



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

JALLES DANTAS DE LUCENA

**EFEITO NEUROPROTETOR DO (-)-LINALOL EM RATOS COM
HEMIPARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA**

FORTALEZA - CE
2019

JALLES DANTAS DE LUCENA

**EFEITO NEUROPROTETOR DO (-)-LINALOL EM RATOS COM
HEMIPARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Neurociência.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glauce Socorro de Barros Viana.

FORTALEZA - CE

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

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

L968e Lucena, Jalles Dantas de.
EFEITO NEUROPROTETOR DO (-)-LINALOL EM RATOS COM HEMIPARKINSONISMO
EXPERIMENTAL INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA / Jalles Dantas de Lucena. – 2019.
176 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2019.
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana.

1. Doença de Parkinson. 2. (-)-linalol. 3. Neuroinflamação. 4. Estresse oxidativo. 5. 6-
OHDA. I. Título.

CDD 611

JALLES DANTAS DE LUCENA

**EFEITO NEUROPROTETOR DO (-)-LINALOL EM RATOS COM
HEMIPARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Neurociência.

Aprovada em: 06/12/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco de Assis Aquino Gondim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Iana Bantim Felício Calou
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

Prof^a. Dr^a. Natália Bitu Pinto
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

À Deus, que me deu a vida e a quem tudo devo, por me guiar e proteger nessa jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, que em meio aos desafios esteve sempre ao meu lado me fortalecendo e renovando minhas forças, durante toda essa jornada.

Aos meus pais, Januário e Dilene, meus maiores mestres, não pelos ensinamentos técnicos e científicos, mas sim pelo exemplo de vida, de perseverança, de moral e humildade. Por não terem medido esforços para que eu e meu irmão pudéssemos estudar, pelo constante incentivo, por terem me apoiado em todas as decisões e por todo amor que me dedicaram.

A meu irmão James Dantas, pela amizade, pelo carinho e por sempre acreditar no meu potencial.

À minha esposa e amiga Sheila Lima, pelo constante incentivo, companheirismo e apoio, permanecendo sempre ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis. Pela dedicação, ajuda, compreensão, cumplicidade e paciência em todos os momentos.

À minha Orientadora, a professor Doutora Glauce Socorro de Barros Viana, pela muita compreensão e ensinamentos dispensados durante este trabalho. Muito Agradecido!

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais (PCMF), pelos ensinamentos e apoio. Em especial, o Amigo e Colega Anatomista Gilberto Cerqueira, pelo apoio e força durante essa jornada.

Aos colegas do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Roberta, Carlos, Arnaldo, Kelly Rose e Pedro. Agradeço pela colaboração nos experimentos, sugestões recebidas, pelos momentos de descontração e pela amizade que fica.

A todos os amigos com os quais convivi durante este tempo no Departamento de Morfologia, Fisiologia e Farmacologia, no Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), e que estão distribuídos pelos diversos laboratórios. Agradeço pelo espírito de colaboração e pela amizade.

À técnica de laboratório Vilani, pela contribuição no trabalho, atenção e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, Fisiologia e Farmacologia, e do NPDM, em especial à secretária do PCMF, Laísa, os veterinários, Gabriela e Wesley, Seu Moreira, Seu Adalto, pela atenção e disponibilidade de sempre.

A todos aqueles que, direto ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse estudo.

À CAPES/CNPq, pelo incentivo científico e apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio no doutorado.

A banca examinadora, pelo aceite do convite e colaboração. Muito Grato.

RESUMO

O (-)-linalol (LIN), um álcool monoterpeneo, é um componente de muitas plantas aromáticas brasileiras. Verificou-se que o LIN possui atividades biológicas, incluindo efeitos anticonvulsivantes, antidepressivos, anti-inflamatórios e antioxidantes no Sistema Nervoso Central (SNC). Considerando a importância da inflamação e do estresse oxidativo na doença de Parkinson (DP), o presente trabalho estudou, por meio de avaliação comportamental, neuroquímica e imunohistoquímica, o efeito neuroprotetor do LIN em ratos com hemiparkinsonismo experimental induzido por 6-hidroxidopamina (lesão unilateral estriatal com 6-OHDA). Ratos Wistar (250-280 g) foram divididos em cinco grupos: Falso-operado (FO), 6-OHDA não tratado e 6-OHDA tratados com LIN (25, 50 e 100 mg/kg, v.o.). A neurotoxina foi injetada no corpo estriado direito (CED) através de cirurgia estereotáxica e o tratamento com o LIN começou 24 h depois da cirurgia com duração de 17 dias. FO e o grupo 6-OHDA foram tratados com solução aquosa de Tween 80, durante o mesmo período. Decorridos 15 (quinze) dias após a cirurgia, todos os animais foram submetidos aos testes comportamentais; após os testes foram eutanasiados para dissecação das seguintes áreas cerebrais: CED e corpo estriado esquerdo (CEE), córtex pré-frontal (CPF) e hipocampo (HC), para as análises neuroquímicas e bioquímicas e ensaios de imunohistoquímica. Os resultados mostraram que o LIN (25, 50 e 100 mg/kg) reduziu o comportamento rotacional induzido pela apomorfina, e protegeu de déficits motores, cognitivos (memória de trabalho e de curta duração) e de discriminação olfatória nos animais hemiparkinsonianos. O LIN protegeu contra o comportamento tipo-depressivo, reduzindo o tempo de imobilidade no teste do nado forçado. Além disso, aumentou os níveis de DA e DOPAC, e reduziu os níveis estriatais dos aminoácidos glutamato e GABA; e aumentou os níveis de taurina, glicina (LIN 25 mg/kg) e tirosina (LIN 100 mg/kg). No estudo imunohistoquímico, o LIN (50 mg/kg) preveniu a morte de neurônios dopaminérgicos no corpo estriado lesionado, e aumentou a imunorreatividade para TH e DAT. Os dados indicam uma ação neuroprotetora do LIN devido a diminuição do estresse oxidativo, demonstrado pela redução dos níveis de lipoperoxidação e de nitrito nas áreas estudadas; e aumento das concentrações de GSH no HC (LIN 25 mg/kg) e CED (LIN 50 e 100 mg/kg). Assim como, à inibição de TNF- α , resultado este reforçado pelo efeito anti-COX-2, visto no CED nos animais hemiparkinsonianos, após tratamento com LIN (50 mg/kg). Em conclusão, mostramos que as alterações comportamentais e neuroquímicas em ratos hemiparkinsonianos foram prevenidas com o tratamento com o LIN, caracterizando um potencial efeito neuroprotetor da substância no modelo experimental de DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. (-)-linalol. Neuroinflamação. Estresse oxidativo. 6-OHDA.

ABSTRACT

(-)-Linalol (LIN), a monoterpene alcohol, is a component of many Brazilian aromatic plants. LIN has been found to have biological activities, including anticonvulsant, anti-depressant, anti-inflammatory and anti-oxidant effects in the Central Nervous System (CNS). Considering the importance of inflammation and oxidative stress in Parkinson's disease (PD), the present research studied, through behavioral, neurochemical and immunohistochemical evaluation, the neuroprotective effect of LIN in rats with experimental 6-hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism (unilateral striatal lesion with 6-OHDA). Male Wistar rats (250-280 g) were divided into 5 groups: sham-operated (SO), untreated 6-OHDA and 6-OHDA treated with LIN (25, 50 and 100 mg/kg, p.o.). The neurotoxin was injected into the right striatum through stereotactic surgery and the treatment with LIN began 24 h after surgery lasting 17 days. FO and the 6-OHDA group were treated with aqueous solution of Tween 80 during the same period. Fifteen days after surgery, all the animals were submitted to behavioral tests; after the tests were euthanized for dissection of the following brain areas: right (injured) striatum and left striatum, prefrontal cortex (PFC) and hippocampus (HC), to perform the neurochemical and biochemical analyzes, and immunohistochemical assays. The results showed that the LIN (25, 50 and 100 mg/kg) reduced the apomorphine-induced rotational behavior, and protected from deficits motor, cognitive (operational memory and short-term memory) and olfactory discrimination in hemiparkinsonian animals. LIN protected against depressive-like behavior by reducing immobility time in forced swim test. In addition, increase DA and DOPAC levels, and decreased striatal levels of the aminoacids glutamate and GABA; and increased taurine, glycine (LIN 25 mg/kg) and tyrosine (LIN 100 mg/kg) levels. In the immunohistochemical study, LIN (50 mg/kg) prevented the death of dopaminergic neurons in right (injured) striatum, increased immunoreactivity for TH and DAT. The data indicate a neuroprotective action of LIN due to decreased oxidative stress, demonstrated by reduction of lipoperoxidation and nitrite levels in the studied areas; and increased glutathione peroxidase concentrations in the HC (LIN 25 mg/kg) and right striatum (LIN 50 and 100 mg/kg). As well as TNF- α inhibition, this result is supported by anti-COX-2 effect on the CED in the hemiparkinsonian animals, after treatment with LIN (50 mg/kg). In conclusion, we have shown that behavioral and neurochemical changes in hemiparkinsonian rats were prevented with treatment with LIN, characterizing the neuroprotective potential of substance in the experimental model of PD.

Keywords: Parkinson's disease. (-)-linalol. Neuroinflammation. Oxidative stress. 6-OHDA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Possíveis fatores envolvidos no desenvolvimento e/ou progressão da DP.....	26
Figura 2 -	Desenho esquemático representativo da organização funcional dos núcleos da base no cérebro normal e na DP.....	38
Figura 3 -	Mecanismos de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA.....	46
Figura 4 -	Estruturas químicas do (-)-Linalol e (+)-Linalol, respectivamente.	48
Figura 5 -	Aparelho estereotáxico.....	55
Figura 6 -	Imagem da tela de monitoramento do comportamento no Ethowatcher®.....	60
Figura 7 -	Desenho esquemático de rato com perda parcial de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais após lesão unilateral induzida por 6-OHDA.....	61
Figura 8 -	Animal no Teste Rotacional Induzido por Apomorfina.....	62
Figura 9 -	Arena do Teste do Campo Aberto dividido em quatro quadrantes iguais.....	63
Figura 10 -	Animal durante o movimento de <i>rearing</i> no Teste do Cilindro.....	64
Figura 11 -	Animal durante o Teste do Labirinto em Y.....	66
Figura 12 -	Esquema da TRO para Memória de Curta e Longa Duração.....	68
Figura 13 -	Ilustração do Teste do Nado Forçado.....	69
Figura 14 -	Animal durante o Teste de Discriminação Olfatória.....	70
Figura 15 -	Efeito do (-)-linalol sobre o Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	80
Figura 16 -	Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora horizontal (<i>crossing</i>) avaliado no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	82
Figura 17 -	Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora vertical (<i>rearing</i>) avaliado no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	84
Figura 18 -	Efeito do (-)-linalol na assimetria no uso da pata ipsilateral anterior avaliado no Teste do Cilindro em ratos com lesão	87

	estriatal unilateral por 6-OHDA.....	
Figura 19 -	Efeito do (-)-linalol na assimetria no uso da pata contralateral anterior avaliado no Teste do Cilindro em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	88
Figura 20 -	Efeito do (-)-linalol no uso simultâneo de ambas as patas dos membros anteriores avaliado no Teste do Cilindro em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	89
Figura 21 -	Efeito do (-)-linalol na percentagem de alterações espontâneas corretas no Teste do Labirinto em Y em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	91
Figura 22 -	Efeito do (-)-linalol na memória de curta duração na TRO em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	93
Figura 23 -	Efeito do (-)-linalol na memória de longa duração na TRO em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	94
Figura 24 -	Efeito do (-)-linalol sobre o comportamento tipo-depressivo no Teste do Nado Forçado em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	96
Figura 25 -	Efeito do (-)-linalol sobre a função olfatória no Teste de Discriminação Olfatória em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	98
Figura 26 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de DA em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	101
Figura 27 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de DOPAC em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	102
Figura 28 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de HVA em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	103
Figura 29 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Glutamato em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA....	106
Figura 30 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Taurina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	107
Figura 31 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de GABA em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	108
Figura 32 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Glicina	109

	em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	
Figura 33 -	Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Tirosina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	110
Figura 34 -	Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) no córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.	112
Figura 35 -	Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) no hipocampo (HC) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	113
Figura 36 -	Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	114
Figura 37 -	Efeito do (-)-linalol nos níveis de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.	116
Figura 38 -	Efeito do (-)-linalol nos níveis de nitrito/nitrato no hipocampo (HC) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	117
Figura 39 -	Efeito do (-)-linalol nos níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	118
Figura 40 -	Efeito do (-)-linalol nos níveis de GSH no córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	120
Figura 41 -	Efeito do (-)-linalol nos níveis de GSH no hipocampo (HC) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	121
Figura 42 -	Efeito do (-)-linalol nos níveis de GSH no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	122
Figura 43 -	Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a imunomarcagem para a TH no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	123
Figura 44 -	Densidade ótica da imunomarcagem para TH no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	124
Figura 45 -	Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a imunomarcagem para DAT no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	125
Figura 46 -	Densidade ótica da imunomarcagem para DAT no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	126
Figura 47 -	Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a	127

	imunomarcção para TNF- α no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	
Figura 48 -	Densidade ótica da imunomarcção para TNF- α no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	128
Figura 49 -	Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a imunomarcção para COX-2 no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	129
Figura 50 -	Densidade ótica da imunomarcção para COX-2 no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	130
Figura 51 -	Modelo esquemático da ação farmacológica do (-)-linalol no modelo experimental de DP induzido por 6-OHDA.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Protocolo Experimental I mostrando a sequência cronológica dos testes comportamentais realizados.....	58
Tabela 2 -	Protocolo Experimental II mostrando a sequência cronológica dos testes comportamentais realizados.....	59
Tabela 3 -	Percentagem de toques com as patas dianteiras na parede do cilindro (5 min).....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais fármacos utilizados no tratamento da DP. Adaptado de Rinaldi (2011).....	44
Quadro 2 - Sítios das lesões unilaterais no CED com a 6-OHDA.....	56
Quadro 3 - Protocolo de tratamento experimental com (-)-linalol.....	57
Quadro 4 - Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica.....	77
Quadro 5 - Anticorpos secundários utilizados para imunohistoquímica.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
Ag/AgCl	Eletrodo de prata/cloreto de prata
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico
ANOVA	Análise de variância
AP	Anteroposterior
ATB	Ácido tiobarbitúrico
ATC	Ácido tricloroacético
ATP	Trifosfato de adenosina
AVD	Atividades da vida diária
BCL-2	Linfoma de células B 2, do inglês " <i>B-cell lymphoma 2</i> "
CE	Corpo estriado
CED	Corpo estriado direito
CEE	Corpo estriado esquerdo
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetro
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CPF	Córtex pré-frontal
D1	Receptor de dopamina do tipo 1
D2	Receptor de dopamina do tipo 2
DA	Dopamina
DAB	3,3'-Diaminobenzidina, do inglês " <i>3,3'-Diaminobenzidine</i> "
DAT	Transportador de dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês " <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> "

et al.	e outros
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas do oxigênio
E.U.A.	Estados Unidos da América
FO	Falso-operado
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GP	Globo pálido
GPI	Globo pálido interno
GPe	Globo pálido externo
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
HC	Hipocampo
Hd	<i>High Definition</i> , traduzido para o português “Alta Definição”
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês “ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ”
HVA	Ácido homovanílico
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-12	Interleucina 12
iNOS	Sintase Indutível do Óxido Nítrico, do inglês “ <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> ”
i.p.	Intraperitoneal
LCR	Líquido cefalorraquidiano
L-DOPA	Levodopa
LIN	(-)-linalol
LPS	Lipopolissacarídeo
$\mu\text{g/g}$	Micrograma por grama de tecido
$\mu\text{mol/g}$	Micromol por grama de tecido
MAO-B	Monoamina oxidase B
MDA	Malondialdeído
min	Minuto
ML	Mediolateral
MOMP	Permeabilização da membrana externa mitocondrial

MPP+	1-metil-4-fenilpirimidina
MPT	Permeabilidade mitocondrial transicional
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirimidina, do inglês “ <i>1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine</i> ”
NA	Noradrenalina
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NEED	Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina, do inglês “ <i>N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride</i> ”
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
ng/g	Nanograma por grama
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX2	NADPH oxidase
NST	Núcleo subtalâmico
OCF	Objeto com cheiro de fêmea
OCN	Objeto com cheiro neutro
PBS	Tampão fosfato salina, do inglês “ <i>Phosphate buffered saline</i> ”
PG	Prostaglandina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
pH	Potencial Hidrogeniônico
PTZ	Pentilenotetrazol
RCF	Força centrífuga relativa, do inglês “ <i>Relative Centrifugal Force</i> ”
SI	Superoinferior
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
SNpr	Substância negra <i>pars reticulada</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês “ <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i> ”

TH	Tirosina Hidroxilase
TNB	Ácido 2-nitro-5-tiobenzóico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa, do inglês <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
Tris HCl	Do inglês " <i>Tris(hydroxymethyl)Aminomethane Hydrochloride</i> "
TRO	Tarefa de Reconhecimento de Objetos
UCH-L1	Ubiquitina carboxil-terminal hidroxilase-L1
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
º	Indicador ordinal
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
% v/v	Porcentual volume/volume
Å	Ångström
Ca ²⁺	Cálcio
g	Gramas
h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HClO ₄	Ácido perclórico
K ⁺	Potássio
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mmol	Milimol
nm	Nanômetro
NO ₂	Nitrito
NO ₃	Nitrato
OH ⁻	Radical hidroxila
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Radical superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
x g	Força Centrífuga Relativa ou força G
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro

μmol	Micromol
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
1.1 Doença de Parkinson (DP).....	24
1.2 Epidemiologia da DP	24
1.3 Etiologia da DP	25
1.3.1 Alterações genéticas na DP	26
1.3.2 Exposição ambiental na DP	27
1.3.3 Estresse oxidativo na DP	28
1.3.4 Neuroinflamação na DP	30
1.3.5 Excitotoxicidade glutamatérgica na DP	33
1.3.6 Apoptose na DP	34
1.4 Fisiopatologia da DP	35
1.5 Manifestações clínicas da DP: sintomas motores e não motores	38
1.6 Terapia farmacológica da DP	42
1.7 Modelo animal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na DP	45
1.8 Plantas medicinais	47
1.9 O (-)-linalol	48
1.9.1 Ação farmacológica do (-)-linalol	49
2 OBJETIVOS.....	52
2.1 Objetivo Geral	52
2.2 Objetivos Específicos	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Animais	53
3.2 Drogas e reagentes utilizadas na pesquisa	53
3.3 Procedimento anestésico para realização da cirurgia estereotáxica	54
3.4 Cirurgia estereotáxica para indução de hemiparkinsonismo experimental (UNGERSTEDT, 1968)	54
3.5 Protocolo de tratamento experimental com (-)-linalol	56
3.6 Testes Comportamentais	57
3.6.1 Avaliação do Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970).....	60
3.6.2 Teste do Campo Aberto (<i>Open Field Test</i>) (Adaptado de BROADHURST, 1960).....	62

3.6.3 Teste do Cilindro (<i>Limb-use Asymmetry Test</i>) (Adaptado de SCHALLERT et al., 2000).....	64
3.6.4 Testes de Avaliação da Memória	65
3.6.4.1 Teste do Labirinto em Y (<i>Y-maze Test</i>) (SARTER et al., 1988).....	65
3.6.4.2 Tarefa de Reconhecimento de Objetos - TRO (Adaptado de ENNACEUR; DELACOUR, 1988).....	66
3.6.5 Teste do Nado Forçado (<i>Forced Swim Test</i>).....	68
3.6.6 Teste de Discriminação Olfatória (Adaptado de TILLERSON et al., 2006)	69
3.7 Dissecção das áreas encefálicas para testes neuroquímicos e imunohistoquímicos	70
3.8 Determinação da concentração de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA) por HPLC (LNF / UFC)	71
3.9 Determinação da concentração de aminoácidos por HPLC (LNF / UFC)	72
3.10 Avaliação do Estresse Oxidativo	73
3.10.1 Determinação da peroxidação lipídica pela mensuração de Malondialdeído - MDA (DRAPER; HADELY, 1990).....	73
3.10.2 Dosagem de Nitrito/Nitrato (GREEN et al., 1982).....	74
3.10.3 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968)	75
3.11 Análise Imunohistoquímica.....	76
3.11.1 Análise imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase - TH (LNF / UFC).....	76
3.11.2 Análise imunohistoquímica para Transportador de Dopamina - DAT (LNF / UFC)	77
3.11.3 Análise imunohistoquímica para TNF- α e COX-2 (LNF / UFC).....	77
3.12 Cálculo da densidade ótica	78
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
5 RESULTADOS.....	79
5.1 Efeito do (-)-linalol no Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	79
5.2 Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora no Teste do Campo Aberto	81
5.2.1 Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora espontânea no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	81
5.2.2 Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora vertical (<i>rearing</i>) no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	83

5.3 Efeito do (-)-linalol na assimetria dos membros anteriores no Teste do Cilindro em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	85
5.4 Efeito do (-)-linalol sobre a memória operacional no Teste do Labirinto em Y (<i>Y-maze Test</i>) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	90
5.5 Efeito do (-)-linalol sobre a memória de curta e longa duração na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	92
5.6 Efeito do (-)-linalol sobre o comportamento tipo-depressivo no Teste do Nado Forçado (<i>Forced Swim Test</i>) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA ...	95
5.7 Efeito do (-)-linalol sobre prejuízos no Teste de Discriminação Olfatória em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	97
5.8 Determinação da concentração de monoaminas e aminoácidos por HPLC	99
5.8.1 Efeito do (-)-linalol nas concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos DOPAC e HVA no corpo estriado de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	99
5.8.2 Efeito do (-)-linalol nas concentrações de aminoácidos no corpo estriado de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	104
5.9 Avaliação do Estresse Oxidativo	111
5.9.1 Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) em tecidos cerebrais de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	111
5.9.2 Efeito do (-)-linalol nos níveis de Nitrito/Nitrato em tecidos cerebrais de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	115
5.9.3 Efeito do (-)-linalol nos níveis de Glutationa Reduzida (GSH) em tecidos cerebrais de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	119
5.10 Análise imunohistoquímica do efeito do (-)-linalol no modelo de DP	123
5.10.1 Efeito do (-)-linalol sobre a imunorreatividade para a Tirosina Hidroxilase (TH) no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA	123
5.10.2 Efeito do (-)-linalol sobre a imunorreatividade para o Transportador de Dopamina (DAT) no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	125
5.11 Análise imunohistoquímica para TNF- α e COX-2.....	127
5.11.1 Efeito do (-)-linalol sobre os níveis de TNF- α no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	127

5.11.2 Efeito do (-)-linalol sobre os níveis de COX-2 no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA.....	129
6 DISCUSSÃO.....	131
7 CONCLUSÃO.....	144
REFERÊNCIAS.....	145
ANEXO I – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	176

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson (DP)

A doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, em sua monografia intitulada “*An Essay on the Shaking Palsy*”, foi intitulada inicialmente de “Paralisia Agitante”. Sendo caracterizada pela presença de movimentos tremulantes, com diminuição da força muscular, tendência para a inclinação do tronco para frente e alteração da marcha (festinação), tendo os sentidos e o intelecto não afetados (PARKINSON, 1817; GOEDERT et al., 2013).

Já no final do século XIX, o neurologista francês Jean-Martin Charcot, definiu a presença dos quatro sinais cardinais da doença, quais sejam tremor de repouso, bradicinesia, rigidez muscular, contestando James Parkinson que citava a presença de uma fraqueza muscular no quadro da doença, e instabilidade postural. Além disso, Charcot apresentou os critérios para o diagnóstico diferencial e sugeriu o primeiro tratamento para a doença (CHARCOT, 1880; GOETZ, 1987; PEARCE, 1992; GOETZ et al., 1995). Charcot discordou da descrição original de Parkinson, quanto a preservação das funções corticais superiores na DP, considerando a presença de perda de memória e enfim, uma disfunção cognitiva, fatos estes hoje bastante conhecidos (CHARCOT, 1880; MOSLEY et al., 2010). Ele também sugeriu a mudança de nome da enfermidade, de Paralisia Agitante, para doença de Parkinson (“*la maladie de Parkinson*”), em homenagem à descrição clássica de James Parkinson (TEIVE et al., 1998).

1.2 Epidemiologia da DP

A DP é apontada pelos estudos epidemiológicos como o distúrbio do movimento mais comum (BERG et al., 2014; MARCON et al., 2019). Atinge em torno de 1-2% da população na faixa etária de 65 anos (SCHRAG, 2018), acometendo, preferencialmente, indivíduos com idade superior aos 50 anos. Estima-se que em 2005 o número de casos de DP no mundo era de 4,1 a 4,6 milhões, e projeta-se que em 2030 esse número seja o dobro, entre 8,7 a 9,3 milhões (DORSEY et al., 2007; MARTINEZ-RAMIREZ et al., 2019).

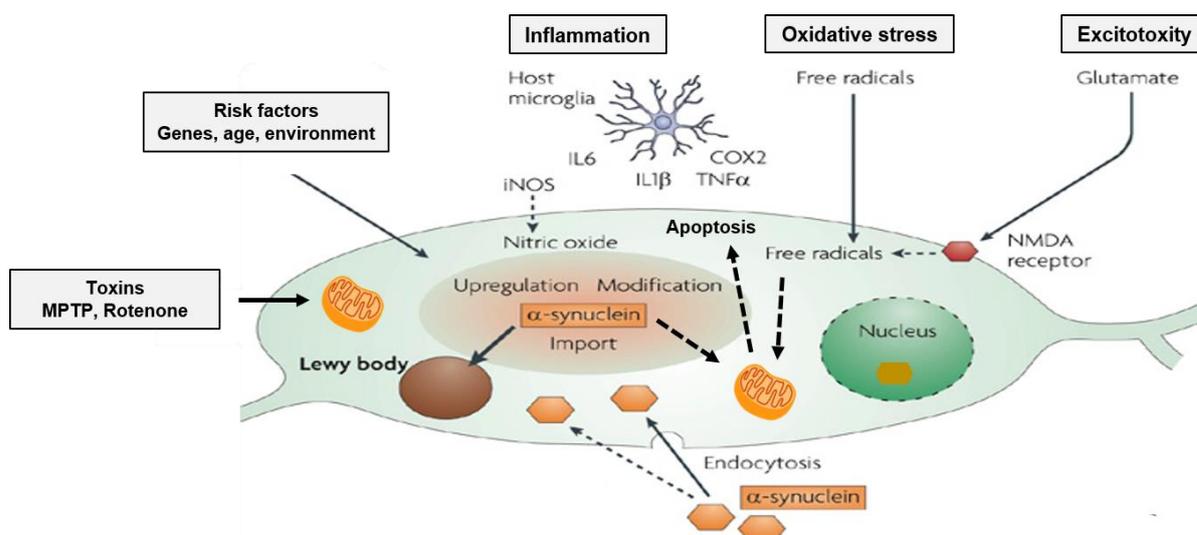
No Brasil, a notificação da DP não é compulsória, o que resulta na subnotificação de sua prevalência no país (BOVOLENTA; FELICIO, 2016). Na população acima dos 60 anos, a prevalência da DP é de 3300/100 mil idosos (BOVOLENTA; FELICIO, 2016). Estima-se que são 220 mil pacientes, e alguns estudos internacionais sugerem que este número mais que dobrará até 2030 (DORSEY et al., 2007; MARTINEZ-RAMIREZ et al., 2019).

