma grande prevalência da doença de Parkinson, que se revela de uma forma crescente e proporcional à idade, ou seja: apresentam a doença 41 em cada 100.000 indivíduos entre 40 a 49 anos; 107 em cada 100.000 indivíduos entre 50 e 59 anos; 428 em 100.000 indivíduos entre 60 e 69 anos; 1.087 por 100.000 indivíduos dos 70 aos 79 anos; e 1.903 por 100.000 em indivíduos com mais de 80 anos. Em relação ao sexo, tal prevalência, está aumentada significativamente nos homens (134 por 100.000) quando comparado às mulheres (41 por 100.000), em todo o mundo, exceto na Ásia onde as taxas se mostram mais equivalentes (PRINGSHEIM et al., 2014).

Segundo Barbosa et al. (2006), o Brasil possui uma prevalência de 330 em 100.000 habitantes, semelhante à de países europeus e do oriente. E de acordo com Dorsey (2007) no ano de 2005 o número de indivíduos, acima dos 50 anos, com DP no mundo, estava entre 4,1 e 4,6 milhões. O mesmo autor fez uma projeção para o ano de 2030, onde esse número dobraria para entre 8,7 e 9,3 milhões.

1.1.2 Etiologia

Em mais de 95% dos casos, a etiologia da DP é desconhecida e essa forma da doença é denominada como DP idiopática ou esporádica. No Brasil causas mais frequentes, da doença, foram as idiopáticas e as induzidas por drogas (BARBOSA et al., 2006). Porém, estudos mostram (DICKSON et al., 2017; DUTY e JENNER, 2011; GASSER, 2005) que vários fatores podem estar envolvidos, entre eles as predisposições genéticas e a exposição a agentes ambientais tóxicos. Logo, esses dois fatores em conjunto teriam as condições necessárias de provocarem a doença.

A hipótese de que toxinas ambientais poderiam gerar parkinsonismo foi descrita após a descoberta dos efeitos do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), em 1982. Nessa época, os usuários de drogas passaram a desenvolver sintomas similares aos observados com a DP, após o uso de meperidina sintética (analgésico opioide), que após análise confirmou-se estar contaminada com MPTP. Os sintomas da DP causados pelo MPTP ocorrem devido ao seu metabólito 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺) que tem atividade tóxica sobre neurônios dopaminérgicos. Essa toxicidade acarreta em uma indução do quadro parkinsoniano irreversível (LANGSTON et al., 1999).

Outras toxinas consideradas ambientais também são prejudiciais aos neurônios dopaminérgicos, como o inseticida rotenona, o herbicida paraquat e o fungicida maneb que causam disfunções mitocondriais. Eles são utilizados como modelos experimentais de DP, e estão associados positivamente ao desenvolvimento da doença em humanos. Estudos epidemiológicos mostraram que exposições a tais substâncias, juntamente com outros fatores, como permanência na residência rural e na agricultura, foram correlacionados também ao desenvolvimento da DP (DUTY e JENNER, 2011; KAMEL et al., 2014; WIRDEFELDT et al., 2011).

Os fatores genéticos, também estão ligados ao surgimento da doença de Parkinson, já que ocorre uma superexpressão de genes mutantes como LRRK2, PINK1, o DJ-1 e o ATP13A2, que codificam a alfa-sinucleína, a principal proteína componente dos corpos de Lewy (CARDONA e PÉREZ-TUR, 2016; GASSER, 2005).

Outros fatores também se correlacionam positivamente com o surgimento da doença, tais fatores incluem: envelhecimento, neuroinflamação, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, ação do sistema imune, excitotoxicidade, exposição a metais (manganês e chumbo) e redução dos hormônios após retirada dos ovários (ELBAZ e MOISANA, 2008; HOSAMANI et al., 2014; LIPSKI et al., 2011; PARK et al., 2014).

Apesar da diversidade de mecanismos patogênicos que foram propostos na etiologia da DP nenhum ainda, foi confirmado, devido à dificuldade de estabelecer qualquer elemento responsável diretamente com a forma idiopática da doença. Porém, o requisito aparente é a indução da morte de neurônios dopaminérgicos (DICKSON et al., 2017; SULZER, 2007).

1.1.3 Fisiopatologia

Os sinais e sintomas motores dessa doença decorrem das alterações funcionais, que ocorrem nos núcleos da base (NB). Essa é uma região composta por uma complexa rede de vias de neurônios e núcleos que participam do planejamento e aprendizagem dos movimentos voluntários, estando também envolvida no controle das funções cognitivas e afetivas. Fazem parte dos NB o corpo estriado (CE) (formado pelo núcleo caudado e putâmen), o globo pálido (GP), núcleo subtalâmico (ST) e a substância negra (SN) situada no mesencéfalo (GOBBI et al., 2014; WICHMANN e DELONG, 2003).

A SN é dividida em duas partes: a parte reticular, onde seus neurônios são responsáveis pela produção de ácido gama aminobutírico (GABA) e a parte compacta, que produz dopamina (DA). As células da parte compacta da SN inervam ricamente o núcleo caudado e putâmen (CE). Essa conexão forma a via dopaminérgica nigroestriatal, onde seus neurônios estão envolvidos no estímulo do movimento intencional (GOBBI et al., 2014; ROSHAN et al., 2016).

Na doença de Parkinson, ocorre uma degeneração dos neurônios nigroestriatais, causando uma depleção da concentração de dopamina no CE. Nesse circuito, além da DA, outros neurotransmissores que também possuem papel fundamental ficam desregulados, como por exemplo: o GABA, a acetilcolina (ACh), o glutamato e a encefalina. As concentrações de ACh não se alteram na DP, mas, com a depleção de DA, ocorre redução do efeito inibitório deste neurotransmissor nos neurônios do CE ricos em ACh, levando a uma hiperatividade relativa dos neurônios colinérgicos e, conseqüentemente, ao distúrbio do movimento característico do Parkinson (XU et al., 2005).

A morte dos neurônios nigroestriatal pode ser desencadeada por inúmeros fatores, que compõem um cenário, que ainda, não está bem compreendido. Porém, um dos achados patológicos mais frequentes na doença de Parkinson é a presença dos corpúsculos de Lewy. Estes são inclusões intracitoplasmática formados por uma forma de agregação anormal da proteína alfa-sinucleína, que deixa de ser hidrofílica para ficar insolúvel. Esses agregados proteicos se acumulam nos neurônios e podem

acarretar em neurotoxicidade, com consequente morte neuronal e concomitante redução da estimulação dopaminérgica para o CE (BRAAK et al., 2003).

Além disso, também pode ocorrer uma ativação das células microgliais, causando uma inflamação que eleva os níveis de citocinas e óxido nítrico na SN e CE. Essa inflamação aumenta ainda mais a neurodegeneração, ativando as células da micróglia, acarretando em um ciclo, que se autoperpetua, tendo como resultado final a morte neuronal (BŁASZCZYK, 2017; WHITTON, 2007).

1.1.4 Quadro Clínico

As principais características motoras da DP são: tremor em repouso, bradicinesia (lentidão na execução de movimentos e dificuldade de iniciar movimentos voluntários), rigidez muscular (determinando alterações posturais típicas) e distúrbio de equilíbrio (decorrente da perda de reflexos de readaptação postural), podendo também apresentar disfunções não motoras (DICKSON et al., 2017; FERNANDEZ, 2012).

Esses sintomas motores causam uma maior dependência e uma redução na qualidade de vida dos pacientes. Tais sintomas costumam aparecer primeiro em um dos lados do corpo, e vão evoluindo para o outro lado de acordo com o avanço desta doença. Contudo, cada indivíduo pode ou não, manifestar todos os sintomas, sendo que 30% desses não chegam a apresentar o mais clássico deles, que é o tremor em repouso (HAWKES et al., 2010; OLANOW et al., 2009).

Além desses sintomas motores, os pacientes que possuem a DP apresentam sintomas neuropsiquiátricos, distúrbios do sono, hiposmia, disfunção gastrointestinal, redução da mímica facial, deficiência na fala, disfunção sexual e sintomas sensoriais. Esses foram encontrados no estágio mais avançado da doença, todavia podem anteceder o aparecimento dos sintomas motores. Estudos sugerem que eles podem ser considerados fatores de risco para o desenvolvimento da DP, bem como um indicativo para o diagnóstico formal (CONNOLLY e LANG, 2014; RANA et al., 2015).

Os sintomas não motores mais comuns são os neuropsiquiátricos. Essas alterações podem ser: depressão, mudança de humor, disfunção cognitiva (encontradas em todos os estágios da doença), déficit de memória, transtornos do

controle de impulso, apatia, ansiedade, déficit de atenção, alucinações, demência, confusão, delírio, crises de pânico, alteração sensorial e dor (RANA et al., 2015).

Distúrbios comportamentais durante o sono, são caracterizados principalmente durante o sono REM (Rapid Eye Movement) e são bastante comuns em pessoas acometidas pela doença. Segundo Gagnon et al. (2006), esses ocorrem devido a uma possível alteração neurológica no tronco cerebral como perda de neurônios e acúmulo de corpos de Lewy no *locus coeruleus* e na SN. A hiposmia, que é uma diminuição do olfato, também é outro sintoma bastante comum na DP. Essa disfunção olfativa decorre do acúmulo de corpos de Lewy no bulbo olfatório (DOTY et al., 1988; HAWKES et al., 1997).

Os sinais e sintomas da doença de Parkinson, geralmente, têm progressão lenta e a confirmação do diagnóstico pode levar vários meses e, até mesmo, anos, após o aparecimento dos primeiros sintomas motores. Consequentemente, o processo neurodegenerativo vai estar num estágio muito avançado quando o diagnóstico for estabelecido. Isso pode acarretar em baixa efetividade de um tratamento farmacológico (BRAAK et al., 2004; FERNANDEZ, 2012).

1.1.5 Terapêutica

A doença de Parkinson, por ter várias manifestações clínicas (motoras e não motoras) e ser uma doença progressiva, possui um tratamento farmacológico cada vez mais desafiador. A estratégia de tratamento mais frequente é a de controlar os sintomas motores incapacitantes e aliviar os outros sintomas, já que não existem agentes capazes de inibir a degeneração neuronal. Essas estratégias, inicialmente, levam a uma melhora relativa dos sinais e sintomas (XU et al., 2005).

Porém, à medida que a doença progride, os medicamentos perdem sua eficácia, sendo necessário um aumento das doses e a substituição ou combinação da terapia. Estudos sugerem que o custo anual mundial com o tratamento farmacológico da doença de Parkinson esteja em torno de 11 bilhões de dólares, sendo que o tratamento fica de 3 a 4 vezes mais caro para os pacientes em estágios avançados (OLESEN et al., 2012; XU et al., 2005).

Existem várias formas de intervenções farmacológicas, tais como: drogas que aumentam a produção endógena de DA (como a levodopa/L-Dopa), em geral utilizada

juntamente com inibidores da enzima aminoácido aromático descarboxilase de ação periférica (carbidopa e benzerazida); agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolida, pramipexol e ropinirol), que são utilizados frequentemente; drogas que previnem a degradação endógena de DA (inibidoras da monoamina oxidase B (MAO-B) como a selegilina e rasagilina); inibidores da catecol-O-metiltransferase (tolcapona e entacapona); e antagonistas colinérgicos (benztropina e biperideno) (CONNOLLY e LANG, 2014; LIPSKI et al., 2011; OLANOW et al., 2009).

Dentre esses, a levodopa permanece sendo considerada como o “padrão-ouro” no tratamento da DP, pois, essa substância é um aminoácido precursor de DA. Embora seja oralmente ativa, ela possui uma absorção retardada junto com alimentos ricos em proteínas, e depois de absorvida pelo intestino delgado, pode ser descarboxilada pela enzima dopa-decarboxilase. Sendo assim, apenas uma pequena parte chega inalterada ao SNC. A meia vida plasmática desse pró-fármaco é bastante curta, e não passa de noventa minutos. Portanto, altas doses se tornam imprescindíveis, embora essas acarretem em efeitos colaterais como náuseas e vômitos (MONTIOLI et al., 2016; NAGATSUA e SAWADAB, 2009).

Para poder reverter as objeções da levodopa, aumentando a sua biodisponibilidade, e bloqueando possíveis efeitos periféricos da dopamina, o pró-fármaco é coadministrado com a carbidopa ou a benzerazida, que são inibidores da enzima descarboxilase de aminoácido aromático. Tais inibidores não atravessam a barreira hematoencefálica; portanto, aumentam a conversão central de L-DOPA (MONTIOLI et al., 2016).

Esse pró-fármaco possui efeitos significantes no início do tratamento da doença de Parkinson. Porém, o prolongamento da sua utilização desenvolve nos pacientes vários efeitos colaterais e, gradualmente, perde o seu efeito principal (MARSDEN e PARKES, 1997). Um desses efeitos colaterais é conhecido como discinesias, sendo uma implicação grave, caracterizada por movimentos musculares anormais, involuntários, excessivos, diminuídos ou ausentes e que atingem, aproximadamente, 50% dos pacientes (normalmente após 3-5 anos). Também ocorre o fenômeno do tipo *on-off*, que são flutuações do estado clínico, caracterizado por movimentos coreoatetóticos nas extremidades, manifestando-se no auge do efeito da L-DOPA, juntamente com as discinesias (KALINDERI et al., 2011; MARSDEN e PARKES, 1997).

Estudos demonstram que a maior frequência desses efeitos colaterais ocorre devido a efeitos pró-oxidantes e tóxicos da levodopa. Esta toxicidade causa um estresse oxidativo devido à auto-oxidação da dopamina, tornando, assim, a L-DOPA não só o fármaco mais potente no tratamento da DP, como também o que causa mais efeitos colaterais (GESI et al., 2001; LIPSKI et al., 2011; MENA et al., 1996; SULZER e ZECCA, 2000).

Como as terapias para a doença de Parkinson, descritas acima, possuem suas próprias limitações ou efeitos adversos a longo prazo, os estudos vêm se concentrando no uso de diversos produtos de origem vegetal para o tratamento/prevenção dessa doença. Principalmente por que tais produtos podem ter atividades antiparkinsonianas devido à supressão do estresse oxidativo, restauração de algumas funções mitocondriais e prevenção de apoptose de neurônios dopaminérgicos (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015; ROSHAN et al., 2016).

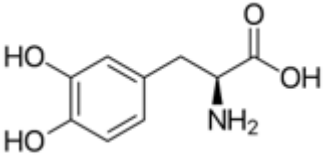
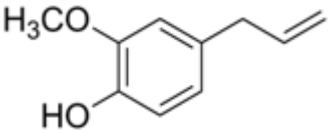
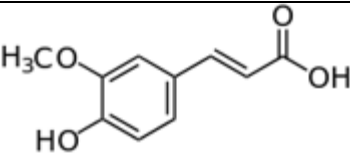
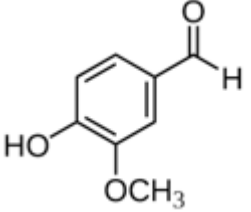
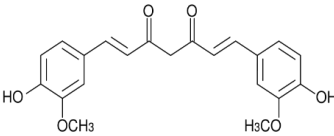
Estudos em humanos e animais vêm sugerindo também que terpenoides, que possuem como núcleo os compostos fenólicos, quimicamente semelhantes a levodopa, possuem atividade antiparkinsoniana. Essas atividades podem ser efeitos antioxidantes e/ou anti-inflamatórios, que são capazes de neutralizar o prejuízo neuronal, além de estabilizar ou regredir a progressão de doenças neurodegenerativas (Quadro 1). Isso motiva, assim, as pesquisas para identificar os mecanismos de morte neuronal, bem como descobrir novos componentes para controlá-los (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015; ROSHAN et al., 2016).

O eugenol, ácido felúrico, vanilina e curcumina, substâncias que possuem o núcleo fenólico, já foram utilizados em modelos experimentais de Parkinson induzido por rotenona. Estas substâncias produziram bons resultados em testes comportamentais e bioquímicos, e sua atividade antiparkinsoniana foi correlacionada a efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores (DHANALAKSHMI et al., 2016; QUALLS et al., 2014; OJHA et al., 2015; SILVA et al., 2014b;)

Logo, faz-se necessário estudos com drogas que tenham potencial ação neuroprotetora, com a finalidade de retardar a progressão da doença de Parkinson. Assim, várias dessas drogas que têm como alvo a disfunção mitocondrial, o estresse oxidativo e/ou inflamação neuronal são candidatos primordiais para serem neuroprotetores. Muitas dessas drogas neuroprotetoras já estão sendo submetidas a ensaios clínicos e acredita-se que o tratamento ideal, para a DP, seria aquele em que

se pode aliar a terapêutica convencional às drogas que evitam o desenvolvimento e avanço desta doença (ROSHAN et al., 2016; SEIDI e POTASHKIN, 2011).

Quadro 1 : Substâncias que possuem em comum núcleo fenólico e são utilizadas em estudos com atividade antiparkinsoniana, antioxidante e/ou neuroprotetora.

Substância	Estrutura química	Referência
levodopa		COLAMARTINO et al. (2012)
eugenol		ITO et al. (2005)
ácido felúrico		OJHA et al. (2015)
vanilina		DHANALAKSHMI et al. (2016)
curcumina		QUALLS et al. (2014)

1.2 Modelos animais de doença de Parkinson

Os modelos experimentais, utilizando animais, são importantes para o desenvolvimento do conhecimento sobre as doenças neurodegenerativas. O seu uso permite refinar as estratégias de pesquisa ajudando a investigar a causa da doença, os mecanismos envolvidos na sintomatologia e as medidas terapêuticas que possam retardar ou interromper a sua progressão (MEREDITH et al., 2008).

A indução de sintomas, semelhantes aos da doença de Parkinson, em animais de laboratório pode ser feita de várias formas e está dividida em: (1) modelos induzidos por neurotoxinas (como o MPTP, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), paraquat, maneb e rotenona), (2) modelos induzidos por inflamação com lipopolissacarídeo (LPS), (3) modelos induzidos por fármacos (como haloperidol e reserpina) e (4) modelos genéticos que expressam α -sinucleína. Entretanto, nenhum modelo abrange perfeitamente todos os aspectos clínicos da doença (DUTY e JENNER, 2011; JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015).

Dentre esses modelos citados, os induzidos pelas neurotoxinas, são os mais comumente utilizados para mimetizar a doença de Parkinson. Tais substâncias agem geralmente destruindo o sistema catecolaminérgico, provocando, assim, os sintomas da doença. O MPTP é uma pró-toxina bastante utilizada em modelos animais para a DP. Sua administração é sistêmica e, rapidamente, atravessa a barreira hematoencefálica. Em seguida, esta substância é oxidada em 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP⁺), pela enzima monoamina oxidase B (MAO B), que logo produz espontaneamente o MPP⁺, o metabólito ativo que irá agir no complexo I da cadeia transportadora de elétrons da respiração mitocondrial. O mesmo funciona também como um excelente substrato para os transportadores de dopamina, sendo transportado e acumulado nos neurônios dopaminérgicos (LANGSTON et al., 1999).

Em outros modelos, utilizando ratos, o MPTP é injetado diretamente no encéfalo, pois a sua administração sistêmica crônica não é tão eficaz devido aos altos níveis de MAO B nos capilares do encéfalo, que forma uma barreira hematoencefálica enzimática. Esse modelo possui a desvantagem de não apresentar inclusões intracitoplasmáticas nos neurônios, semelhantes aos corpos de Lewy. O MPTP pode, também, gerar efeitos sistêmicos, afetando não só os neurônios dopaminérgicos, como também células periféricas e plaquetas (MEREDITH et al., 2008).

A neurotoxina 6-OHDA possui sua estrutura química semelhante a dopamina e noradrenalina, apresentando assim uma alta afinidade pelos transportadores de membrana das catecolaminas. Uma vez dentro dos neurônios, ela é oxidada, formando radicais livres altamente tóxicos. Tal substância possui uma natureza química hidrofílica, que não permite atravessar a barreira hematoencefálica. Porém, quando administrada por infusão intracerebral, consegue produzir seus efeitos e destruir os neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. Outra desvantagem desse modelo é que não consegue produzir inclusões nos neurônios semelhantes aos corpos de Lewy (DAUER e PRZEDBORSKI, 2003).