Trata-se da segunda doença neurodegenerativa mais comum na população idosa, estando apenas atrás da doença de Alzheimer (MARTINEZ-RAMIREZ et al., 2019). Mas ainda não se conhece completamente a sua etiologia (NASROLAHI et al., 2019), nem se dispõem de tratamentos efetivos para tratar os sintomas e prevenir a progressão da DP (LIM et al., 2019).

1.3 Etiologia da DP

Acredita-se que o processo de envelhecimento é o fator causal mais predominante, já que são poucos os casos de DP em pessoas com menos de 40 anos (MARCON et al., 2019). A doença também é mais prevalente em homens (MARCON et al., 2019) devido a um possível papel protetor do estrogênio nas mulheres (PETROVSKA et al., 2012; CERSOSIMO; BENARROCH, 2015). Estima-se que aproximadamente 90% dos casos de DP sejam idiopáticos (MOISAN et al., 2015), enquanto os outros 10% dos casos são formas familiares da doença (MAELE-FABRY et al., 2012). Apesar disso, a comunidade científica acredita que a maioria dos casos resultem de uma complexa interação entre alterações genéticas (LUBBE; MORRIS, 2014; CHANG et al., 2017) e fatores de riscos ambientais (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; GHOSH et al., 2016; SONG et al., 2019), somados ao envelhecimento (MARCON et al., 2019). Outros fatores causais associados à etiologia da DP incluem: estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, neuroinflamação, excitotoxicidade glutamatérgica, mecanismos pró-apoptóticos e formação de agregados protéicos (Figura 1) (GUPTA et al., 2008; LEES et al., 2009; PRZEDBORSKI, 2010; FAROOQUI; FAROOQUI, 2011; SCHAPIRA; JENNER, 2011; MARTINEZ; GREENAMYRE, 2012; ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; SARKAR et al., 2017; LUO et al., 2019).

Figura 1 - Possíveis fatores envolvidos no desenvolvimento e/ou progressão da DP.



Fonte: Adaptado de Brundin et al. (2008).

1.3.1 Alterações genéticas na DP

Em 1997, foi confirmada a primeira evidência genética ligada à DP através da identificação de uma mutação no gene SNCA, que codifica a proteína α -sinucleína, gerando formas mutantes desta proteína, acelerando a formação de agregados de α -sinucleína e formação de corpos de Lewy (SPILLANTINI et al., 1997; POLYMERPOULOS et al., 1997). Acredita-se que a superexpressão da α -sinucleína no sistema nigroestriatal de ratos estimula a geração excessiva de espécies reativas do oxigênio (EROs) (JUNN; MOURADIAN, 2002), aumenta a sensibilidade dos neurônios dopaminérgicos ao dano oxidativo (ORTH et al., 2004) e induz a disfunção mitocondrial (SUTACHAN et al., 2012). Respondendo por uma perda de 30-80% de neurônios dopaminérgicos nigrais e uma redução de 40-50% dos níveis de DA estriatal (KIRIK et al., 2002), comprovando o papel desta proteína na patogênese da DP (DEVINE et al., 2011; TAN et al., 2019).

Além da proteína α -sinucleína, alterações genéticas que afetam genes que codificam outras proteínas também estão envolvidas no desenvolvimento da forma familiar da DP, incluindo a parkina (ARKINSON; WALDEN, 2018), a DJ-1 (CHOI et al., 2006; ZHAO et al., 2019) e a ubiquitina carboxil-terminal hidroxilase-L1 (UCH-L1) (CHUNG et al., 2001). Mutações no gene PARK2 causam deficiência na proteína parkina, com perda da capacidade de ubiquinização, e degeneração nigroestriatal

predominante sem corpos de Lewy (CALNE, 2005). Enquanto mutações no gene PARK7, que codifica a proteína DJ-1, está associada ao início precoce das formas familiares de DP (ZHAO et al., 2019), com pacientes apresentando precocemente sinais de discinesia, rigidez muscular e tremores, seguido de sintomas psiquiátricos, como distúrbios psicóticos, ansiedade e declínio cognitivo (ABOU-SLEIMAN et al., 2003; REPICI; GIORGINI, 2019). A mutação da proteína UCH-L1 e a perda da atividade catalítica dessa enzima, envolvida no sistema de degradação ubiquitina-proteossoma, está associada à neurodegeneração, como na DP e doença de Alzheimer (WANG et al., 2017).

1.3.2 Exposição ambiental na DP

Estudos epidemiológicos associam o desenvolvimento da DP à fatores de riscos ambientais, como residência rural, trabalho na agricultura e exposição à metais pesados e pesticidas (DI MONTE et al., 2002; MAELE-FABRY et al., 2012; FLEMING, 2017; SONG et al., 2019).

Estudos sobre a relação entre pesticidas e DP foram desenvolvidos depois da descrição de parkinsonismo em usuários de drogas expostos ao 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirimidina (MPTP), que demonstrou causar degeneração de neurônios dopaminérgicos em animais (BOVÉ et al., 2005), bem como pela semelhança entre a estrutura química do MPP⁺ (1-metil-4-fenilpirimidina, o tóxico metabólito do MPTP) e do herbicida bupiridil (por exemplo, paraquat) (ELBAZ et al., 2009). As classes de pesticidas potencialmente associadas à degeneração nigroestriatal não foram determinadas na maioria dos estudos epidemiológicos, entretanto, alguns estudos demonstraram que os pesticidas organoclorados são neurotóxicos e podem danificar o sistema dopaminérgico através da geração de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e aumento da agregação proteica de α -sinucleína, todos associados à DP (ASCHERIO et al., 2006; HATCHER et al., 2007; CHILLAR et al., 2013).

A interação entre metais e proteínas do sistema nervoso é considerada um dos principais fatores para a neurodegeneração (LEAL et al., 2012; AJSUVAKOVA et al., 2019). A homeostase alterada de alguns elementos metálicos pode estar relacionada à progressão da DP (ZHAO et al., 2013). O cobre, o ferro, o manganês e o zinco, são oligoelementos responsáveis pela função de muitas enzimas e

proteínas celulares; contudo, esses mesmos elementos tornam-se tóxicos quando ocorre uma acumulação excessiva a nível intracelular, proporcionando desordens neurodegenerativas como a DP (KOZLOWSKI et al., 2009). Estudos recentes demonstraram efeito neurotóxico do cobre, ferro e manganês e seus mecanismos relacionados a patogênese da DP (DUSEK et al., 2015; LAN et al., 2016), enquanto o zinco demonstrou efeito neurotóxico quanto neuroprotetor, dependendo da dose e do desenvolvimento da doença (YANG et al., 2017; AJSUVAKOVA et al., 2019).

Vários estudos avaliaram os níveis de ferro e cobre na DP. Dusek e colaboradores (2015), encontraram um aumento significativo nos depósitos de ferro na substância negra *pars compacta* (SNpc) e nos níveis séricos de cobre na DP, e associaram à redução do conteúdo de ceruloplasmina e à atividade da ferritina. A ferritina é uma proteína chave no metabolismo do ferro no organismo, sendo capaz de manter o ferro em um estado não reativo. Assim, o acúmulo do ferro associado à redução da ferritina podem mediar processos tóxicos na DP. Kozlowski et al. (2012) também demonstraram um aumento significativo dos níveis de cobre e zinco no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com DP.

O papel patogênico do manganês no desenvolvimento da DP concomitante com alterações no sistema dopaminérgico está bem estabelecido, juntamente com excitotoxicidade, neuroinflamação e alterações na transmissão sináptica (MARTINEZ-FINLEY et al., 2013; BOUABID et al., 2016; PERES et al., 2016). Vários estudos relataram que o manganês aumentou o risco de DP, e indicaram uma associação significativa entre DP e um aumento dos níveis circulantes desse metal (AHMED; SANTOSH, 2010; FUKUSHIMA et al., 2010; HOZUMI et al., 2011; VERMA et al., 2016; DU et al., 2018).

1.3.3 Estresse oxidativo na DP

Os radicais livres são moléculas altamente reativas produzidas durante o metabolismo celular (VALKO et al., 2007). Estas moléculas são formadas a partir da transferência de elétrons podendo reagir e formar EROs. O estresse oxidativo se dá quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e os mecanismos antioxidantes (BLESA et al., 2015), e é causa de dano neuronal observado em várias doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a DP (CARLESI et al., 2011; FAROOQUI; FAROOQUI, 2011; SUTACHAN et al., 2012; MARTINEZ;

GREENAMYRE, 2012; SARKAR et al., 2017). A citotoxicidade das EROs pode causar danos a biomoléculas, especialmente lipídios, ácidos nucléicos e proteínas. Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula e levando-a a morte por apoptose ou necrose (BARNHAM et al., 2004; ZHOU et al., 2008; BLESA et al., 2015).

Existem várias fontes de EROs na DP, desde as altas concentrações de ferro na SNpc (DUSEK et al., 2015), até o próprio sistema dopaminérgico nigroestriatal (SEGURA-AGUILAR et al., 2014), uma vez que a dopamina (DA), a despeito de imprescindível para o funcionamento normal dos gânglios da base, pode ser degradada tanto pela enzima monoamina oxidase A (MAO-A) quanto por auto-oxidação, gerando EROs citotóxicas (ZUCCA et al., 2014). O metabolismo da DA pela MAO-A leva à formação do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sob consumo de O_2 e H_2O (GESI et al., 2001). A auto-oxidação intracelular da DA produz H_2O_2 e DA-quinona (SULZER; ZECCA, 2000; CHINTA; ANDERSEN, 2008), a qual pode modificar várias proteínas relacionadas à DP, como α -sinucleína, parkina, DJ-1, UCH-L1 e a glutatona reduzida (GSH), principal antioxidante (GIROTTO et al., 2012; DA SILVA et al., 2013; HAUSER et al., 2013; TOYAMA et al., 2014; ZHOU et al., 2014). Além disso, a DA-quinona causa inativação do transportador de dopamina (DAT) nos sinaptossomas e da enzima tirosina hidroxilase (TH) (KUHN et al., 1999; WHITEHEAD et al., 2001), assim como disfunção mitocondrial (LEE et al., 2003), alterações das mitocôndrias cerebrais (GLUCK; ZEEVALK, 2004) e disfunção na atividade do complexo I (JANA et al., 2011).

A mitocôndria também contribui para a produção de EROs. A grande maioria do consumo de O_2 pela célula ocorre nas mitocôndrias através da cadeia de transporte de elétrons. Em situação normal, pequenas quantidades de O_2 molecular nas mitocôndrias, podem levar à geração de EROs, como os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) (CHINTA; ANDERSEN, 2008). Graças a ação de mecanismos antioxidantes nas mitocôndrias, os níveis basais de EROs da respiração mitocondrial são mínimos (ZHOU et al., 2008). No entanto, em caso de um dano respiratório mitocondrial, como observado na DP, prever-se uma grande produção de EROs na mitocôndria, sobrecarregando assim os seus mecanismos antioxidantes (ZHOU et al., 2008).

A disfunção do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial é considerada uma das principais fontes de EROs nos neurônios dopaminérgicos na DP (REALE et al., 2012; BLESÁ et al., 2015). A disfunção do complexo I é responsável por aumentar a produção de superóxido (O_2^-), que é reduzido para produzir H_2O_2 , que na presença íons metálicos, principalmente o ferro, forma radicais hidroxila (OH^-), espécies altamente reativas (CHINTA; ANDERSEN, 2008). Além disso, o superóxido (O_2^-) pode reagir com o óxido nítrico (NO), um radical livre de vida curta, para gerar peroxinitrito ($ONOO^-$), um poderoso oxidante de proteínas (CHINTA; ANDERSEN, 2011). Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* da doença foram desenvolvidos com a utilização de inibidores do complexo I como o MPTP, a rotenona e a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), que provocam uma diminuição de até 40% da atividade do complexo mitocondrial I (BETARBET et al., 2002). A disfunção mitocondrial e do complexo I da cadeia respiratória, traz como consequência a redução da produção de trifosfato de adenosina (ATP) e disfunção do processo respiratório mitocondrial, com um aumento do estresse oxidativo e dos produtos secundários da lipoperoxidação, como o malondialdeído (MDA), dos produtos metabólicos do NO (nitratos/nitritos) e a ativação da ciclooxygenase 2 (COX-2), envolvida no processo inflamatório (ORTIZ et al., 2017).

O NO é uma molécula de sinalização gasosa, altamente permeável às membranas biológicas, constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. No sistema nervoso central (SNC), atua como um neurotransmissor retrógrado, tendo sido implicado em várias condições fisiológicas e patológicas, incluindo a morte celular (LIU et al., 2019). Quando da sua reação com o superóxido (O_2^-), é formado o peroxinitrito ($ONOO^-$), importante para a nitração e oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial, levando a apoptose e necrose celular (RADI, 2018). Importantes evidências têm demonstrado o envolvimento do NO na degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (DUNCAN; HEALES, 2005; ZHANG et al., 2006).

1.3.4 Neuroinflamação na DP

Além do estresse oxidativo e consequente disfunção mitocondrial, estudos evidenciam que a neuroinflamação também constitui um mecanismo importante na DP (HIRSCH et al., 2012; CEBRIAN et al., 2015; WANG et al., 2015). A resposta

inflamatória intensa, infiltração de células T e ativação de células gliais, são características comuns em pacientes com DP e modelos animais da doença, e desempenham papéis vitais na degeneração de neurônios dopaminérgicos (HIRSCH et al., 2012; WANG et al., 2015).

Em 1988, McGeer e colaboradores mostraram pela primeira vez neuroinflamação na forma de ativação microglial no contexto da DP (MCGEER et al., 1988), sugerindo que o sistema imunológico desempenha um papel importante na patogênese e progressão da DP (BENKLER et al., 2012; KANNARKAT et al., 2013). No cérebro de pacientes com DP, as densidades das células T CD4+ e CD8+ na proximidade dos neurônios dopaminérgicos são altas quando comparadas às de indivíduos saudáveis (HIRSCH; HUNOT, 2009). Essa seletividade anatômica sugere que a infiltração linfocítica é uma resposta ao dano neuronal na DP (MEHTA; TANNER, 2016).

As células da glia correspondem a um completo e eficiente sistema imunológico inato (HAWEL et al., 2005), representado principalmente pelas células microgliais e astrócitos (PERRY, 2012). Micróglia são células imunes do SNC e desempenham papéis importantes nas infecções e inflamações cerebrais (KAUR et al., 2017). Quando ativadas, as células microgliais têm a capacidade de alterar sua morfologia, além de produzir produtos secretores que contribuem para a defesa de danos ao SNC (PERRY, 2012; KAUR et al., 2017). No entanto, a superativação da micróglia resulta em uma produção contínua e excessiva de mediadores pró-inflamatórios que são tóxicos para os neurônios e, portanto, tem sido associada à neurodegeneração na DP (MOSLEY et al., 2006; MCGEER; MCGEER, 2008; LULL; BLOCK, 2010; KAUR et al., 2017).

A ativação microglial leva a produção de mediadores pró-inflamatórios incluindo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , do inglês *Tumor necrosis factor-alpha*), algumas interleucinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12), enzimas como as ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e a óxido nítrico sintase indutiva (iNOS), e outras moléculas citotóxicas que agravam o dano inflamatório na DP (DUFEEK et al., 2015; LESZEK et al., 2016; MEHTA; TANNER, 2016; KAUR et al., 2017). Estudos *post-mortem* encontraram níveis elevados desses mediadores no parênquima cerebral ou no fluido cerebrospinal de pacientes com DP (REALE et al., 2009; HIRSCH; HUNOT, 2009; WANG et al., 2015).

Astrócitos são as células da glia mais abundantes, sendo diretamente responsáveis pela sustentação e isolamento do neurônio e, portanto, fundamentais para a sua sobrevivência (McGEER; McGEER, 2008). Assim como a micróglia, a ativação dos astrócitos produz citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1 β , embora com menor participação que as células da micróglia (VILA et al., 2001). Os astrócitos são ativados por várias moléculas, incluindo mediadores pró-inflamatórios liberados pela micróglia ativada, e esses são aumentados ainda mais pelos astrócitos (WANG et al., 2015). Estudos demonstraram que os astrócitos estão envolvidos de maneira importante no processo neuroinflamatório na DP (KAUR et al., 2017).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, células linfóides e neurônios (KOUCHAKI et al., 2018), se ligam a seus receptores, o receptor TNF-1 (TNFR-1) e o receptor TNF-2 (TNFR-2) (GLINKA; PRUD'HOMME, 2008) e ativa o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), na via de sinalização envolvida com a inflamação (GETNET et al., 2010).

A elevação de TNF- α é evidente em uma série de doenças neurodegenerativas, incluindo DP (BRODACKI et al., 2008; SCALZO et al., 2009; CHENG et al., 2010; 2014; KIM et al., 2017). O TNF- α desempenha um importante papel como mediador e modulador da resposta inflamatória (KOUCHAKI et al., 2018). Estudos indicam que o TNF- α é altamente tóxico para neurônios dopaminérgicos tanto *in vitro* (SRIRAM et al., 2006) como *in vivo* (DE LELLA EZCURRA et al., 2010; CHERTOFF et al., 2011). De acordo com McCoy e Tansey (2008) a combinação de dados histopatológicos, epidemiológicos e estudos farmacológicos sugerem um papel importante para o TNF- α na degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatal, contribuindo diretamente para os sintomas da DP.

A expressão da isoforma da enzima COX-2 também se apresenta aumentada na SNpc tanto de pacientes com DP quanto em modelos animais usando 6-OHDA e MPTP (TEISMANN, 2012) e lipopolissacarídeo (LPS) (DUTTA et al., 2008), indicando o seu envolvimento no desenvolvimento da DP (TEISMANN, 2012).

A ciclooxigenase (COX) é a principal enzima responsável pela formação de prostaglandinas (PGs), a denominar PGE2, PGF2, PGD2, PGI2, envolvidas na inflamação (KAUR et al., 2017). COX existe em duas isoformas, COX-1 (constitutiva) e COX-2 (induzível), codificadas por genes diferentes. Ambas as isoformas de COX

estão presentes no neocórtex, corpo estriado (CE), tálamo, hipotálamo e no hipocampo (HC) (BARTELS; LEENDERS, 2010). O papel de COX-2 tem sido relacionado como mediador de processos inflamatórios pela regulação de PGs pró-inflamatórios em vários modelos de neuroinflamação (AÏD; BOSETTI, 2011).

Bartels e Leenders (2010), demonstraram que o aumento da expressão de COX-2 microglial em pacientes com DP pode estimular a ativação da micróglia e aumentar a resposta inflamatória. Usando camundongos deficientes em COX-2, estudo mostrou que os animais apresentaram proteção significativa contra a neurodegeneração induzida por MPTP, confirmando a participação de COX-2 na resposta inflamatória (TEISMANN et al., 2003).

1.3.5 Excitotoxicidade glutamatérgica na DP

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC, onde atua sobre os receptores ionotrópicos (N-metil-D-aspartato - NMDA) e o ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) ou metabotrópicos (mGlu1-mGlu8) (KEW; KEMP, 2005; REINER; LEVITZ, 2018; MALIK; WILLNOW, 2019). Embora o glutamato tenha um papel central na neurotransmissão excitatória, alterações na homeostase do glutamato podem ter repercussões significativas nos neurônios através da geração de cascatas neurotóxicas ou excitotóxicas (MOUSSAWI et al., 2011).

Essas cascatas são iniciadas principalmente após a ativação dos receptores NMDA, AMPA e canais de cálcio dependentes de voltagem, resultando em um influxo maciço de cálcio (Ca^{2+}) extracelular. Além disso, as reservas intracelulares de Ca^{2+} são liberadas do retículo endoplasmático. Acredita-se que a excitotoxicidade possa danificar os neurônios diretamente através da superestimulação dos receptores NMDA, como resultado do aumento da liberação de glutamato extracelular ou da redução na sua remoção da fenda sináptica, propagando o influxo de Ca^{2+} (CAUDLE; ZHANG, 2009).

O glutamato também é o neurotransmissor excitatório predominante nos núcleos da base, que é a sede dos déficits motores na DP (GREENAMYRE; PORTER, 1994). Evidências demonstram que a projeção dopaminérgica da SNpc para alguns núcleos da base exerce uma importante função reguladora no padrão de disparo de algumas vias glutamatérgicas. A depleção de DA, como observado na

DP, causa redução de sinalização dopaminérgica para o CE, resultando em uma superativação do núcleo subtalâmico (NST), causando um aumento na liberação de glutamato na SNpc (KINCSES; VECSEI, 2011). Acredita-se que o aumento nos disparos dos neurônios do NST na DP, funciona como um mecanismo compensatório destinado a elevar a liberação de DA dos neurônios dopaminérgicos sobreviventes na SNpc, a fim de manter a homeostase da DA (KINCSES; VECSEI, 2011). No entanto, o aumento nas concentrações de glutamato liberado na SNpc pode provocar excitotoxicidade e potencializar a neurodegeneração (CAUDLE; ZHANG, 2009; MOUSSAWI et al., 2011).

O excesso de glutamato na SNpc pode prolongar a abertura dos receptores neuronais de NMDA, resultando em entrada excessiva de Ca^{2+} , levando ao dano neuronal (HOEKSTRA et al., 2015). Esse fenômeno de excitotoxicidade tem sido implicado na DP e nos modelos animais da DP (VERNON et al., 2005; MEREDITH et al., 2009; VILLALBA et al., 2015), bem como em outras doenças neurodegenerativas (HYND et al., 2004; CASSANO et al., 2012).

1.3.6 Apoptose na DP

A apoptose tem sido vista como um mecanismo importante de morte celular associado à neurodegeneração na DP (BATTISTI et al., 2008; CALOPA et al., 2010). A apoptose é uma cascata clássica que leva à morte celular caracterizada pelo aumento do potencial da membrana mitocondrial, levando à liberação do citocromo c, resultando na ativação das caspases 9 e 3. Essa cascata facilita as alterações morfológicas que definem a apoptose, como encolhimento celular, fragmentação da membrana nuclear e condensação da cromatina (LEV et al., 2003; CAUDLE; ZHANG, 2009). Foram descobertos mais de 14 tipos de caspases no tecido nervoso de mamíferos, elas podem agir como iniciadoras, executoras de apoptose ou como mediadores inflamatórios, dependendo do tipo de caspase (WALDMEIER; TATTON, 2004).

As proteínas intracelulares que regulam diretamente o processo de ativação das caspases constituem a família BCL-2 (linfoma de células B 2, do inglês "*B-cell lymphoma 2*"). Os membros dessa família podem ser divididos em moléculas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BCL-x_s, BAD, BID, BIK, HRK, BIM e BOK) e antiapoptóticas (BCL-2, BCL-x_L, BCL-w, BFL-1, BRSAG-1, MCL-1, A1, E1B19K, LMW5-HL e EBV

BHRF1). O equilíbrio entre as diferentes proteínas, refletindo a formação de homodímeros e heterodímeros (neutralização), define a via de atuação sobre o mecanismo de morte celular programada (CZABOTAR et al., 2014).

Na apoptose, existem duas vias que relacionam a contribuição mitocondrial com a morte celular. A primeira via envolve a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) e consequente liberação do citocromo c; isso ocorre quando são ativadas as proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 (Bax e/ou Bak) (GREEN, 2005; CZABOTAR et al., 2014). A segunda via de morte celular é iniciada por condições que levam a permeabilidade mitocondrial transicional (MPT), definido como um aumento não específico da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (HALESTRAP et al., 2002), levando ao inchaço e ruptura da membrana externa (GREEN, 2005; CZABOTAR et al., 2014).

Todos esses mecanismos contribuem para o desenvolvimento da doença, participando na progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, causando uma intensa redução dos níveis de DA no estriado, bem como em outros núcleos da base (LEV et al., 2003).

1.4 Fisiopatologia da DP

A neuropatologia da DP caracteriza-se pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da SNpc, evidenciada macroscopicamente pela despigmentação da porção ventrolateral desta estrutura, em associação com a acumulação de agregados da proteína α -sinucleína na forma de corpos de Lewy (MARCON et al., 2019; ANGELOPOULOU et al., 2020). Além do comprometimento de neurônios da SNpc, outras populações de neurônios são afetadas: o *locus coeruleus*, os núcleos da rafe, o núcleo basal de Meynert, o núcleo motor dorsal do vago, o hipotálamo, o bulbo olfatório, o córtex cerebral, assim como o sistema nervoso autônomo (SNA) e o sistema entérico (BRAAK et al., 2003; ROSSO et al., 2008; OBESO et al., 2014; KALIA; KALIA, 2015; DEL TREDICI; BRAAK, 2016; ANGELOPOULOU et al., 2020; SIMON et al., 2020).

A degeneração de neurônios dopaminérgicos na SNpc, resulta na depleção de DA no estriado, produzindo alterações na atividade dos núcleos da base (GARCIA-MUNOZ et al., 2010; ROMMELFANGER; WICHMANN, 2010; GALVAN et al., 2015). Os núcleos da base consistem num conjunto de núcleos subcorticais

interconectados, incluindo o estriado (caudado e putâmen), os segmentos externo e interno do globo pálido (GPe e GPi, respectivamente), o NST e a SN (*pars compacta* – SNpc, e *pars reticulada* – SNpr). Essas estruturas fazem parte de circuitos paralelos anatomicamente e funcionalmente maiores, que também incluem áreas do córtex cerebral e do tálamo (ROMMELFANGER; WICHMANN, 2010; GALVAN et al., 2015; VILLALBA et al., 2015). Embora historicamente considerado como componentes principais do sistema motor, os núcleos da base recebem projeções de diferentes áreas funcionais do córtex cerebral, contribuindo para as funções motoras e não motoras (VILLALBA et al., 2015). Dependendo da função da área cortical de origem, os circuitos gânglio-tálamo-córtex são designados como motores, associativos/cognitivos e límbicos (MIDDLETON; STRICK, 2000; KREITZER; MALENKA, 2008; LANCIEGO et al., 2012).

O circuito motor se origina nas áreas motoras do córtex frontal e envolve partes motoras do estriado, GPe, NST, GPi, SNpr e tálamo, retornando ao córtex frontal. Os circuitos associativo e límbico se originam do córtex pré-frontal (CPF) associativo e límbico, e envolvem áreas relacionadas nos núcleos da base e tálamo, separadas daquelas ocupadas pelo circuito motor. O circuito motor está envolvido no controle do movimento, o circuito associativo no controle das funções executivas, enquanto o circuito límbico está envolvido no controle das emoções e da motivação (ROMMELFANGER; WICHMANN, 2010).