O paraquat é um herbicida que tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, ser transportado por um carreador para dentro das mitocôndrias e produzir um ciclo redox que causa neurotoxicidade por meio da produção de radicais livres. Essa substância perturba, indiretamente, a função mitocondrial por meio de interações com o complexo I. Pesquisas mostram que ocorre uma progressiva perda de neurônios dopaminérgicos, pequenas, mas significativas, que acarreta em déficit motor. Porém esse modelo ainda precisa ser melhor estabelecido (NUNES et al., 2016). O maneb é um fungicida, que tem a capacidade de inibir o transporte de glutamato e interromper a liberação de dopamina. Essa substância, geralmente, é coadministrada com o paraquat para aumentar a sua toxicidade (THIRUCHELVAM et al., 2000).

1.2.1 Rotenona

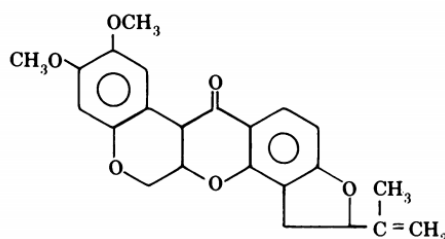
A rotenona é uma isoflavonoide, pertencente à família dos rotenoides, que é produzida pelas raízes ou rizomas de legumes tropicais como *Derris spp.*, *Lonchocarpus* e *Tephrosia* (CABIZZA et al., 2004). Essa neurotoxina é utilizada como inseticida em plantações, pesticida e veneno para peixes por mais de cento e cinquenta anos (RAVANEL et al., 1984).

Ela, juntamente com os outros rotenoides, são substâncias muito fotosensíveis, logo a radiação solar pode degradá-las rapidamente em alguns minutos (CABIZZA et al., 2004). Com isso, sua manipulação deve ser feita com o mínimo de luz possível e a mesma deve ser armazenada em frasco âmbar.

Outra característica da rotenona é ser uma substância altamente hidrofóbica (Figura 1). Assim, ela consegue atravessar, facilmente, a barreira hematoencefálica,

sem precisar de transportadores como os de dopamina, para provocar os seus efeitos centrais (BETARBET et al., 2000).

Figura 1 - Estrutura química da rotenona.



Fonte: CABIZZA et al. (2004).

Sua principal característica é de ser um potente inibidor do complexo I (enzima NADH-desidrogenase), que é uma das cinco enzimas da cadeia transportadora de elétrons presente na membrana interna mitocondrial, envolvida na fosforilação oxidativa para produção de adenosina trifosfato (ATP) (MURAI e MIYOSHI, 2016).

Com isso, ela interfere na respiração celular, pois, com tal inibição, os elétrons provenientes da NADH não podem entrar na cadeia de transporte, o que resulta na incapacidade de produzir ATP a partir da oxidação do NADH. Isso gera um aumento na produção de radicais livres que irão acarretar numa inflamação neuronal, uma reação microglial e, finalmente, induzir uma morte celular por apoptose (SEATON, et al., 1997). Os radicais livres também irão formar as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que irão acarretar em um estresse oxidativo por acúmulo de eletrodos. Estes reagem e formam radicais hidroxilados, altamente tóxicos que acarretam numa peroxidação lipídica, danos no DNA e desorganização do citoesqueleto celular (MARTINEZ e GREENAMYRE, 2012).

A administração da rotenona também altera a sinalização do cálcio nos neurônios, diminui a tirosina hidroxilase, causando uma disfunção proteossômica, acúmulo de ferro nigral, que facilita a formação de citoplasma fibrilar e aumento de inclusões, contendo ubiquitina e alfa sinucleína (BETARBET et al., 2006; ZHANG et al., 2017).

A intoxicação aguda por essa substância leva a uma depleção de vários neurotransmissores, principalmente o de dopamina. A sua exposição crônica pode

levar também a depleção maior de outros neurotransmissores como serotonina e noradrenalina (SANTIAGO et al., 2010).

Os sintomas motores da doença de Parkinson, induzidos pela rotenona podem variar conforme a via de administração, período de tratamento e dose utilizada. Dependendo do modelo, alguns sintomas são bem mais evidenciados do que outros. Porém, nenhum consegue reproduzir todos os aspectos clínicos da DP. O Quadro 2 expõe alguns modelos animais da rotenona e sua correlação com o déficit motor e perda da dopamina estriatal.

Quadro 2 - Modelos experimentais utilizando a rotenona.

Via de administração	Período de tratamento	Dose utilizada (mg/kg)	Perda de dopamina estriatal	Déficit motor
Inalação	30 dias	2,5	-	Sem mudanças no teste do campo aberto
Oral	1 – 3 meses	0,25-100	+	Déficit de memória; Déficit motor no teste do rotarod
Infusão estereotáxica	5 dias - 5 semanas	0,4-12 µg/kg	+	Déficit motor e contrações espontâneas; Não ocorreu perda de massa corporal
Subcutânea	4 - 30 dias	1,25 - 3	+	Déficit motor, lentidão de movimentos e distúrbios posturais
Intravenosa	28 dias	2 - 3	+	Déficit motor, rigidez e tremores
Intraperitoneal	6 dias – 2 meses	2-3	+	Déficit motor, rigidez, anormalidade na postura

Legenda: (-) sem perda de dopamina no estriado. (+) perda de dopamina no estriado. Fonte: adaptado de JOHNSON e BOBROVSKAYA (2015); ZHANG et al. (2017).

A infusão estereotáxica tem sido bastante popular devido aos seus efeitos adversos mínimos e baixa mortalidade dos animais em comparação com vias sistêmicas. Porém, mesmo com essas vantagens, têm sido relatadas dificuldades no

procedimento da infusão, como também uma necrose liquefativa e cicatrização glial resultante da sua toxicidade aguda (ROJAS et al., 2009). Além disso, alguns estudos mostram resultados altamente variados sobre a expressão da proteína alfa-sinucleína (MULCAHY et al., 2012; XIONG et al., 2009).

A via oral não é tão utilizada devido aos longos períodos de tratamento dos animais, como também os altos níveis de contaminação, inviabilizando as pesquisas. Enquanto que ratos que recebem a rotenona por uma forma sistêmica (subcutânea, intravenosa e intraperitoneal) pelo período de até um mês, obtêm uma degradação crônica progressiva da via nigroestriatal e uma expressão da alfa-sinucleína semelhante àquela observada na DP. Porém, esse tipo de administração pode gerar uma toxicidade sistêmica, levando a uma mortalidade nos animais (BETARBET et al., 2002; JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015).

Os sintomas motores mais comuns do parkinsonismo induzido pela rotenona são: a bradicinesia, rigidez muscular e postura curvada (BETARBET et al., 2002). Alguns dos sintomas não motores também são evidenciados, entre eles: hiposmia (diminuição do olfato) (DOTY, 2012); disfunção gastrointestinal (DROLET et al., 2009); distúrbios no sono (GARCIA-GARCIA et al., 2005); diminuição da retenção de memória (DOS SANTOS et al., 2013); ansiedade (GOKUL, 2014) e depressão (BURN, 2002).

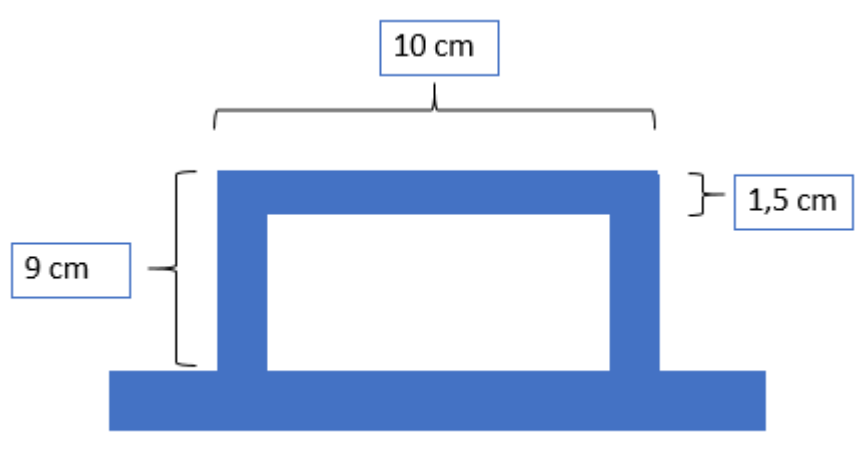
Logo, a intoxicação pela neurotoxina rotenona é o suficiente para gerar um estresse oxidativo, que ocasiona neurodegeneração seletiva na via dopaminérgica nigroestriatal. Essa neurodegeneração irá produzir características neuroquímicas, neuropatológicas, motoras e não motoras semelhantes às da doença de Parkinson (BETARBET et al., 2000; SHERER et al., 2007).

1.3 Testes utilizados no estudo da doença de Parkinson

Os testes comportamentais são comumente utilizados no estudo das alterações motoras e não motoras induzidas por rotenona. Essa neurotoxina induz varios déficits motores associados a doença, como: prolongamento da latência no teste da catalepsia, início tardio dos movimentos, redução da atividade motora no teste do campo aberto, redução a resistência no rotarod e déficit cognitivo (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015).

A catalepsia é uma mudança fisiológica definida como uma incapacidade do animal de responder a uma posição não natural imposta a ele. Esse comportamento pode ser compreendido como uma incapacidade de iniciar um movimento voluntário, característica do parkinsonismo, que está correlacionado a rigidez muscular e a acinesia (DUTY e JENNER, 2011). Esse teste geralmente é determinando por meio da latência em que animal tira a suas patas dianteiras de uma barra, que fica elevada, paralela a uma base (ALAM e SCHMIDT, 2004; DHANALAKSHMI,. 2016).

Figura 2 - Teste da catalepsia.



Fonte: do autor.

O teste do campo aberto é utilizado para avaliar a atividade motora, exploratória e respostas emocionais dos animais. Nesse teste o animal é colocado em uma arena dividida em quadrantes, e o seu comportamento é observado e contabilizado em vários parâmetros por um período de tempo (Figura 3). Os parâmetros variam entre tempo para início dos movimentos, movimentos exploratórios verticais (atividade de levantar) e horizontais (ambulação), atividade de autolimpeza, imobilidade, defecação, micção, entre outros, dependendo do objetivo do estudo (BROADHURST, 1957; ZHANG et al., 2017).

O início rápido dos movimentos está correlacionado a um estado saudável do animal, enquanto que um início tardio pode indicar uma sedação ou incapacidade de iniciar um movimento voluntário. A contabilização da atividade de levantar é um parâmetro que pode ser usado para avaliar o comportamento e a capacidade exploratória do animal, onde o animal retira as duas patas dianteiras da base, se

apoiando ou não sobre a parede da arena, e se apoiando apenas sobre as patas traseiras. É também um método efetivo para a detecção de déficits motores em ratos que receberam a rotenona (FLEMING et al., 2004; JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015). A atividade de autolimpeza é uma ação considerada normal do animal saudável e pode ser contabilizada pelo número de vezes que o animal lambe o pêlo ou limpa/coça a sua face e demais regiões do corpo. A imobilidade é contabilizada por meio da ausência de atividade motora, permanecendo estático em relação à cabeça, ao tronco, às patas e a cauda, e pode indicar acinesia (BERNARDI e PALERMONETO, 1979; TEEMA et al., 2016).

O parâmetro de ambulação dos animais é indicado pela quantidade total de quadrantes que animal percorre, sendo que é contabilizado um quadrante quando o mesmo penetra em uma unidade com as quatro patas. Em modelos animais de doença de Parkinson, a ambulação pode ser prejudicada por meio de: discinesias orolingual, axial ou dos membros que interrompe a atividade locomotora voluntária; de movimentos circulares, que os animais podem realizar, em uma determinada área estreita, que não contribui para o número total de quadrantes contabilizados e devido a rigidez muscular (TEEMA et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

Figura 3 – Teste do campo aberto.



Fonte: do autor.

O teste do rotarod é bastante utilizado em roedores para avaliar o aprendizado de competências, a coordenação motora, desempenho muscular e o equilíbrio. Esses

parâmetros são indicadores básicos da função motora normal, e uma performance ruim nesse teste indica uma deterioração dessa função dentro de um estado patológico (BROOKS et al., 2012). O teste consiste na observação dos animais sobre uma barra que é mantida em rotação por um motor (Figura 4). Parâmetros como tempo de permanência, a latência para a primeira queda e o número de quedas podem ser registrados. E para a realização dessa metodologia os animais precisam passar por um treinamento para a aprendizagem da nova competência (DUNHAM e MIYA, 1957).

Figura 4 – Teste do rotarod.



Fonte: do autor.

A cognição e memória dos animais podem ser mensurados pelo teste do labirinto T elevado (Figura 5). Essa metodologia permite avaliar o desempenho da memória límbica e cognitiva em modelos experimentais de neurodegeneração em núcleos basais (KUMAR et al., 2006).

O teste consiste na contabilização do tempo em que animal leva para entrar no braço fechado em uma primeira sessão (latência inicial) e em uma segunda sessão 24h após (latência repetição). Nesse teste, especula-se que a latência de repetição possa ser encurtada, pois o animal já experimentou entrar no braço fechado antes (por meio da latência inicial), gerando, assim, um maior percentual de retenção de memória nos animais. Por meio desse percentual pode-se avaliar a tarefa de aprendizagem e a memória espacial a longo prazo (KAUR et al., 2011; SILVA et al., 2014b).

Figura 5 – Teste do labirinto T elevado.



Fonte: do autor.

1.4 Estresse oxidativo

Os radicais livres são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em sua orbita externa. Isso torna essas substâncias altamente reativas, que são capazes de interagir com qualquer composto situado próximo à órbita externa para atingir a sua estabilidade. Essas substâncias passam a ter uma característica oxidante/redutora, que faz com que as mesmas provoquem ou resultem em reações de oxido-redução (KEHRER e KLOTZ, 2015).

Em sistemas biológicos, a maioria desses radicais são espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A formação de tais radicais é parte fundamental da vida aeróbia e de seu metabolismo, pois sua formação é resultado do processo de respiração celular que ocorre nas mitocôndrias para poder gerar ATP (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000).

Existem três EROs que são biologicamente importantes na fisiologia dos mamíferos, pois participam do processo de defesa do sistema imune e da sinalização molecular, que são: o superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH\cdot$). Os organismos que produzem essas EROs geralmente possuem mecanismos de defesas para a proteção celular. Esses mecanismos podem ser do tipo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam conjuntamente contra a exposição aos radicais livres. Tais mecanismos conseguem neutralizar os agentes

pró-oxidantes e mantê-los em níveis adequados para a sobrevivência dos organismos (KEHRER e KLOTZ, 2015).

Dos antioxidantes enzimáticos temos a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do superóxido em H_2O_2 . Embora o peróxido não seja um radical livre, ele continua sendo uma espécie reativa de oxigênio e pode ser perigoso, uma vez que, facilmente, pode ser convertido em OH^- . Logo, existem outras enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase (GPx), que catalisam a reação do peróxido de hidrogênio em água (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Já os antioxidantes não enzimáticos são compostos por algumas substâncias sintetizadas pelos organismos, como, por exemplo: bilirrubina, glutathione, ácido úrico e melatonina. Também são desse grupo aquelas substâncias ingeridas por meio da dieta regular como o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol, o selênio, o cobre, o zinco, o betacaroteno e os compostos fenólicos (SANDERS e GREENAMYRE, 2013).

Substâncias fenólicas ou polifenólicas são aquelas que possuem um ou mais anéis aromáticos, contendo substituintes hidroxilados e/ou seus derivados, substituindo pelo menos um dos hidrogênios. Esses compostos fenólicos podem atuar nas plantas como antimicrobianos, antifúngicos, fotorreceptores, atraentes visuais e possuem, além dessas, a capacidade de serem antioxidantes. Logo, há um crescimento no interesse dos pesquisadores, sobre as suas atividades antioxidantes, devido a sua capacidade de sequestrar e reduzir a formação de radicais livres (RENDEIRO et al., 2015; ROSHAN et al., 2016).

Um desequilíbrio entre a produção dos agentes pró-oxidantes e da capacidade de neutralização, por meio das defesas antioxidantes dos organismos, pode gerar estresse oxidativo, já que os excessos destas espécies reativas causam danos em macromoléculas, entre elas, ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas (SANDERS e GREENAMYRE, 2013).

Os danos causados pelos radicais livres podem ser nos ácidos nucleicos, como DNA e RNA. Esses danos causam modificações que interferem na função metabólica normal, instabilidade na produção de proteínas, danos no genoma, gerando morte celular que pode ocasionar inúmeros processos patológicos. Tais processos resultam muitas vezes em doenças típicas do envelhecimento como cardiopatias, acidente vascular cerebral, catarata, osteomalacia, osteoporose, câncer, declínio cognitivo e

doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (BHATTI et al., 2017; KRAUSE, 2007).

O excesso desses radicais também pode produzir danos celulares na membrana lipídica, devido ao fato de os ácidos graxos poli-insaturados serem alvos da oxidação por conta das múltiplas duplas ligações. A peroxidação dos lipídios de membrana (lipoperoxidação), promove reações deletérias que acarretam em mudanças na estrutura e permeabilidade. Assim, ocorre uma perda da permeabilidade iônica, liberação do conteúdo de lisossomos e formação de produtos citotóxicos (como malonaldeído e dienos conjugados), induzindo assim à morte celular (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2000; KEHRER e KLOTZ, 2015).

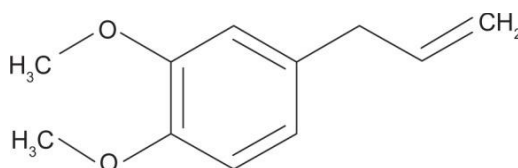
O cérebro é um órgão bem susceptível a esses danos ocasionados pelo estresse oxidativo, principalmente por causa dos altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados e por conta dos baixos níveis de atividade antioxidante (MARIANI et al., 2005). Além disso, alguns neurotransmissores também podem ocasionar um estresse oxidativo, como o neurotransmissor dopamina, que pode ser degradado pela enzima monoamino oxidase (MAO) e também por auto-oxidação. O metabolismo pela MAO leva à formação do ácido dihidroxifenilacético e H_2O_2 e a auto oxidação produz dopamina-quinona e H_2O_2 . Essas vias geram radicais livres e quinonas reativas que podem ocasionar em uma toxicidade neuronal (GESI et al., 2001; SULZER e ZECCA, 2000).

Vários estudos em tecidos cerebrais *post-mortem* de pacientes com a doença de Parkinson evidenciam a presença de altos níveis de uma peroxidação lipídica e elevação oxidação proteica. Por isso, sugeriu-se que os radicais livres e o estresse oxidativo estão envolvidas na degeneração de neurônios dopaminérgicos (TSANG e CHUNG, 2009).

1.5 Metileugenol

O metileugenol (ME) (Figura 6) é uma substância da classe dos fenilpropanoides, que possui vários sinônimos: 4-alil- 1,2-dimetoxibenzeno; éter metílico de eugenila; 1,2-dimetoxi-4-(2-propenil) benzeno; 3,4-dimetoxi-alilbenzeno; 3-(3,4-dimetoxifenil) prop-1-eno e éter metil eugenol.

Figura 6 – Fórmula estrutural do metileugenol.



Fonte Ding, et al. (2014).

Essa substância é uma molécula pequena, não iônica e altamente lipofílica. Tais características permitem ao ME uma rápida absorção após a sua ingestão (sem jejum), sendo mensurado no plasma a partir de 2 min. Ele atinge um pico de concentração em aproximadamente 5 -15 minutos, que é seguido de um pico secundário em até 300 minutos. Sua biodisponibilidade, após a administração via oral, é baixa ($\leq 9,2\%$) e o tempo de meia vida dessa droga é de aproximadamente 100 minutos, sendo rapidamente excretado na urina (HONG et al., 2013; SCHECTER et al. 2004).

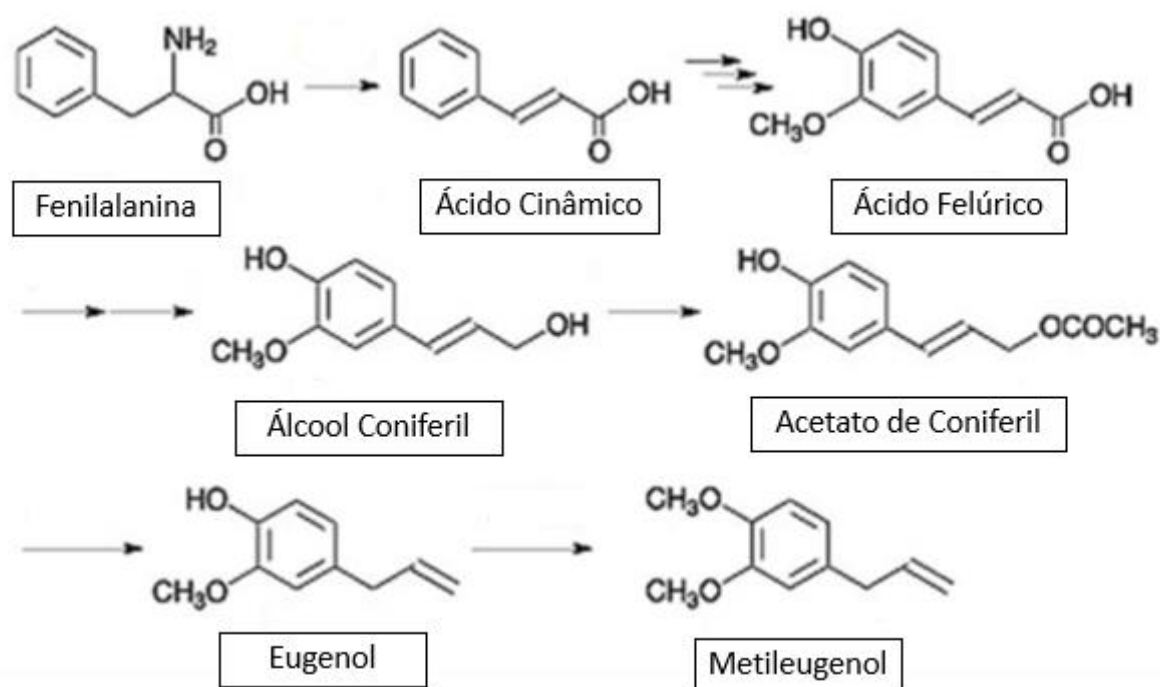
Sua metabolização é hepática, e se dá por várias isoenzimas do citocromo P450 (GARDNER et al., 1997). Suas vias de degradação incluem: oxidação da cadeia lateral alílica, formação do ácido hidroxílico por meio da epoxidação da dupla ligação seguida de uma hidratação e hidroxilação do anel fenila (SOLHEIM e SCHELINE 1976).

Na natureza, essa substância é um constituinte de várias plantas aromáticas e de seus óleos essenciais, como, por exemplo: *Myristica fragrans* Houtt (*Myristicaceae*), *Ocimum basilicum* L. (*Laminaceae*), *Pimenta officinalis* Lindl. (*Myrtaceae*), *Cinnamomum oliveri* Baily (*Lauraceae*), *Thapsia villosa* L. (*Apiaceae*), *Doryphora Sassafras* Endl. (*Monimiaceae*), *Piper divaricatum* (*Piperaceae*) e *Croton nepetaefolius* Baill. (*Euphorbiaceae*) (SILVA et al., 2014a; TAN e NISHIDA, 2012).

O ME é um derivado direto do eugenol, que sofre uma metilação por meio da enzima eugenol o-metiltransferase. O eugenol é um produto da fenilalanina (aminoácido essencial) que passa pela via do ácido chiquímico, e por alguns intermediários como ácido cinâmico e ácido felúrico (TAN e NISHIDA, 2012) (Figura 7). O seu precursor, eugenol, é um fenilpropanoide comum, que também está presente na composição de óleos essenciais de várias espécies de vegetais. Tal

substância é conhecida por ter ações antioxidantes (ITO et al., 2005) e neuroprotetora (WIE et al., 1997).

Figura 7- Possível biossíntese do metileugenol.



Fonte: adaptado de TAN e NISHIDA (2012).

O metileugenol também possui várias propriedades biológicas e farmacológicas em mamíferos, essas incluem: atividade anestésica (SELL e CARLINI, 1976), antinociceptivo (YANO et al., 2006), relaxante muscular (LIMA et al., 2000), anticonvulsivante (ZELGER et al., 1983), vasodilatadora (LAHLOU et al., 2004), gastroprotetora (SÁNCHEZ-MENDOZA et al., 2015), ansiolítica (NORTE et al., 2005), agonista GABAérgico (DING et al., 2014), inibidora da MAO B (TAO et al., 2005), antioxidante e neuroprotetora (CHOI et al., 2010).

O ME também possui um lugar substancial na vida diária. No ramo industrial, ele é produzido comercialmente pela metilação do eugenol, e é amplamente utilizado em prontos de higiene, cigarros, produtos aderentes, e usado como fragrância em perfumes, cosméticos, sabonetes e xampus. Ele também é utilizado como estimulante olfativo para atrair insetos, para, depois, serem executados por inseticidas (COUNCIL OF EUROPE, 2001; TAN e NISHIDA, 2012).

É também utilizado como agente frutífero em geleias e como agente aromatizante (5 – 52 ppm) em doces, pães, *cookies*, *ketchups*, molhos, bebidas não alcoólicas, gomas de mascar e sorvetes, sendo encontrado na maior concentração (aproximadamente 3,3 µg/g) em *cookies* de gengibre (*gingersnaps*), e em concentrações menores nos de canela e aveia-flavorizada (COUNCIL OF EUROPE, 2001; SCHECTER et al., 2004).

O seu uso bastante difundido permite uma grande exposição em humanos, que se dá por meio da via dermica, via de inalatória (pela sua utilização nos cosméticos) e por via oral (por meio da sua utilização como aromatizantes em alimentos). Devido a isso e a sua semelhança química com carcinógenos conhecidos (como safrol, isosafrol e estragol), o metileugenol é tido como tóxico (MILLER et al., 1983). E, de fato, estudos mostraram que o ME possui efeitos moderadamente tóxicos. Sua dose letal DL₅₀ em ratos fica na faixa de 850-1560 mg/kg e em camundongos de 540 mg/kg (ABDO et al., 2001; NTP, 2000). E alguns dos efeitos tóxicos mais observados, em ambas as espécies e, ambos os sexos, foram: lesão hepatocelular e aumento da massa do fígado, neoplasias renais, fibroadenoma da glândula mamária, fibrosarcoma, tumores de estômago e também uma citotoxicidade e genotoxicidade em hepatócitos de ratos (BURKEY et al., 2000; HONG et al., 2013).

Contudo, nesses estudos, os efeitos tóxicos só apareceram nos animais que receberam a droga numa dose muito acima dos níveis consumidos pelos seres humanos. A primeira alteração a aparecer foi a lesão hepatocelular e o aumento da massa do fígado observado em doses ≥ 100 mg/kg. Vários autores afirmam não haver causa de preocupação em relação aos níveis de exposição nos humanos (NTP, 2000; ROBISON e BARR, 2006).

Considerando que o tratamento atual não é capaz de impedir a progressão da doença e que substâncias antioxidantes têm recebido atenção especial como agentes capazes de prevenir a progressão de doenças neurodegenerativas, pareceu-nos atraente verificar a hipótese de que o metileugenol possua um efeito neuroprotetor no modelo experimental de doença de Parkinson.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar se o metileugenol pode reduzir as alterações comportamentais induzidas pela neurotoxina rotenona no modelo experimental de doença de Parkinson em ratos Wistar.

2.2 Objetivos específicos

- Interpretar uma curva de sobrevivência em ratos Wistar de doses diferentes da neurotoxina rotenona.
- Explorar uma curva de sobrevivência em ratos Wistar de doses diferentes do metileugenol no modelo experimental da doença de Parkinson induzido por rotenona.
- Avaliar o efeito do metileugenol nas alterações comportamentais induzidas pela rotenona em ratos avaliados no teste da catalepsia;
- Investigar o efeito do metileugenol nas alterações comportamentais induzidas pela rotenona em ratos avaliados no teste do campo aberto.
- Analisar o efeito do metileugenol nas alterações comportamentais induzidas pela rotenona em ratos avaliados no teste do rotarod.
- Estudar o efeito do metileugenol nas alterações comportamentais induzidas pela rotenona em ratos avaliados no teste do labirinto T elevado.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos machos (*Rattus norvegicus*), com 3 meses de idade, e com massa corporal, variando entre 300-350 g. Os animais foram obtidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal Pernambuco (UFPE). Os mesmos foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), umidade (55 - 65%) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso à ração (Purina, Paulínea, São Paulo, Brasil) e água. O tratamento dos animais foi realizado em sala com controle de temperatura, na fase clara do ciclo (8h às 11h) e os experimentos na fase escura (das 4h às 7h). A quantificação de luminosidade do ambiente era analisada com luxímetro digital (Digital Lux Meter, MLM-1011, Imipa).

Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados (n. 0001/2016 em anexo) na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, que está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 Drogas e reagentes

Todas as drogas (rotenona e metileugenol) e reagentes (álcool absoluto, formaldeído, fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio bibásico) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), exceto o óleo de girassol e carbidopa + levodopa (25/250 mg) que foram obtidos das empresas Bandeira e Cavalcante Indústria de Cosméticos Ltda (Abreu e Lima, PE, BR) e Teuto (Anápolis, GO, BR) respectivamente.

A rotenona foi dissolvida no veículo óleo de girassol, numa concentração de 2:1 mg/mL (ZHANG et al, 2017). A manipulação da droga foi realizada em condições de baixa iluminação e imediatamente após o material foi armazenado em frasco âmbar. O metileugenol foi diluído em uma solução aquosa de tween 80 a 2%. A carbidopa +

levodopa foram dissolvidas em solução aquosa de tween 80 a 2% e administradas nas doses de 0,75 + 7,5 mg/kg.

3.3 Análise de sobrevivência

O critério de escolha da dose ideal da rotenona, para os estudos subsequentes, foi definida pela menor dose capaz de produzir mortalidade. Essa dose foi obtida pela construção da curva de sobrevivência dos animais durante cinco dias de tratamento diário com rotenona. A sobrevivência foi avaliada duas vezes por dia, durante seis dias consecutivos. Para isso, os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=15/grupo):

- Veículo: Tween 80 a 2 % (v.o.) + óleo de girassol (s.c.);
- Tween 80 a 2 % (v.o.) + rotenona 2,5 mg/kg (s.c.);
- Tween 80 a 2 % (v.o.) + rotenona 2 mg/kg (s.c.);
- Tween 80 a 2 % (v.o.) + rotenona (1,5 mg/kg, s.c. por três dias) + rotenona (1,0 mg/kg, s.c. por dois dias);

A partir desse experimento foi possível determinar a dose que gerou a menor mortalidade (rotenona 1,5 mg/kg + rotenona 1 mg/kg), a qual foi usada nos protocolos experimentais subsequentes. A maior dose do metileugenol (ME, 37 mg/kg) foi escolhida baseada em trabalho anterior (SILVA et al., 2014b) e nas características farmacocinéticas do óleo essencial (HONG et al., 2013).

3.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em seis grupos (n=8-13/grupo) e tratados em dose única e diariamente por cinco dias consecutivos, por via oral (v.o.), com veículo (solução aquosa de tween 80 a 2%), carbidopa + levodopa (0,75 + 7,5 mg/kg) ou metileugenol (ME, 5, 15 e 37 mg/kg). Após dez minutos, do tratamento, os animais receberam rotenona (1,5 mg/kg por três dias + 1 mg/kg por dois dias) por via

subcutânea diluída no veículo óleo de girassol (2:1 mg/mL). O grupo controle recebeu apenas veículo. Dessa forma foram formados os grupos:

- Grupo 1 - Veículo: Sol. aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c.);
- Grupo 2 - Controle: Sol. aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e rotenona (s.c.);
- Grupo 3 – Padrão: carbidopa + levodopa (0,75 + 7,5 mg/kg, v.o.) e rotenona (s.c). Os animais não tiveram acesso à alimentação uma hora antes e uma hora após a administração do fármaco padrão.
- Grupo 4, 5 e 6 – Grupos pré-tratados com metileugenol (ME, 5, 15 e 37 mg/kg, v.o.) e rotenona (s.c).

3.5 Determinações do consumo de ração e da variação de massa corporal (absoluta e relativa)

O consumo de ração (g) dos animais foi determinado durante os cinco dias de pré-tratamento e no dia do experimento. Como também a massa corporal, que foi registrada diariamente para o ajuste de doses e sua variação foi expressa em valores absoluto (g) e relativo (%).

3.6 Testes Comportamentais

Após 24 h do último tratamento, foram realizados os testes comportamentais, com exceção do teste da catalepsia, que foi realizado durante todos os dias de experimento.

3.6.1 Teste da Catalepsia

A catalepsia foi determinada por meio do teste da barra, adaptado daquele descrito por Costall and Naylor (1974). A barra (diâmetro de 2 cm, comprimento de 14 cm e altura de 9 cm) ficou suspensa na horizontal paralela a uma base (Figura 2). O teste foi iniciado, após administração de rotenona. Ambas as patas dianteiras dos animais foram colocadas suavemente sobre a barra horizontal, e a latência para a retirada das patas, da posição imposta, foi mensurado com auxílio de cronômetro

diariamente por 6 dias. O tempo máximo de observação diária foi limitado a 180 segundos.

3.6.2 Teste do Campo Aberto

O teste do campo aberto foi utilizado com o objetivo de avaliar a motricidade e atividade exploratória dos animais segundo o procedimento descrito por Broadhurst (1957) e Bernardi e Palermo-Neto (1979). O aparelho usado constitui-se de uma arena circular (uma caixa de madeira com 90 cm de diâmetro e 31 cm de altura). As paredes e o piso da arena são todos brancos, onde o piso é dividido com linhas pretas em 20 pequenos setores (círculo central com diâmetro de 18 cm; tronco maior com os raios de 10 e 28,5 cm e geratriz de 18 cm; tronco menor com os raios de 14, 25 e 24 cm e geratriz de 18 cm) (Figura 3). Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi avaliado por 5 minutos, de acordo com os parâmetros: frequência de locomoção (penetrar em uma unidade de quadrante com as quatro patas), levantar (retirada das duas patas dianteiras, com apoio ou não das mesmas sobre a parede do campo, e se apoiando sobre as patas traseiras), tempo de imobilidade (ausência de atividade motora, permanecendo estático em relação à cabeça, ao tronco, às patas e a cauda), tempo de latência para início do movimento (tempo em que o animal levou para sair do primeiro quadrante no centro da arena) e total de autolimpeza.

A quantidade de luz para esse teste foi de 1 lux. Os tempos de imobilidade e latência para o início do movimento foram mensurados com auxílio de cronômetro. Após a retirada de cada animal, a arena foi limpa com uma solução de álcool a 5%.

3.6.3 Teste do Rotarod

Foi utilizado um aparelho automático rotarod (Insight, modelo EFF 411), que consiste de uma caixa de acrílico (530 cm x 400 cm x 410 cm) com um cilindro de 8 cm de diâmetro, instalado transversalmente a partir de 20 cm. O cilindro foi mantido em rotação de 16 rpm (Figura 4). Para a execução desse teste, cada animal foi submetido a duas sessões. Na primeira sessão (sessão de treinamento, figura 8, dia 0) os animais eram submetidos a 120 segundos de treinamento, para aclimatização antes do tratamento. Foram utilizados no experimento, apenas os animais que conseguiram ficar mais de 60 segundos andando sobre a barra giratória durante essa sessão. A segunda sessão (sessão do teste), foi realizada após o período de pré-tratamento (figura 8, dia 6). Os parâmetros analisados foram: o tempo de permanência, a latência

para a primeira queda e o número de quedas no rotarod; e foram registrados durante a sessão que ocorria no período de 60 segundos. Esse teste permite avaliar a coordenação motora dos animais e foi adaptado daquele descrito por Dunham e Miya, (1957).

3.6.4 Teste do Labirinto em T Elevado

O aparelho do labirinto é composto de um braço aberto (50 x 10 cm) perpendicular a dois braços fechados com as mesmas dimensões, com paredes de 40 cm de altura, voltadas uma para a outra e uma zona central, conectando os braços. O labirinto foi suspenso a 43 cm do chão (Figura 5). Esse teste foi realizado de acordo com Kumar et al. (2006).

Após 24h do último dia de tratamento, os ratos foram colocados individualmente no final do braço aberto com a face voltada para a área central. O tempo levado pelo animal para se mover a partir do braço aberto e entrar em um dos braços fechados foi registrado e foi chamado de “latência inicial”. Aos ratos foi permitido explorar o labirinto por 30 segundos após o registro inicial da aquisição de latência e, em seguida eles foram colocados em suas gaiolas. No dia seguinte, a retenção de latência foi mensurada novamente e registrada como “latência de repetição”. O tempo dos parâmetros foi controlado com auxílio de cronômetros e a limpeza do labirinto em T elevado, após a remoção de cada animal, foi realizada com solução de álcool a 5%. A quantidade de luz para esse teste era: 1 lux para o braço aberto e 0 lux para o braço fechado. O percentual de retenção da memória foi calculado por meio da fórmula:

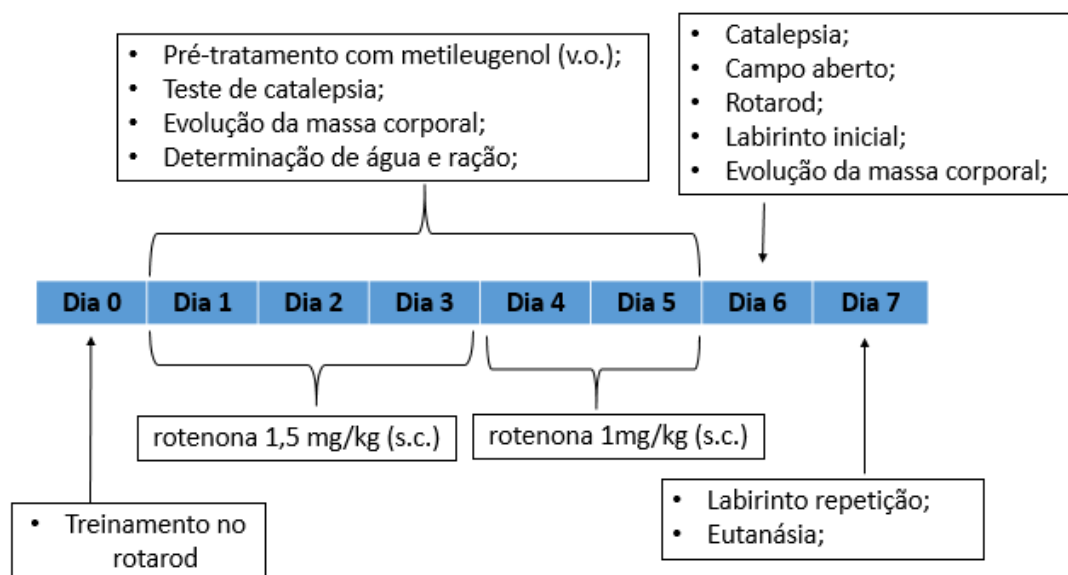
$$\% \text{ de retenção da memória} = \frac{(\text{latência inicial} - \text{latência de repetição}) \times 100}{\text{latência inicial}}$$

3.7 Eutanásia

Ao final do período de experimentação, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.) com xilazina, 6 mg/kg + quetamina, 60 mg/kg e eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico. Em seguida, foram decapitados com auxílio de uma guilhotina.

Todos os protocolos usados estão sintetizados no organograma abaixo (Figura 8).

Figura 8 -Delineamento experimental.



3.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) ou mediana $\pm$ intervalo interquartil. A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para determinar a normalidade. A diferença entre grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) de uma via seguida, quando necessário, pelo pós-teste de Dunnett's, ou foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, para dados não-paramétricos, seguido pelo pós-teste de Dunn's. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p \leq 0,05$). O teste de Mann Whitney foi utilizado para a análise da catalepsia. E o teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para calcular as curvas de sobrevivência.