O controle motor mediado pelos núcleos da base ocorre por meio de duas vias: a direta e a indireta onde, a primeira está envolvida na iniciação e manutenção dos movimentos e segunda na iniciação e/ou finalização dos movimentos (GRILLNER et al., 2005; ROMMELFANGER; WICHMANN, 2010). A via direta apresenta os neurônios estriatais GABAérgicos contendo substância P e encefalina como co-transmissores e expressão de receptores dopaminérgicos tipo 1 (D1). A ativação dos neurônios estriatais pelo córtex causa inibição dos neurônios GABAérgicos do GPi e SNpr, os quais são responsáveis pela eferência que se projeta ao tálamo. Logo, a ativação desta via inibitória causa desinibição do tálamo que então excita o córtex através de projeções glutamatérgicas, facilitando a movimentação (ALEXANDER; CRUTCHER, 1990; GALVAN; WICHMANN, 2008).

A via indireta, por sua vez, apresenta neurônios estriatais GABAérgicos contendo encefalina/neurotensina como co-transmissores e expressa receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2). Ao serem ativados, os neurônios estriatais causam

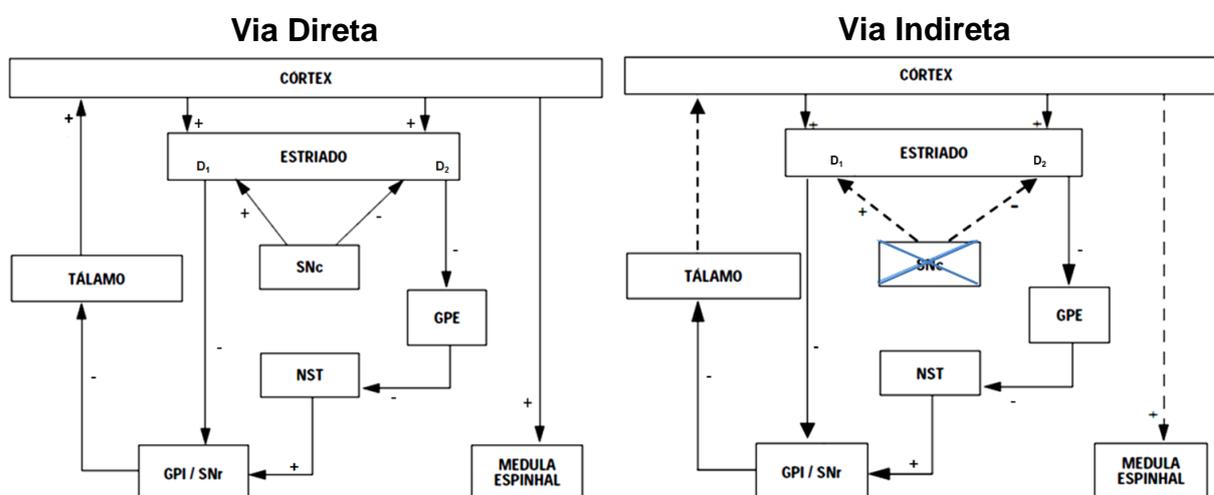
inibição do GPe. Do GPe uma via GABAérgica se projeta para o NST exercendo influência inibitória, a ação dos neurônios estriatais sobre o GPe então provoca uma desinibição do NST que possui neurônios glutamatérgicos estimuladores da atividade inibitória do GPi sobre o tálamo, dificultando pois a estimulação cortical. As vias são, portanto antagônicas e, se assim não fosse, seria impossível a função de modulação. A via indireta, aparentemente, serve para aumentar o nível de inibição tônica no tálamo, sendo uma via mais lenta, que regula o grau de excitação cortical e modula as ações desinibitórias da via direta (ROMMELFANGER; WICHMANN, 2010).

Em condições normais, a DA formada nos neurônios dopaminérgicos da SNpc é liberada no CE através de seus terminais e é captada pelos receptores D1 e D2 dos neurônios espinhosos médios. Dessa forma, a DA liberada no CE tende a aumentar a atividade da via direta e reduzir a da via indireta, reduzindo o efluxo de sinais inibitórios do GPi ao tálamo, aumentando a excitabilidade do tálamo e dos neurônios motores superiores, Figura 2 (KRAVITZ et al., 2010).

Na DP, com a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc e a consequente diminuição de DA no estriado, faz os neurônios dopaminérgicos estriatais, GABAérgicos e inibitórios, reduzir a atividade da via direta e aumentar a da via indireta, aumentando o efluxo de sinais inibitórios do GPi ao tálamo, e desta forma, diminuindo a excitabilidade do tálamo e dos neurônios motores superiores (ROMMELFANGER; WICHMANN, 2010). Essas alterações funcionais estão relacionadas com as dificuldades de iniciação e controle dos movimentos voluntários encontrados na DP (KRAVITZ et al., 2010).

A α -sinucleína é essencial para a liberação de DA dos neurônios pré-sinápticos (DEHAY; FERNAGUT, 2016). Ela é importante no processo de formação de vesículas sinápticas, facilitando a interação entre os endossomos primários e a fosfolipase D2. Mutações da α -sinucleína prejudicam a formação das vesículas sinápticas disponíveis para o estoque de DA, levando ao seu acúmulo no citosol (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002). O metabolismo da DA vai produzir EROs, e causar disfunção mitocondrial e disfunção na atividade do complexo I (LEE et al., 2003; JANA et al., 2011), levando o neurônio dopaminérgico a degeneração (XU; PU, 2016).

Figura 2 - Desenho esquemático representativo da organização funcional dos núcleos da base no cérebro normal e na DP.



Legenda- SNpc: Substância Negra (*pars compacta*); SNpr: Substância Negra (*pars reticulada*); GPe: Globo Pálido Externo; GPi: Globo Pálido Interno; NST: Núcleo Subtalâmico, D1 e D2: Receptores dopaminérgicos. Linha cheia: função normal, Linha interrompida: função diminuída. Adaptado de Alexander e Crutcher (1990).

1.5 Manifestações clínicas da DP: sintomas motores e não motores

Os quatro sinais cardinais da DP incluem o tremor distal em repouso, bradicinesia, rigidez, e alterações posturais e da marcha, resultantes da perda progressiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; RODRIGUEZ-OROZ et al., 2009; POEWE et al., 2017).

O **tremor em repouso** é o sintoma inicial em cerca de 70% a 90% dos pacientes. Geralmente começa de maneira leve e intermitente, a uma frequência de 4 a 6 Hz em repouso (DEMAAGD; PHILIP, 2015). No início é um tremor unilateral, que progride para o comprometimento bilateral ao longo do desenvolvimento da doença (GARCIA RUIZ et al., 2011; XIA; MAO, 2012). Descrito como de repouso que aumenta durante a marcha e em situações de tensão emocional. Desaparece quando o membro em movimento, mas ressurgue quando os membros mantêm uma postura (LEES et al., 2009; DEMAAGD; PHILIP, 2015).

Bradicinesia foi definida como uma redução na velocidade, marcha e amplitude de uma ação repetitiva envolvendo movimentos voluntários (GRABLI et al., 2012). A bradicinesia é a característica clínica mais comum observada em

pacientes com DP e é considerada um critério-chave para o diagnóstico. A marcha torna-se lenta, com passos mais curtos e uma tendência a arrastar os pés; a oscilação dos braços diminui e acaba por desaparecer (XIA; MAO, 2012; DEMAAGD; PHILIP, 2015). A bradicinesia da mão dominante acarreta uma escrita com letra pequena e lenta (micrografia) (REICHMANN, 2010; DEMAAGD; PHILIP, 2015).

A **rigidez** caracteriza-se por uma resistência aumentada ao movimento passivo por toda a amplitude de movimento, é global e plástica, caracterizada pela contração prolongada dos músculos envolvidos por algum tempo (PAULSON; STERN, 2004; DEMAAGD; PHILIP, 2015). A resistência à movimentação do membro afetado pode ser contínua ou intermitente, sendo esta caracterizada por movimentos fragmentados, fenômeno conhecido como “roda denteada” (GARCIA RUIZ et al., 2011; DEMAAGD; PHILIP, 2015). Outra característica da hipertonía plástica é o acometimento preferencial da musculatura flexora, determinando alterações típicas da postura, com flexão anterior do tronco e semiflexão dos membros (PAULSON; STERN, 2004). A rigidez da DP pode afetar outras partes do corpo além dos membros, como a face, que pode exibir uma expressão “mascarada” (hipomímia) (REICHMANN, 2010; XIA; MAO, 2012).

Alterações posturais e da marcha: A instabilidade postural geralmente ocorre mais tarde nos pacientes parkinsonianos, é decorrente da perda de reflexos de readaptação postural. A cabeça inclina-se, o corpo dobra-se para frente, as costas entram em cifose, os braços são mantidos à frente do corpo e cotovelos, quadris e joelhos fletidos (PAULSON; STERN, 2004). A instabilidade postural pode ser seriamente incapacitante devido à sua associação com a perda de equilíbrio e o risco de quedas (DOHERTY et al., 2011; DEMAAGD; PHILIP, 2015). A marcha é marcada por festinação, aceleração involuntária, tentando mover os pés para frente para ficar sob o centro de gravidade do corpo flexionado, evitando assim a queda (PAULSON; STERN, 2004).

Embora a DP seja definida e caracterizada como uma doença do movimento, cada vez mais se reconhece a importância dos sintomas não motores na DP, como as alterações cognitivas, psiquiátricas e autonômicas, que têm grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (MARTINEZ-MARTIN et al., 2011; KADASTIK-EERME et al., 2016; TAYLOR et al., 2016; BUTALA et al., 2019).

O comprometimento cognitivo está associado à progressão da DP (AARSLAND et al., 2010), e é responsável por afetar a qualidade de vida e a independência de pacientes parkinsonianos (SCHRAG et al., 2017), maximizando o risco para o desenvolvimento de demência (WILLIAMS-GRAY et al., 2009). As alterações cognitivas em fases iniciais da DP, quando presentes, geralmente são discretas e sem déficits significativos sobre o desempenho cognitivo (PAULSON; STERN, 2004). Mas, déficits em uma variedade de domínios cognitivos, tais como a função executiva, habilidades visuoespaciais, linguagem e memória têm sido observados em pacientes com DP sem demência (GUO et al., 2019). A função executiva, que inclui a capacidade para planejar, organizar, iniciar e regular um comportamento para solução de um problema complexo, e se baseia em circuitos frontoestriatais incluindo as regiões pré-frontais como o CPF dorsolateral e suas conexões com os gânglios da base (DIAMOND, 2013), é um dos domínios mais comumente afetados (MUSLIMOVIC et al., 2005). A função da linguagem é relativamente poupada; no entanto, pode ocorrer decréscimo do conteúdo de informação da fala espontânea, prejuízo na compreensão de frases complexas e na fluência verbal (GALHARDO et al., 2009).

O distúrbio de memória está entre as alterações cognitivas mais frequentes observadas na DP, caracterizado pela dificuldade em recordar informações verbais recentemente aprendidas, devido a déficit na codificação de novas informações ou a uma dificuldade na capacidade de utilizar eficientemente a codificação semântica devido a problemas no processamento da informação. Outro aspecto também prejudicado nesta função é o comprometimento da memória para conteúdo não-verbal, que costuma ser maior do que para o conteúdo verbal (GALHARDO et al., 2009).

As habilidades visuoespaciais são complexas e exigem a integração das funções corticais dos lobos occipitais, parietais e frontais, assim como a participação de estrutura subcorticais (ROCHA, 2004). O reconhecimento visual encontra-se preservado nos pacientes com DP, e estes não costumam apresentar déficits de reconhecimento como agnosias, prosopagnosia ou agnosias do ambiente. No entanto, estão comprometidas as respostas que exigem habilidade visual discriminatória, como a orientação linear, desenhos complexos, percepção de posição espacial, percepção de constância de formas e tamanhos e relacionamento espacial (GALHARDO et al., 2009).

O quadro demencial na DP instala-se em fases mais avançadas na evolução da doença e tem como principais características a lentificação do processo cognitivo (bradifrenia), a apatia, o comprometimento da memória e das funções executivas frontais (BARBOSA, 2006). A prevalência de demência na DP corresponde a 25% a 30% dos pacientes parkinsonianos, e aumenta drasticamente com a idade avançada (DAVIS; RACETTE, 2016). Foi relatado pelo Sydney Multicenter Study, que 83% dos pacientes com diagnóstico de DP a pelo menos 20 anos, desenvolveram demência (HELY et al., 2008).

A depressão é o transtorno neuropsiquiátrico mais comum na DP (GAENSLEN et al., 2011). As taxas variam muito entre os estudos, variando entre 30% a 40% nos casos de DP (AARSLAND et al., 2011; CHEN; MARSH, 2013). A depressão na DP ocorre principalmente pela quantidade insuficiente de DA na via nigroestriatal, porém acredita-se que outras vias também estejam envolvidas - noradrenérgica, serotoninérgica e gabaérgica (BALLANGER et al., 2012). Os sintomas depressivos são observados em todos os estágios da doença, e podem preceder o surgimento de sintomas motores em até 2 ou 3 anos (MIYASAKI et al., 2006). A melancolia é a característica principal da depressão na DP, mas também pode ser relatado a anedonia, que é a perda de interesse por atividades diárias, objetos ou familiares (LEMKE, 2008; RIZVI et al., 2016).

Quanto às disfunções autonômicas, acredita-se que o envolvimento do SNA na DP possa decorrer da própria doença, do tratamento farmacológico ou de uma combinação destes fatores. Acredita-se, também, que a atividade do SNA é comprometida com o envelhecimento. Entretanto, os fatores encontrados na DP e as alterações do SNA não estão suficientemente esclarecidos, assim como não existe unanimidade quanto à exata correlação entre os distúrbios autonômicos, a duração, a gravidade e a terapêutica utilizada no tratamento da DP (NICARETTA et al., 2011). As disfunções autonômicas incluem a desregulação das glândulas sudoríparas, temperatura corporal, sistemas cardiovascular, gastrointestinal e geniturinário (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ et al., 2010; NICARETTA et al., 2011; KAUFMANN; GOLDSTEIN, 2013; PALMA; KAUFMANN, 2014; ZHANG et al., 2016c), relevantes para a presença dos corpos de Lewy nos gânglios colinérgicos simpáticos ou parassimpáticos e no gânglio do nervo adrenérgico simpático (TRUONG et al., 2008).

A prevalência dos distúrbios autonômicos na DP varia de 14 a 80% em diferentes estudos. Esta desproporção se deve aos diferentes critérios diagnósticos utilizados (GÓMEZ et al., 2011; NICARETTA et al., 2011; YEO et al., 2012). Estudo australiano, o Sydney Multicenter Study, acompanhou 136 pacientes durante 20 anos, foram encontrados: incontinência urinária em 71%, hipotensão postural sintomática em 48%, disfagia em 48%, constipação intestinal em 40% e incontinência fecal em 17% (HELY et al., 2008). Apesar da alta prevalência, estas, ainda não são adequadamente diagnosticadas.

A perda olfatória na DP não está associada a alterações na mucosa nasal ou no tamanho do bulbo olfatório (HUMMEL et al., 2010; PASCHEN et al., 2015). De acordo com estudos *post-mortem* em pacientes com DP, os corpos de Lewy estão presentes no bulbo olfatório, no núcleo olfatório anterior, no córtex entorrinal e no córtex piriforme (SILVEIRA-MORIYAMA et al., 2009; SAITO et al., 2016; GEORGIPOULOS et al., 2019). Aproximadamente 90% dos pacientes parkinsonianos apresentam hiposmia em diferentes graus (PONSEN et al., 2004), que ocorre nos estágios iniciais da DP, frequentemente antecedendo o aparecimento dos sintomas motores (TOLOSA; POEWE, 2009; GEORGIPOULOS et al., 2019), e é independente da medicação e da idade de início (TISSINGH et al., 2001). Zhang e colaboradores (2016c) mostraram um declínio significativo do olfato em pacientes com DP, devido ao envolvimento precoce de regiões cerebrais relacionadas ao olfato com o acúmulo de agregados de α -sinucleína, de acordo com o estadiamento de Braak para a DP (BRAAK et al., 2003; DEL TREDICI; BRAAK, 2016).

1.6 Terapia farmacológica da DP

Os objetivos da terapia na DP devem ser centrados no paciente, a fim de maximizar a qualidade de vida e minimizar as incapacidades. O tratamento deve ser iniciado quando os sintomas motores ou não motores começarem a causar incapacidade física ou social e prejudicar a qualidade de vida (HECHTNER et al., 2014). Até o momento, não existe cura para a DP. As terapias atualmente disponíveis não conseguem impedir a progressão do processo neurodegenerativo. No entanto, as opções farmacoterapêuticas para pacientes parkinsonianos aumentaram consideravelmente nos últimos 30 anos, assim como o entendimento

da patogênese da DP. Até a década de 1960, o tratamento medicamentoso foi limitado a anticolinérgicos (biperideno, metixeno e triexifenidil), que apresentam baixa eficácia e uma alta incidência de efeitos colaterais gastrointestinais e neuropsiquiátricos (KATZENSCHLAGER et al., 2003). A introdução da Levodopa (L-DOPA), uma amina precursora da DA, absorvida no intestino delgado e transportada pela corrente sanguínea até o cérebro onde penetra e é convertida em DA pela ação da enzima DOPA-descarboxilase; revolucionou o tratamento, reduzindo significativamente os escores de incapacidade e a mortalidade, levando a um aumento na qualidade de vida dos pacientes parkinsonianos (FERRAZ, 2004).

Além da L-DOPA, outros medicamentos (Quadro 1) são utilizados no tratamento da DP: anticolinérgicos, liberadores de DA, precursor dopaminérgico, inibidores periféricos da DOPA-descarboxilase, agonistas dopaminérgicos, inibidores das enzimas degradadoras de DA, principalmente da monoamina oxidase B (MAO-B), e da catecol-O-metiltransferase (COMT) (ANDRADE et al., 2006; FOX et al., 2011).

Apesar do surgimento de novos fármacos dopaminérgicos para a DP, a L-DOPA permanece como tratamento padrão ouro (MURATA, 2009), mesmo após 60 anos da sua introdução no mercado e incansáveis pesquisas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Todavia, mesmo com a eficácia demonstrada pelo tratamento com a L-DOPA, a sua associação com a origem de efeitos adversos que incluem flutuações motoras, náuseas, vômito, alucinações visuais, sonolência e complicações neuropsiquiátricas, pode ser causa na redução da prescrição desta medicação (BASTIDE et al., 2015; HAYES et al., 2019).

Tendo-se em vista as opções terapêuticas limitadas para o tratamento da DP, drogas neuroprotetoras estão atualmente sendo estudadas, com a finalidade de tornar mais lenta a neurodegeneração dopaminérgica na doença. Assim, várias drogas que têm como alvos o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inflamação são candidatas primordiais como neuroprotetoras. Muitas destas drogas já estão sendo submetidas a ensaios clínicos (SEIDL; POTASHKIN, 2011; LOTIA; JANKOVIC, 2016; LIMA et al., 2017).

Quadro 1 - Classificação, mecanismo de ação e efeitos adversos dos principais fármacos utilizados no tratamento da DP. Adaptado de Rinaldi (2011).

Classificação dos Fármacos	Mecanismo de Ação	Efeitos Adversos
Anticolinérgicos (Triexifenidil, Biperideno)	Inibem a ação da acetilcolina (ACh)	Confusão, alucinações
Liberadores de DA (Amantadina)	Antagonistas de receptores excitatórios	Disfunção cognitiva, alucinações
Precursor dopaminérgico (L-DOPA) + Inibidores periféricos da DOPA-descarboxilase (carbidopa, benzerasida)	Sofre ação da DOPA-descarboxilase, dando origem à DA. Impedem o metabolismo da L-DOPA antes de atingir o SNC	Náusea, vômito, alucinações visuais, sonolência, discinesia
Agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, pergolida, pramipexol)	Não necessitam de transformação enzimática para serem ativos. Agem diretamente sobre os receptores dopaminérgicos D1, D2 e D3 na SNpc	Náusea, hipotensão, alucinações, dores de cabeça, problemas no sono, fibrose pulmonar
Inibidores da enzima monoamina oxidase B (MAO-B) (selegilina, rasagilina)	Agem no SNC impedindo a remoção da DA após utilizada pelo receptor	Perda de peso, vômito, problemas no equilíbrio, hipotensão
Inibidores da enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) (entacapone, tolcapone)	Agem tanto no SNC quanto fora dele, junto com a MAO-B. Esta enzima também inibe a transformação da L-dopa em 3-Ometildopa, substância sem efeito terapêutico	Diarréia, discinesia, toxicidade no fígado

Dessa forma, o (-)-linalol, um monoterpene encontrado em diversas espécies de plantas da flora brasileira, apresenta-se como uma alternativa terapêutica de indivíduos acometidos pela DP, devido suas ações anti-inflamatória e antioxidante, já comprovadas (PEANA et al., 2002; CELIK; OZKAYA, 2002; SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2016).

1.7 Modelo animal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) na DP

A DP é uma doença exclusiva da espécie humana, não se manifestando espontaneamente em animais (GERLACH; RIEDERER, 1996). Para se estudar novos tratamentos para a DP é necessário utilizar modelos animais que mimetizem alguns aspectos da doença. Um dos modelos mais utilizados em pesquisas envolvendo a DP é o modelo da neurotoxina 6-OHDA (UNGERSTEDT, 1968; UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970; SCHNEIDER et al., 1984; PRZEDBORSKI et al., 1995; DEUMENS et al., 2002; AGUIAR et al., 2006; XIMENES et al., 2015; LIMA et al., 2017).

O primeiro modelo que utilizou a neurotoxicidade da 6-OHDA foi desenvolvido em 1968 por Ungerstedt que consistiu na injeção bilateralmente da neurotoxina na SNpc de ratos, obtendo-se um modelo animal de acinesia com uma taxa de mortalidade muito elevada (UNGERSTEDT, 1968). Mais tarde a 6-OHDA foi injetada unilateralmente e tornou-se uma das neurotoxinas mais amplamente utilizadas para modelagem experimental de DP, tanto *in vitro* como também *in vivo* (UNGERSTEDT, 1968; SCHWARTING; HUSTON, 1996; XIMENES et al., 2015; LIMA et al., 2017; GHAHARI et al., 2020). Na administração unilateral o hemisfério contralateral serve como controle (UNGERSTEDT, 1968; SCHWARTING; HUSTON, 1996).

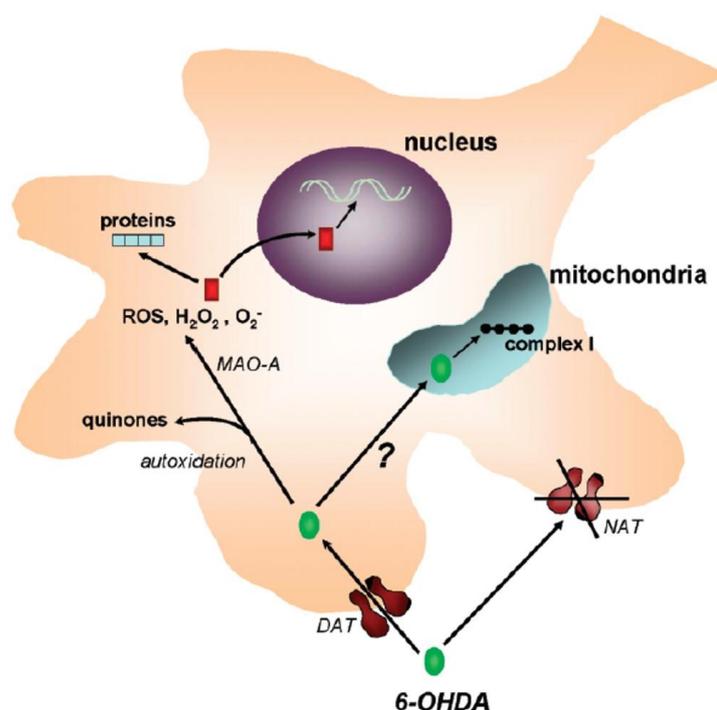
A 6-OHDA não atravessa a barreira hematoencefálica, sendo necessária a administração diretamente na SNpc, feixe medial do prosencéfalo ou CE, por meio de cirurgia estereotáxica (BLANDINI et al., 2008). A 6-OHDA apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo DAT na fenda sináptica, que é usada para gerar lesões nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais em ratos (UNGERSTEDT, 1968). A administração intraestriatal de 6-OHDA induz neurotoxicidade nos terminais dopaminérgicos 24 h após a injeção, seguido de uma perda de neurônios dopaminérgicos localizados na SNpc no hemisfério ipsilateral (KIRIK et al., 1998).

Após a entrada na célula, a 6-OHDA é convertida em 6-OHDA-quinona em uma reação que produz H_2O_2 e EROs, como radical OH^- , e inibição do complexo I mitocondrial - Figura 3 (MILLER et al., 2009). A 6-OHDA também pode induzir a ativação microglial (McGEER; McGEER, 2008; MILLER et al., 2009; SANCHEZ-GUAJARDO et al., 2010). A amplitude da lesão é dose-dependente de 6-OHDA injetada e do local de injeção. Diferentes modelos utilizando 6-OHDA em roedores

têm sido desenvolvidos a fim de se obter um grau de variância na neurodegeneração (BOVÉ; PERIER, 2012).

Devido à lesão ocasionada pela 6-OHDA, os animais apresentam comportamento motor assimétrico, quando recebem agonistas do receptor da DA, como a apomorfina, demonstrando rotações contralaterais (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970; DUNNETT; LELOS, 2010). As vantagens deste modelo são o dano às células dopaminérgicas nigroestriatais, principalmente por estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial, semelhante ao que ocorre no paciente com DP. Como desvantagens, o uso da 6-OHDA não leva à formação dos corpos de Lewy, presentes na fisiopatologia da DP (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014; FUNCHAL; DANI, 2014).

Figura 3 - Mecanismos de neurotoxicidade induzida por 6-OHDA.



Legenda- EROs: espécies reativas do oxigênio; DAT: transportador de dopamina; NAT: transportador de noradrenalina (NA). Fonte: Adaptado de Simola et al. (2007).

Este modelo tem sido amplamente utilizado nas últimas décadas para investigação de novos produtos com potencial terapêutico possível de interromper ou retardar a morte neuronal dopaminérgica, entre eles os produtos naturais, com ação antioxidante e anti-inflamatória (KHAN et al., 2010; LIMA et al., 2017).

1.8 Plantas medicinais

Desde a antiguidade, as plantas são utilizadas pelo homem como fontes terapêuticas. Isso acontece em consequência ao fácil acesso, baixo custo e principalmente, pelo empirismo (SIXTEL; PECINALLI, 2005). A medicina tradicional vem utilizando muitas espécies de plantas para aliviar sintomas e para o tratamento de várias doenças tanto agudas quanto crônicas.

Estima-se que existam aproximadamente 200.000 espécies de plantas no mundo, das quais cerca de 20.000 espécies são utilizadas na medicina tradicional, entretanto, a maioria delas não foi avaliada quimicamente ou farmacologicamente (SARTORATTO et al., 2004). O Brasil é conhecido mundialmente por apresentar uma flora bastante diversificada e pouco explorada pela sociedade científica.

As plantas medicinais representam uma excelente fonte para estudos farmacológicos, atraindo, constantemente, a atenção de pesquisadores, por serem produtoras de muitas substâncias biologicamente ativas (BAKKALI et al., 2008; KHAN et al., 2010; GUZMÁN-GUTIÉRREZ et al., 2015; JAVED et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2018).

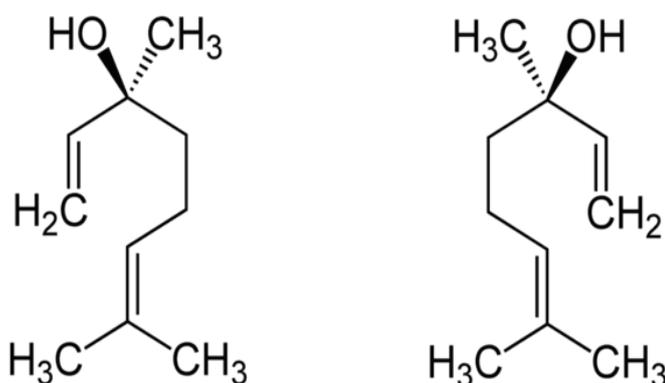
Óleos essenciais são substâncias naturais provenientes de plantas, constituídos principalmente por moléculas chamadas terpenos, que podem ser classificados como hidrocarbonetos. Os monoterpenos (C_{10}) são constituintes básicos voláteis de óleos essenciais aromáticos e pertencem a um grupo diverso de compostos químicos, de modo a constituir 90% dos óleos essenciais (QUINTANS-JUNIOR et al., 2013), com enorme variedade de estruturas e com implicações em diversas atividades biológicas, tais como: bradicardia (ANJOS et al., 2013), atividade antimicrobiana (SARRAZIN et al., 2016), ação sedativa (De ALMEIDA et al., 2009; LINCK et al., 2009), anticonvulsivante (ELISABETSKY; SILVA BRUM, 2003; QUINTANS-JUNIOR et al., 2008), analgésica (LI et al., 2016), ansiolítica (SOUTO-MAIOR et al., 2011; ZHANG et al., 2016b), vasorrelaxante (PINTO et al., 2009; PEIXOTO-NEVES et al., 2010), atividade antinociceptiva (MELO et al., 2010; QUINTANS-JUNIOR et al., 2013), antidepressiva (GUZMÁN-GUTIÉRREZ et al., 2012; 2015), anti-inflamatória (HUO et al., 2013; PARK et al., 2016) e antioxidante (LIU et al., 2012; PARK et al., 2016).

1.9 O (-)-linalol

O (-)-linalol é componente de vários óleos essenciais, encontrado em diversas espécies de plantas da flora brasileira, principalmente das regiões Norte e Nordeste, como o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), a tangerina (*Citrus reticulata*), a bergamota (*Citrus bergamia*), o jasmim (*Jasminum auriculatum*) e da lavanda francesa (*Lavandula dentata*), além do manjeriço (*Ocimum gratissimum*) e do coentro (*Coriandrum sativum*), estes últimos tão presentes na culinária brasileira (ELISABETSKY et al., 1995; 1999; PEANA et al., 2003; ROSA et al., 2003; BATISTA et al., 2008; LINCK et al., 2009; 2010).

O (-)-linalol (3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol), é um composto monoterpênico alcoólico terciário de cadeia aberta, de fórmula molecular $C_{10}H_{18}O$, peso molecular de 154,25 g/mol e densidade relativa de 0,87 g/cm³ a 25 °C. Apresenta-se na forma líquida com ponto de ebulição entre 194-197 °C (graus Celsius) e solubilidade em água moderada (SIGMA-ALDRICH, 2018). Possui um átomo de carbono assimétrico, o que possibilita a existência dos enantiômeros (+)-linalol e (-)-linalol (Figura 4), que apresentam odores distintos, assim como diferentes propriedades químicas e efeitos biológicos (ROSA et al., 2003).

Figura 4 - Estruturas químicas do (-)-Linalol e (+)-Linalol, respectivamente.



Fonte: Adaptado de Usta et al. (2009).

Estudos experimentais relataram que o (-)-linalol apresenta uma variedade de efeitos farmacológicos, incluindo efeitos anticonvulsivantes, antidepressivos, ansiolíticos, antinociceptivos, anti-inflamatórios e antioxidantes (SILVA BRUM et al.,

2001a,b; PEANA et al., 2002; ELISABETSKY; SILVA BRUM, 2003; PEANA et al., 2004a,b; PEANA et al., 2006a,b; BRADLEY et al., 2007; SHAW et al., 2007; BATISTA et al., 2008; GUZMÁN-GUTIÉRREZ et al., 2012; 2015; DOS SANTOS et al., 2018).

1.9.1 Ação farmacológica do (-)-linalol

Estudos realizados para avaliar a atividade biológica do (-)-linalol demonstraram um potencial anti-inflamatório no modelo de edema da pata induzido pela injeção de carragenina em ratos. A administração sistêmica de (-)-linalol (25, 50 e 75 mg/kg) produziu um efeito tardio e mais prolongado, enquanto a forma racêmica (12,5, 25, 50 e 75 mg/kg) reduziu significativamente o edema da pata somente 1 h após a administração de carragenina, sugerindo um potencial anti-inflamatório da substância (PEANA et al., 2002).

Estudo pré-clínico realizado pelos mesmos autores, mostrou que o (-)-linalol reduziu a hiperalgesia térmica provocada por carragenina, glutamato e PGE₂, bem como edema da pata induzido por carragenina e nocicepção induzida por formalina, sugerindo uma importante ação anti-inflamatória dessa substância (PEANA et al., 2004b). Além disso, o (-)-linalol mostrou atividade antinociceptiva na dor visceral induzida por ácido acético em camundongos, efeito que envolve a ativação da neurotransmissão opioidérgica e colinérgica (PEANA et al., 2003). Mais recentemente, foi sugerido que os efeitos antinociceptivos do (-)-linalol podem estar relacionados à inibição da síntese de NO e aos mecanismos operados pelos receptores da adenosina A₁ e A_{2A} (PEANA et al., 2006a,b).

A administração do (-)-linalol, tanto por via periférica quanto central, produziu efeito antinociceptivo em camundongos. Tais dados sugerem a atuação do (-)-linalol no sistema glutamatérgico, mostrando o seu envolvimento nos receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA e kainato (BATISTA et al., 2008). Peana e colaboradores (2004a), sugerem que os efeitos antinociceptivos desse monoterpene também podem estar relacionados à atividade sobre a neurotransmissão glutamatérgica, visto que o antagonismo a receptores NMDA é capaz de provocar analgesia supraespinal mediada pela estimulação de receptores opióides centrais e de receptores dopaminérgicos D₁/D₂ (PEANA et al., 2004b).

O (-)-linalol também é citado com propriedade anticonvulsivante (SILVA BRUM et al., 2001a,b; ELISABETSKY; SILVA BRUM, 2003). A atividade anticonvulsivante do (-)-linalol foi observada em convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos e posteriormente confirmada em vários outros modelos *in vivo* e *in vitro*. O mecanismo de ação do (-)-linalol é multifatorial, modulando vários elementos relevantes da transmissão glutamatérgica, incluindo receptores antagonistas do glutamato e NMDA, bem como comprometimento da liberação de glutamato estimulado por potássio (K⁺) (ELISABETSKY; SILVA BRUM, 2003).

Silva Brum e colaboradores (2001a,b) demonstraram em experimentos *in vitro* que uma diminuição na transmissão excitatória glutamatérgica (através da inibição da liberação de glutamato e/ou bloqueio de receptores glutamatérgicos NMDA) está envolvida na atividade anticonvulsivante do (-)-linalol.

Shaw e colaboradores (2007) investigaram os efeitos do (-)-linalol inalado na ansiedade em ratos. Demonstraram que a inalação de óleo de lavanda composto por 25% de (-)-linalol e 46% de acetato de linalil induziu efeitos ansiolíticos (campo aberto) após 30 min de inalação. Efeitos semelhantes (*plus maze*) foram observados com a inalação de lavanda contendo 38,47% de (-)-linalol e 43,98% de acetato de linalil em gerbil após 1 ou 14 dias de inalação (BRADLEY et al., 2007).

Outros estudos apontam atividade antidepressiva do (-)-linalol (GUZMÁN-GUTIÉRREZ et al., 2012; 2015; DOS SANTOS et al., 2018). Estudo Brasileiro avaliou a ação de três óleos essenciais de plantas da Amazônia e do (-)-linalol (30 mg/kg) no comportamento tipo-depressivo em ratos, no teste de Nado Forçado. Os dados mostram uma diminuição significativa do tempo de imobilidade sobre o grupo controle, confirmando a atividade antidepressiva dos óleos avaliados (dose mais alta) e do (-)-linalol. Dos Santos et al. (2018), destacam que o (-)-linalol é o principal componente dos três óleos essenciais, estando na mesma proporção em cada um deles e apresentando resultados semelhantes, dessa forma, é o responsável pelo efeito antidepressivo.

Por fim, Celik e Ozkaya (2002), mostraram propriedades antioxidantes do (-)-linalol no cérebro de cobaias após a administração de H₂O₂. Mehri e colaboradores (2015), demonstraram a atividade antioxidante do (-)-linalol contra a neurotoxicidade induzida pela acrilamida, um potente neurotóxico, através da análise do estresse oxidativo (medições de GSH e peroxidação lipídica), no tecido cerebral de ratos.

Portanto, todas as evidências supracitadas são importantes indícios de que o (-)-linalol pode ser estudado quanto ao seu papel neuroprotetor na DP.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito neuroprotetor do (-)-linalol, em um modelo experimental de DP induzido pela neurotoxina 6-OHDA em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito neuroprotetor do (-)-linalol, sobre a lesão estriatal unilateral induzida pela 6-OHDA em ratos, nos seguintes parâmetros:

- Extensão da lesão estriatal unilateral induzida pela 6-OHDA, através do Teste Rotacional Induzido pela Apomorfina;
- Alterações motoras, na memória, no comportamento tipo-depressivo e na perda olfatória, através dos testes do Campo Aberto, Labirinto em Y, Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO), Nado Forçado e Discriminação Olfatória, respectivamente;
- Alterações no sistema dopaminérgico envolvido no processo neurodegenerativo, através da determinação das concentrações de DA e de seus metabólitos (DOPAC e HVA), e das concentrações de aminoácidos, no CE lesionado e não-lesionado;
- Degeneração de neurônios dopaminérgicos, através de testes imunohistoquímicos para Tirosina Hidroxilase (TH) e Transportador de Dopamina (DAT), no CE lesionado e não-lesionado;
- Potencial antioxidante, através da determinação do índice de peroxidação lipídica (MDA), produção de nitrito e glutathiona redutase (GSH), no Córtex Pré-frontal (CPF), Hipocampo (HC) e Corpo Estriado (CE);
- Resposta anti-inflamatória, através da determinação da expressão de COX-2 e TNF- α , no CE lesionado.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, com peso corporal variando entre 250-280 gramas no início dos experimentos, provenientes do Biotério Central do Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), e transferidos para o biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, UFC. Os animais foram alojados em caixas de polipropileno de dimensões (40 cm de comprimento x 32 cm de largura x 17 cm altura), forradas com maravalha, contendo, no máximo, 4 animais por caixa. O ambiente foi mantido à temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em um ciclo claro/escuro de 12 h, com luzes acesas às 6:30 h.

Os animais receberam ração padrão e água *ad libitum* durante todo o experimento. Os experimentos foram conduzidos entre 9:00 e 15:00 h, numa sala com temperatura e iluminação controladas.

Os animais foram mantidos e manipulados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sempre buscando reduzir o número de animais utilizados, bem como, eventuais desconfortos causados aos mesmos durante os experimentos. O presente estudo foi aprovado para execução segundo o parecer emitido pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, sob o número de registro 64/2015 (Anexo I).

3.2 Drogas e reagentes utilizadas na pesquisa

Foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes:

6-Hidroxidopamina (6-OHDA), Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, E.U.A.), dissolvida em ácido ascórbico 0,2%. A 6-OHDA foi administrada por via intraestriatal, na dose de 12 µg/2 µL por animal, como previamente descrito por Machado-Filho e colaboradores (2014).

Ácido ascórbico, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, E.U.A.), utilizado como agente antioxidante na solução de 6-OHDA, dissolvido em solução salina 0,9%.

(-)-Linalol, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, E.U.A.), foi emulsionado em Tween® 80 1%, dissolvido em solução salina 0,9%.

Apomorfina, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, E.U.A.), dissolvida em solução salina 0,9%. Administrada por via intraperitoneal (i.p.) na dose de 1 mg/kg (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970).

Tween® 80 1%, R&D Systems® (Minnesota, E.U.A.), utilizado como solvente para o (-)-linalol, dissolvido em solução salina 0,9% (veículo).

Solução de cloreto de sódio 0,9%, solução salina.

Cloridrato de Cetamina 10%, Agener União® (São Paulo, Brasil), utilizado como anestésico, associado ao Cloridrato de Xilazina. Administrado por via i.p. na dose de 100 mg/kg, por animal.

Cloridrato de Xilazina 2%, Agener União® (São Paulo, Brasil), utilizado como anestésico, associado ao Cloridrato de Cetamina. Administrado por via i.p. na dose de 10 mg/kg, por animal.

Anticorpos para ensaios imunohistoquímicos foram originários de Santa Cruz Biotechnology® (Dallas, Texas, E.U.A), Merck-Millipore® (Darmstadt, Alemanha) ou Abcam Plc® (Cambridge, Reino Unido). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3 Procedimento anestésico para realização da cirurgia estereotáxica

Os animais submetidos à cirurgia estereotáxica foram inicialmente pesados, e depois anestesiados com uma solução combinada de Cloridrato de Cetamina (100 mg/kg) e Cloridrato de Xilazina (10 mg/kg), administrada por via i.p. O nível desejado da anestesia cirúrgica foi determinado pela ausência de reflexos de retirada ao estímulo doloroso provocado pelo “*pinch*” da cauda, e de endireitamento do corpo.

3.4 Cirurgia estereotáxica para indução de hemiparkinsonismo experimental (UNGERSTEDT, 1968)

O procedimento de lesão unilateral do corpo estriado direito (CED) foi realizado através de cirurgia estereotáxica, utilizando um aparelho estereotáxico (Stoelting®, E.U.A.) com uma seringa *Hamilton*® acoplada, para administração da 6-OHDA diretamente no CED (Figura 5). Esse modelo de hemiparkinsonismo experimental com 6-OHDA foi proposto por Ungerstedt (1968).

Após sedação, os animais foram submetidos à tricotomia da região superior da cabeça, e fixados ao aparelho estereotáxico através das barras intra-auriculares e dentes incisivos superiores. Álcool iodado tópico 1% foi utilizado para assepsia local, seguindo com a administração de 0,2 mL de lidocaína 2% com vasoconstrictor, abaixo da derme que recobre o crânio dos ratos.

Com auxílio de um bisturi, foi realizada uma incisão na linha mediana de aproximadamente 1 cm de comprimento na pele que recobre o crânio dos animais para exposição das suturas ósseas. O bregma e o lambda foram localizados e posicionados no aparelho estereotáxico de forma que ficassem no mesmo plano horizontal, garantindo a localização correta do CED.

Figura 5 - Aparelho estereotáxico.



Fonte: Arquivo pessoal.

A partir do bregma, duas coordenadas de acesso ao CED foram marcadas de acordo com o atlas de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (2005), Quadro 2. Utilizando uma broca odontológica (Dremel®), foram feitas duas perfurações no crânio, permitindo entrada da seringa *Hamilton*® de 5 μ L diretamente no CED. Os animais receberam duas microinjeções de 6-OHDA (mantida refrigerada durante a cirurgia) dissolvida em solução salina 0,9% com 0,2% de ácido ascórbico na concentração de 6 μ g/ μ L em cada sítio do CED, perfazendo um total de 12 μ g/2 μ L (MACHADO-FILHO et al., 2014). A injeção foi realizada a um fluxo aproximado

de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ e a agulha foi deixada no local cerca de 5 min para assegurar a difusão da 6-OHDA no tecido cerebral, antes de ser lentamente retirada (THIELE et al., 2012).

Após o término da cirurgia, a incisão foi suturada com fio cirúrgico de náilon 3.0 e desinfetada com álcool iodado 1%. Em seguida, os animais foram colocados em caixas limpas e mantidos aquecidos para manutenção da temperatura corpórea, sendo observados até retornarem da anestesia.

Quadro 2 - Sítios das lesões unilaterais no CED com a 6-OHDA.

Coordenadas estriatais	1^a	2^a	Ponto de referência
Anteroposterior (AP)	+0,5	-0,9	Bregma
Mediolateral (ML)	-2,5	-3,7	Bregma
Superoinferior (SI)	+5,5	+6,5	Dura-máter

Fonte: PAXINOS; WATSON, 2005.

Os animais do grupo falso-operado (FO) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina 6-OHDA, sendo somente introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas (Quadro 2), seguido de infusão de 1 μL de solução salina 0,9% com 0,2% de ácido ascórbico em cada sítio do CED.

3.5 Protocolo de tratamento experimental com (-)-linalol

Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos com 8 ratos cada. Os animais submetidos à lesão nigroestriatal com 6-OHDA foram tratados com (-)-linalol nas doses 25, 50 e 100 mg/kg/dia, v.o., por 17 dias. O grupo controle com lesão nigroestriatal e o grupo FO (sem lesão nigroestriatal) foram tratados com veículo, 1 mL/kg/dia, v.o., por 17 dias (Quadro 3).

O tratamento iniciou-se 24 h após o procedimento cirúrgico, continuando por 17 dias. Decorridos 15 (quinze) dias após a cirurgia, 1 h após a administração do (-)-linalol ou veículo, os animais foram submetidos aos testes comportamentais, e a eutanásia ocorreu no 20^o ou 21^o (vigésimo ou vigésimo primeiro) dia.

As doses de (-)-linalol utilizadas neste trabalho foram determinadas a partir de pesquisa na literatura (BATISTA et al., 2010; COELHO et al., 2011; 2013; MEHRI et

al., 2015), e de teste piloto realizado no Laboratório de Neuropsicofarmacologia da UFC.

Quadro 3 - Protocolo de tratamento experimental com (-)-linalol.

Grupos	Tratamento
1 - Falso-operado	Veículo - Tween 80 + Solução salina 0,9%, v.o., durante 17 dias
2 - Controle 6-OHDA, sem tratamento (-)-linalol	Veículo - Tween 80 + Solução salina 0,9%, v.o., 17 dias
3 - 6-OHDA + (-)-linalol 25 mg/kg/dia	(-)-linalol na dose 25 mg/kg/dia + Veículo, v.o., 17 dias
4 - 6-OHDA + (-)-linalol 50 mg/kg/dia	(-)-linalol na dose 50 mg/kg/dia + Veículo, v.o., 17 dias
5 - 6-OHDA + (-)-linalol 100 mg/kg/dia	(-)-linalol na dose 100 mg/kg/dia + Veículo, v.o., 17 dias

*Veículo= Tween 80 + Solução salina 0,9%

3.6 Testes Comportamentais

No 16º dia após a cirurgia, todos os animais foram submetidos a testes comportamentais, com o objetivo de avaliar o grau de lesão dos neurônios dopaminérgicos (Teste de Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina), atividade locomotora e exploratória vertical e horizontal (Teste do Campo Aberto), assimetria dos membros anteriores (Teste do Cilindro), memória operacional (Teste do Labirinto em Y), memória de curta e longa duração (Tarefa de Reconhecimento de Objetos - TRO), comportamento tipo-depressivo (Teste do Nado Forçado) e função olfatória (Teste de Discriminação Olfatória). Dois protocolos experimentais distintos foram utilizados na realização dos Testes de Memória de Curta e Longa Duração. Isso, porque o animal que realiza o Teste de Memória de Curta Duração, guarda pistas espaciais e tende a apresentar preferência pelos objetos ainda não utilizados num segundo momento, impedindo-o de realizar o Teste de Longa Duração. Os demais testes comportamentais foram realizados pelos animais de ambos os protocolos, conforme descrito nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Protocolo Experimental I mostrando a sequência cronológica dos testes comportamentais realizados.

Dias	Procedimentos	Grupos
1º	Cirurgia com 6-OHDA	6-OHDA, e 6-OHDA + LIN 25, 50 e 100 mg/kg
	Cirurgia com salina	FO
2º - 18º	Tratamento com (-)-linalol	6-OHDA + LIN 25, 50 e 100 mg/kg
	Tratamento com veículo	6-OHDA e FO
16º	Teste do Campo Aberto e Labirinto em Y	Todos
17º	Teste de Memória de Curta Duração e do Cilindro	Todos
18º	Teste de Discriminação Olfatória e do Nado Forçado (Treino)	Todos
19º	Teste do Nado Forçado e Rotacional Induzido por Apomorfina	Todos
20º	Eutanásia e dissecação dos cérebros	As amostras foram destinadas aos testes bioquímicos, neuroquímicos e imunohistoquímicos

Estes testes comportamentais foram escolhidos porque são de fácil aplicabilidade, requerem pouco ou nenhum treinamento e são de baixo custo. Os animais foram submetidos a, no máximo, dois testes por dia, e o último teste realizado foi o Teste Rotacional Induzido por Apomorfina.

Tabela 2 - Protocolo Experimental II mostrando a sequência cronológica dos testes comportamentais realizados.

Dias	Procedimentos	Grupos
1º	Cirurgia com 6-OHDA	6-OHDA, e 6-OHDA + LIN 25, 50 e 100 mg/kg
	Cirurgia com salina	FO
2º - 18º	Tratamento com (-)-linalol	6-OHDA + LIN 25, 50 e 100 mg/kg
	Tratamento com veículo	6-OHDA e FO
16º	Teste do Campo Aberto e Labirinto em Y	Todos
17º	Teste de Memória de Longa Duração (Treino)	Todos
18º	Teste de Memória de Longa Duração e do Cilindro	Todos
19º	Teste de Discriminação Olfatória e do Nado Forçado (Treino)	Todos
20º	Teste do Nado Forçado e Rotacional Induzido por Apomorfina	Todos
21º	Eutanásia e dissecação dos cérebros	As amostras foram destinadas aos testes bioquímicos, neuroquímicos e imunohistoquímicos

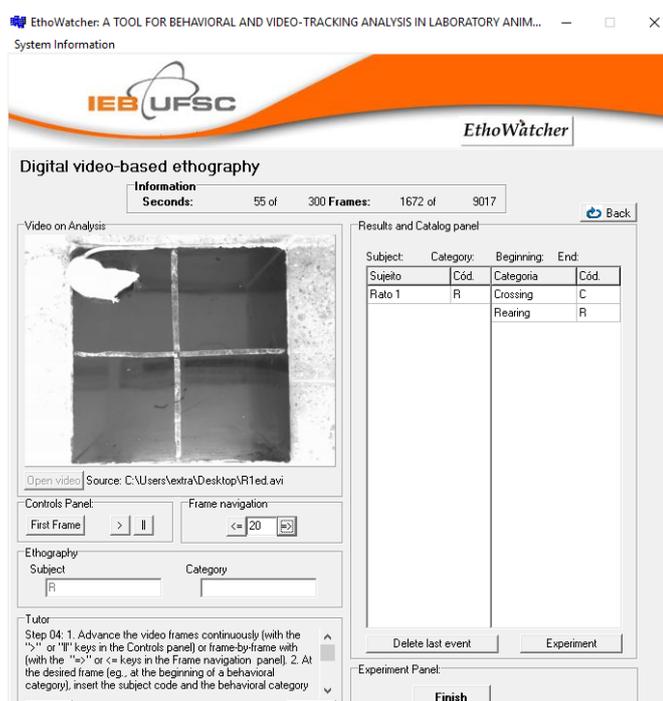
Todos os testes comportamentais aconteceram na fase clara do ciclo, entre 9:00 e 15:00 h, de modo a minimizar as influências de flutuações do ritmo circadiano dos animais. Os ratos foram aclimatados a sala de experimentação 1 h antes do início dos testes. A sala de experimentação foi mantida com iluminação e temperatura controlada a 22 ± 2 °C, no período de aclimação e durante os testes, de modo que os animais se adaptassem ao ambiente experimental.

Os testes comportamentais foram gravados com o uso de uma Webcam (Logitech®, C270 Hd 720p), com exceção do Teste Rotacional Induzido por Apomorfina, colocada sobre o aparato experimental, ligada a um computador em

uma sala adjacente à sala de testes, que registrou os parâmetros comportamentais utilizando o programa Virtualdub®. Os vídeos produzidos foram armazenados para análise posterior, através do software de análise comportamental Ethowatcher®, Figura 6. Esse software foi desenvolvido no Laboratório de Neurofisiologia Comparada (CRISPIM JUNIOR et al., 2012) e está disponível gratuitamente no site www.ethowatcher.ufsc.br.

Os aparatos utilizados nos testes foram limpos com uma solução hidroalcoólica 10% e toalhas de papel para secar, cada vez que um animal foi testado. A limpeza minimiza uma possível interferência de substâncias liberadas pela urina ou fezes dos animais, cujo odor pode influenciar no comportamento do animal (ABEL; BILITZKE, 1990).

Figura 6 - Imagem da tela de monitoramento do comportamento no Ethowatcher®.



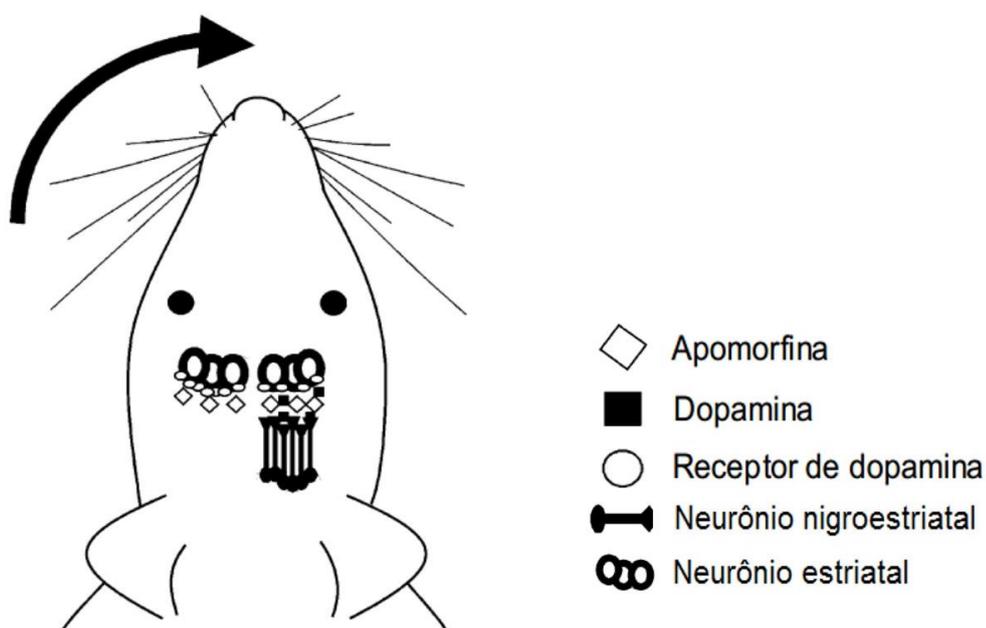
Fonte: Arquivo Pessoal.