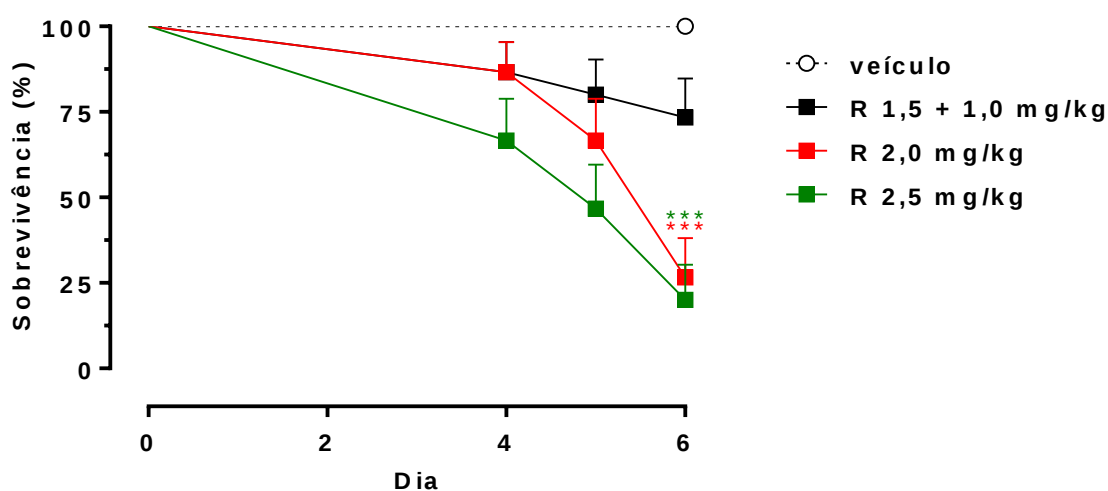
4.RESULTADOS

4.1 Análise de sobrevivência

A curva de sobrevivência dos animais expostos a diferentes doses é montada na figura 9. Não houve mortalidade no grupo tratado com o veículo (óleo de girassol) durante o período de observação (sobrevivência de 100%). Os grupos de animais que receberam rotenona 2,5 e 2,0 mg/kg tiveram uma sobrevivência de $20,00 \pm 10,32$ e $26,67 \pm 11,42\%$ respectivamente, quando avaliados no sexto dia de observação. Enquanto que o grupo que recebeu rotenona 1,5 + 1,0 mg/kg apresentaram sobrevivência de $73,33 \pm 11,42\%$, a qual não foi estatisticamente diferente do grupo do veículo (óleo de girassol).

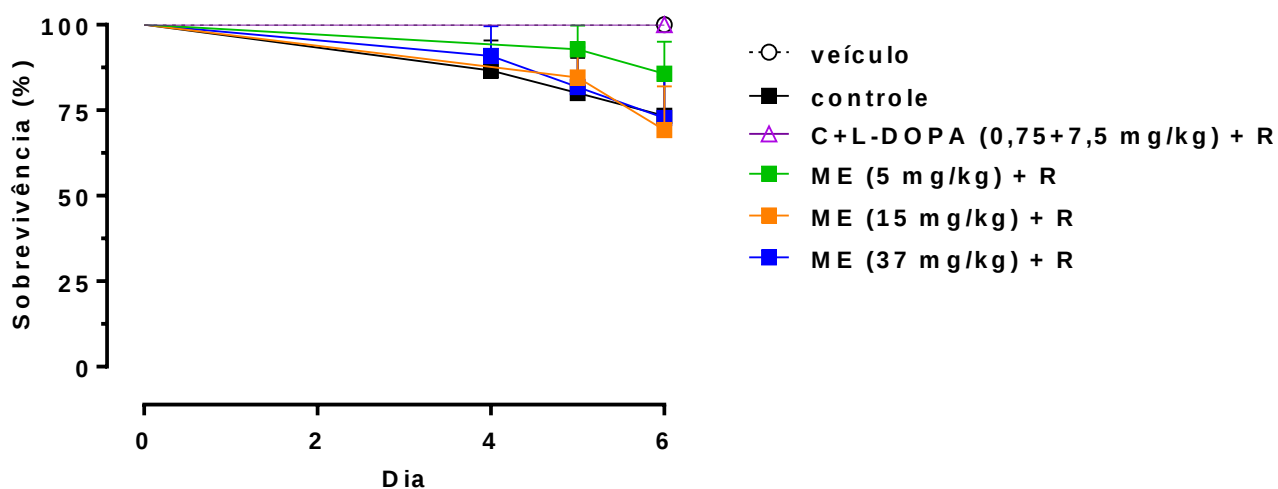
Em virtude desses resultados, foram usadas rotenona nas doses de 1,5 + 1,0 mg/kg nos protocolos subsequentes.

Figura 9 - Curva de sobrevivência de ratos submetidos a diferentes doses de rotenona, avaliados durante seis dias. R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias, s.c. Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=15/grupo). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). *** $p < 0,001$ vs grupo veículo (óleo de girassol).



Não ocorreu nenhuma mortalidade no grupo de animais tratados com o veículo (tween 80 a 2%) ou carbidopa + levodopa 7,5 mg/kg, gerando uma sobrevivência de 100%. Enquanto que os grupos controle (tween 80 a 2% + rotenona) e experimentais (ME, 5, 15 e 37 mg/kg) obtiveram uma sobrevivência de $73,33 \pm 11,41$; $85,71 \pm 9,3$; $69,23 \pm 12,80$; $72,73 \pm 13,43\%$ respectivamente. Os grupos veículo, controle e tratados com metileugenol (ME 5, 15 e 37 mg/kg) não tiveram diferenças significantes quando comparados entre si no final do período de tratamento (Figura 10).

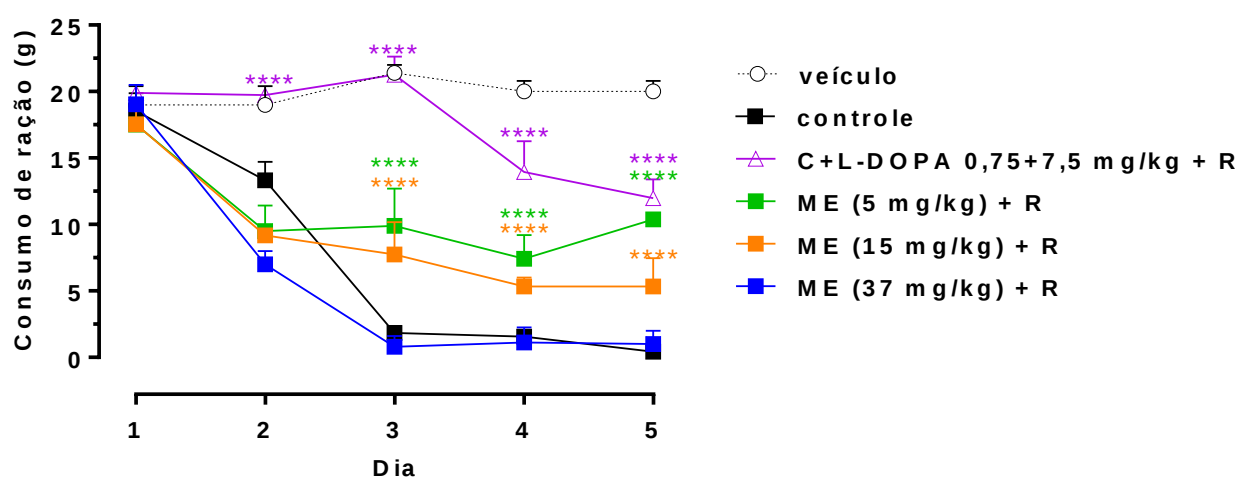
Figura 10 - Curva de sobrevivência de ratos no modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias, s.c.) após tratamento por via oral com metileugenol (ME por 5 dias consecutivos) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. (n=15/grupo). O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).



4. 2 Determinação do consumo de ração

No consumo de ração os ratos tratados com veículo + rotenona (controle) apresentaram uma queda significativa (variação de $18,85 \pm 1,33$ para $0,58 \pm 0,34$ g) quando comparado ao grupo veículo (solução aquosa de tween 80 a 2%, v.o. e óleo de girassol, s.c.), que não variou estatisticamente de ($18,53 \pm 0,93$ para $20,26 \pm 0,53$ g) ao final do tratamento. Já os animais tratados com metileugenol (ME 5 e ME 15 mg/kg) foram estatisticamente diferentes do grupo controle, a partir do terceiro dia (variação de $9,90 \pm 1,39$ para $10,38 \pm 0,23$ g e de $7,73 \pm 1,22$ para $5,33 \pm 1,07$ g respectivamente). O grupo ME 37 mg/kg não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. E o grupo padrão (carbidopa + levodopa, $0,75 + 7,5$ mg/kg) foi estatisticamente diferente do controle a partir do segundo dia (variação de $13,33 \pm 0,69$ para $11,98 \pm 0,71$ g) como pode ser visualizado na figura 11.

Figura 11 - Efeito do metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, $0,75 + 7,5$ mg/kg) sobre o consumo de ração de ratos com doença de Parkinson induzida por rotenona (R, $1,5$ mg/kg por 3 dias + $1,0$ mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. ($n=8$ /grupo). A diferença entre grupos foi determinada por ANOVA, seguida pelo pós-teste de Dunnett's. **** $p < 0,0001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c.).

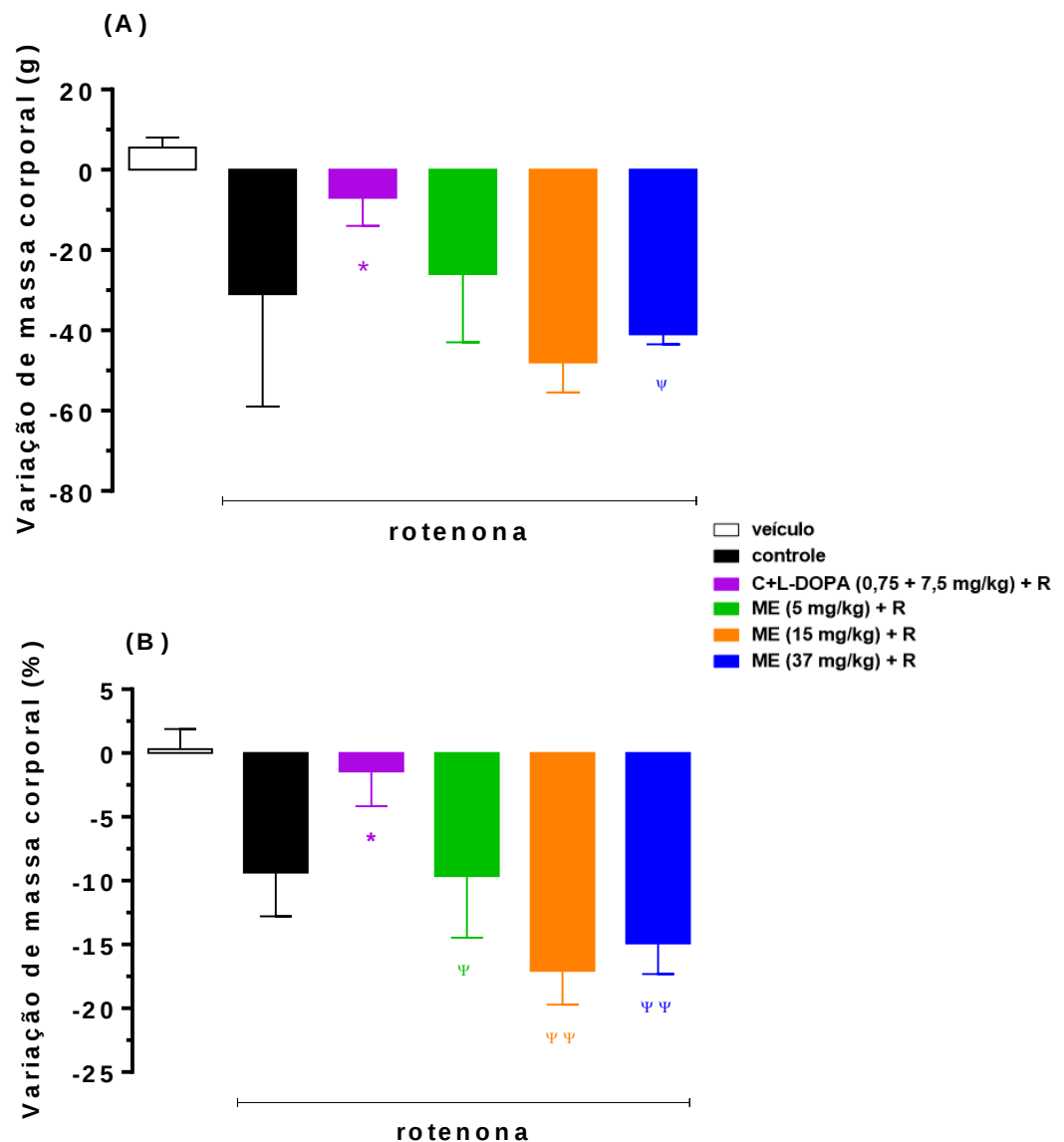


4.3 Evolução da massa corporal

Os ratos tratados com veículo seguido de rotenona (grupo controle) apresentaram uma perda de massa corporal absoluta cuja mediana com os intervalos interquartil foram de -31,00 g (+22,00; -64,00 g) ao final do período de tratamento. Essa redução foi estatisticamente significante quando comparado ao grupo veículo, que por sua vez obteve um ganho de mediana igual a 5,50 g (+8,00 -1,00 g). De forma similar ao grupo controle, os animais tratados com metileugenol (ME 5, 15 e 37 mg/kg) tiveram perda significativa de massa corporal cuja mediana foi de -26,00 (-74,00; -6,00 g), -48,00 (-56,00; -6,00 g) e -41,00 g (-54,00; -22,00 g) respectivamente. Entretanto, nos animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) foi verificada a diferença estatística de massa corporal em relação ao grupo controle, como pode ser visualizado na figura 12A.

A figura 12B mostra que em relação a massa corporal relativa (%) o padrão de resposta não foi diferente do obtido com a massa corporal absoluta, exceto que se registrou redução estatística de massa corporal nos animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg). E ocorreu diferença estatística entre a variação da massa dos animais tratados com ME (5, 15 e 37 mg/kg) e do grupo padrão.

Figura 12 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a massa corporal de ratos no modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). (A) massa corporal absoluta (g). (B) massa corporal relativa (%). Os valores foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ $p < 0,05$ vs grupo C+L. $\Psi\Psi$ $p < 0,01$ vs grupo C+L. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).

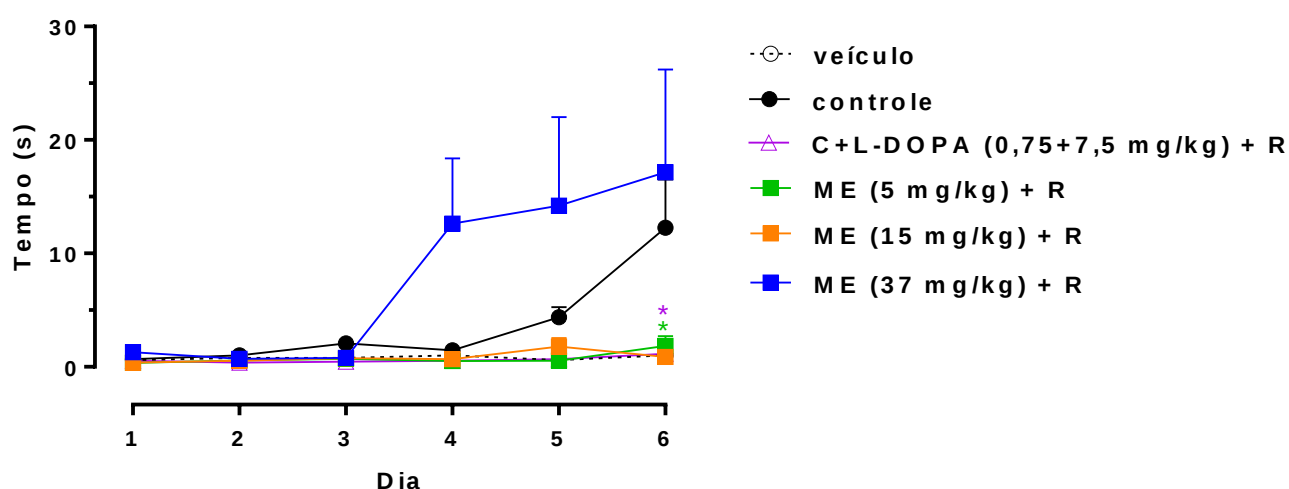


4.1 Testes comportamentais

4.4.1 Teste da Catalepsia

Os animais do grupo controle (tween 80 a 2% + rotenona) tiveram um significativo prolongamento da latência, para a retirada das patas da barra cuja mediana foi igual a 0,00 s (+0,00; -0,00 s) para 6,00 s (+44,00; +2,00 s) ao final do período de administração, quando comparado ao grupo veículo (que variou de 0,00 s (+0,00; -0,00 s) para 1,00 s (+4,00; -0,00 s)). O grupo ME 5 mg/kg reduziu o tempo de latência de 0,00 s (+0,00; -0,00 s) para 1,00 s (+3,00; -0,00 s) de maneira estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle. Entretanto, os grupos tratados com metileugenol 15 e 37 mg/kg não produziram aumento estatisticamente significativo do tempo expresso em mediana quando comparado ao grupo controle igual a 1,00 s (+8,00; -0,00 s) e 5,00 s (+57,00; +2,00 s) respectivamente. E o grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) também reduziu estatisticamente o tempo de 0,00 s (+0,00; -0,00 s) para 1,00 s (+5,00; -0,00 s) em relação ao grupo controle, como pode ser visualizado na figura 13.

Figura 13 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a latência no teste da catalepsia de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de teste Mann Whitney. * $p < 0,05$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).



4.4.2 Teste do Campo Aberto

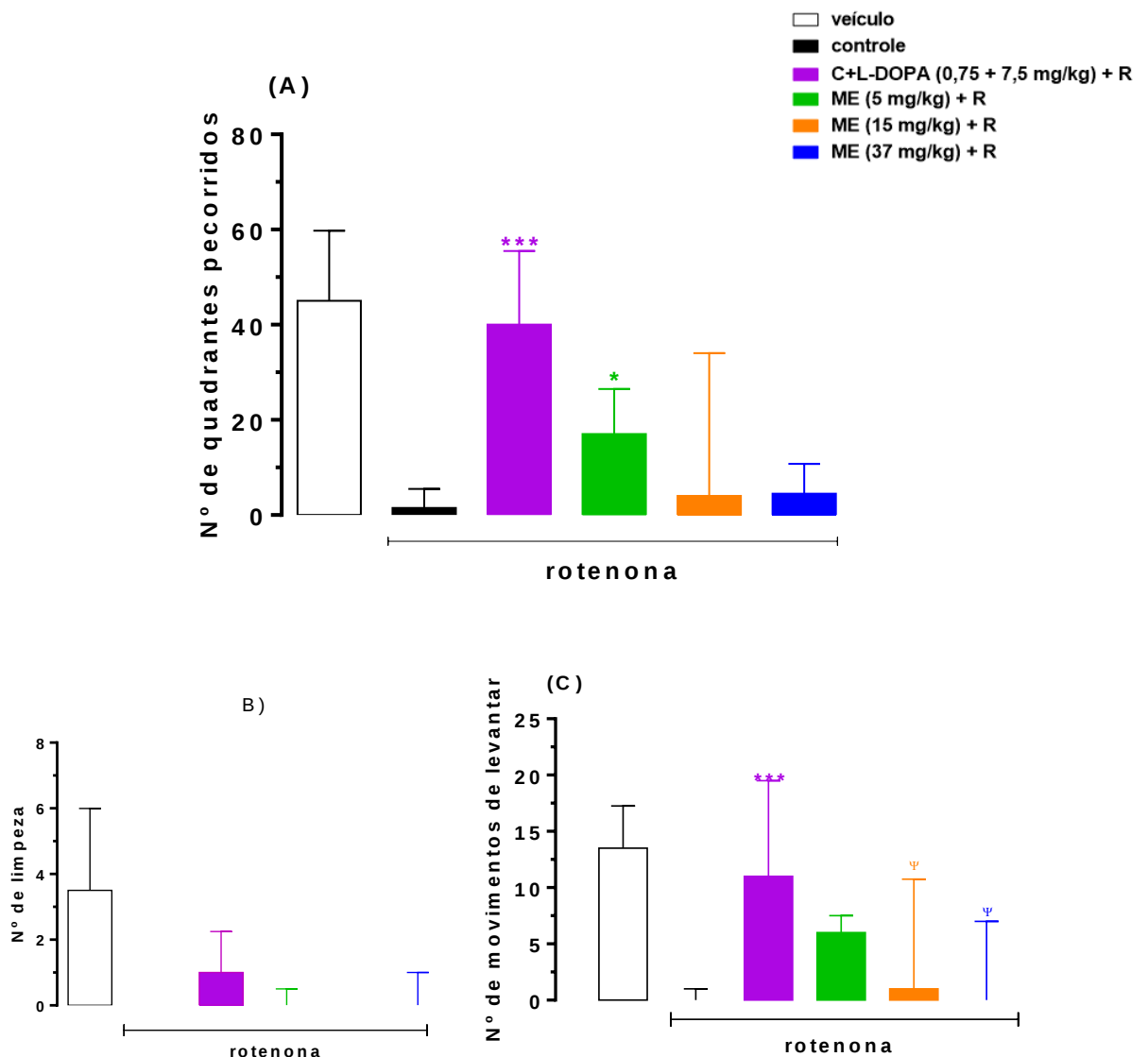
Os animais do grupo controle (tween 80 a 2% e em seguida rotenona) apresentaram uma significativa redução na ambulação, ou seja, no total de quadrantes percorridos, obteve-se a mediana de 1,50 quadrantes (+10,00; -0,00 quadrantes) quando comparado ao grupo veículo cuja a mediana foi de 45,00 quadrantes (+80,00; +17,00 quadrantes). Entretanto, nos animais do grupo metileugenol (5 mg/kg) ocorreu aumento estatisticamente significativo da movimentação espontânea com a mediana de 17,00 quadrantes (+ 36,00; + 1,00 quadrantes) em comparação ao grupo controle. Os grupos metileugenol (15 e 37 mg/kg) não produziram aumento estatístico do número de quadrantes invadidos com as medianas de 4,00 (+44,00; +0,00) e 4,50 (+17,00; + 1,00) quadrantes respectivamente. E finalmente, o grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) aumentou de forma significativa a deambulação em relação ao grupo controle 40,00 quadrantes (+64,00; +10,00 quadrantes) como pode ser visualizado na figura 14A.