3.6.1 Avaliação do Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970)

A apomorfina é um agonista direto dos receptores D2, sua administração em animais com lesão unilateral com 6-OHDA induz rotações contralaterais ao

hemisfério lesionado (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970; KIRIK et al., 1998; HENDERSON et al., 2003), Figura 7. O comportamento rotacional é um teste muito utilizado para indicação do grau de lesão dos neurônios dopaminérgicos no modelo de parkinsonismo (KIRIK et al., 1998), uma vez, que este teste é sensível para lesões estriatais com extensões maiores que 80% (DEUMENS et al., 2002). Também é utilizado para avaliação de novos medicamentos para o tratamento da DP (UNGERSTEDT, 1976).

Figura 7 - Desenho esquemático de rato com perda parcial de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais após lesão unilateral induzida por 6-OHDA.



O animal gira para o lado que apresentar menor densidade de receptores dopaminérgicos em neurônios estriatais após desafio com apomorfina, decorrente de uma *up regulation* dos receptores dopaminérgicos no lado não-lesionado. Fonte: Adaptado de Da Cunha et al. (2008).

A avaliação do comportamento rotacional dos animais por apomorfina foi realizada no 19º e 20º (décimo nono e vigésimo) dia após a lesão unilateral no CED com 6-OHDA. Os animais receberam uma injeção i.p. de 1 mg/kg de apomorfina (Sigma-Aldrich®, E.U.A.) dissolvida em solução salina 0,9% (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados em um aparato circular de plástico medindo 25 cm de diâmetro e 20 cm de altura

para monitoramento do número de rotações completas em volta do próprio eixo (Figura 8), tanto para o lado contralateral quanto para o lado ipsilateral ao CED lesionado, durante 60 min (DA CUNHA et al., 2008). Os animais do grupo 6-OHDA que apresentaram um número de rotações inferior a 150/h foram excluídos do estudo.

Figura 8 - Animal no Teste Rotacional Induzido por Apomorfina.



Fonte: Arquivo Pessoal.

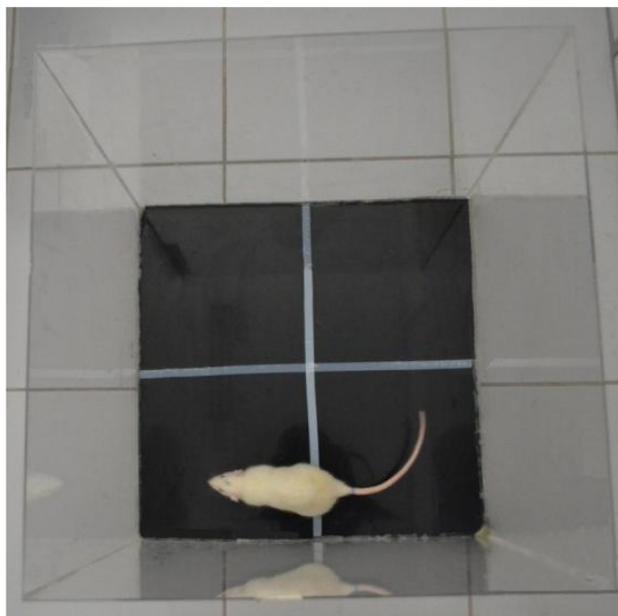
3.6.2 Teste do Campo Aberto (*Open Field Test*) (Adaptado de BROADHURST, 1960)

O teste do campo aberto ou "*Open Field Test*", proposto por Hall em 1934, permite a avaliação da atividade locomotora e exploratória do animal (HALL, 1934). Esse teste também permite avaliar a atividade estimulante ou depressora de substâncias sobre o sistema motor dos animais. Substâncias estimulantes do SNC tendem a aumentar os parâmetros comportamentais registrados no modelo, enquanto substâncias depressoras tendem a diminuí-los. A tendência natural do animal em um ambiente novo é de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pela novidade (ARCHER, 1973).

O campo aberto utilizado consiste de uma arena quadrada confeccionada em acrílico transparente, com 50 cm de diâmetro e 50 cm de altura, com o fundo preto

dividido em quatro quadrantes iguais por duas linhas brancas (Figura 9). O aparelho foi construído a partir de uma adaptação do modelo sugerido por Broadhurst (1960).

Figura 9 - Arena do Teste do Campo Aberto dividido em quatro quadrantes iguais.



Fonte: Laboratório de Neurociência e Comportamento, UFC.

No teste, os animais foram colocados individualmente no centro da arena e deixados para explorá-la por 5 min (SNOWDON et al., 1964), para registro do número de cruzamentos “*crossings*” com as quatro patas de um quadrante para o outro (movimentação espontânea). Também foi avaliado o número de levantamentos do animal para explorar o ambiente, mantendo-se suspenso apenas pelas patas traseiras e sem apoiar-se nas paredes do aparato, caracterizando o comportamento exploratório vertical “*rearing*”.

Após cada sessão experimental, a arena foi limpa com solução hidroalcoólica 10% e toalhas de papel para secar, a fim de evitar interferências pelo cheiro de urina e fezes do animal previamente testado, no resultado do animal subsequente.

3.6.3 Teste do Cilindro (*Limb-use Asymmetry Test*) (Adaptado de SCHALLERT et al., 2000)

O teste do cilindro ou "*Limb-use Asymmetry Test*", desenvolvido por Schallert e colaboradores (2000), é utilizado para avaliar a assimetria no uso dos membros anteriores na atividade exploratória vertical - *rearing*. Mas também, pode ser utilizado para avaliar perda de DA nigroestriatal (TILLERSON et al., 2001; 2002).

O aparato utilizado consiste de um cilindro transparente de 18 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Cada animal foi colocado individualmente no cilindro para explorá-lo durante 5 min. Foi registrado o número de contatos do membro anterior não comprometido (ipsilateral, direito), do membro anterior comprometido (contralateral, esquerdo) e de ambos os membros simultaneamente na parede do cilindro durante a elevação e movimentos laterais (Figura 10). Animais com menos de 10 toques com os membros anteriores na parede do cilindro foram excluídos da análise (GULLEY, 2007). E, por limitações da filmagem, caso o avaliador não pudesse determinar se um membro estava sendo utilizado ou não, contatos desse membro na parede do cilindro não foram considerados.

Figura 10 - Animal durante o movimento de *rearing* no Teste do Cilindro.



Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados foram expressos em termos de percentagem do uso do membro ipsilateral e contralateral, assim como o uso de ambos os membros simultaneamente em relação ao número total de movimentos dos membros anteriores (ipsilateral+contralateral+ambos). Tal como demonstrado pelas equações:

- Percentual ipsilateral $[(\text{ipsilateral} / \text{Total}) \times 100]$.
- Percentual contralateral $[(\text{contralateral} / \text{Total}) \times 100]$.
- Percentual de ambas $[(\text{ambas} / \text{Total}) \times 100]$.

3.6.4 Testes de Avaliação da Memória

Os testes de avaliação da memória utilizados foram o Teste do Labirinto em Y (*Y-maze Test*), para análise da memória operacional, e a Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO) para o estudo da Memória de Curta e Longa Duração.

3.6.4.1 Teste do Labirinto em Y (*Y-maze Test*) (SARTER et al., 1988)

Proposto por Montgomery (1955), o teste do labirinto em forma de Y ou *Y-maze* é utilizado na avaliação da memória operacional (*working memory*) em roedores (CHEN et al., 2010; OKOJIE; OYEKUNLE, 2013). O *Y-maze* utilizado neste estudo consiste de uma caixa acrílica preta com 3 braços iguais (35 cm de altura x 40 cm de comprimento x 12 cm de largura), com um ângulo de 120° entre eles (Figura 11). Antes do teste, os braços foram numerados em 1, 2 e 3. O animal é colocado individualmente no centro do labirinto para explorá-lo por 8 min (SARTER et al., 1988). Registrou-se o número e a sequência de todos os braços visitados pelo animal, a fim de determinar o número de alternâncias corretas. A entrada em um braço do labirinto foi considerada quando o animal entrou neste braço com as 4 patas. Animais com menos de 10 entradas nos braços foram excluídos da análise.

Uma alternância é considerada correta se o animal visita um novo braço e não retorna aos dois braços anteriormente visitados, ou seja, alternâncias do tipo 123, 132, 231, 213, 321 ou 312, não sendo considerada alternância correta a tríade 313, por exemplo. A percentagem de alternância para cada rato foi definida como: a razão entre o número de alternâncias corretas e o número total de entradas nos braços menos dois, multiplicado por 100, tal como demonstrado pela equação abaixo (YAMADA et al., 1996). Entre cada sessão experimental, o labirinto foi limpo

com solução hidroalcoólica 10% e toalhas de papel para secar, cada vez que um animal foi testado.

$$\text{Alterações espontâneas (\%)} = \frac{\text{Número de alternâncias corretas}}{\text{Número total de entradas} - 2} \times 100$$

Figura 11 - Animal durante o Teste do Labirinto em Y.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.6.4.2 Tarefa de Reconhecimento de Objetos - TRO (Adaptado de ENNACEUR; DELACOUR, 1988)

Na década de 1980, Ennaceur e Delacour propuseram uma TRO para o estudo da memória de curta e longa duração em ratos. Roedores possuem uma preferência natural para explorar objetos novos mais do que objetos familiares (ENNACEUR; DELACOUR, 1988). Nesse teste, foi utilizado uma arena quadrada confeccionada em acrílico transparente, a mesma utilizada no teste do campo aberto.

Os objetos utilizados eram fabricados em material biologicamente neutro (plástico ou vidro), apresentavam textura, cor e tamanho semelhantes, mas diferentes quanto à forma, e pesados o suficiente para que o animal não conseguisse movê-los.

No primeiro dia, antes de qualquer procedimento, o animal foi colocado no campo aberto, e deixado por 5 min, sem nenhum objeto, para adaptação ao aparato. Após 24 h, o animal foi reexposto a arena com dois objetos idênticos (denominados A1 e A2) posicionados paralelamente, a 10 cm das paredes, para exploração por 5 min e, em seguida, devolvido à sua gaiola moradia. Para avaliação da memória de curta duração, 1,5 h após o treinamento, o animal foi novamente apresentado ao campo por 5 min na presença de um objeto familiar (A3) na mesma localização e um novo objeto substituindo o que foi retirado (B) (Figura 12). Para a realização do teste de memória de longa duração, foi selecionado um novo grupo de animais que passou pelas mesmas condições de adaptação ao aparato, treinamento e teste descritas anteriormente, porém com um intervalo de 24 h para a sessão de teste (Figura 12).

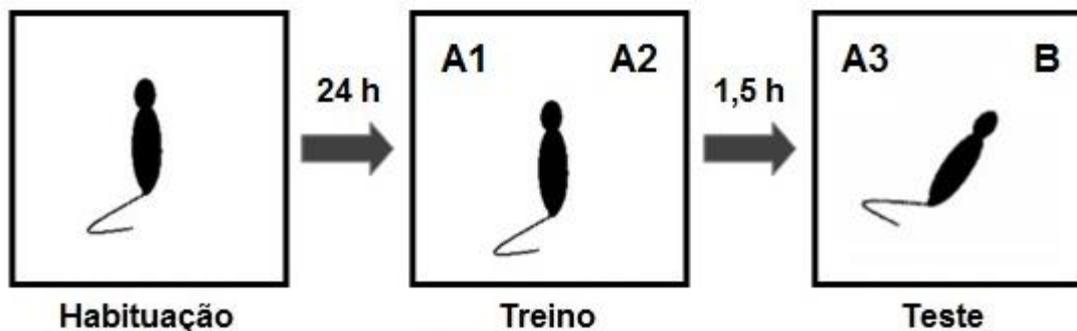
Em ambas as tarefas, foi registrado o tempo de exploração de cada objeto na sessão de teste (novo e familiar), que foi utilizado para medir o índice de discriminação entre os objetos. Na TRO, esta variável foi estabelecida pela equação matemática: razão do tempo de exploração do objeto novo pela soma do tempo de exploração do objeto novo e familiar ($B / B + A3$) (ENNACEUR et al., 1997).

O índice de discriminação foi avaliado, porque ele indica relação entre o tempo de exploração dos objetos. Este índice pode variar entre -1 a +1, indicando se a exploração aconteceu ao acaso (quando a relação está próxima de zero), se o animal discriminou entre o objeto novo e o objeto familiar (quando o valor da relação se aproxima de +1), ou ainda, quando o animal não consegue discriminar os objetos, explorando mais o objeto familiar (quando o valor da relação se aproxima de -1).

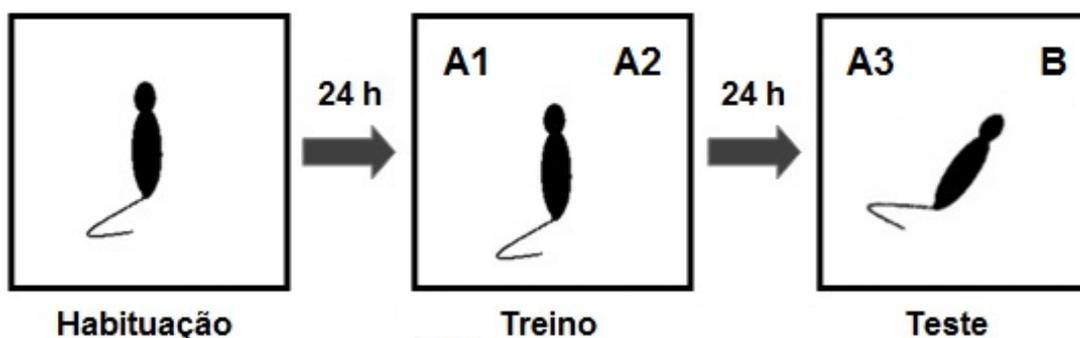
Foi definido como atividade exploratória quando o focinho do animal tocou ou esteve a menos de 1 cm do objeto. Ações como subir no objeto ou a permanência do focinho do animal próximo ao objeto sem atividade exploratória, não foram contabilizadas. Entre cada sessão experimental, o campo aberto e os objetos foram limpos com solução hidroalcoólica 10% e toalhas de papel para secar.

Figura 12 - Esquema da TRO para Memória de Curta e Longa Duração.

Memória de Curta Duração



Memória de Longa Duração



Fonte: Adaptado de Ennaceur et al. (2005).

3.6.5 Teste do Nado Forçado (*Forced Swim Test*)

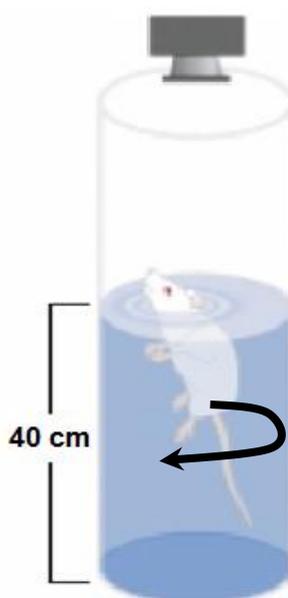
O modelo proposto por Porsolt et al. (1978) é amplamente utilizado para avaliação do efeito antidepressivo de drogas em modelos animais. Neste modelo, o animal é exposto a uma situação onde não há possibilidade de escape, em um tanque cilíndrico com uma quantidade de água que impede o apoio das patas e da cauda no fundo do cilindro e a fuga pela borda superior, que após um período de agitação inicial, eles adotam uma postura de imobilidade.

O teste do nado forçado consistiu de duas sessões de natação separadas por um intervalo de 24 h. Na primeira sessão (treino), os animais foram colocados individualmente em um cilindro circular acrílico de 60 cm de altura e 22 cm de diâmetro, contendo água a uma profundidade de 40 cm e temperatura ambiente, por 15 min. Na sessão de teste, os animais foram submetidos ao mesmo procedimento por 5 min. Nesta sessão foi avaliado o tempo de imobilidade do animal, ou seja, o

tempo que o animal permanece imóvel ou flutuando com movimentos mínimos para manter a cabeça acima do nível da água (Figura 13).

Ao término das sessões, os animais foram retirados do cilindro, secos e colocados em um ambiente aquecido por 10 min, antes de retornarem as suas caixas moradia. A água do cilindro foi trocada após cada sessão experimental e o aparato limpo com solução hidroalcoólica 10%, cada vez que um animal foi testado.

Figura 13 - Ilustração do Teste do Nado Forçado.



Fonte: Adaptado de Cryan et al. (2002).

3.6.6 Teste de Discriminação Olfatória (Adaptado de TILLERSON et al., 2006)

Proposto por Tillerson et al. (2006), o teste de discriminação olfatória é utilizado na avaliação de comprometimento da via olfatória. O animal é colocado individualmente no campo aberto com dois objetos idênticos, com 1 dos objetos contendo cheiro de fêmeas, para exploração por 2 min (TILLERSON et al., 2006).

Nesse teste, foi utilizado uma arena quadrada confeccionada em acrílico transparente, a mesma utilizada no teste do campo aberto (Figura 14). Os objetos consistiam em dois cilindros de vidro, com 3 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro, que eram fixados ao fundo da arena com fita adesiva sem cheiro, a fim de evitar o deslocamento pelos animais. Um dos cilindros foi colocado em gaiolas com fêmeas

pelas 12 h que antecediam o teste. Registrou-se o tempo que o animal explorou cada um dos cilindros, durante um período de dois min. Foi definido como atividade exploratória quando o focinho do animal tocou ou esteve a menos de 1 cm do cilindro.

Entre os testes, foram utilizados cilindros novos e o aparato experimental limpo com solução hidroalcoólica 10% e toalhas de papel para secar.

Figura 14 - Animal durante o Teste de Discriminação Olfatória.



Fonte: Arquivo pessoal.

3.7 Dissecção das áreas encefálicas para testes neuroquímicos e imunohistoquímicos

Após 24 h da realização dos testes comportamentais, os animais foram divididos para os testes neuroquímicos e imunohistoquímicos. Para os imunohistoquímicos, os animais foram eutanasiados por decapitação com uma guilhotina (Harvard, E.U.A.) sem utilização de anestésicos, pois a sua utilização pode interferir nos resultados da pesquisa, devido à sua ação no SNC. Os encéfalos foram removidos e acondicionados em formol tamponado 4% para fixação do material e, após 24 h, esta solução foi substituída por álcool 70% e, posteriormente, foram incluídos em parafina para o preparo das lâminas.

Para os testes neuroquímicos, os animais foram eutanasiados como descrito anteriormente, sendo os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio em placa de Petri com gelo. Em seguida, as áreas de interesse do estudo, o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC), corpo estriado direito (CED) e corpo estriado esquerdo (CEE), foram isoladas bilateralmente das estruturas circunjacentes por divulsionamento, com ajuda de uma pinça de microdissecação. Terminada a dissecação, as áreas foram acondicionadas em tubos de microcentrifuga devidamente identificados, pesadas e armazenadas a -70 °C até o dia da análise. O lado contralateral a lesão foi utilizado como controle.

3.8 Determinação da concentração de dopamina (DA) e seus metabólitos (DOPAC e HVA) por HPLC (LNF / UFC)

As concentrações de monoaminas foram determinadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), com detecção e quantificação eletroquímica. Utilizou-se um equipamento de HPLC da Shimadzu®, modelo C-R6A, Japão.

O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO₄) à 1% por aproximadamente 30 segundos, a seguir, o homogenato foi centrifugado a uma força centrífuga relativa (RCF, do inglês *Relative Centrifugal Force*) ou força G (x g) de 1764, por 15 min à 4 °C. O sobrenadante foi separado e filtrado através de uma membrana (Merck-Millipore® 0,2 µm), e uma alíquota de 20 µL foi retirada e injetada no equipamento de HPLC para análise eletroquímica.

Para a análise de DA e seus metabólitos ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA), foi utilizada uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 5 µm, Shimadzu®, Japão. A fase móvel utilizada foi composta por ácido cítrico 0,163 M (Grupo Química®, Rio de Janeiro, Brasil), pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico 0,69 M (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, E.U.A.), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v (Carlo Erba Reagents®, MI, Itália) e tetrahidrofurano 1,7% v/v (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, E.U.A.). A solução utilizada foi preparada pesando-se 17,75 g de ácido cítrico, o qual foi dissolvido em água milli-Q para um

volume de 400 mL e o pH ajustado para um valor igual a 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen®, Rio de Janeiro, Brasil).

A esta solução foi adicionado 75 mg de ácido octanosulfônico sódico e o volume acrescido para 471,5 mL com água milli-Q. A fase móvel foi então filtrada em um sistema a vácuo e deaerada por aproximadamente 3 min por um degaseificador a hélio, e acrescidos 20 mL de acetonitrila e 10 mL de tetrahidrofurano, completando um volume final de 500 mL. A seguir, foi colocada no HPLC para circular no sistema por 12 h (*overnight*) para equilíbrio da coluna, que operou num fluxo de 1 mL/min.

A DA e os seus metabólitos DOPAC e HVA, foram eletroquimicamente detectados usando um detector eletroquímico (Modelo L-ECD-6A, Shimadzu®, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). Para definição das concentrações de DA, DOPAC e HVA nas amostras, foram preparados padrões numa concentração final de 4 ng (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, E.U.A.). A partir da área sob a curva dos padrões, as concentrações de DA e seus metabólitos foram calculadas com ajuda do programa *Microsoft Office Excel*® 2016 e os resultados expressos em nanograma por grama de tecido (ng/g de tecido).

3.9 Determinação da concentração de aminoácidos por HPLC (LNF / UFC)

Para determinação das concentrações dos aminoácidos glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), taurina, glicina e tirosina, por questões técnicas, utilizou-se um segundo equipamento de HPLC, Waters® Alliance e2695 Separations Module, E.U.A. Após preparação do homogenato, como descrito anteriormente, e posteriormente associado a uma solução de derivatização pré-coluna, para obtenção de fluorescência, em uma proporção de 1:1. Um minuto depois do início dessa associação uma alíquota de 20 µL foi retirada e injetada no equipamento de HPLC para análise eletroquímica.

A análise dos aminoácidos foi realizada utilizando uma coluna Luna®, modelo C18(2) 100 Å, com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 5 µm. A fase móvel composta de duas fases: A (pH 6,95) - acetato de sódio (0,1 M), metanol (6% v/v) e tetrahidrofurano (1,5%); B - Metanol puro (100%), correu em um fluxo de 1 mL/min em um gradiente de 30 min de duração. Os aminoácidos foram detectados usando um detector de fluorescência (Modelo FLR-2475 da

Waters® Alliance, E.U.A.) com comprimento de ondas excitação e emissão de 370 e 450 nm, respectivamente. Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um computador usando um software da Waters® Alliance. Os níveis de aminoácidos foram determinados por comparação com os padrões injetados no HPLC no dia do experimento e foram expressos em $\mu\text{mol/g}$ de tecido.

3.10 Avaliação do Estresse Oxidativo

3.10.1 Determinação da peroxidação lipídica pela mensuração de Malondialdeído - MDA (DRAPER; HADELY,1990)

A peroxidação lipídica é avaliada pela mensuração de malondialdeído (MDA) em amostras biológicas, baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (ATB). Nesta reação, duas moléculas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) reagem com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo, que tem absorvância máxima em solução ácida em 532 a 535 nm.

Para analisar o efeito do tratamento com (-)-linalol sobre a determinação da peroxidação lipídica em modelo de 6-OHDA em ratos, foi avaliado as concentrações de MDA nos homogenatos do CE, CPF e HC dos animais. As amostras foram homogeneizadas a 10% em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) gelado, e colocadas para centrifugar a 1764 x g por 30 min à 4 °C. Após a centrifugação, 63 μL do sobrenadante foram colocados num tubo de microcentrífuga com 100 μL de HClO_4 35%, para interromper a peroxidação, e centrifugados a 784 x g por 10 min à 4 °C. Em seguida, 150 μL do sobrenadante foram retirados, e adicionados a 50 μL de ATB 1,2% aquecido. A mistura foi levada ao banho de água, por 30 min, a uma temperatura variável de 95 a 100 °C. A solução foi então retirada e colocada para esfriar a temperatura ambiente. Após isso, as amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços, e determinada a quantidade de absorvância das mesmas com espectrofotômetro com leitor de microplacas de Elisa, em 535 nm. A curva-padrão foi obtida mediante a leitura das concentrações de MDA - padrão.

A partir da absorvância das amostras, as concentrações de MDA foram calculadas com ajuda do programa *Microsoft Office Excel*® 2016 e os resultados

expressos em μg de MDA por grama de tecido ($\mu\text{g/g}$ de tecido) (OHKAWA et al., 1979).

3.10.2 Dosagem de Nitrito/Nitrato (GREEN et al., 1982)

A molécula de NO é extremamente tóxica e danifica proteínas, lipídeos de membrana e ácido desoxirribonucleico (DNA). A partir da dosagem de nitrito e nitrato (NO_2/NO_3) de forma indireta é possível quantificar a produção de NO, haja vista que são seus metabólitos. Para verificar o efeito do tratamento com (-)-linalol na produção de NO em modelo de 6-OHDA em ratos, foi determinado os níveis de nitrito (NO_2) nas amostras de CE, CPF e HC de todos os grupos.

Para realização do ensaio, homogenato das áreas cerebrais a 10% em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) foi preparado, e colocado para centrifugar a $1764 \times g$, por 30 min à 4°C . Após a centrifugação, uma alíquota de 50 μL do sobrenadante foi transferida para uma placa de 96 poços, e incubada com 50 μL do reagente de Griess [sulfanilamida 1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, E.U.A.) em ácido fosfórico (H_3PO_4) 5%, dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NEED) 0,1% (Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, E.U.A.) em água destilada, H_3PO_4 5% e água destilada (1:1:1:1)] à temperatura ambiente por 10 min, para determinação da produção de NO_2 . Após o intervalo para a reação da amostra com o reagente de Griess, a absorvância é medida em espectrofotômetro com leitor de ELISA a 540nm.

A concentração de NO_2 foi determinada a partir de uma curva-padrão de Nitrito de Sódio (NaNO_2) (GREEN et al., 1982). Foram pesados 7 mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água destilada. Foram feitas as diluições em série (10 e 2x), com as seguintes concentrações: 1 mmol, 100 μmol , 50 μmol , 25 μmol , 12,5 μmol , 6,25 μmol , 3,12 μmol e 1,56 μmol .

A partir da absorvância das amostras, as concentrações de NO_2 foram calculadas com ajuda do programa *Microsoft Office Excel*® 2016 e os resultados expressos em μmol de NO_2 por grama de tecido ($\mu\text{mol/g}$ de tecido).

3.10.3 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) (SEDLAK; LINDSAY, 1968)

A glutathiona, um tripeptídeo (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), agindo direta ou indiretamente em processos biológicos importantes, incluindo metabolismo e proteção celular. Alterações na concentração deste tripeptídeo podem ser um indicador útil de desordens fisiológicas com alteração do estado antioxidante (MEISTER; ANDERSON, 1983).

A dosagem da concentração de GSH foi realizada através da determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona), de acordo com a metodologia descrita por Sedlak e Lindsay (1968). Baseia-se na reação do reagente de Ellman, o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) – DTNB, com o tiol livre gerando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico (TNB). Para analisar o efeito do tratamento com (-)-linalol sobre a concentração de glutathiona em modelo de 6-OHDA em ratos, foram avaliadas as concentrações de GSH nos homogenatos do CE, CPF e HC de todos os grupos.

As amostras foram homogeneizadas a 10% em tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,4) gelado, e colocadas para centrifugar a 1764 x g por 30 min à 4 °C. Após a centrifugação, uma alíquota de 65,57 μ L do sobrenadante foi adicionada a 52,45 μ L de água destilada, e 13,11 μ L de ácido tricloroacético (ATC) 50%, num tubo de microcentrífuga. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 196 x g por 15 min à 4 °C. Depois de centrifugado, 65,57 μ L do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços, e adicionou-se 131,14 μ L de tampão Tris HCl 0,4 M [do inglês *Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*], dissolvido em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) 0,05 M + água destilada, pH 8,9. As amostras permaneceram resfriadas durante todo o ensaio. Por fim, logo antes da leitura, foi adicionado 3,27 μ L de DTNB 0,01 M (dissolvido em metanol) e a absorbância determinada a 412 nm, em espectrofotômetro.

A concentração de GSH foi determinada a partir de uma curva-padrão. Foram pesados 5 mg de GSH e dissolvidos em 5 mL de água destilada (1 mg/mL). Foram feitas as diluições em série (10 e 2x), com as concentrações: 1 mg, 100 μ g, 50 μ g, 25 μ g, 12,5 μ g, 6,25 μ g, 3,12 μ g e 1,56 μ g.

A partir da absorbância das amostras, as concentrações de GSH foram calculadas com ajuda do programa *Microsoft Office Excel*® 2016 e os resultados expressos em µg de GSH por grama de tecido (µg/g de tecido).

3.11 Análise Imunohistoquímica

3.11.1 Análise imunohistoquímica para Tirosina Hidroxilase - TH (LNF / UFC)

A Tirosina Hidroxilase (TH) é uma enzima limitante na síntese de DA que catalisa a hidroxilação do aminoácido L-tirosina para L-Dopa, podendo ser utilizada como um importante marcador molecular de neurônios dopaminérgicos (BASTIDE et al., 2015). Na DP há uma deficiência de TH, assim como baixos níveis de DA. A detecção imunohistoquímica foi realizada sobre cortes estriatais, o lado lesionado e não lesionado, para examinar a extensão da desnervação presente no CE.

Os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em graduações decrescentes de álcool até a água destilada. Para a recuperação antigênica, foram imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento a 90 °C em banho-maria, por 15 min. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foram lavados 3 vezes com solução tampão fosfato salina (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) - pH 7,4 por 5 min, intercalado com o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% (H₂O₂) durante 10 min, e depois lavados mais 2 vezes por 5 min em PBS. Foram incubados com o anticorpo primário (1:100, anti-TH; anticorpo produzido em coelho, Merck-Millipore®, Alemanha) durante a noite a 4 °C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS por 5 min, e em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo secundário (1:100, anti-rabbit de cabra, Santa Cruz®, E.U.A.), de acordo com as instruções do fabricante. A revelação foi feita com DAB (diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 0,03%) por 5-10 min. Em seguida, os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de álcool (50, 70 e 100%), diafanizados e montados em meio à base de xilol (Entellan®), e posteriormente examinadas em microscópio ótico.

3.11.2 Análise imunohistoquímica para Transportador de Dopamina - DAT (LNF / UFC)

O transportador transmembrana de dopamina (DAT) está localizado na terminação nervosa pré-sináptica, onde é responsável pela recaptação de DA encontrada no espaço extracelular para dentro do terminal nervoso (GULLEY; ZAHNISER, 2003). Os receptores dopaminérgicos parecem apresentar alterações na DP (BA; MARTIN, 2015). O procedimento seguiu o mesmo para TH, com o anticorpo anti-DAT (produzido em cabra, Sigma-Aldrich® (St. Louis, Missouri, E.U.A.) diluído em 1:100.

3.11.3 Análise imunohistoquímica para TNF- α e COX-2 (LNF / UFC)

Pesquisas indicam que os níveis de TNF- α e COX-2 encontram-se aumentados em cérebros de pacientes com DP, e isso pode ser reproduzido no modelo animal com a 6-OHDA (OKUNO et al., 2005; KOPPULA et al., 2012; FISCHER; MAIER, 2015). As técnicas de imunohistoquímica seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente. Os anticorpos primários anti-TNF- α (produzido em coelho, Abcam®, Reino Unido) e anti-COX-2 (produzido em coelho, Santa Cruz Biotechnology®, E.U.A.) foram usados na diluição 1:200, de acordo com as instruções dos fabricantes.

Quadro 4 - Anticorpos primários utilizados para imunohistoquímica.

Anticorpos primários	Diluição	Fabricante	País
Anti-TH	1:100	Merck-Millipore®	Alemanha
Anti-DAT	1:100	Sigma-Aldrich®	E.U.A.
Anti-TNF- α	1:200	Abcam®	Reino Unido
Anti-COX-2	1:200	Santa Cruz Biotechnology®	E.U.A.

Quadro 5 - Anticorpos secundários utilizados para imunohistoquímica.

Anticorpos secundários	Diluição	Fabricante	País
Anti-rabbit	1:100	Santa Cruz Biotechnology®	E.U.A.
Anti-goat	1:100	Abcam®	Reino Unido

3.12 Cálculo da densidade ótica

Os cortes foram visualizados no microscópio Nikon® ECLIPSE Ni-U (Japão) e as fotomicrografias das áreas de interesse realizadas. Registros estes, utilizados para observação da imunorreatividade a TH, DAT, TNF- α e COX-2, através da análise semi-quantitativa da densidade ótica utilizando o software ImageJ 1.45s® (National Institutes of Health, E.U.A.). Foram feitas quatro imagens do CE lesionado e quatro do seu contralateral, com objetiva de 20X; a seguir, foi calculada a percentagem de densidade nas duas áreas em cada animal. O valor final da percentagem de densidade ótica de cada grupo advém de uma média das densidades de todos os animais.

4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o Software GraphPad Prism® 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, E.U.A.) e todos os dados expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados. Foram realizados testes de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparações múltiplas. Em todas as análises, foram consideradas, estatisticamente significantes, valores de $p < 0,05$. Estatística descritiva foi utilizada quando necessário.

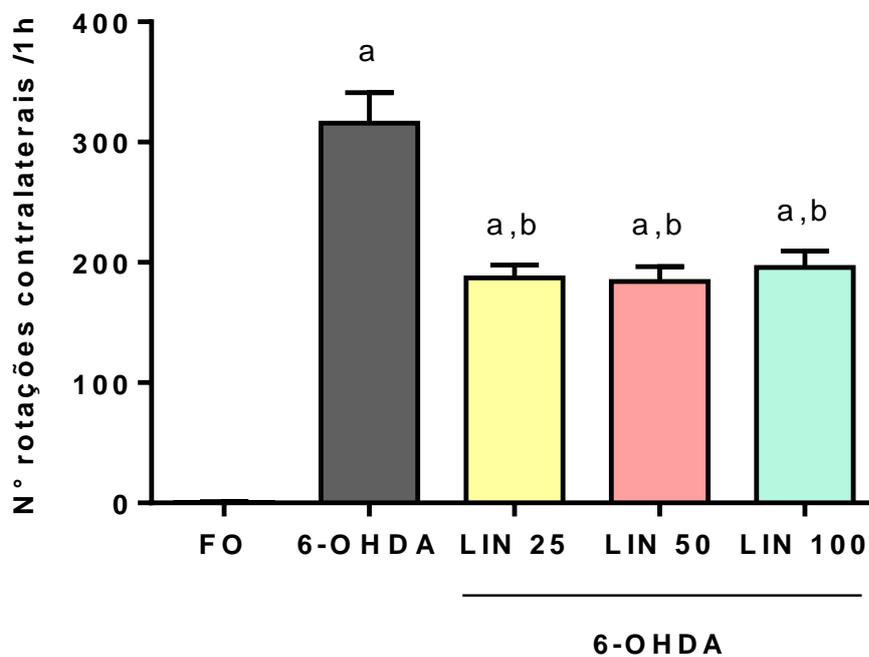
5 RESULTADOS

5.1 Efeito do (-)-linalol no Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

A severidade da lesão dos neurônios dopaminérgicos foi analisada através do teste rotacional por apomorfina, que é considerado um teste padrão para confirmar a reprodutibilidade do modelo de hemiparkinsonismo experimental com 6-OHDA. Os resultados mostraram que o grupo 6-OHDA não tratado apresentou um número 570 vezes maior de rotações contralaterais em 1 h, quando comparado ao grupo FO (6-OHDA: $316 \pm 25,21$; FO: $0,55 \pm 0,55$; $p < 0,0001$). Nos grupos tratados com (-)-linalol, houve redução estatisticamente significativa no número de rotações contralaterais nas doses 25 mg/kg ($187,2 \pm 10,65$; $p < 0,0001$), 50 mg/kg ($184,1 \pm 12,47$; $p < 0,0001$) e 100 mg/kg ($195,9 \pm 13,63$; $p < 0,0001$), quando comparado ao grupo 6-OHDA não tratado [$F(4,95)=58,81$; $p < 0,0001$]. Representando uma redução de cerca de 40%, 42% e 38%, respectivamente. Não observando ação dose-dependente.

Demonstrou-se, portanto, que o (-)-linalol preveniu a degeneração dos neurônios dopaminérgicos estriatais nos animais tratados, sugerindo um efeito neuroprotetor, como mostra a Figura 15.

Figura 15 - Efeito do (-)-linalol sobre o Comportamento Rotacional Induzido por Apomorfina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



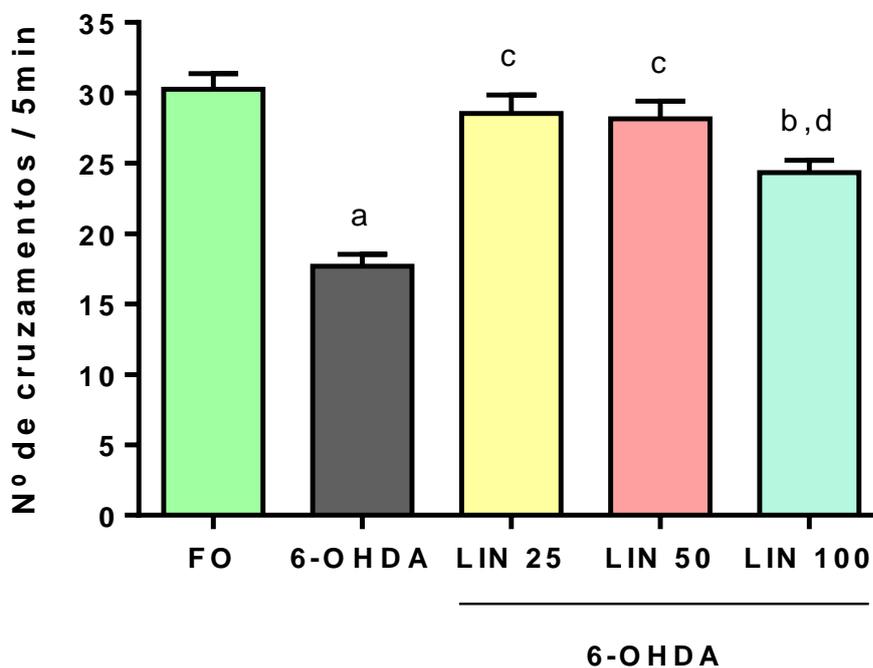
As barras representam o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina (1 mg/kg, i.p.) determinadas em 1 h. Foram utilizados 20 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.2 Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora no Teste do Campo Aberto

5.2.1 Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora espontânea no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

Para avaliar a atividade locomotora horizontal, o número de cruzamentos (*crossings*) no campo aberto foi analisado durante 5 min. O grupo 6-OHDA não tratado mostrou redução de 41,5% no número de cruzamentos nos quadrantes, quando comparado ao grupo FO (6-OHDA: $17,7 \pm 0,82$; FO: $30,25 \pm 1,11$; $p < 0,0001$). Este efeito foi estatisticamente revertido nos animais hemiparkinsonianos tratados com (-)-linalol, nas doses 25 mg/kg ($28,55 \pm 1,29$; $p < 0,0001$), 50 mg/kg ($28,15 \pm 1,27$; $p < 0,0001$) e 100 mg/kg ($24,35 \pm 0,85$; $p < 0,001$) [$F(4,95)=21,11$; $p < 0,0001$], Figura 16. Representando um aumento no número de *crossings* de cerca de 38%, 37% e 27%, respectivamente. Apesar dessas alterações na atividade locomotora, não foi observado prejuízo motor nos animais que os tornassem inaptos a realizar os demais testes comportamentais.

Figura 16 - Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora horizontal (*crossing*) avaliado no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

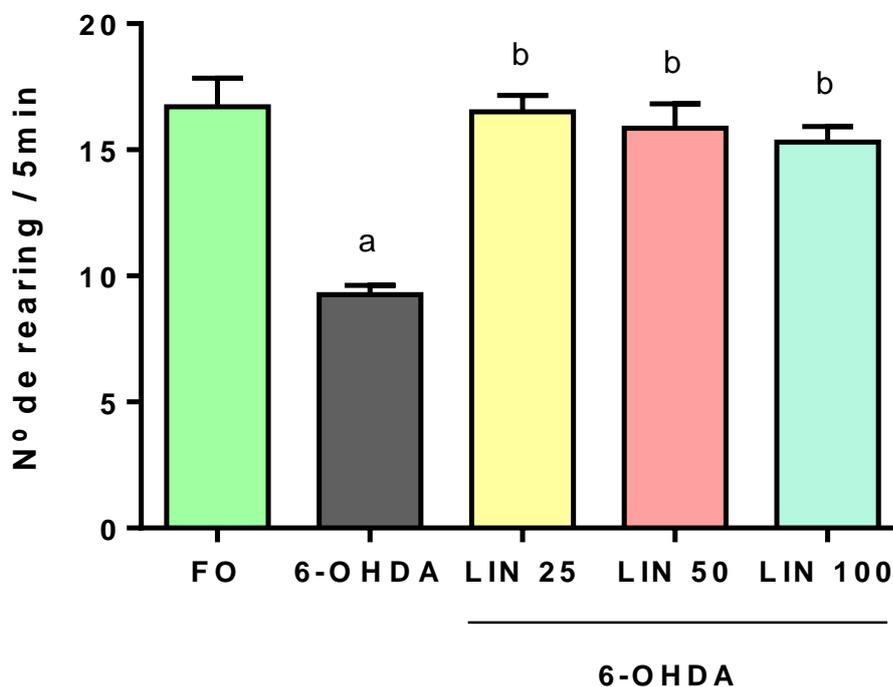


As barras representam o número de cruzamentos nos quadrantes no campo aberto, em 5 min. Foram utilizados 20 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; d vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.2.2 Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora vertical (*rearing*) no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

Na avaliação da atividade exploratória vertical (*rearing*), o grupo 6-OHDA não tratado apresentou uma redução de 45% no número de eventos, em relação ao grupo FO (6-OHDA: $9,25 \pm 0,37$; FO: $16,70 \pm 1,14$; $p < 0,0001$). Este efeito no número de *rearing* foi estatisticamente revertido nos animais hemiparkinsonianos tratados com (-)-linalol, nas doses 25 mg/kg ($16,50 \pm 0,65$; $p < 0,0001$), 50 mg/kg ($15,85 \pm 0,98$; $p < 0,0001$) e 100 mg/kg ($15,30 \pm 0,62$; $p < 0,0001$) [$F(4,95)=14,89$; $p < 0,0001$], Figura 17. Representando um aumento no número de *rearing* de cerca de 44%, 42% e 40%, respectivamente.

Figura 17 - Efeito do (-)-linalol na atividade locomotora vertical (*rearing*) avaliado no Teste do Campo Aberto em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras indicam o número de levantamentos pelos animais no campo aberto, em 5 min. Foram utilizados 20 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.3 Efeito do (-)-linalol na assimetria dos membros anteriores no Teste do Cilindro em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

O Teste do Cilindro foi utilizado para análise do uso das patas dianteiras pelos animais na atividade exploratória vertical (*rearing*), quando toca a parede do cilindro de forma independente, patas ipsi e contralateral à lesão, bem como de forma simultânea, ambas as patas.

Os animais do grupo 6-OHDA não tratado apresentaram um aumento significativo na percentagem de toques ipsilaterais (% toques ipsilaterais: 6-OHDA: $69,81 \pm 3,84$; FO: $49,13 \pm 2,19$; $p < 0,001$), uma diminuição significativa nos toques contralaterais (% toques contralaterais: 6-OHDA: $20,77 \pm 2,66$; FO: $48,47 \pm 2,68$; $p < 0,0001$) e com ambas as patas (% toques com ambas as patas: 6-OHDA: $4,21 \pm 0,48$; FO: $9,90 \pm 1,20$; $p < 0,001$), quando comparado ao grupo FO. O tratamento com (-)-linalol diminuiu significativamente a percentagem de toques ipsilaterais nos animais hemiparkinsonianos nas doses 25 e 50 mg/kg (% toques ipsilaterais: 6-OHDA + LIN25: $48,47 \pm 3,46$; $p < 0,001$; 6-OHDA + LIN50: $53,51 \pm 3,19$; $p < 0,01$; 6-OHDA + LIN100: $58,46 \pm 2,87$; $p > 0,05$) [$F(4,48)=7,77$; $p < 0,0001$], Figura 18. Também observou-se aumento significativo da frequência de toques contralaterais nos animais hemiparkinsonianos tratados nas três doses estudadas (% toques contralaterais: 6-OHDA + LIN25: $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN50: $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN100: $p < 0,01$) [$F(4,46)=15,91$; $p < 0,0001$], Figura 19. Os dados mostram aumento significativo da frequência de toques com ambas as patas nos animais hemiparkinsonianos tratados com a dose 25 mg/kg (% toques com ambas as patas: 6-OHDA + LIN25: $9,27 \pm 0,90$; $p < 0,01$; 6-OHDA + LIN50: $6,45 \pm 0,77$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN100: $6,05 \pm 0,92$; $p > 0,05$) [$F(4,40)=7,61$; $p < 0,0001$], ver Figura 20.

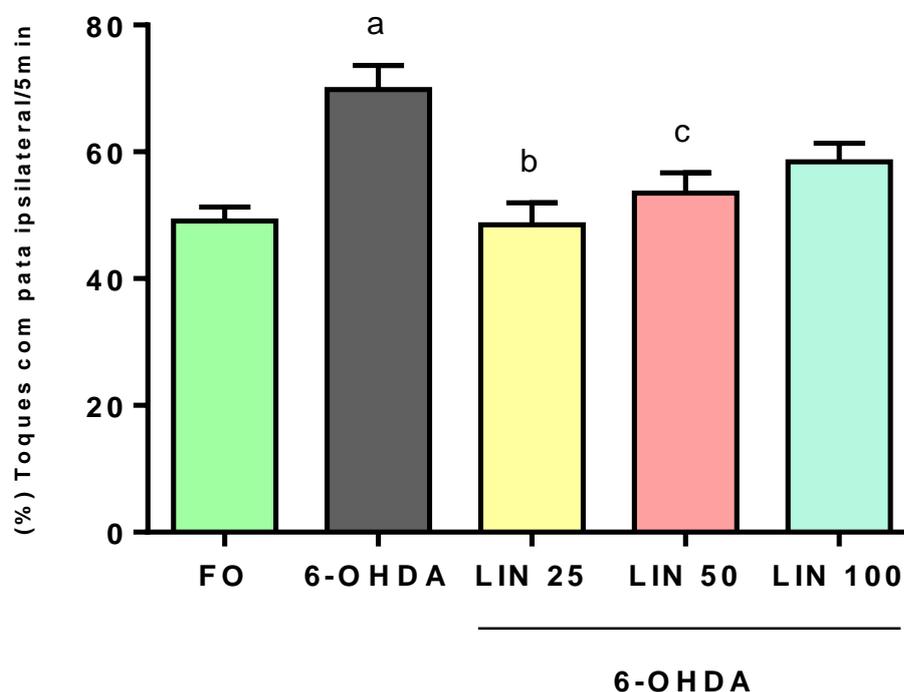
Os animais com hemiparkinsonismo (6-OHDA) apresentaram assimetria dos membros anteriores, parcialmente revertida após tratamento com (-)-linalol nas três doses estudadas, indicando prevenção do comprometimento motor nesses animais.

Tabela 3 - Percentagem de toques com as patas dianteiras na parede do cilindro (5 min)

Grupos	Pata ipsilateral a lesão (%)	Pata contralateral a lesão (%)	Ambas as patas (%)
FO	49,13 ± 2,19	48,47 ± 2,68	9,90 ± 1,20
6-OHDA	69,81 ± 3,84 ^a	20,77 ± 2,66 ^a	4,21 ± 0,48 ^a
6-OHDA + LIN 25 mg	48,47 ± 3,46 ^b	45,74 ± 2,76 ^b	9,27 ± 0,90 ^b
6-OHDA + LIN 50 mg	53,51 ± 3,19 ^b	42,45 ± 2,58 ^b	6,45 ± 0,77
6-OHDA + LIN 100 mg	58,46 ± 2,87	36,16 ± 2,64 ^{a,b}	6,05 ± 0,92 ^a

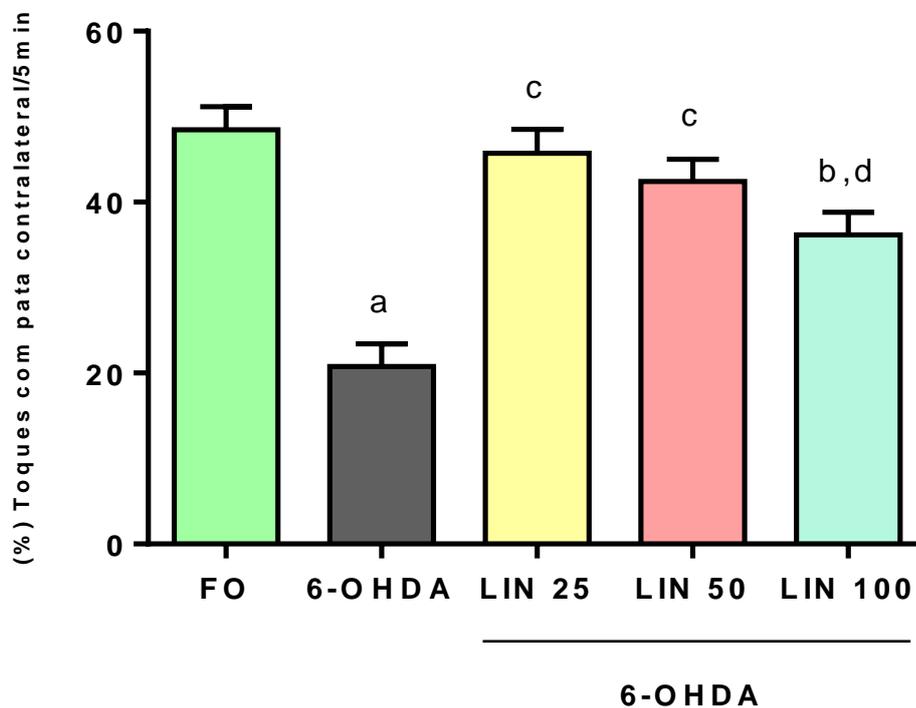
Foram utilizados 8 a 11 animais por grupo. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,05$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 18 - Efeito do (-)-linalol na assimetria no uso da pata ipsilateral anterior avaliado no Teste do Cilindro em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



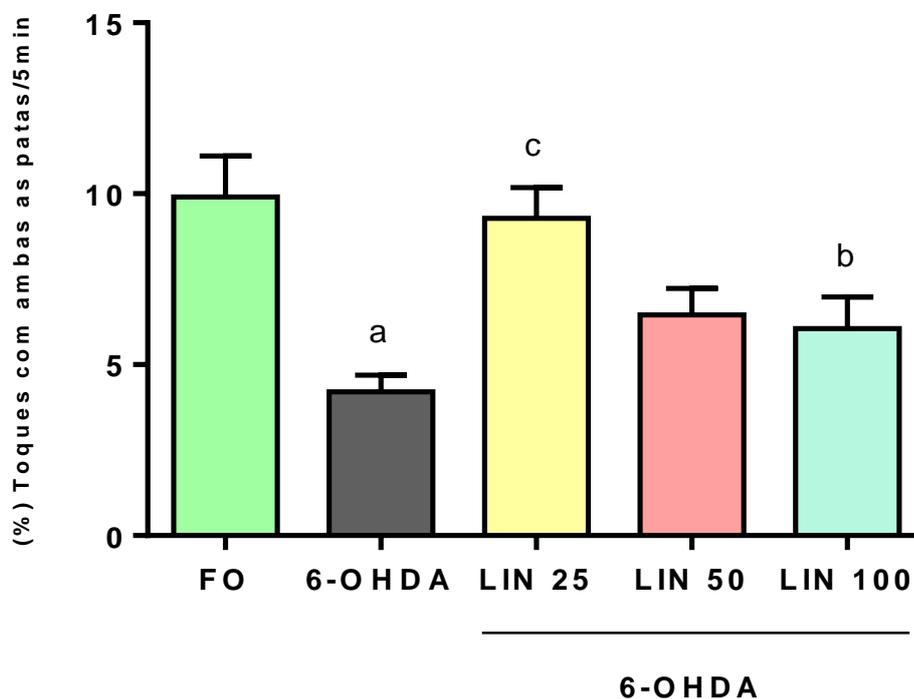
As barras representam a percentagem de toques com a pata ipsilateral à lesão, pelos animais no Teste do Cilindro, em 5 min. Foram utilizados 9 a 11 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,001$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 19 - Efeito do (-)-linalol na assimetria no uso da pata contralateral anterior avaliado no Teste do Cilindro em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam a percentagem de toques com a pata contralateral à lesão, pelos animais no Teste do Cilindro, em 5 min. Foram utilizados 9 a 11 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,05$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; d vs. 6-OHDA, $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 20 - Efeito do (-)-linalol no uso simultâneo de ambas as patas dos membros anteriores avaliado no Teste do Cilindro em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



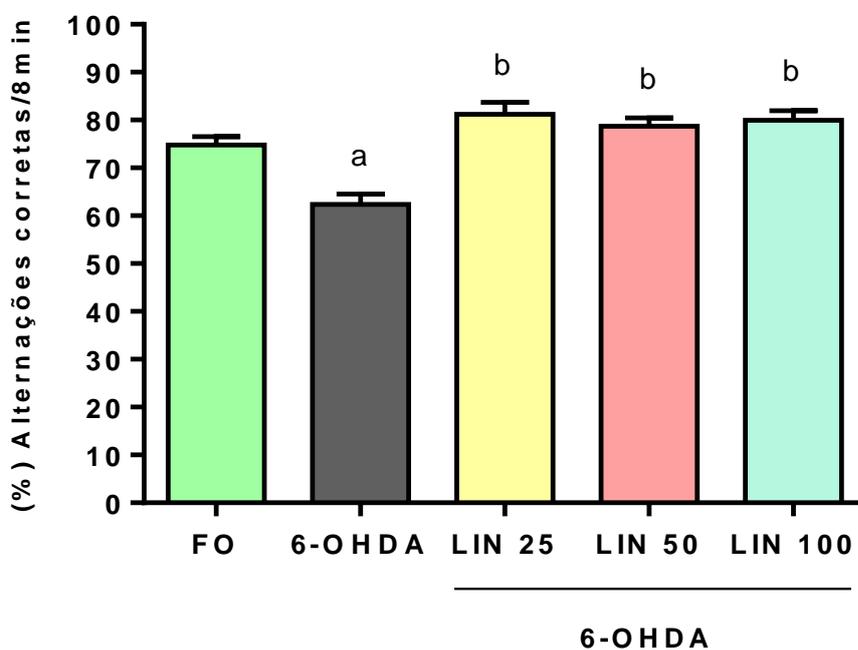
As barras representam a percentagem de toques com ambas as patas dos membros anteriores, pelos animais no Teste do Cilindro, em 5 min. Foram utilizados 8 a 11 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. FO, $p < 0,05$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.4 Efeito do (-)-linalol sobre a memória operacional no Teste do Labirinto em Y (*Y-maze Test*) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

No Teste do Labirinto em Y, avaliou-se o desempenho do animal na tarefa de entrar nos braços do labirinto de maneira alternada, o que chamamos de memória de procedimento ou de trabalho. O grupo 6-OHDA não tratado apresentou uma redução significativa na percentagem de alterações espontâneas corretas no *Y-maze*, em relação ao grupo FO (% alterações corretas: 6-OHDA: $62,40 \pm 2,11$; FO: $74,80 \pm 1,74$; $p < 0,001$). Este efeito no grupo hemiparkinsoniano foi estatisticamente revertido com o (-)-linalol nas três doses testadas (% alterações corretas: 6-OHDA + LIN25: $81,17 \pm 2,53$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN50: $78,71 \pm 1,78$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN100: $80 \pm 1,95$; $p < 0,0001$) [$F(4,95)=14,02$; $p < 0,0001$], ver Figura 21.