No registro do movimento de autolimpeza, os ratos do grupo controle (tween 80 a 2% e em seguida rotenona) tiveram uma redução significativa destes movimentos, obtendo uma mediana de 0,00 movimentos de autolimpeza (+1,00; -0,00 movimentos de autolimpeza) quando comparado ao grupo veículo cuja a mediana foi de 3,50 (+ 10,00; +0,00 movimentos de autolimpeza). De forma similar, ao obtido no grupo controle, os animais tratados com metileugenol (ME 5, 15 e 37 mg/kg) tiveram descenso significativo, cujas as medianas foram: ME 5: 0,00 (+ 2,00; 0,00), ME 15: 0,00 (+1,00; +0,00) e ME 37: 0,00 (+ 2,00; + 0,00) movimentos de autolimpeza. E os animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) também não apresentaram diferença estatística de movimentos de autolimpeza com mediana 1,00 movimentos de autolimpeza (+4,00; +0,00 movimentos de autolimpeza) em relação ao grupo controle como pode ser visualizado na figura 14B.

Em relação ao número de movimentos de levantar, os ratos tratados com tween 80 a 2% e em seguida rotenona (controle) apresentaram significativa redução com a mediana de 0,00 movimentos de levantar (+2,00; +0,00 movimentos de levantar) quando comparado ao grupo veículo cuja a mediana foi de 13,50 (+18,00; + 0,00 movimentos de levantar). Os animais tratados com metileugenol (ME 5, 15 e 37 mg/kg) tiveram descenso significativo de movimentos de levantar e as medianas foram: ME 5: 6,00 (+18,00; +0,00), ME 15: 1,00 (+17,00; +0,00) e ME 37: 0,00 (+9,00; +0,00)

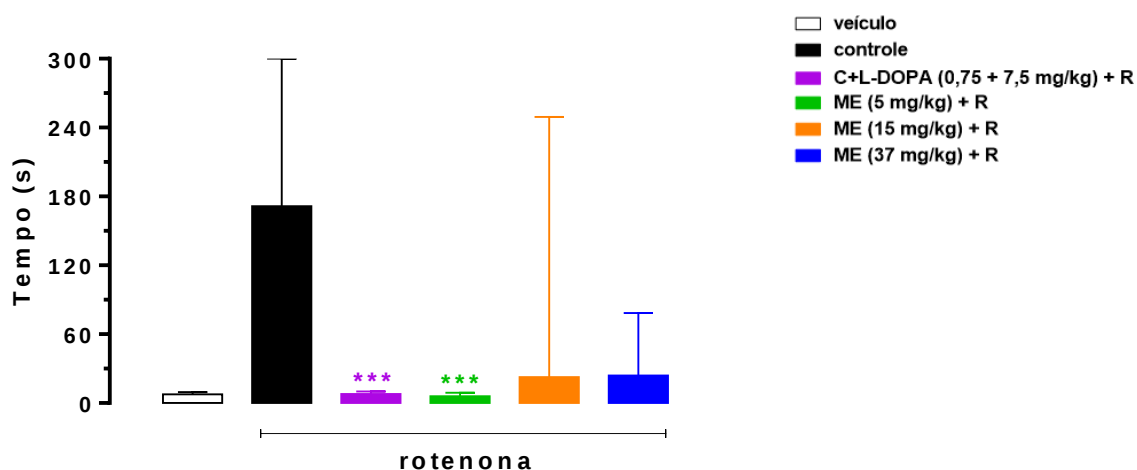
movimentos de levantar, respectivamente. Todavia, nos animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) ocorreu uma reversão dos movimentos de levantar 11,00 (+22,00; +6,00 movimentos de levantar) quando comparado ao controle (figura 14C).

Figura 14 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a ambulação (A), autolimpeza (B) e levantar (C) no teste do campo aberto de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ $p < 0,05$ vs grupo C+L-DOPA. *** $p < 0,001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).



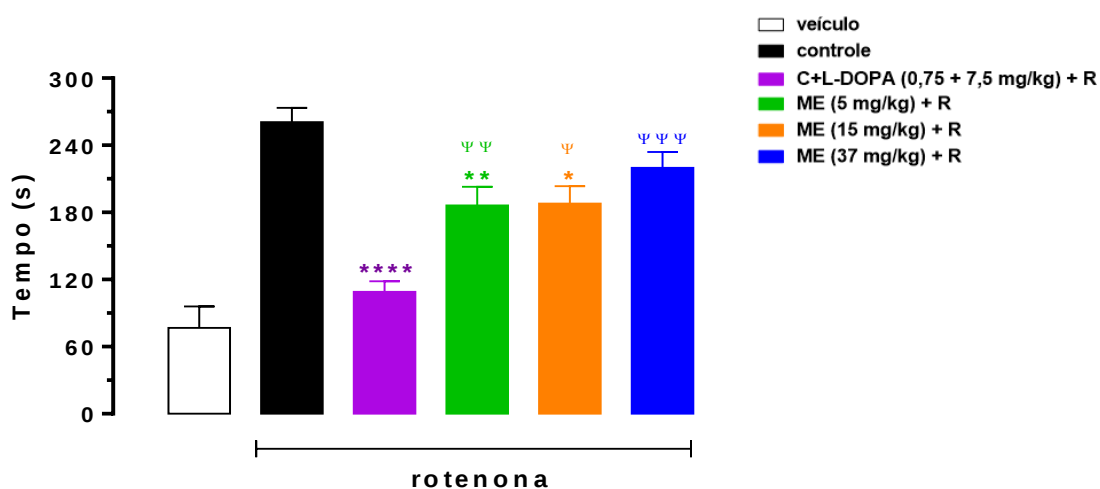
Já no tempo de latência para sair do primeiro quadrante, os ratos tratados com tween 80 a 2% e em seguida rotenona (grupo controle) apresentaram aumento significativo com a mediana de 171,50 s (+300; +3,00 s) quando comparado ao grupo veículo que obteve a mediana de 7,50 s (+12,00; +3,00 s). Enquanto que os ratos tratados com metileugenol (ME 5 mg/kg) reduziram de forma significativa o tempo de latência, com mediana de 6,00 s (+300,00; +3,00 s), quando comparados ao grupo controle. Já os animais dos grupos ME 15 e 37 mg/kg tiveram aumento de forma similar ao grupo controle, com medianas de 22,50 s (+300,00; +2,00) e 24,00 s (+300,00; +7,00 s) respectivamente. Já no grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) foi verificado significativa redução, com mediana de 8,00 s (+300,00; +3,00 s), quando comparado ao grupo controle, como pode ser visualizado na figura 15.

Figura 15 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre o tempo de latência para sair do primeiro quadrante no teste do campo aberto em ratos com doença de Parkinson induzida por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil. (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. *** $p < 0,001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).



No tempo de imobilidade, os ratos tratados com tween 80 a 2% e em seguida rotenona (grupo controle) apresentaram aumento significativo ($260,70 \pm 12,81$ s) quando comparado ao grupo veículo ($76,90 \pm 19,00$ s). Os animais tratados com metileugenol (ME 5 e 15 mg/kg) tiveram redução significativa ($186,30 \pm 16,60$ s e $187,90 \pm 15,69$ s respectivamente) do tempo de imobilidade quando comparado ao controle. Os animais tratados com ME 37 mg/kg ($219,80 \pm 14,18$ s) apresentaram aumento ($219,80 \pm 14,18$ s), de forma similar ao controle. Enquanto que nos animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, $0,75 + 7,5$ mg/kg) ocorreu uma diminuição significativa ($109,10 \pm 9,39$ s) quando comparado ao controle. Os animais tratados com metileugenol (ME 5, 15 e 37 mg/kg) também foram estatisticamente diferentes do grupo padrão, como pode ser visualizado na figura 16.

Figura 16 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, $0,75 + 7,5$ mg/kg) sobre o tempo de imobilidade no teste do campo aberto de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, $1,5$ mg/kg por 3 dias + $1,0$ mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como média $\pm$ E.P.M (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada por ANOVA, seguida, pelo pós-teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ $0,05$ vs grupo C+L, ** $p < 0,01$ vs grupo controle. $\Psi\Psi$ $p < 0,01$ vs grupo C+L-DOPA. $\Psi\Psi\Psi$ $p < 0,001$ vs grupo C+L. **** $p < 0,0001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).



4.4.3 Teste do Rotarod

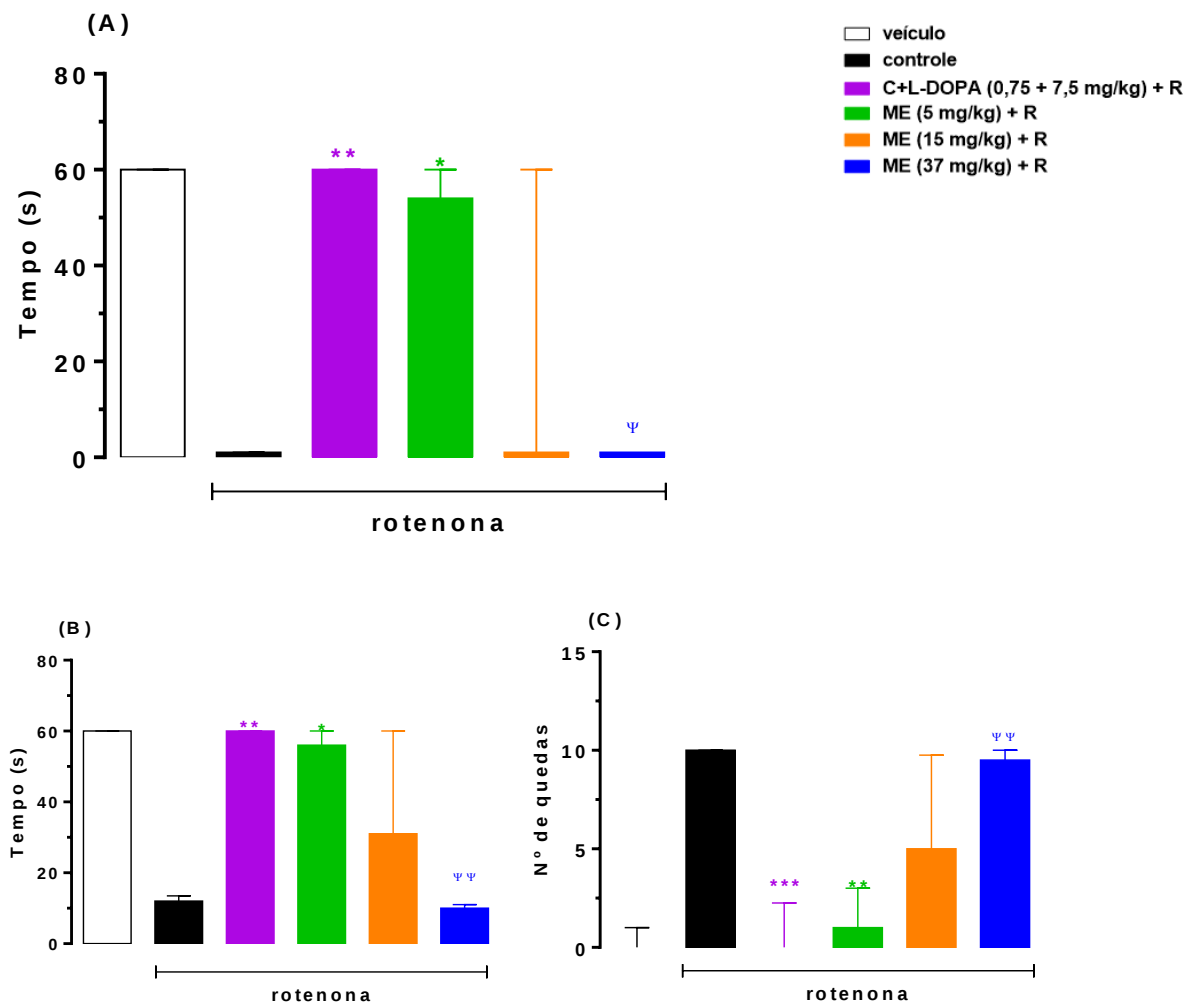
No parâmetro tempo de latência para a primeira queda do teste do rotarod, os animais tratados com tween 80 a 2% e em seguida rotenona (grupo controle) apresentaram diminuição significativa, obtendo uma mediana de 1,00 s (+1,00; +0,00 s), quando comparados ao grupo veículo cuja a mediana foi de 60,00 s (+60,00; +10,00 s). Enquanto que o ME 5 mg/kg teve um aumento significativo na reversão da latência, com a mediana de 54,00 s (+60,00; +0,00 s) quando comparados ao grupo controle. Enquanto que os animais tratados com metileugenol (ME 15 e 37 mg/kg) tiveram diminuição significativa, obtendo as medianas de 1,00 s (+60,00; +1,00 s) e 1,00 s (+1,00; +0,00 s) respectivamente, quando comparados ao grupo controle. E os animais do grupo ME 37 mg/kg tiveram uma diminuição diferente do grupo padrão, obtendo uma mediana de 60,00 s (+60,00; +1,00 s), como pode ser visualizado na figura 17A.

Já no tempo de permanência no rotarod, os ratos tratados com tween 80 a 2% e em seguida rotenona (grupo controle) apresentaram diminuição significativa, obtendo uma mediana de 12,00 s (+15,00; +2,00 s), quando comparado ao grupo veículo cuja a mediana foi de 60,00 s (+60,00; +47,00 s). Já os animais tratados com metileugenol (ME 5 mg/kg) tiveram aumento significativo, com a mediana de 56,00 s (+60,00; +5,00 s), quando comparados ao controle. E os animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) também apresentaram diferença estatística, com a mediana de 60,00 s (+60,00; +12,00 s), quando comparados ao controle. E os animais do grupo ME 37 mg/kg apresentaram diferença do grupo padrão, com a mediana de 10,00 s (+40,00; +8,00 s), como pode ser visualizado na figura 17B.

E no número total de quedas, os ratos tratados com tween 80 a 2% e em seguida rotenona (grupo controle) apresentaram um aumento significativo, com a mediana de 10,00 quedas (+11,00; +9,00 quedas), quando comparados ao grupo veículo cuja a mediana foi de 0,00 quedas (+2,00; +0,00 quedas). Enquanto que os animais tratados com metileugenol (ME 5 mg/kg) tiveram diminuição significativa, obtendo a mediana de 1,00 quedas (+10,00; +0,00 quedas) quando comparados ao grupo controle. Os animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) também apresentaram diferença estatística, cuja mediana 0,00 quedas (+10,00; +0,00 quedas) quando comparados ao grupo controle. E os animais do grupo ME 37 mg/kg

apresentaram diferença do grupo padrão, com a mediana de 9,50 quedas (+10,00; +2,00 quedas) como pode ser visualizado na figura 17C.

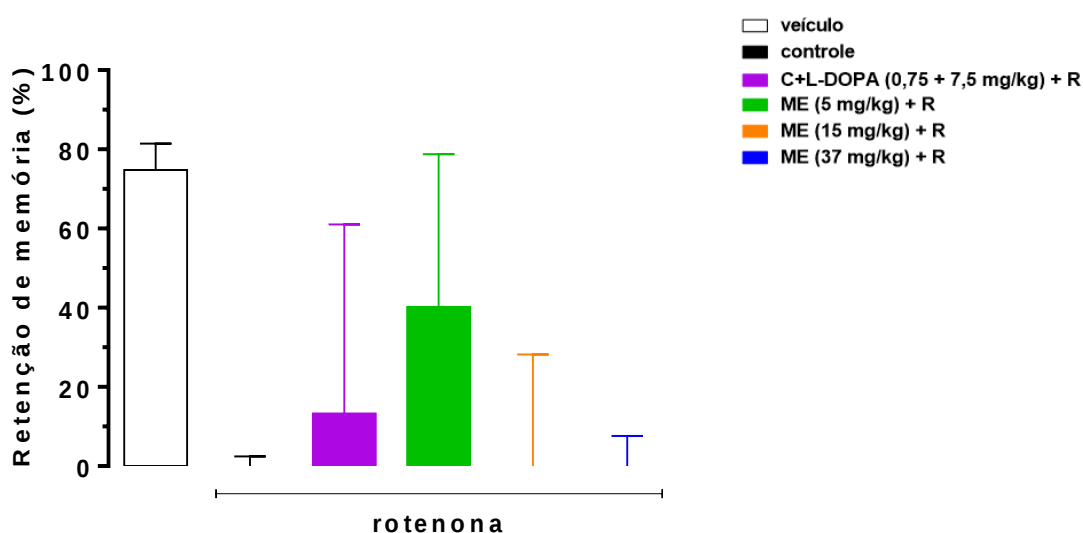
Figura 17 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre o tempo na latência para a primeira queda (A), o tempo de permanência (B) e nº de quedas (C), no rotarod de ratos com doença de Parkinson induzido por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. * $p < 0,05$ vs grupo controle. Ψ $p < 0,05$ vs grupo C+L. ** $p < 0,01$ vs grupo controle. $\Psi\Psi$ $p < 0,05$ vs grupo C+L *** $p < 0,001$ vs grupo controle. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).



4.4.4 Teste do Labirinto em T Elevado

Os ratos do grupo controle (tween 80 a 2% e em seguida rotenona) apresentaram diminuição significativa do percentual de retenção de memória, cuja a mediana foi de 0,00 % (+11,00; +0,00 %), quando comparados ao grupo veículo que obteve a mediana de 74,82 % (+90,57; +69,44 %). De forma similar, ao grupo controle, os animais tratados com metileugenol (ME 5, 15 e 37 mg/kg) tiveram descenso significativo no percentual de retenção de memória, e as medianas foram: ME 5: 40,20 % (+97,78; -41,18 %), ME 15: 0,00 % (+46,03; -0,00 %) e ME 37: 0,00 % (+19,75; +0,00 %) respectivamente. Todavia, os animais do grupo padrão (carbidopa + levodopa, 0,75 + 7,5 mg/kg) também apresentaram descenso, cuja a mediana foi de 13,33 % (+82,14; -72,33 %), como pode ser visualizado na figura 18.

Figura 18 - Efeito do pré-tratamento por via oral com metileugenol (ME) ou carbidopa + levodopa (C+L, 0,75 + 7,5 mg/kg) sobre a retenção de memória em ratos com doença de Parkinson induzida por rotenona (R, 1,5 mg/kg por 3 dias + 1,0 mg/kg por 2 dias). Os resultados foram expressos como mediana $\pm$ intervalo interquartil (n=8-13/grupo). A diferença entre grupos foi determinada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn's. O grupo veículo recebeu solução aquosa de tween 80 a 2% (v.o.) e óleo de girassol (s.c).



5. DISCUSSÃO

No presente estudo foi investigado a atividade farmacológica central do composto metileugenol contra as alterações comportamentais induzidas pela neurotoxina rotenona em ratos. Para isso, a capacidade do ME em reverter o prejuízo motor e cognitivo induzido pela rotenona foi comparada com o tratamento padrão, carbidopa + levodopa.

A rotenona é uma neurotoxina mitocondrial utilizada amplamente em modelos experimentais de doença de Parkinson, sendo que a intoxicação pode ser induzida por vários modelos e é dependente da via de administração, dose e período de administração (JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015). O modelo escolhido para a realização deste trabalho consistiu na administração da neurotoxina rotenona no período de cinco dias. Esse modelo experimental tem a vantagem de conseguir reproduzir as alterações comportamentais, bioquímicas e histológicas da DP nos animais, sem ter uma longa exposição da neurotoxina ao pesquisador (LIUN et al., 2015; ZHANG et al., 2017). Isso justifica, parcialmente, o critério de escolha desta neurotoxina como modelo experimental utilizado no presente trabalho. Outro motivo, é que a exposição dessa droga ao homem, é considerada um fator de risco importante para o desenvolvimento da DP, pois estudos epidemiológicos trazem correlações entre as exposições ao pesticida com uma maior incidência da doença de Parkinson (KAMEL et al., 2014; WIRDEFELDT et al., 2011).

Sendo assim, a primeira etapa deste trabalho teve por objetivo padronizar o modelo da DP, utilizando diferentes doses de rotenona. Primeiramente, foi caracterizada uma faixa de dose que causasse uma menor mortalidade, e que conseguisse reproduzir as características motoras. Para isso, uma curva de sobrevivência frente a diferentes doses foi realizada, obtendo, assim, como a melhor dose, uma administração subcutânea do pesticida na dose diária de 1,5 mg/kg durante três dias consecutivos, e uma menor de 1 mg/kg durante mais dois dias. Nesse esquema de tratamento verificou-se não existir diferença estatística entre o grupo exposto à rotenona em relação ao grupo veículo (Figura 9).

Esse resultado mostra uma maior sensibilidade dos animais a neurotoxina, quando comparamos com outros estudos. Como o estudo realizado por Zhang et al. (2017), onde foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 220-290 g, que

receberam doses diárias de rotenona (1,5 mg/kg, 2 mg/kg e 2,5 mg/kg s.c.) dissolvidos em óleo de girassol, por cinco semanas. Neste estudo, a dose de 1,5 mg/kg foi capaz de gerar 100% de sobrevivência. O grupo tratado 2 mg/kg apresentou uma taxa de sobrevivência de 93,3%, enquanto que o grupo tratado com 2,5 mg/kg apresentou sobrevivência de 46,7%. Já no estudo de Fleming et al. (2004), foram utilizados ratos Lewis, linhagem mais sensível do que a Wistar, pesando entre 240-327 g. Neste, a rotenona foi diluída em DMSO e aplicada por via subcutânea nas doses de 2 ou 2,5 mg/kg, por 21 dias, produzindo uma taxa de sobrevivência de 67% e 36%, respectivamente. Também ocorreu uma taxa de sobrevivência de 9% no grupo que recebeu a neurotoxina na dose de 3,5 mg/kg.

Tal diferença na sobrevivência pode estar correlacionada à variabilidade genética dos animais e diferença na metabolização da rotenona. Vários estudos também demonstram uma perda variável de neurônios em resposta à rotenona, sugerindo uma variabilidade entre os animais (BETARBERT et al., 2000; FLEMING et al., 2004; SHERER et al., 2007). Logo, percebe-se a importância da padronização do modelo utilizando essa neurotoxina, quando ocorre mudança entre centros de pesquisas.

Após a padronização da dose do pesticida, para se estabelecer o quadro de parkinsonismo nos animais, o período de pré-tratamento do grupo veículo, padrão (carbidopa + levodopa) e dos grupos com ME foi iniciado. As doses do ME foram escolhidas baseada em trabalho anterior de dissertação utilizando o precursor eugenol (SILVA et al., 2014b) e nas características farmacocinéticas descritas para o metileugenol (HONG et al., 2013; SCHECTER et al. 2004).

Em todas as avaliações a administração da rotenona induziu comprometimento comportamental quando comparado ao grupo veículo. Esse comprometimento comportamental é justificado devido à perda gradual de neurônios dopaminérgicos, que residem na substância negra compacta e no estriado, ocasionada pela rotenona (BŁASZCZYK, 2017; SEDELIS et al., 2001).

Podemos observar que ocorreu uma diminuição significativa no consumo de ração dos animais que foram tratados apenas com rotenona (grupo controle) (Figura 11). A possível justificativa para isso, é que pode ocorrer um aumento da letargia e diminuição do apetite ocasionados pelos níveis diminuídos de dopamina (BALDO et

al., 2002); como também uma rigidez muscular que está impedindo os animais de ir buscar o seu alimento (BETARBET et al., 2002). Observa-se que os animais tratados com metileugenol 5 e 15 mg/kg produziram um consumo diferente do controle, já a partir do terceiro dia, o que pode indicar uma reversão parcial da diminuição do apetite e da rigidez muscular. Enquanto que o tratamento com ME 37 mg/kg não foi capaz de reverter, sendo semelhante ao grupo controle, o que pode indicar perda do efeito, nesta dose.

E embora os animais tratados com ME 5 e 15 mg/kg tenham apresentado menor prejuízo no consumo do alimento, a perda de massa corporal (relativa e absoluta) destes animais foi similar a dos animais tratados com rotenona (controle) e ME 37 mg/kg (Figura 12). Ou seja, embora os animais estivessem se alimentando eles continuavam perdendo massa corporal, e essa perda possivelmente está ocorrendo devido a dois fatores: (1) a disfunção mitocondrial, e consequentemente, pela disfunção metabólica, ocasionada pela neurotoxina (BETARBET et al., 2000; SHERER et al., 2007); (2) diminuição da motilidade gastrointestinal, bem como uma deficiência na absorção de nutrientes, sintoma que também pode ser observado nos primeiros estágios da DP (DROLET et al., 2009; GREENE et al., 2009). O que pode sugerir que o óleo essencial não conseguiu reverter as alterações metabólicas e gastrointestinais, ocasionada pela rotenona.

No parâmetro de massa corporal, também percebemos a sensibilidade dos animais perante a rotenona, quando comparamos com outros estudos. Pois, o resultado foi semelhante aquele obtidos por Alam e Schmidt (2004), em que os animais tratados com rotenona 2,5 mg/kg (i.p.) por 48 dias perderam 8-9% de massa corporal; e no estudo de Sharma et al. (2016), em que os animais tratados com rotenona 1,5 mg/kg por 28 dias perderam aproximadamente 35% de massa corporal.

Os testes de catalepsia, campo aberto e rota rod são testes normalmente utilizados para avaliar a iniciação de movimento, locomoção, exploração e rigidez muscular em roedores. Neste estudo, a rotenona induziu nos animais uma maior latência para retirada das patas, no teste da catalepsia (Figura 13), que está correlacionada a diminuição da atividade da dopamina nos núcleos da base, que acarreta em sintomas parecidos com os da DP, como a maior latência para iniciar os movimentos, rigidez muscular e acinesia. Logo, o aumento da latência no teste da

cataplexia está correlacionado a esses sintomas do parkinsonismo (ALAM e SCHMIDT, 2002).

Percebe-se então que o tratamento com metileugenol 5 mg/kg conseguiu reverter a latência no teste, sugerindo assim, que essa dose é capaz de reverter os três sinais indicativos de prejuízo motor, efeito similar ao do grupo padrão. Enquanto que os grupos ME 15 e 37 mg/kg não conseguiram reverter, o que pode indicar uma perda do efeito ou sugerir uma letargia devido a ação anestésica e GABAérgica (DING et al., 2014; SELL e CARLINI, 1976).

A sensibilidade dos animais perante a rotenona, também pode ser vista nesse teste, onde o aumento da latência foi semelhante a de outros estudos como o de Alam e Schmidt (2004), em que os animais tratados com rotenona 2,5 mg/kg (i.p.) no período de 48 dias produziram uma latência de aproximadamente 40 s; o estudo de Dhanalakshmi et al. (2016), em que os animais tratados com rotenona 2,5 mg/kg (i.p.) no período de 28 dias produziram uma latência de aproximadamente 30 s e o estudo de Zhang et al. (2017), em que os animais tratados com rotenona 1,5 mg/kg (s.c.) por 35 dias produziram uma latência de aproximadamente 30 s.

A acinesia e alta rigidez muscular podem ser percebidas também em outros testes, como, por exemplo, o teste do campo aberto. Este é utilizado amplamente devido a sua capacidade de avaliar o comportamento exploratório e atividades gerais, correlacionadas aos circuitos neuronais associados à função dos núcleos da base, como a iniciação de movimentos, a ambulação e o comportamento de levantar (GOULD et al., 2009). Neste teste, ratos tratados com rotenona apresentaram: uma menor ambulação (total de quadrantes), menor quantidade de movimentos de autolimpeza, menor número de movimentos de levantar (Figura 14), maior latência para sair do primeiro quadrante (Figura 15) e maior tempo de imobilidade (Figura 16).

Esses parâmetros, e principalmente o de menor ambulação, nos animais que receberam a rotenona pode ser indicativo de três fatores: (1) a ocorrência de discinesias orolingual, axial ou dos membros que interrompe a atividade locomotora voluntária; (2) de movimentos circulares, que os animais podem realizar, em uma determinada área estreita, que não contribui para o número total de quadrantes contabilizados e (3) rigidez muscular, que também atrapalha o movimento voluntário (TEEMA et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

Percebemos que tratamento com ME 5 mg/kg conseguiu reverter parcialmente essas alterações no parâmetro de ambulação, como também na latência para sair do primeiro quadrante e a imobilidade (Figuras 14,15 e 16). Enquanto que a dose de 15 mg/kg conseguiu reverter parcialmente apenas a imobilidade (Figura 15) e a dose de 37 mg/kg não reverteu em nenhum dos parâmetros. O que pode sugerir uma perda do efeito do ME quando a dose fica mais elevada ou sugerir uma letargia devido a ação anestésica e GABAérgica (DING et al., 2014; SELL e CARLINI, 1976).

O controle central do comportamento animal é uma via muito complexa e envolve vários sistemas neuronais. A atividade locomotora é um padrão neurocomportamental que está bem correlacionado ao sistema dopaminérgico. E de fato, está bem estabelecido que a dopamina, dentro das vias nigroestriatais, é um dos moduladores neuroquímicos do comportamento locomotor (RAMIREZ et al., 2011). Logo os efeitos observados pelo tratamento com metileugenol no campo aberto, provavelmente ocorreram por que a substância preveniu parcialmente o prejuízo motor e a rigidez muscular (TEEMA et al., 2016).

Esses resultados também mostram sensibilidade dos animais perante a rotenona, e estão de acordo com os estudos realizados por Teema et al. (2016), em que a rotenona 1 mg/kg (s.c.) por 30 dias foi capaz de reduzir a ambulação em 75% e uma imobilidade, atividade de levantar e de autolimpeza próximas de zero; e o estudo de Zhang et al. (2017), em que os animais tratados com rotenona 1,5 mg/kg (s.c.) por 30 dias produziram uma redução da atividade de autolimpeza em aproximadamente 50% e uma redução da atividade locomotora de aproximadamente 75%.

As alterações na coordenação motora, estão relacionados geralmente à degeneração em neurônios estriatais, uma região funcionalmente conectada por meio de projeções provenientes do córtex motor. Alterações na coordenação motora podem ser avaliadas por outro teste além do campo aberto, como o teste do rotarod (DELAVILLE et al., 2014; GOULD et al., 2009). Nesse teste, percebe-se que a neurotoxina utilizada causou déficit na coordenação motora, que pode ser evidenciado pela baixa latência para a primeira queda, curto tempo de permanência na barra giratória e um elevado número no total de quedas no rotarod (Figura 17).

O tratamento com metileugenol na dose de 5 mg/kg conseguiu reverter as alterações motoras induzidas pela rotenona nesse teste, de uma forma semelhante

ao grupo padrão (Figura 17), o que confirma que a substância preveniu parcialmente o prejuízo motor e a rigidez muscular. Enquanto que a dose de ME 15 e 37 mg/kg não modificaram o efeito da rotenona, o que pode sugerir uma perda do efeito do ME quando a dose fica mais elevada ou sugerir uma letargia devido a ação anestésica e GABAérgica do ME (DING et al., 2014; SELL e CARLINI, 1976).

Estes efeitos no rotarod ficaram de acordo com aqueles descritos no estudo de Sharma et al. (2016), em que ratos tratados com rotenona 1,5 mg/kg (s.c.) por 28 dias produziram um tempo de queda de aproximadamente um quarto do tempo de queda do grupo veículo e no estudo de Zhang et al. (2017), em que os animais tratados com rotenona 1,5 mg/kg (s.c.) por trinta dias produziram um tempo de queda de aproximadamente um quarto do tempo de queda do grupo veículo.

O efeito do metileugenol sobre esses parâmetros motores pode estar correlacionado a alguns mecanismos, porém são necessários mais estudos para se estabelecer sua atividade antiparkinsoniana. A primeira sugestão é que esse efeito pode ter ocorrido devido à atividade antioxidante e neuroprotetora descrita no estudo *in vitro* de Choi et al. (2010). Onde o metileugenol reduziu a lesão por isquemia cerebral por meio de vários mecanismos. Um deles envolve a diminuição da ativação de caspases-3, um mediador pró-apoptótico envolvido na morte celular programada. Outro mecanismo envolve a diminuição da produção de radicais livres, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α), bem como elevação da atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase. Logo, percebe-se que essa substância tem uma atividade anti-inflamatória comprovada, que não envolve mecanismos de inibição da ciclooxigenase 1 e 2 (YANO et al., 2006).

A atividade de eliminação de radicais livres do metileugenol também foi observada por meio de ensaios, utilizando o 1,1-difenil-2-picrilidrazilo (DPPH) como doador de radical. Neste, a IC₅₀ do ME foi 13,7 μ M (enquanto do controle positivo (vitamina C) foi de 3,6 μ M), o que sugere que esta substância tem um efeito direto, embora fraco, na capacidade de remoção de EROs quando comparado à vitamina C (CHOI et al., 2010).

Essa atividade antioxidante também descrita para o proveniente óleo essencial das folhas de *Piper divaricatum* (Piperaceae). Esse óleo contém uma proporção de 63 - 77 % de metileugenol e 10 – 23 % de eugenol. Testes antioxidantes

para avaliar a atividade foram realizados com o óleo e o mesmo foi capaz de eliminar o radical DPPH, com uma inibição variando de 19% a 74%, com um valor IC₅₀ de 16,2 ± 1,9 µg/mL (SILVA et al., 2014a). Esses resultados em conjunto fortalecem a ideia do possível efeito moderado neuroprotetor do metileugenol perante processos envolvendo estresse oxidativo.

Outra possível sugestão para o efeito do metileugenol, sobre as alterações motoras dos animais, é que essa substância tem a atividade farmacológica de inibir a enzima monoamina oxidase (MAO). A inibição do ME é mais seletiva para a MAO B do que para a MAO A, e foi mostrada no estudo em que foi utilizado o ME na dose de 0,17 mmol/kg (TAO et al., 2005). A MAO B está presente em níveis elevados no cérebro e é responsável por degradar alguns neurotransmissores, entre eles, a dopamina. Logo sua inibição acarreta em um aumento nos níveis de dopamina na fenda sináptica, sendo evidenciado por uma melhora dos sintomas do parkinsonismo (FINBERG, 2014). Além disso, a degradação da dopamina pela MAO leva à formação do ácido dihidroxifenilacético e H₂O₂, e consequentemente a formação de radicais livres. Logo, sua inibição contribui também para uma diminuição do estresse oxidativo resultante da degradação da própria dopamina (GESI et al., 2001; SULZER e ZECCA, 2000).

Além das alterações motoras, a rotenona também ocasionou um prejuízo na memória e na aprendizagem dos animais, sintomas estes, que também podem estar presentes na doença de Parkinson (DA CUNHA et al., 2003; DOS SANTOS et al., 2013). Esse comprometimento cognitivo nos ratos foi evidenciado pela diminuição do percentual de retenção da memória no teste do labirinto T elevado (Figura 18).

O grupo controle apresentou um menor percentual de retenção da memória, ficando de acordo com os estudos de Dhanalakshmi et al. (2016), em que os animais tratados com rotenona 2,5 mg/kg (i.p.) por 10 dias produziram um percentual de memória próximo de zero enquanto que o grupo veículo produziu uma retenção de aproximadamente 100% e o estudo de Kaur et al. (2011), em que os animais tratados com rotenona 3 mg/kg (s.c.) por 30 dias também produziram um percentual de retenção próximo de zero. No presente trabalho, esse percentual de memória não foi revertido com o tratamento com metileugenol nas doses de 5, 15 e 37 mg/kg.

Porém não foi observada nenhuma reversão no tratamento com o metileugenol. Isso pode indicar que essa substância haja mais nos circuitos motores, do que nos cognitivos, de forma similar a carbidopa + levodopa, que também não produziu efeito nesse teste. O grupo padrão também ajuda a perceber que mesmo os animais não tendo prejuízo motor, pode ocorrer o declínio cognitivo.

Este declínio também é observado nos estágios iniciais em pacientes com a doença de Parkinson. Estes geralmente apresentam defeitos colinérgicos significativos, que podem ser tratados com inibidores da colinesterase, como a rivastigmina. E, de fato, o sistema colinérgico desempenha um papel de suma importância na memória e em funções relacionadas ao aprendizado (DOHI et al., 2009; VAN LAAR et al., 2010).

A neurotoxina rotenona também tem a capacidade de aumentar os níveis da acetilcolinesterase (AChE) no cérebro, o que leva a diminuição dos níveis de acetilcolina, levando assim a um declínio na memória, sendo observado no teste do labirinto (KAUR et al., 2011). Isso pode sugerir que o metileugenol não atue por essa via, embora tenha uma estrutura terpenóide, e os grupos funcionais, semelhantes de estrutura-atividade, dos inibidores da AChE (DOHI et al., 2009 FUJIWARA et al., 2010; MIYAZAWA e YAMAFUJI, 2005). Porém, seus mecanismos precisam, ainda, ser melhor elucidados.

O cérebro é um órgão bem susceptível aos danos do estresse oxidativo, como aqueles ocasionados pela rotenona. Essa susceptibilidade se dá principalmente devido à alta utilização de oxigênio, dos altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados e por conta das baixas concentrações de enzimas antioxidantes e baixos níveis de quelantes de radicais livres (MARIANI, 2005). Sendo assim, substâncias fenólicas e derivados, bem como substâncias com cadeia insaturada, como o metileugenol, possuem a capacidade de proteger o DNA dos neurônios por serem quelantes de íons metálicos, e com isso interrompendo a propagação da oxidação (DA et al., 2015; HORVATHOVA et al., 2014; MESSAOUD et al., 2012).

Estudos em humanos e animais vêm sugerindo também que os compostos fenólicos e polifenólicos dietéticos, bem como seus derivados, possuem a atividade antioxidante sendo capazes de neutralizar o prejuízo neuronal. Estes também apresentam potencial atividade antiparkinsoniana devido a capacidade de supressão

do estresse oxidativo, por restaurar algumas funções mitocondriais e prevenir a apoptose de neurônios dopaminérgicos (DUTTA e MOHANAKUMAR, 2015; JOHNSON e BOBROVSKAYA, 2015; ROSHAN et al., 2016). Algumas substâncias que são quimicamente semelhantes ao metileugenol, e possuem um núcleo fenólico, vem sendo estudadas por terem atividades neuroprotetoras e/ou antiparkinsonianas (Quadro 1 e Figura 6).