Os animais hemiparkinsonianos (6-OHDA) apresentaram prejuízo na memória operacional, prevenido com o (-)-linalol nas três doses estudadas, indicando possível efeito neuroprotetor no comprometimento cognitivo nesses animais.

Figura 21 - Efeito do (-)-linalol na percentagem de alterações espontâneas corretas no Teste do Labirinto em Y em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



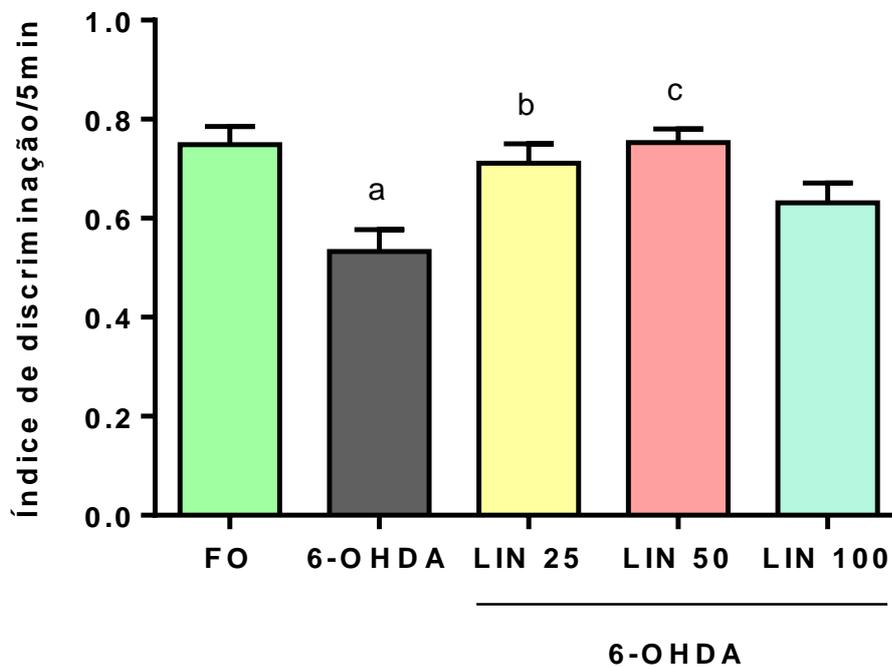
As barras representam a percentagem de alterações espontâneas corretas no Teste do Labirinto em Y, em 8 min. Foram utilizados 20 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.5 Efeito do (-)-linalol sobre a memória de curta e longa duração na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

Na Tarefa de Reconhecimento de Objetos (TRO), avaliou-se a memória de curta e longa duração. O grupo 6-OHDA não tratado apresentou prejuízo estaticamente significativo na memória de curta duração em comparação ao grupo FO (índice de discriminação: 6-OHDA: $0,53 \pm 0,04$; FO: $0,74 \pm 0,03$; $p < 0,01$). Este efeito foi estatisticamente revertido nos animais hemiparkinsonianos tratados com (-)-linalol nas doses 25 e 50 mg/kg (índice de discriminação: 6-OHDA + LIN25: $0,71 \pm 0,03$; $p < 0,05$; 6-OHDA + LIN50: $0,75 \pm 0,02$; $p < 0,01$; 6-OHDA + LIN100: $0,63 \pm 0,03$; $p > 0,05$) [$F(4,33)=5,57$; $p < 0,0015$], ver Figura 22.

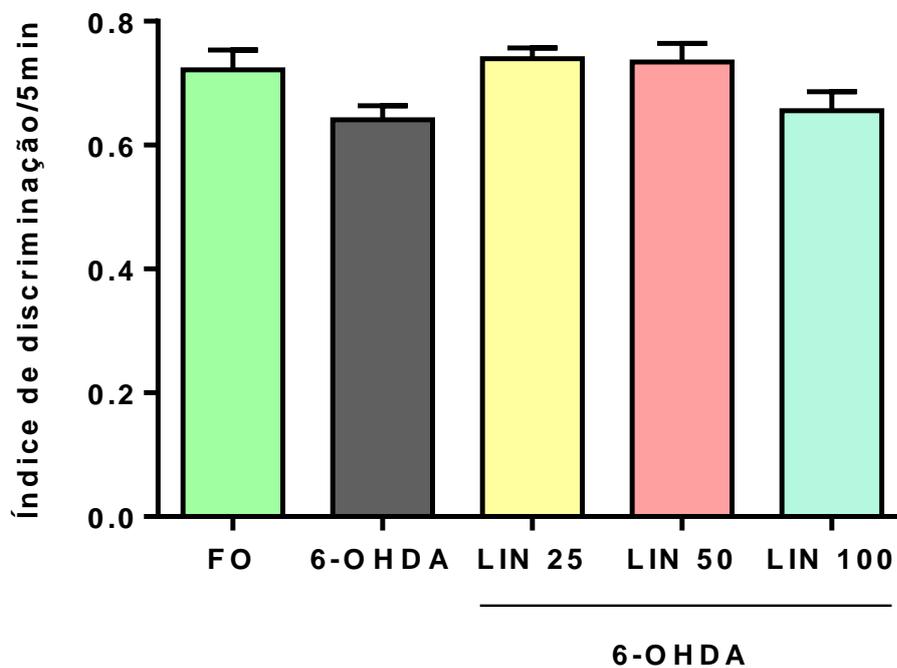
Se tratando da memória de longa duração, não observou-se diferença estatística na discriminação dos objetos entre os grupos (índice de discriminação: 6-OHDA: $0,64 \pm 0,02$; FO: $0,72 \pm 0,03$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN25: $0,73 \pm 0,01$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN50: $0,73 \pm 0,03$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN100: $0,65 \pm 0,03$; $p > 0,05$) [$F(4,34)=3,02$; $p < 0,0308$], ver Figura 23.

Figura 22 - Efeito do (-)-linalol na memória de curta duração na TRO em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam o índice de discriminação na TRO, na análise da memória de curta duração, em 5 min. Foram utilizados 6 a 8 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,01$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,05$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 23 - Efeito do (-)-linalol na memória de longa duração na TRO em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

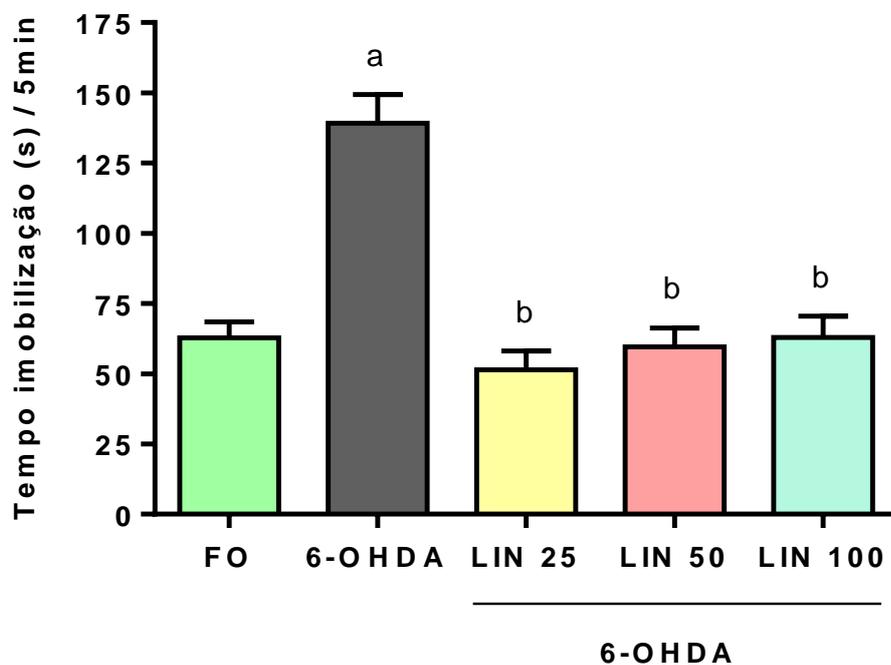


As barras representam o índice de discriminação na TRO, na análise da memória de longa duração, em 5 min. Foram utilizados 7 a 8 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.6 Efeito do (-)-linalol sobre o comportamento tipo-depressivo no Teste do Nado Forçado (*Forced Swim Test*) em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

O Teste do Nado Forçado foi utilizado para avaliar o comportamento tipo-depressivo dos animais. O grupo 6-OHDA não tratado apresentou maior desespero comportamental, medido pelo tempo de imobilização, quando comparado ao grupo FO (tempo de imobilização: 6-OHDA: $139,16 \pm 10,27$; FO: $62,74 \pm 5,78$; $p < 0,0001$). Os animais hemiparkinsonianos tratados com (-)-linalol nas 3 doses estudadas foram capazes de prevenir estatisticamente o aumento do tempo de imobilização, mantendo valores próximos ao grupo FO (tempo de imobilização: 6-OHDA + LIN25: $51,38 \pm 6,75$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN50: $59,51 \pm 6,81$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN100: $62,93 \pm 7,59$; $p < 0,0001$) [$F(4,36)=22,52$; $p < 0,0001$], ver Figura 24.

Figura 24 - Efeito do (-)-linalol sobre o comportamento tipo-depressivo no Teste do Nado Forçado em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam o tempo de imobilização no Teste do Nado Forçado, em 5 min. Foram utilizados 8 a 9 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

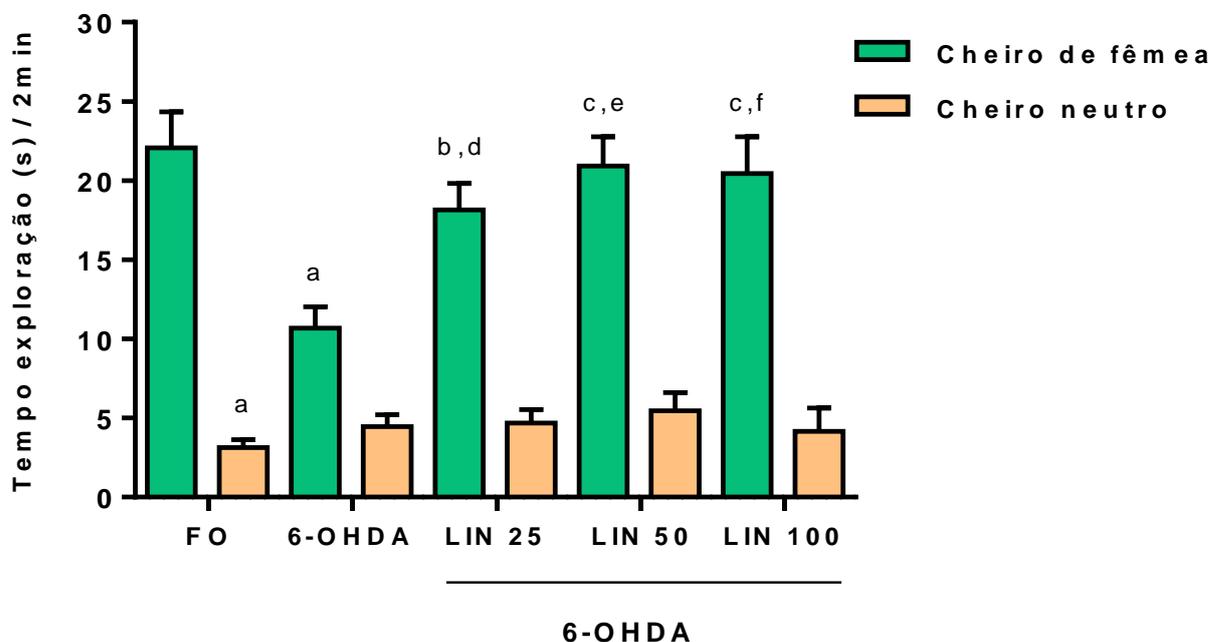
5.7 Efeito do (-)-linalol sobre prejuízos no Teste de Discriminação Olfatória em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

O Teste de Discriminação Olfatória foi utilizado para avaliação de comprometimento da via olfatória. Os animais do grupo FO, com função olfatória intacta, foram capazes de discriminar entre os dois objetos [objeto com cheiro de fêmea (OCF) e objeto com cheiro neutro (OCN)], preferindo o OCF (tempo de exploração: FO_{OCF}: 22,06 ± 2,27; FO_{OCN}: 3,12 ± 0,51; p<0,0001). De forma contrária, os animais hemiparkinsonianos não foram capazes de discriminar entre os dois objetos (tempo de exploração: 6-OHDA_{OCF}: 10,68 ± 1,33; 6-OHDA_{OCN}: 4,45 ± 0,74; p>0,05).

Os animais hemiparkinsonianos tratados com (-)-linalol nas 3 doses estudadas conseguiram discriminar estatisticamente entre os dois objetos, preferindo o OCF (tempo de exploração: 6-OHDA + LIN25_{OCF}: 18,13 ± 1,68; 6-OHDA + LIN25_{OCN}: 4,68 ± 0,86; p<0,0001; 6-OHDA + LIN50_{OCF}: 20,91 ± 1,85; 6-OHDA + LIN50_{OCN}: 5,44 ± 1,16; p<0,0001; 6-OHDA + LIN100_{OCF}: 20,45 ± 2,31; 6-OHDA + LIN100_{OCN}: 4,16 ± 1,47; p<0,0001), ver Figura 25. Este resultado é um indicativo da manutenção das concentrações de DA na via olfatória, confirmando menor neurodegeneração dopaminérgica.

Os animais hemiparkinsonianos tratados com (-)-linalol também conseguiram explorar mais o OCF, quando comparados aos animais hemiparkinsonianos [p<0,05; F(9,60)=27,21; p<0,0001], ver Figura 25.

Figura 25 - Efeito do (-)-linalol sobre a função olfatória no Teste de Discriminação Olfatória em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam o tempo de exploração do OCF e OCN no Teste de Discriminação Olfatória, em 2 min. Foram utilizados 6 a 8 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO (cheiro de fêmea), $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA (cheiro de fêmea), $p < 0,05$; c vs. 6-OHDA (cheiro de fêmea), $p < 0,001$; d vs. 6-OHDA + LIN 25 (cheiro neutro), $p < 0,0001$; e vs. 6-OHDA + LIN 50 (cheiro neutro), $p < 0,0001$; f vs. 6-OHDA + LIN 100 (cheiro neutro), $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.8 Determinação da concentração de monoaminas e aminoácidos por HPLC

5.8.1 Efeito do (-)-linalol nas concentrações de dopamina (DA) e seus metabólitos DOPAC e HVA no corpo estriado de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

A injeção intraestriatal de 6-OHDA produziu lesão nos neurônios catecolaminérgicos resultando na redução de cerca de 74% na concentração de DA no CED (lesionado) quando comparado ao seu contralateral (não lesionado), nos animais do grupo 6-OHDA não tratado, e uma redução de 77,5% em relação ao CED dos animais controles (FO). Como esperado, o grupo FO mostrou concentrações de DA semelhantes no CED e CEE, ver Figura 26.

O (-)-linalol protegeu significativamente contra a depleção dopaminérgica nos animais hemiparkinsonianos tratados nas 3 doses estudadas (concentração de DA em ng/g tecido: 6-OHDA-D: $0,668 \pm 0,128$; 6-OHDA + LIN25-D: $1,902 \pm 0,339$; $p < 0,01$; 6-OHDA + LIN50-D: $2,396 \pm 0,204$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN100-D: $1,924 \pm 0,234$; $p < 0,01$) [$F(9,84)=9,07$; $p < 0,0001$], representando um aumento nas concentrações de DA de 64,88%, 72,12% e 65,28%, respectivamente (Figura 26).

Quanto ao DOPAC, principal metabólito da DA, o grupo 6-OHDA não tratado apresentou uma redução de aproximadamente 73% na sua concentração no CED (lesionado) em relação ao seu contralateral (não lesionado), e uma redução de 77,8% em relação ao CED do grupo FO. Os resultados também mostram que o grupo FO apresenta valores semelhantes de DOPAC no CED e CEE, ver Figura 27. Esse efeito sugere uma ação neuroprotetora do (-)-linalol e seu potencial para o tratamento da DP.

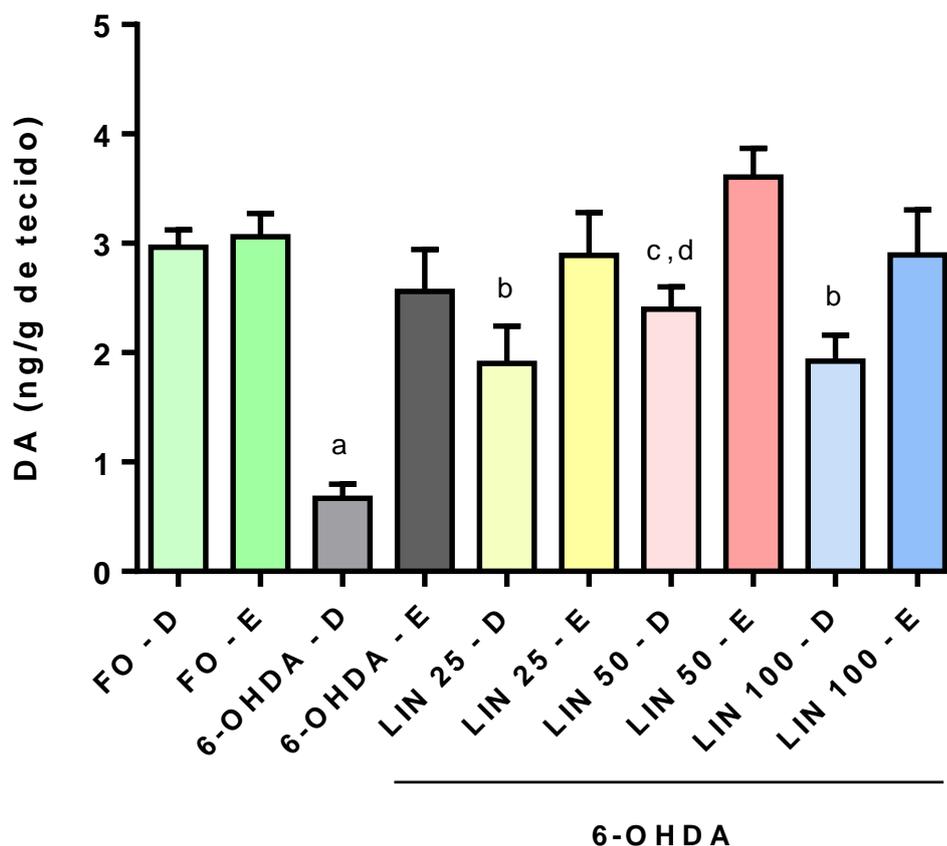
O tratamento com (-)-linalol protegeu significativamente contra a redução dos níveis de DOPAC nos animais hemiparkinsonianos tratados nas 3 doses estudadas (concentração de DOPAC em ng/g tecido: 6-OHDA-D: $0,951 \pm 0,120$; 6-OHDA + LIN25-D: $2,123 \pm 0,245$; $p < 0,01$; 6-OHDA + LIN50-D: $2,695 \pm 0,191$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN100-D: $1,975 \pm 0,171$; $p < 0,01$) [$F(9,90)=33,26$; $p < 0,0001$], representando um aumento nas concentrações de DOPAC de 55,2%, 64,7% e 51,9%, respectivamente (Figura 27).

Com relação as concentrações de HVA, o grupo 6-OHDA não tratado apresentou uma redução de aproximadamente 41% na sua concentração no CED

(lesionado) em relação ao seu contralateral (não lesionado), e uma redução de 57% em relação ao CED do grupo FO. Os resultados também mostram que o grupo FO apresenta valores semelhantes de HVA no CED e CEE, ver Figura 28.

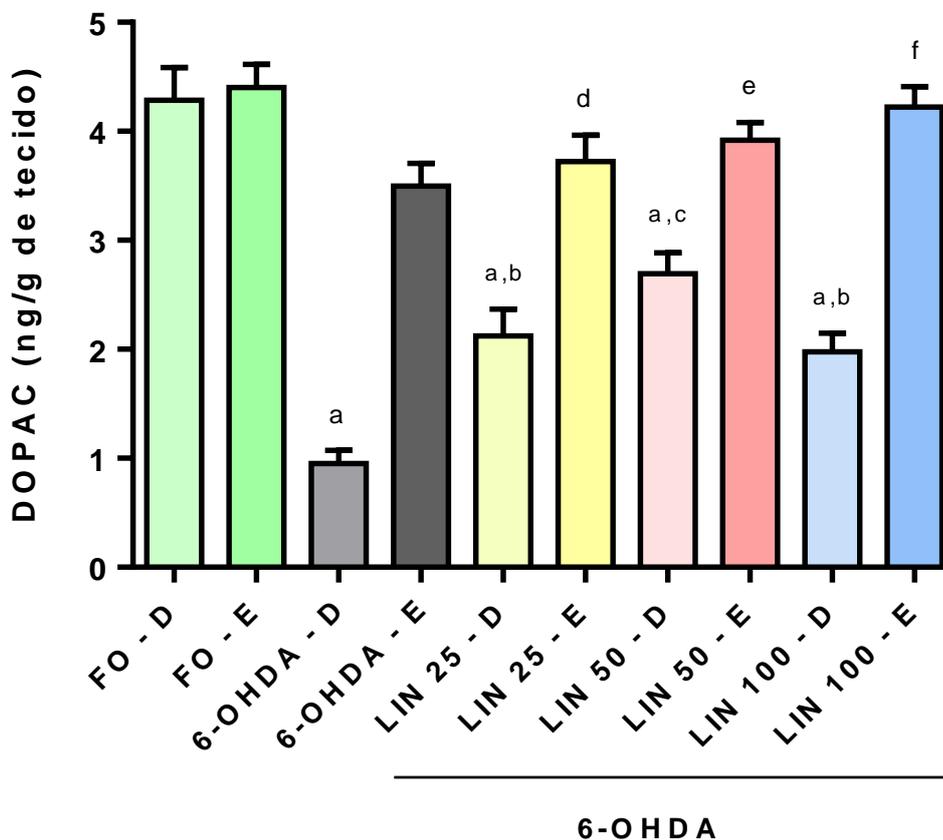
Embora o tratamento com (-)-linalol tenha reduzido a depleção dos níveis de HVA nos animais hemiparkinsonianos tratados nas 3 doses estudadas. Sua proteção não garantiu concentrações significativamente maiores de HVA em relação aos animais hemiparkinsonianos não tratados (concentração de HVA em ng/g tecido: 6-OHDA-D: $246,5 \pm 17,97$; 6-OHDA + LIN25-D: $337,8 \pm 62,89$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN50-D: $430,0 \pm 39,14$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN100-D: $410,1 \pm 63,31$; $p > 0,05$) [$F(9,66)=3,43$; $p < 0,0016$], ver Figura 28.