Como por exemplo, o eugenol, que é um composto fenólico e precursor do metileugenol, que já foi utilizado em modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona. No estudo essa substância, reverteu parcialmente a hipolocomoção e a imobilidade, nos testes do campo aberto; bem como reverteu parcialmente o efeito da rotenona no rotarod na dose de 37 mg/kg (SILVA et al., 2014b). Essa mesma substância foi utilizada no modelo experimental da doença de Huntington induzida por ácido-3-nitropropilônico e também obteve um efeito neuroprotetor na dose de 37 mg/kg (NOBREGA et al., 2013).

Percebe-se que para o metileugenol, que se diferencia do eugenol apenas pelo grupamento metila (figura 7), a dose mais efetiva foi a de 5 mg/kg. Isso pode indicar maior potencialidade do efeito, provavelmente por conta da lipossolubilidade do ME, e características farmacocinéticas como a rápida absorção após a ingestão e pico de concentração plasmática em aproximadamente 5-15 min. Porém seus efeitos precisam ser melhor elucidados (HONG et al., 2013; SCHECTER et al. 2004).

O ácido felúrico, que também é outro composto fenólico, precursor do metileugenol, foi utilizado no modelo experimental de rotenona. Nesse estudo, a dose de 30 mg/kg não só conseguiu proteger terminais nervosos do estriado contra estresse oxidativo, como também restaurou os níveis de enzimas antioxidantes e inibiu a peroxidação lipídica. Essa substância também produziu efeitos antiinflamatórios, reduzindo níveis de ciclooxigenase-2, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (OJHA et al., 2015).

Outro estudo mostra a vanilina, que é um composto fenólico simples, estruturalmente parecido com o metileugenol e eugenol, sendo utilizado em modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona. Sua administração nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg conseguiu reverter alguns dos sintomas do parkinsonismo, obtendo respostas significativas nos testes de catalepsia, campo aberto e labirinto.

Sua atividade antiparkinsoniana também foi atribuída à atividade antioxidante e neuroprotetora (DHANALAKSHMI et al., 2016). A vanilina também foi utilizada em um modelo experimental de doença de Huntington na qual também se obteve uma resposta satisfatória (GUPTA e SHARMA, 2014).

Vários outros compostos fenólicos e polifenólicos, bem como seus derivados, também vêm produzindo efeitos antiparkinsonianos em modelos experimentais utilizando a rotenona. Essas ações vêm sendo atribuídas também aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e neuroprotetores. Alguns exemplos dessas substâncias são: curcumina (KHATRI et al., 2016; QUALLS et al., 2014), apigenina (ANUSHA et al., 2017) e timoquinona (EBRAHIMI et al., 2017).

Vale ressaltar que os compostos fenólicos e seus derivados, que, geralmente, possuem atividade antioxidante, depois de certo limiar, passam a ter um efeito contrário gerando uma atividade pró-oxidante. Estudos mostram que vários antioxidantes podem exibir um comportamento pró-oxidante sob certas condições, e essa dualidade depende de fatores como o potencial de redução de metal, o comportamento quelante, o pH, a solubilidade e dose da substância (SHIN, 2007).

A levodopa e a carbidopa, por exemplo, que são substâncias comumente utilizadas no tratamento da doença de Parkinson, possuem seus efeitos antioxidantes. Porém, em estudos *in vitro* com soluções de levodopa e carbidopa, as concentrações mais altas passaram a ter atividade pró-oxidante. Os efeitos da L-DOPA sobre a produção de radicais livres são complexos, mas, geralmente, são dependentes de ferro e peróxido de hidrogênio, de uma forma que estimulam a produção do radical OH⁻ (COLAMARTINO et al., 2012; SPENCER et al., 1996).

Outras substâncias que também foram descritas com atividade antiparkinsoniana, e às quais também foram atribuídas as propriedades antioxidantes, passam a ser pró-oxidantes, dependendo da concentração, como, por exemplo: a vanilina, em que num estudo *in vitro*, 0,1 mL produziram peroxidação lipídica e danos dependente de ferro, sobre o DNA em uma cultura de células (LIU e MORI, 1993) e o ácido felúrico, que num estudo *in vitro*, que possuía soluções com as concentrações variando 0,5 µM a 2 µM/mL, as maiores concentrações passaram a produzir um radical fenoxi felúrico, com atividades pró-oxidante (BOURNE e RICE-EVANS, 1997).

O metileugenol e o eugenol, que são tidos como antioxidantes, também podem agir como substâncias pró-oxidantes. O estudo *in vitro* de Sipe, et al. (2014) mostrou

que essas substâncias passam por um metabolismo de oxidação e formam radicais livres. O metileugenol também passa por um processo de autooxidação, de modo que o produto pode ser o cátion metileugenol e/ou hidroperóxidos orgânicos. Esses hidroperóxidos são capazes de ativar peroxidases, mesmo sem a presença do peróxido de hidrogênio, o que, por um lado, facilita a atividade antioxidante. Porém, hidroperóxidos não são bons substratos para a enzima catalase, o que demonstra que essa defesa não se torna tão eficaz contra a exposição de altas doses do eugenol e metileugenol (SIPE, et al., 2014).

Em outro estudo, utilizando o eugenol, foi verificada a dualidade de seu efeito em um modelo de parkinsonismo induzido por 6-OHDA. No pré-tratamento com este óleo essencial, ocorreu uma melhora do quadro parkinsoniano bem como uma prevenção da queda dos níveis de DA no estriado. Enquanto que no pós-tratamento ocorreu diminuição dos níveis de DA, melhora no comportamento e ocorreu uma diminuição da atividade da catalase, aumento da atividade da glutathione peroxidase e aumento de L-ascorbato oxidado no estriado (KABUTO e YAMANUSHI, 2011; KABUTO et al., 2007).

Esse efeito pró-oxidante do ME, juntamente com o desequilíbrio mitocondrial causado pela rotenona, aumenta ainda mais o estresse oxidativo. Isso sugere que, a partir de certo limiar, essa substância deixa de ser neuroprotetora e passa a ser neurotóxica, pelo menos nesse modelo animal de doença de Parkinson. Em nosso trabalho, enquanto que baixas doses do ME (5 mg/kg) produziu efeito semelhante ao efeito do grupo padrão, as doses mais elevadas (15 e 37 mg/kg) produziram efeitos semelhantes aos do grupo controle, nos diferentes testes comportamentais.

Logo, mostramos que o pré-tratamento de ratos com metileugenol (5 mg/kg) produziu efeito antiparkinsonianos significativo. Porém em doses mais elevadas (15 e 37 mg/kg) o ME perdeu sua atividade. Assim, o presente trabalho trouxe novas perspectivas farmacológicas para o tratamento e prevenção da doença de Parkinson, contudo seus mecanismos e doses terapêuticas precisam ser melhor esclarecidos.

6. CONCLUSÃO

O metileugenol (5 mg/kg) reduziu as alterações comportamentais do parkinsonismo induzidas pela neurotoxina rotenona sobre a atividade locomotora, cataléptica e no rotarod, porém não reverteu o déficit de memória, sugerindo possível ação neuroprotetora.

6.1 PERSPECTIVAS

Pretende-se continuar os estudos com o metileugenol em modelos experimentais da doença de Parkinson para um melhor entendimento dos seus efeitos e mecanismo de ação. Estes estudos irão incluir:

- Análises histológicas do modelo experimental, utilizando rotenona;
- Mensuração de enzimas antioxidantes como Superóxido Dismutase e Catalase no modelo experimental, utilizando rotenona;
- Mensuração peroxidação lipídica do modelo experimental, utilizando rotenona;
- Mensuração da atividade anticolinesterasica do metileugenol;
- Fazer as mesmas análises com outras doses do metileugenol (1 mg/kg e 10 mg/kg);
- Fazer as mesmas análises em modelos experimentais induzidos por haloperidol e MPTP, para uma melhor elucidação dos mecanismos;

REFERÊNCIAS

- ABDO, K.M.; CUNNINGHAM, M.L.; SNELL, R.A. HERBERT, G.S.; TRAVLOS, S.R. ELDRIDGE, J.R. 14-Week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered by gavage to F344 rats and B6C3F1 mice. **Food Chem Toxicol.**, v.39, p. 303-316, 2001.
- ALAM, M.; SCHMIDT, W. J. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. **Behav Brain Res.**, v. 153, p. 439–446, 2004.
- ALAM, M.; SCHMIDT, W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces Parkinsonian symptoms in rats. **Behav Brain Res.**, v.136, p. 317–24, 2002.
- ANUSHA, C.; SUMATHI, T.; JOSEPH, L. D.. Protective role of apigenin on rotenone induced rat model of Parkinson's disease: Suppression of neuroinflammation and oxidative stress mediated apoptosis. **Chem Biol Interact.**, v. 269, p. 67-79, 2017.
- BALDO, B. A.; SADEGHIAN, K.; BASSO, A. M.; KELLEY, A.E. Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. **Behav Brain Res.**, v. 2, n. 37, p. 165-77, 2002.
- BARBOSA, M. T.; CARAMELLI, P.; MAIA, D. P.; CUNNINGHAM, M.C.; GUERRA, H.L.; LIMA-COSTA, M.F.; Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: a community-based survey in Brazil (the Bambui study). **Mov Disord.**, v.21, p.800–8, 2006.
- BERNARDI, M.M; PALERMO-NETO, J. Effect of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open field behavior of rats. **Psy pharmacol.**, v. 65, p. 247-250, 1979.
- BETARBET, R.; CANET-AVILES, R.M.; SHERER, T.B.; MASTROBERARDINO, P.G.; MCLENDON, C.; KIM, J.H..Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: effects of the pesticide rotenone on DJ-1, α -synuclein, and the ubiquitin–proteasome system. **Neurobiol Dis.**, v.22, p. 404–20. 2006.
- BETARBET, R.; SHERER, T.B.; GREENAMYRE, J.T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays.**, v.24, p.308–318, 2002.
- BETARBERT, R.; SHERER, T.B.; MACKENZIE, G.; GARCIA-OSUNA, M.; PANOV, A.V.; GREENAMYRE, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuro.**, v. 3, p. 1301-1306, 2000.
- BHATTI, J. S.; KUMAR, S.; VIJAYAN, M.; BHATTI, G. K.; REDDY, P. H. Therapeutic Strategies for Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Age-Related Metabolic Disorders. **Prog Mol Biol Transl Sci.**, v. 146, p. 13-46, 2017.
- BŁASZCZYK, J. W. Nigrostriatal interaction in the aging brain: new therapeutic target for Parkinson's disease. **Acta Neurobiol Exp.**, v. 77, n. 1, p. 106-112, 2017.

BOURNE, L.C.; RICE-EVANS, C. A. The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. **Free Radic Res.**, v. 27, n. 3, p. 337-44, 1997.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, A. K.; RÜB, U.; JANSEN STEUR, E. N. H.; BRAAK, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobio of Aging.**, v.24, p. 197–211, 2003.

BRAAK, H.; GHEBREMEDHIN, E.; RÜB, U.; BRATZKE, H.; DEL TREDICI, K. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res.**, v.318, p.121–134, 2004.

BROADHURST, P. L. Determination of emotionality in the rat. I. Situational factors. **Psychol.**, v. 49, p. 12–20, 1957.

BROOKS, S. P.; TRUEMAN, R. C.; DUNNETT, S. B. Assessment of motor coordination and balance in mice using the rotarod, elevated bridge, and footprint tests. **Curr. Protoc. Mouse Biol.**, v. 2, p. 37–53, 2012.

BURKEY, J. L.; SAUER, J. M.; MCQUEEN, C. A.; SIPES, I.G. Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners— a mechanism of activation for methyleugenol. **Mutat Res.**, v. 453, p. 25–33, 2000.

BURN, D.J. Beyond the iron mask: towards better recognition and treatment of depression associated with Parkinson's disease. **Mov Disord.**, v.17, p. 445–54. 2002.

CABIZZA, M.; ANGIONI, A.; MELIS, M.; CABRAS, M.; TUBEROSO, C.V.; CABRAS, P.; Rotenone and rotenoids in cube resins, formulations, and residues on olives. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.288–93. 2004.

CARDONA, F.; PÉREZ-TUR, J. Other proteins involved in Parkinson's disease and related disorders. **Curr Protein Pept Sci.**, 2016

CHEN, Y.; ZHANG, D. Q.; LIAO, Z.; WANG, B.; GONG, S.; WANG, C. Anti-oxidant polydatin (piceid) protects against substantia nigral motor degeneration in multiple rodent models of Parkinson's disease. **Mol Neurodegener.**, v. 2; p. 10 - 4, 2015.

CHOI, Y. K.; CHO, G. S.; HWANG, S.; KIM, B. W.; LIM, J. H.; LEE, J. C.; KIM, H. C.; KIM, W. K.; KIM, Y. S. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. **Free Rad Res.**, v. 44, p. 925–935, 2010.

COLAMARTINO, M.; PADUA, L.; MENEGHINI, C.; LEONE, S.; CORNETTA, T.; TESTA, A.; COZZI, R. Protective effects of L-dopa and carbidopa combined treatments on human catecholaminergic cells. **DNA Cell Biol.**, v. 31, p. 1572-1579, 2012.

COLAMARTINO, M.; SANTORO, M.; DURANTI, G.; SABATINI, S.; CECI, R.; TESTA, A.; PADUA, L.; COZZI, R. Evaluation of levodopa and carbidopa antioxidant activity in normal human lymphocytes in vitro: implication for oxidative stress in Parkinson's disease. **Neurotox Res.**, v. 27, p. 106-117, 2015.

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. **JAMA**, v. 16, p. 1670-83, 2014.

COSTALL, B.; NAYLOR, R.J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. **Psychopharmacol.**, v. 34, p. 233-41, 1974.

COUNCIL OF EUROPE-COMMITTEE OF EXPERTS ON FLAVOURING SUBSTANCES. Opinion of the Scientific Committee on Food on Methyleugenol (4-Allyl-1,2-dimethoxybenzene). Document SCF/CS/Flavour/4 ADD1 Final. p. 1-10, 2011.

DA, T. T.; THANH, N. T.; CHI, MEERVELT, L. V. Synthesis, structure and properties of two series of platinum (II) complexes containing methyleugenol or chelating methyleugenol and amine. **Polyhedron**. v. 85, 8, p. 104-109. 2015.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E.; FERRO, M. M; MIYOSHI, E; ANSELMO-FRANCI, J. A; CANTERAS, N. S. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 79, p. 236-242, 2003.

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

DHANALAKSHMI, C.; JANAKIRAMAN, U.; MANIVASAGAM, T.; THENMOZHI, A. J.; ESSA, M. M. Vanillin Attenuated Behavioural Impairments, Neurochemical Deficits, Oxidative Stress and Apoptosis Against Rotenone Induced Rat Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Res.**, DOI 10.1007/s11064-016-1901-5, 2016.

DELAVILLE, C.; CRUZ, A. V.; MCCOY, A. J.; BRAZHNİK, E.; AVILA, I.; NOVIKOV, N.; WALTERS, J. R. Oscillatory Activity in Basal Ganglia and Motor Cortex in an Awake Behaving Rodent Model of Parkinson's Disease. **Bas Gang.**, v. 1, n. 3, p. 221-227, 2014.

DICKSON, D. W. Neuropathology of Parkinson disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, 2017.

DING, J.; HUANG, C.; PENG, Z.; XIE, Y.; SHINING DENG, S.; NIE, Y.; XU, T.; GE, W.; LI, W.; LI, F. Electrophysiological Characterization of Methyleugenol: A Novel Agonist of GABA (A) Receptors. **ACS Chemical. Neurosci.**, v. 5, p. 803-811, 2014

DOHI, S.; TERASAKI, M.; MAKINO, M. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. **J Agric Food Chem.**, v. 27, n. 57, p. 4313-8, 2009.

DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. P.; BIGLAN, K. M.; HOLLOWAY, R.G.; KIEBURTZ, K.; Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology.**, v.68, p. 384–6, 2007.

DOS SANTOS, A.C.; CASTRO, M.A.; JOSE, E.A.; DELATTRE, A.M.; DOMBROWSKI, P.A.; DA CUNHA, C. REM sleep deprivation generates cognitive and neurochemical disruptions in the intranigral rotenone model of Parkinson's disease. **J Neurosci Res.**, v. 91, p. 1508–16, 2013.

DOTY, R.L.; DEEMS, D. A.; STELLAR, S. Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. **Neurology.**, v.38, p.1237–44, 1988.

DOTY, R.L. Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. **Neurobiol Dis.**, v.46, p. 527–52. 2012.

DROLET, R.E.; CANNON, J.R.; MONTERO, L.; GREENAMYRE, J.T. Chronic rotenone exposure reproduces Parkinson's disease gastrointestinal neuropathology. **Neurobiol Dis.**, v. 36, p. 96–102, 2009.

DUNHAM, N. W; MYIA, TS. A Note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rat and mice. **J. Amer. Pharm. Associ.**, v. 46, p. 208-210, 1957.

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

DUTTA, D.; MOHANAKUMAR, K. P. Tea and Parkinson's disease: Constituents of tea synergize with antiparkinsonian drugs to provide better therapeutic benefits. **Neurochem Int.**, v. 89, p. 181-90, 2015.

EBRAHIMI, S. S.; ORYAN, S.; IZADPANA, E.; HASSANZADEH, K. Thymoquinone exerts neuroprotective effect in animal model of Parkinson's disease. **Toxicol Lett.**, v. 5, n. 276, p. 108-114, 2017.

ELBAZ, A. and MOISANA, F. Update in the epidemiology of Parkinson's disease. **Current Op Neur.**, v. 21, p. 454–460, 2008.

FINBERG, J. P. M. Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine. **Pharma & Therap**, 2014.

FERNANDEZ, H. H. Updates in the medical management of Parkinson disease. **ClevClinic J Med.**, v. 79, p. 28-35, 2012.

FLEMING, S. M.; ZHU, C.; FERNAGUT, P. O.; MEHTA, A.; CHERYL, D. C.; RONALD L. SEAMAN, R. L.; Chesselet, M. F. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. **Exp Neur.**, v. 187, p. 418–429, 2004.

FUJIWARA, M.; YAGI, N.; MIYAZAWA, M. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Volatile Oil from *Peltophorum dasyrachis* Kurz ex Bakar (Yellow Batai) and Bisabolane-Type Sesquiterpenoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 5, p 2824–2829, 2010.

GAGNON, J.F.; POSTUMA, R.B.; MAZZA, S.; DOYON, J.; MONTPLAISIR, J. Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases. **Lancet Neurol.**, v. 5, p. 424–32, 2006.

GARCIA-GARCIA, F.; PONCE, S.; BROWN, R.; CUSSEN, V.; KRUEGER, J.M. Sleep disturbances in the rotenone animal model of Parkinson disease. **Brain Res.**, v. 1042, p. 160–8. 2005.

GARDNER, I.; WAKAZONO, H.; BERGIN, P.; DE WAZIERS, I.; BEAUNE, P.; KENNA, J.G. Cytochrome P450 mediated bioactivation of methyleugenol to 1'-hydroxymethyleugenol in Fischer 344 rat and human liver microsomes. **Carcigen.**, v. 18, p. 1775–1783, 1997.

GASSER, T. Genetics of Parkinson's disease. **Curr. Opin. Neurol.**, v. 18, p. 363–369, 2005.

GESI, M.; SANTINAMI, A.; RUFFOLI, R.; CONTI, G.; FORNAI, F. Novel Aspects of Dopamine Oxidative Metabolism (Confounding Outcomes Take Place of Certainties. **Pharma & Toxicol.**, v. 89, n. 5, p. 217-24, 2001.

GOBBI, L. T.; BUCKEN, F. A.; VITÓRIO, R. **Doença de Parkinson e exercício físico**. Curitiba: Editora CRV, 2014.

GOKUL, K. Oral supplements of aqueous extract of tomato seeds alleviate motor abnormality, oxidative impairments and neurotoxicity induced by rotenone in mice: Relevance To Parkinson's Disease. **Neurochem res.**, v. 39, p.1382–94, 2014.

GOULD, T. D.; DAO, D.T.; KOVACSICS, C. E. The open field test. Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. **Neurometh.**, v. 42, p. 1-20 chapter 1, 2009.

GREENE, J. G.; NOORIAN, A. R.; SRINIVASAN, S. Delayed gastric emptying and enteric nervous system dysfunction in the rotenone model of Parkinson's disease. **Exp Neurol.**, v. 218, p. 154-61, 2009.

GUPTA, S.; SHARMA, B. Pharmacological benefits of agomelatine and vanillin in experimental model of Huntington's disease. **Pharma Biochem Behav.**, v. 122 p. 122–135, 2014.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad Sci.**, v.899, p.136-47, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th edition London: Oxford Univ. Press., 2007.

HAWKES, C. H.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H.A timeline for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, v.16, p. 79-84, 2010.

HAWKES, C. H.; SHEPHARD, B.C.; DANIEL, S.E. Olfactory dysfunction in Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychi.**, v. 62, p. 436–46, 1997.

HONG, S.P.; FUCIARELLI, A.F.; JOHNSON, J. D.; GRAVES, S. W.; BATES, D. J.; WAIDYANATHA, S.; SMITH, S. C. Toxicokinetics of methyleugenol in F344 rats and B6C3F1 mice. **Xenobio.**, v.43, n.3, p. 293–302, 2013.

HORVATHOVA, E.; NAVAROVA, J.; GALOVA, E.; SEVCOVICOVA, A.; CHODAKOVA, L.; SNAHNICANOVA, Z.; MELUSOVA, M.; KOZICS, K.; SLAMENOVA, D. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil. **J Agric Food Chemical.**, v. 16, p. 62, 2014.

HOSAMANI, R.; KRISHNA, G.; MURALIDHARA. Standardized *Bacopamonnieri* extract ameliorates acute paraquat-induced oxidative stress, and neurotoxicity in prepubertal mice brain. **Nutri Neuro**, v.1, p. 1-13, 2014.

ITO, M.; MURAKAMI, K.; YOSHINO, M. Antioxidant action of eugenol compounds: role of metal ion in the inhibition of lipid peroxidation. **Food Chem Toxicol.**, v.43, p.461 – 466, 2005.

JOHNSON, M. E. and BOBROVSKAYA, L. An update on the rotenone models of Parkinson's disease: Their ability to reproduce the features of clinical disease and model gene–environment interactions. **NeuroToxicol.**, v. 46, p.101–116, 2015.

KALINDERI, K.*et al.* GSK3b polymorphisms, MAPT H1 haplotype and Parkinson's disease in a Greek cohort. **Neurobiol Aging.**, v. 32, p.546–546, 2011.

KAMEL, F.; GOLDMAN, S. M.; UMBACH D. M.; CHEN, H.; RICHARDSON, G. *et al.* Dietary fat intake, pesticide use, and Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 20, n. 1, p. 82-7, 2014.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L. O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Crit Rev Toxicol.**, v. 45, n. 9, p. 765-98, 2015.

KHATRI, D. K.; JUVEKAR, A. R. Neuroprotective effect of curcumin as evinced by abrogation of rotenone-induced motor deficits, oxidative and mitochondrial dysfunctions in mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.150-151, p. 39-47, 2016.

KABUTO, H.; TADA, M.; KOHNO, M. Eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol] prevents 6-hydroxydopamine-induced dopamine depression and lipid peroxidation inductivity in mouse striatum. **Biol Pharm Bull.**, v. 30, n. 3, p.423-7, 2007.

KABUTO, H. e YAMANUSHI, T.T. Effects of zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone] and eugenol [2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol] on the pathological progress in the 6-hydroxydopamine-induced Parkinson's disease mouse model. **Neurochem Res.**, v.36, n. 12, p. 2244-9, 2011.

KAUR, H.; CHAUHAN, S.; SANDHIR, R. Protective effect of lycopene on oxidative stress and cognitive decline in rotenone induced model of Parkinson's Disease. **Neurochem Res.**, v. 36, p. 1435–1443, 2011.

KRAUSE, K. H. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. **Exp Geront.**, London, v. 42, p. 256-262, 2007.

KUMAR, P; PADI, S. S. V; NAIDU, P. S; KUMAR, A. Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms. **Behav Pharma.**, v.17, p.485–92, 2006.

LAHLOU, S.; FIGUEIREDO, A. F.; MAGALHAES, P. J.; LEAL-CARDOSO, J. H.; GLORIA, P. D. Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats. **Life Sci.**, v.74, p. 2401–2412, 2004.

LANGSTON, J. W.; FORNO, L. S.; TETRUD, J.; REEVES, A. G.; KAPLAN, J. A.; KARLUK, D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Ann Neurol.**, v.4, p.598-605, 1999.

LIMA, C. C. et al. Relaxant and Antispasmodic Actions of Methyleugenol on Guinea-Pig Isolated Ileum. **Planta Med.**, v. 66, n. 5, p. 408-411, 2000.

LIPSKI, J.; NISTICO, R.; BERRETTA, N.; GUATTEO, E.; BERNARDI, G.; NICOLA B.; MERCURI, N. B. L-DOPA: A scapegoat for accelerated neurodegeneration in Parkinson's disease? **Prog Neurobio.**, v.94, p. 389–407, 2011.

LIU, J.; MORI, A. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. **Neuropharma.**, v. 32, n. 7, p. 659-69, 1993.

LIUN, B.; SUN, J.; ZHANG, J.; MAO, W.; MA, Y.; LI, S.; CHENG, X.; LV, C. Autophagy-related protein expression in the substantia nigra and eldepryl intervention in rat models of Parkinson's disease. **Brain Res.**, v. 1625, p.180-8. 2015.

MARIANI, E.; POLIDORI, M.C.; CHERUBINI, A.; MECOCCHI, P. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an over view. **J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.**, v.827, p. 65–75, 2005.

MARSDEN, C.D. and PARKES, J. D. Success and problems of long-term levodopa

therapy in Parkinson's disease. **Lancet.**, v.1, p. 345–349, 1997.

MARTINEZ, T. N.; GREENAMYRE, J. T. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal.**, v. 1, n.6, p. 920-34, 2012.

MENA, M.A.; CASAREJOS, M.J.; CARAZO, A.; PAINO, C.L.; YEBENES, J. G. Glia conditioned medium protects fetal rat midbrain neurones in culture from LDOPA toxicity. **Neuroreport.**, v.7, n.2, p. 441–445, 1996.

MEREDITH, G. E.; SONSALLA, P. K.; CHESSELET, M. F. Animal models of Parkinson's disease progression. **Acta Neuropathol.**, .115:385–398, 2008.

MESSAOUD, C.; LAABIDI, A.; BOUSSAID, M. *Myrtus communis* L. Infusions: The Effect of Infusion Time on Phytochemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Activities. **J Food Sci.**, v. 77, n. 9, 2012.

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 5, p. 1765–1768, 2005.

MILLER EC, SWANSON AB, PHILLIPS DH, FLETCHER AL, MILLER JA. Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. **Cancer Res**, v. 43, p.1124–1134, 1983.

MONTIOLI, R.; VOLTATTORNI, C. B.; BERTOLDI, M. Parkinson's Disease: Recent Updates in the Identification of Human Dopa Decarboxylase Inhibitors. **Curr Drug Metab.** v. 17, n. 5, p. 513-8, 2016.

MULCAHY, P.; O'DOHERTY, A.; PAUCARD, A.; O'BRIEN, T.; KIRIK, D.; DOWD, E.; Development and characterisation of a novel rat model of Parkinson's disease induced by sequential intranigral administration of AAV-alpha-synuclein and the pesticide, rotenone. **NeurCien.**, v.203, p.170–179, 2012.

MURAI, M.; MIYOSHI, H. Current topics on inhibitors of respiratory complex I. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1857, n. 7, p. 884-91, 2016.

NAGATSUA, T.; SAWADAB, M. L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. **Parkinsonism Relat Disord.**, v.15, p.3-8, 2009.

NOBREGA, R. F. Estudo do Efeito Neuroprotetor do Eugenol em Modelo Experimental da Doença de Huntington. 2013. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

NORTE, M. C. B.; COSENTINO, R. M.; LAZARINI, C. A. Effects of methyl-eugenol administration on behavioral models related to depression and anxiety, in rats. **Phytomed.**, v. 12, p. 294–298, 2005.

NTP, National Toxicology Program. Technical Report 491 on toxicology and carcinogenesis studies of methyleugenol (CAS No. 93-15-12) in F344/N rats and

B6C3F1 mice (Gavage Studies). NIH Publication No. 98–3950. Research Triangle Park: US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 2000.

NUNES, E. M.; MÜLLER, T. E.; BRAGA, M. M.; FONTANA, B. D.; QUADROS, V. A.; MARINS, A.; RODRIGUES, C.; MENEZES, C.; ROSEMBERG, D. B.; LORO, V. L. Chronic Treatment with Paraquat Induces Brain Injury, Changes in Antioxidant Defenses System, and Modulates Behavioral Functions in Zebrafish. **Mol Neurobiol.**, May, 2016.

OJHA, S.; JAVED, H.; AZIMULLAH, S.; ABUL KHAIR, S.B.; HAQUE, M.E. Neuroprotective potential of ferulic acid in the rotenone model of Parkinson's disease. **Drug Des Devel Ther.**, v. 9, p.5499-510, 2015.

OLANOW, C.W.; STERN, M.B.; SETHI, K. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease. **Neurol.**, v.72, p. S1–S136, 2009.

OLESEN, J. *et al.* CDBE study group; European Brain Council. The economic cost of brain disorders in Europe. **Eur J Neurol.**, v. 19, n.1, p.155-62, 2012.

PARK, S. E. *et al.* Rutin from *Dendropanax morbifera* Leveille protects human dopaminergic cells against rotenone induced cell injury through inhibiting JNK and p38 MAPK signaling. **Neurchem Res.**, v. 39, p. 707–718, 2014.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. D. L. The Prevalence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. **Mov Disor.**, v. 00, 2014.

QUALLS, Z.; BROWN, D.; RAMLOCHANSINGH, C.; HURLEY, L.; L.; TIZABI. Y. Protective Effects of Curcumin Against Rotenone and Salsolinol Induced Toxicity: Implications for Parkinson's Disease. **Neurotox Res.**, v. 25, n. 1, p. 81–89, 2014.

RAMIREZ, B. L.; DEL-RIO, J. M.; PARDO, P. C. Acute and chronic metal exposure impairs locomotion activity in *Drosophila melanogaster*: a model to study Parkinsonism. **BioMet.**, v. 24, n. 6, p.1045-1057, 2011.

RAVANEL, P.; TISSUR, M.; DOUCE, R. Effects of Rotenoids on Isolated Plant Mitochondria. **Plant Physiol.**, 75, 414-420.1984.

RANA, A. Q.; AHMED, U. S.; CHAUDRY, Z. M.; VASAN, S. Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms. **Expert Rev Neurother.**, v.5, p.549-62, 2015.

RENDEIRO, C.; RHODES, J. S.; SPENCER, J. P. The mechanisms of action of flavonoids in the brain: Direct versus indirect effects. **Neurochem Int.**, v.89, p. 126-39, 2015.

ROBISON, S. H.; BARR, D.B. Use of biomonitoring data to evaluate methyl eugenol exposure. **Environ. Hea Perspect.**, v.114, p. 1797-1801, 2006.

ROJAS, J.C.; SIMOLA, N.; KERMATH, B.A.; KANE, J.R.; SCHALLERT, T.; GONZALEZ-LIMA, F. Striatal neuroprotection with methylene blue. **NeuScien.**, v.163, p. 877–889, 2009.

ROSHAN, M. H. K.; TAMBO, A.; NIKOLAI, P. PACE. Potential Role of Caffeine in the Treatment of Parkinson's Disease. **Open Neurol J.**, v. 10, p. 42–58, 2016.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E.; ANTONIO, L. C.; BAEZ, D. A.; CORICHI, I. M.; MARTÍNEZ, R. R.; CABRERA, D. M.; ARRIETA, J. Gastroprotective Activity of Methyleugenol from *Peperomia hispidula* on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. **Inter J Pharma.**, v.11, n. 7, p. 697-704, 2015.

SANDERS, L. H.; GREENAMYRE, J. T. Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. **Free Rad Bio Med.**, v.62, p.111-20, 2013.

SANTIAGO, R.M.; BARBIEIRO, J.; LIMA, M.M.; DOMBROWSKI, P.A.; ANDREATINI, R.; VITAL, M.A. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.**, v.16, n. 34, p. 1104-14, 2010.

SCHECTER, A.; LUCIER, G.W.; CUNNINGHAM, M. L.; ABDO, K. M.; BLUMENTHAL, G.; SILVER, A. G.; MELNICK, R.; PORTIER, C.; BARR, D. B; BARR, J. B.; STANFILL, S. B. Human Consumption of Methyleugenol and Its Elimination from Serum. **Envir Health Perspec.**, v.112, n. 6, May 2004.

SEATON, T. A., COOPER, J. M. & SCHAPIRA, A. H. Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. **Brain Res.**, v.777, p.110–118, 1997.

SEDELIS, M.; SCHWARTING, R.K.; HUSTON, J.P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res.**, v. 125, p. 109–122, 2001.

SEIDI, S. E.; POTASHKIN, J. A. The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease. **Front Neurol.**, Lausanne, v. 2, p. 68, 2011.

SELL, A. B.; CARLINI, E. A. Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives. **Pharma.**, v.14, p. 367– 377, 1976.

SHARMA, N.; JAMWAL, S.; KUMAR, P.; Beneficial effect of antidepressants against rotenone induced Parkinsonism like symptoms in rats. **Pathophys.**, v. 23, p. 2, 2016.

SHERER, T.B.; RICHARDSON, J.R.; TESTA, C.M.; SEO, B.B.; PANOV, A.V.; YAGI, T.; MATSUNOYAGI, A.; MILLER, G.W.; GREENAMYRE, J.T., Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. **J. Neurochem.**, v.100, p.1469–1479, 2007.

SHIN, J.K.; KIM, G.N.; JANG, H.D. Antioxidant and pro-oxidant effects of green tea extracts in oxygen radical absorbance capacity assay. **J Med Food.**, v. 10, n. 1, p. 32-40, 2007.

SHIN, M. S.; KIM, T.W.; LEE, J.M.; JI, E.S.; LIM, B.V. Treadmill exercise alleviates nigrostriatal dopaminergic loss of neurons and fibers in rotenone-induced Parkinson rats. **J Exerc Rehabil.**, v. 13, n. 1, p. 30-35, 2017.

SILVA, J. K.; SILVA, J. R.; NASCIMENTO, S. B.; MEIRELES, E. N.; ALVES, C. N.; RAMOS, A. R.; MAIA, J. G. Antifungal activity and computational study of constituents from *Piper divaricatum* essential oil against *Fusarium* infection in black pepper. **Molec.**, v. 4, n. 9, p. 17926-42, 2014a.

SILVA, J. L. et al. Avaliação da atividade neuroprotetora do Eugenol em modelo experimental da Doença de Parkinson. 2014. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014b.

SIPE, H. J.; LARDINOIS, O. M.; MASON, R. P. Free radical metabolism of methyleugenol and related compounds. **Chem Res Toxicol.**, v. 21, n. 27, p. 483-9, 2014.

SOLHEIM, E.; SCHELINE, R. R. Metabolism of alkenylbenzene derivatives in the rat. II. Eugenol and isoeugenol methyl ethers. **Xenobio.**, v.6, p.137–150, 1976.

SPENCER, J.P.; JENNER, A.; BUTLER, J.; ARUOMA, O. I.; DEXTER, D. T.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. Evaluation of the pro-oxidant and antioxidant actions of L-DOPA and dopamine in vitro: implications for Parkinson's disease. **Free Radic Res.**, v. 24, n. 2, p. 95-105, 1996.

SULZER, D. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.**, v.30, n.5, 244–250, 2007.

SULZER, D. and ZECCA. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. **Neurotox Res.**, v.1, n.3, p.181-95, 2000.

TAO, G.; IRIE, Y.; LIA, D.; KEUNGA, W. M. Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity. **Bioorg & Med Chem.**, v. 13, p. 4777–4788, 2005.

TAN, K. H.; NISHIDA, R. Methyl eugenol: Its occurrence, distribution, and role in nature, especially in relation to insect behavior and pollination. **J. Insect Sci.**, v.12, p.56, 2012.

TAYLOR, K.S.; COOK, J.A.; COUNSELL, C.E. Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.78, p.905–6, 2007.

TEEMA, A. M.; ZAITONE, S. A.; MOUSTAFA, Y.M.. Ibuprofen or piroxicam protects nigral neurons and delays the development of L-dopa induced dyskinesia in rats with

experimental Parkinsonism: Influence on angiogenesis. **Neuropharma.**, v. 107, p. 432-50, 2016.

THIRUCHELVAM, M.; RICHFIELD, E. K.; BAGGS, R. B.; TANK, A. W.; CORY-SLECHTA, D.A. The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease. **J Neurosci.**, 20:9207–9214. 2000.

TSANG, A.H.; CHUNG, K.K. Oxidative stress and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1792, p. 643-650, 2009.

VAN LAAR, T.; DE DEYN, P.P.; AARSLAND, D.; BARONE, P.; GALVIN, J.E. Effects of cholinesterase inhibitors in Parkinson's disease dementia: a review of clinical data. **CNS Neurosci Ther.**, 2010.

WHITTON, P. S. Inflammation as a causative factor in the etiology of Parkinson's disease. **British J Pharma.**, v.150, p.963-976, 2007.

WICHMANN, T.; DELONG, M. R. Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. **Adv. Neurol.**, v. 91, p. 9–18, 2003.

WIE, M.; WON, M.; LEE, K.; SHIN, J.; LEE, J.; SUH, H.; SONG, D.; KIM, Y. Eugenol protects neuronal cells from excitotoxic and oxidative injury in primary cortical cultures. **NeuroSci Lett.**, v. 225, p. 93–96, 1997.

WIRDEFELDT, K.; ADAMI, H.; COLE, P.; TRICHOPOULOS, D.; MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol.**, v. 26, S1–S58, 2011.

WOOTEN, G. F.; CURRIE, L. J.; BOVBJERG, V.E.; LEE, J.K.; PATRIE, J. Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? **J Neurol Neurosurg Psychiatry.**, v.75, p.637–9, 2009.

XIONG, N.; HUANG, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, Z.; XIONG, J.; LIU, X.; JIA, M.; WANG, F.; CHEN, C.; CAO, X.; LIANG, Z.; SUN, S.; LIN, Z.; WANG, T., Stereotaxical infusion of rotenone: a reliable rodent model for Parkinson's disease. **PLoS One.**, v.4, e7878, 2009.

XU, K.; BASTIA, E.; SCHWARZSCHILD, M. A. Therapeutic potential of adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease. **Pharmacol Ther.**, v.105, p.267-310, 2005.

YANO, S.; SUZUKI, Y.; YUZURIHARA, M.; KASE, Y.; TAKEDA, S.; WATANABE, S.; ABURADA, M.; MIYAMOTO, K. Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice. **Eur J Pharmacol.**, v. 553, p. 99 – 103, 2006.

ZELGER, K. R. D.; ZELGER, J. L.; CARLINI, E. A. New anticonvulsants derived from 4-allyl-2-methoxyphenol (Eugenol): comparison with common antiepileptics in mice. **Pharma.**, v.27, n. 1, p. 40-9, 1983.

ZHANG, Z.; ZHANG, J.; XIANG, J.; YU, Z.; ZHANG, W.; CAI, M.; LI, X.; WU, T.; LI, W.; CAI, D. Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. **Brain Res.**, v. 1655, p. 104–113, 2017.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351

fax: (55 81) 2126 8350
www.ccbi.ufpe.br

Recife, 20 de novembro de 2017.

Ofício nº 114/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Almir Gonçalves Wanderley**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo online nº 0001/2016

Certificamos que a proposta intitulada “**Efeito dual do metileugenol em modelo experimental de doença de Parkinson induzido por rotenona**”, registrada com o nº 0001/2016, sob a responsabilidade de **Prof. Almir Gonçalves Wanderley** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/11/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/09/2016 a 10/09/2018
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	48
Peso/Idade	300-350g/ 90-120 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Depto de Fisiologia e Farmacologia.

Atenciosamente

Pedro V. Carelli
Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1301584