Figura 26 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de DA em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



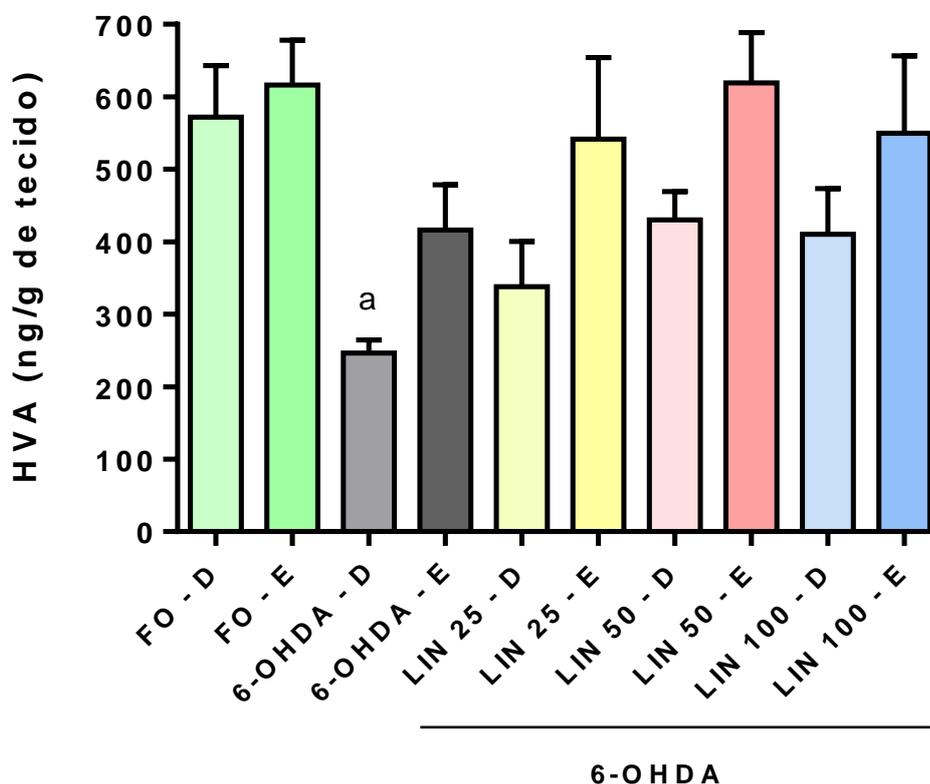
As barras representam as concentrações estriatais de DA em ng/g de tecido. Foram utilizados 7 a 11 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO-D, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA-D, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA-D, $p < 0,0001$; d vs. 6-OHDA + LIN50-E, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 27 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de DOPAC em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações estriatais de DOPAC em ng/g de tecido. Foram utilizados 9 a 11 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO-D, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA-D, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA-D, $p < 0,0001$; d vs. 6-OHDA + LIN25-D, $p < 0,0001$; e vs. 6-OHDA + LIN50-D, $p < 0,01$; f vs. 6-OHDA + LIN100-D, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 28 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de HVA em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações estriatais de HVA em ng/g de tecido. Foram utilizados 6 a 9 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO-D, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.8.2 Efeito do (-)-linalol nas concentrações de aminoácidos no corpo estriado de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

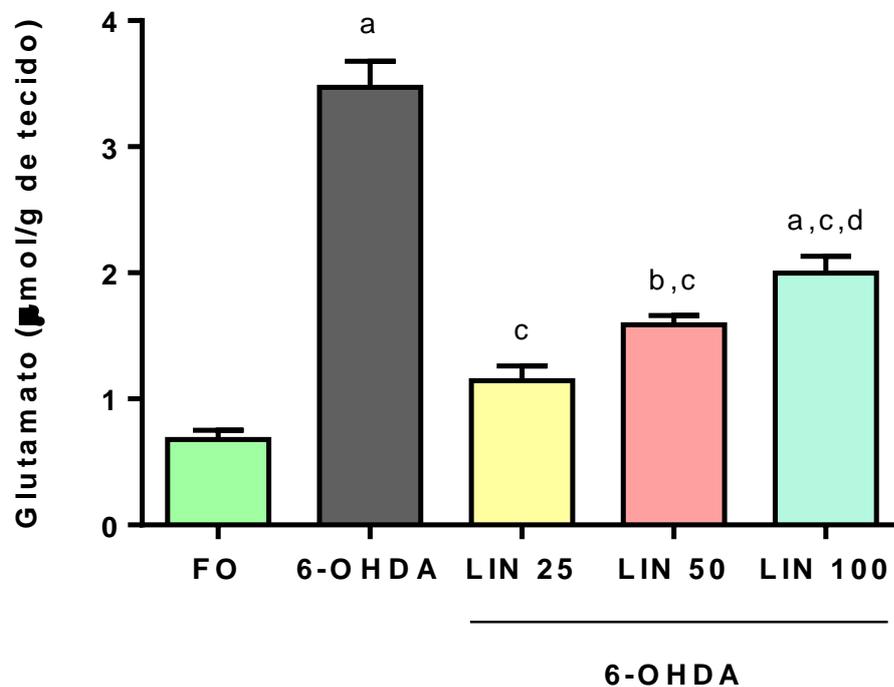
Os resultados mostraram que a concentração do aminoácido excitatório Glutamato, no CED dos animais do grupo 6-OHDA não tratado, estava estatisticamente aumentada em relação ao grupo FO (concentração de Glutamato em $\mu\text{mol/g}$ tecido: 6-OHDA: $3,47 \pm 0,20$; FO: $0,67 \pm 0,07$; $p < 0,0001$). O tratamento com (-)-linalol impediu o aumento das concentrações de Glutamato nos animais hemiparkinsonianos tratados nas 3 doses estudadas [$F(4,25)=74,45$; $p < 0,0001$], ver Figura 29. Já, a concentração de Taurina no CED dos animais do grupo 6-OHDA não tratado, estava estatisticamente reduzida (concentração de Taurina em $\mu\text{mol/g}$ tecido: 6-OHDA: $0,47 \pm 0,06$; FO: $2,43 \pm 0,31$; $p < 0,01$), quando comparado ao grupo FO. O (-)-linalol impediu a redução das concentrações de Taurina nos animais tratados nas 3 doses estudadas, mantendo valores próximos aos do grupo FO [$F(4,27)=8,68$; $p < 0,0001$], ver Figura 30.

No que se refere aos aminoácidos inibitórios, observou-se um aumento significativo dos níveis de GABA no CED do grupo 6-OHDA não tratado, em relação ao grupo FO (concentração de GABA em $\mu\text{mol/g}$ tecido: 6-OHDA: $8,76 \pm 0,58$; FO: $4,98 \pm 0,39$; $p < 0,0001$). O tratamento com (-)-linalol protegeu contra o aumento dos níveis de GABA nos animais hemiparkinsonianos tratados nas 3 doses estudadas [$F(4,24)=30,51$; $p < 0,0001$], ver Figura 31. Os níveis de Glicina no CED do grupo 6-OHDA não tratado reduziu significativamente quando comparado ao grupo FO (concentração de Glicina em $\mu\text{mol/g}$ tecido: 6-OHDA: $2,32 \pm 0,18$; FO: $4,91 \pm 0,35$; $p < 0,0001$). Mas, diferente dos achados de GABA, apenas a dose de (-)-linalol 25 mg/kg (v.o.) produziu efeito, aumentando significativamente os níveis de Glicina dos animais hemiparkinsonianos (concentração de Glicina em $\mu\text{mol/g}$ tecido: 6-OHDA + LIN25: $4,14 \pm 0,45$; $p < 0,01$; 6-OHDA + LIN50: $2,89 \pm 0,48$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN100: $1,98 \pm 0,23$; $p > 0,05$) [$F(4,27)=12,61$; $p < 0,0001$], ver Figura 32.

A Tirosina, precursor imediato das catecolaminas, estava com sua concentração reduzida no CED do grupo 6-OHDA não tratado quando comparado ao grupo FO (concentração de Tirosina em $\mu\text{mol/g}$ tecido: 6-OHDA: $0,51 \pm 0,09$; FO: $1,14 \pm 0,13$; $p < 0,001$). O (-)-linalol na dose de 100 mg/kg v.o., aumentou significativamente a sua concentração no CED (concentração de Tirosina em $\mu\text{mol/g}$

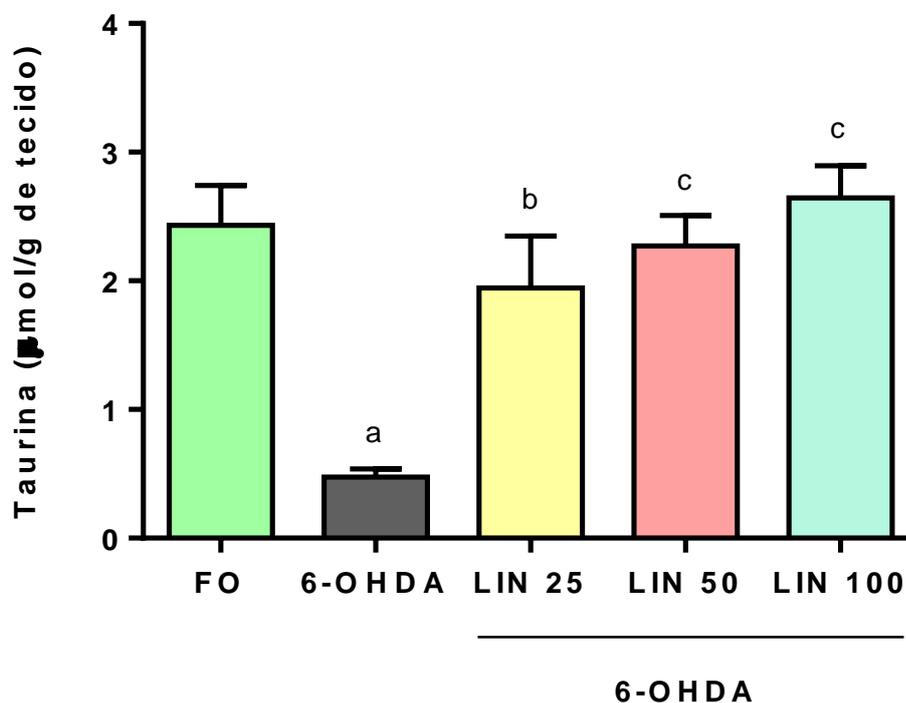
tecido: 6-OHDA + LIN25: $0,64 \pm 0,07$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN50: $0,70 \pm 0,08$; $p > 0,05$;
6-OHDA + LIN100: $1,09 \pm 0,06$; $p < 0,01$) [$F(4,25)=8,80$; $p < 0,0001$], ver Figura 33.

Figura 29 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Glutamato em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



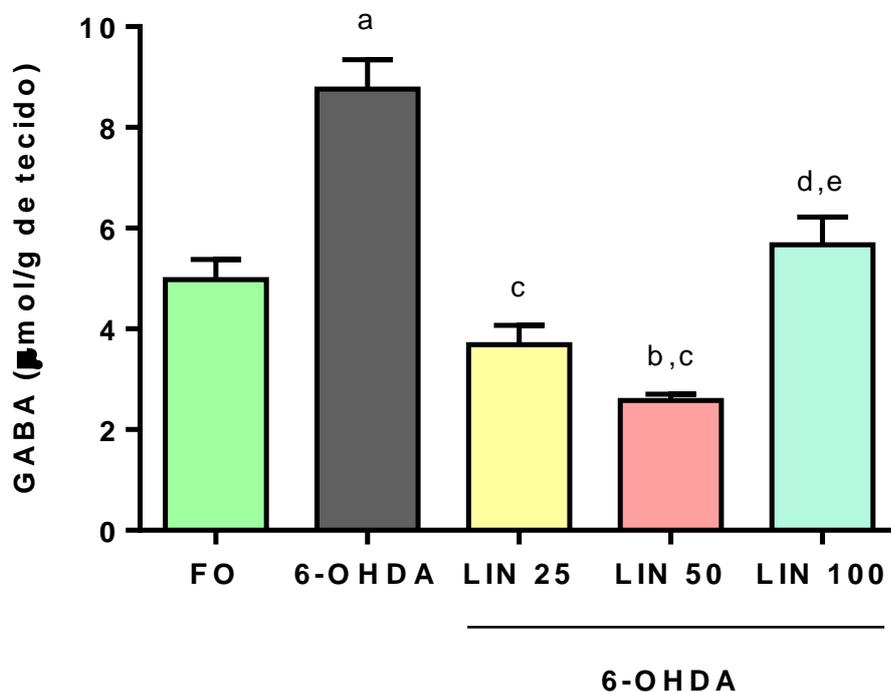
As barras representam as concentrações estriatais de Glutamato em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 5 a 7 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,001$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; d vs. 6-OHDA + LIN25, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 30 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Taurina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



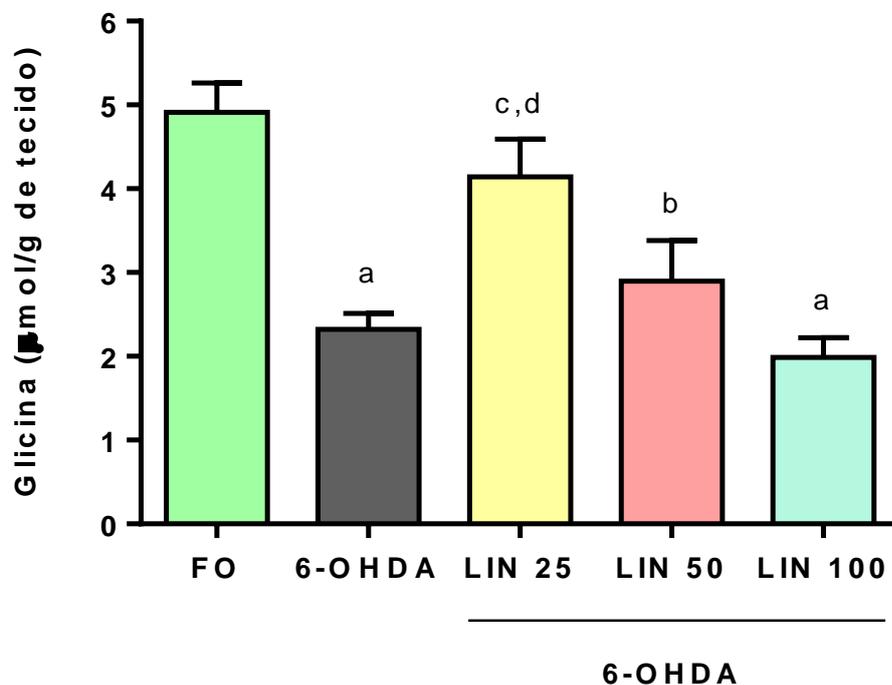
As barras representam as concentrações estriatais de Taurina em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 5 a 8 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,01$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 31 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de GABA em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



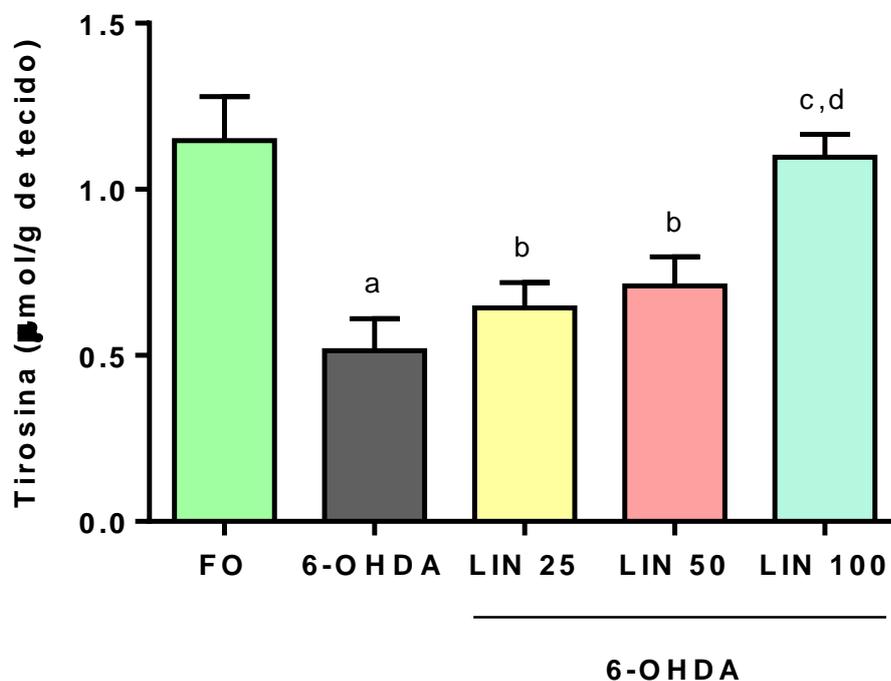
As barras representam as concentrações estriatais de GABA em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 5 a 6 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; d vs. 6-OHDA, $p < 0,001$; e vs. 6-OHDA + LIN50, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 32 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Glicina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações estriatais de Glicina em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 6 a 7 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,01$; d vs. 6-OHDA + LIN100, $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 33 - Efeito do (-)-linalol sobre as concentrações estriatais de Tirosina em ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações estriatais de Tirosina em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 6 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. FO, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,01$; d vs. 6-OHDA + LIN25, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

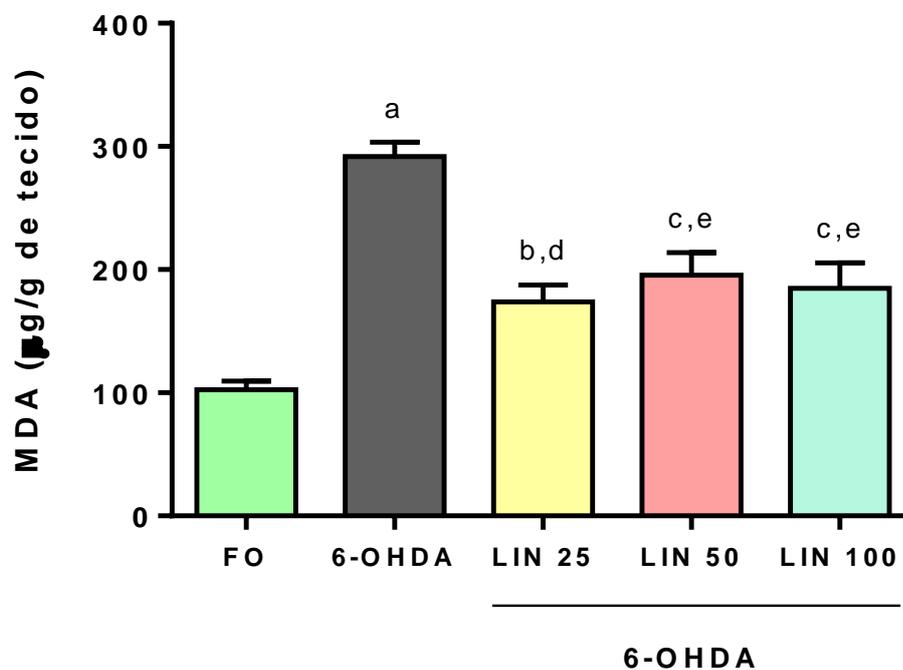
5.9 Avaliação do Estresse Oxidativo

5.9.1 Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) em tecidos cerebrais de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

Os resultados mostraram que o córtex pré-frontal (CPF) e o hipocampo (HC) dos animais do grupo 6-OHDA não tratado apresentaram aumento estatisticamente significativo do conteúdo de MDA (concentração de MDA em $\mu\text{g/g}$ tecido: CPF: $324,03 \pm 18,72$; HC: $585,55 \pm 32,81$), quando comparado ao grupo FO (concentração de MDA em $\mu\text{g/g}$ tecido: CPF: $86,74 \pm 4,32$; $p < 0,0001$; HC: $105,43 \pm 5,14$; $p < 0,0001$). O tratamento com (-)-linalol protegeu contra o aumento na peroxidação lipídica pela 6-OHDA nas 3 doses estudadas em ambas as áreas cerebrais [$F(4,51)=34,21$; $p < 0,0001$] e [$F(4,53)=99,05$; $p < 0,0001$], respectivamente (Figuras 34 e 35).

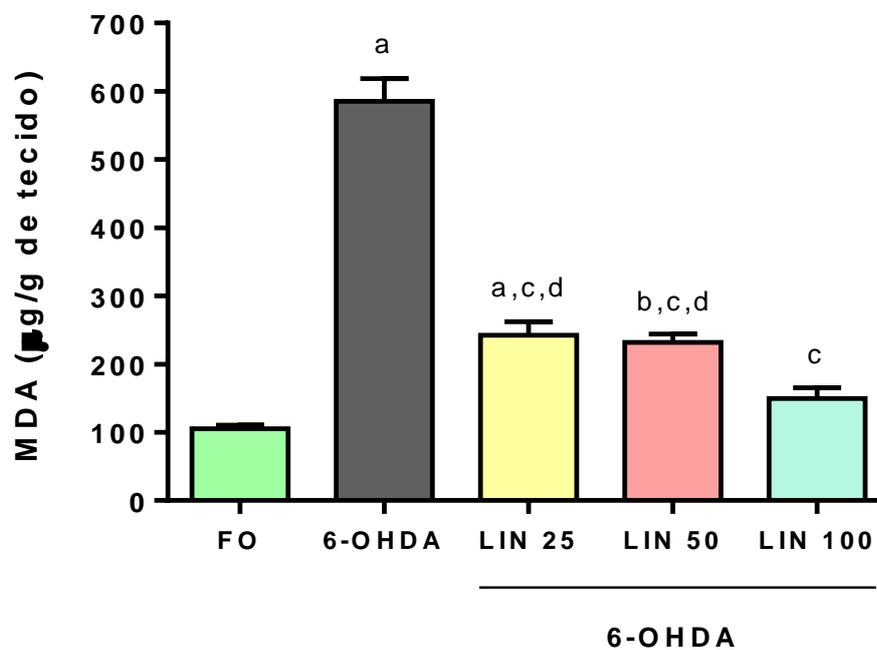
Quanto ao CED (lesionado), o grupo 6-OHDA não tratado apresentou aumento de MDA quando comparado ao grupo FO (concentração de MDA em $\mu\text{g/g}$ tecido: 6-OHDA: $291,70 \pm 11,75$; FO: $102,35 \pm 7,18$; $p < 0,0001$), demonstrando que o estresse oxidativo tem um papel importante no mecanismo de lesão induzida pela 6-OHDA. O (-)-linalol protegeu contra o aumento na peroxidação lipídica pela 6-OHDA nas 3 doses estudadas no CED (concentração de MDA em $\mu\text{g/g}$ tecido: 6-OHDA + LIN25: $173,77 \pm 13,82$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN50: $195,59 \pm 18,25$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN100: $184,90 \pm 20,44$; $p < 0,0001$) [$F(4,43)=17,99$; $p < 0,0001$], ver Figura 36. Esse efeito indica uma ação neuroprotetora do (-)-linalol e seu potencial para o tratamento da DP.

Figura 34 - Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) no córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



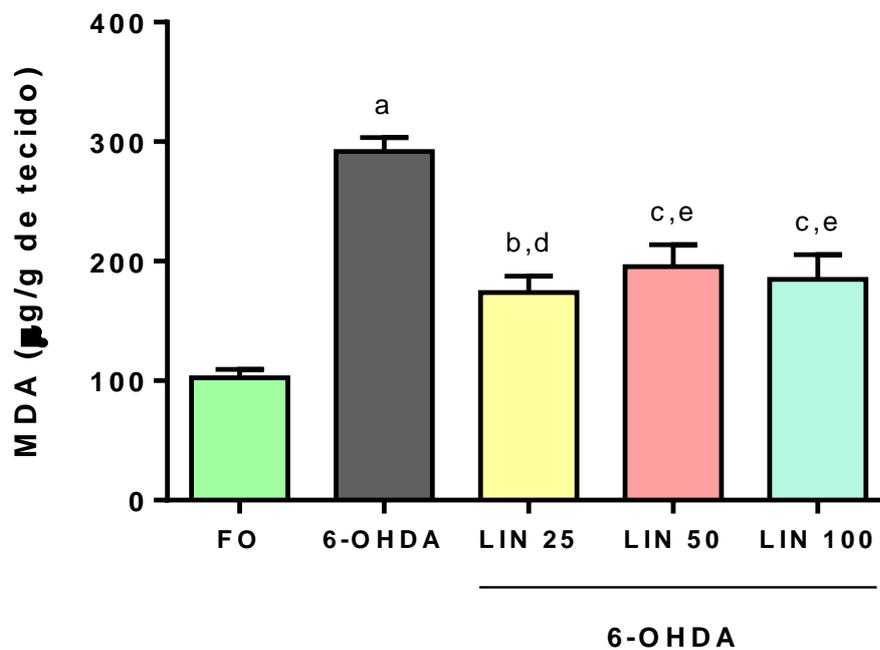
As barras representam as concentrações de MDA no CPF, em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Foram utilizados 10 a 12 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,05$; c vs. FO, $p < 0,01$; d vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; e vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 35 - Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) no hipocampo (HC) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam as concentrações de MDA no HC, em µg/g de tecido. Foram utilizados 11 a 12 animais por grupo. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,001$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; d vs. 6-OHDA + LIN100, $p < 0,01$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 36 - Efeito do (-)-linalol na peroxidação lipídica (MDA) no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



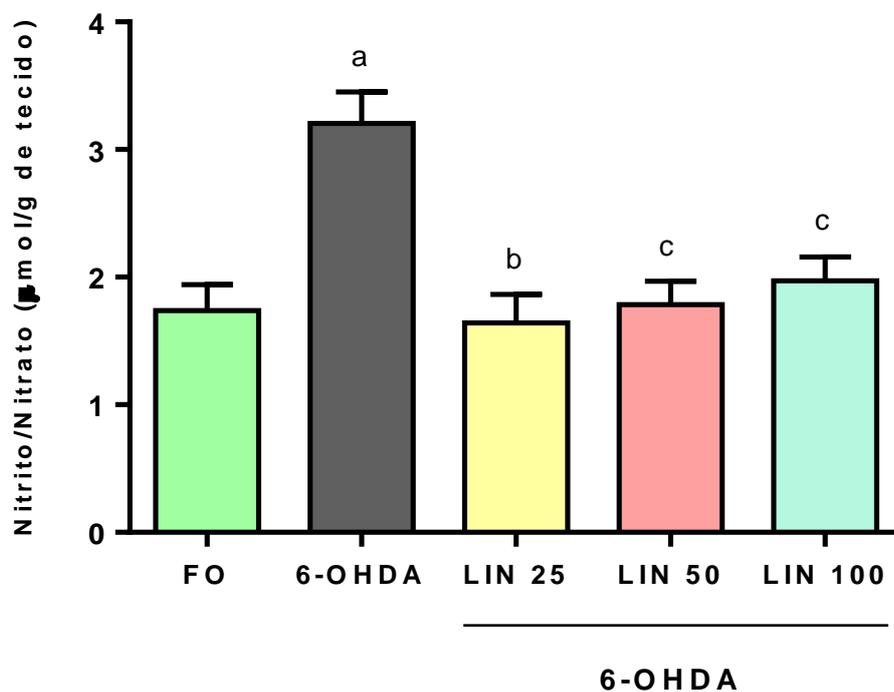
As barras representam as concentrações estriatais de MDA em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Foram utilizados 8 a 10 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,05$; c vs. FO, $p < 0,01$; d vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; e vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.9.2 Efeito do (-)-linalol nos níveis de Nitrito/Nitrato em tecidos cerebrais de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

Os resultados mostraram que o CPF e o HC dos animais do grupo 6-OHDA não tratado apresentaram aumento significativo das concentrações de nitrito (concentração de nitrito em $\mu\text{mol/g}$ de tecido: CPF: $3,20 \pm 0,24$; HC: $4,0 \pm 0,29$), quando comparado ao grupo FO (concentração de nitrito em $\mu\text{mol/g}$ de tecido: CPF: $1,73 \pm 0,20$; $p < 0,0001$; HC: $1,86 \pm 0,15$; $p < 0,0001$). O tratamento com (-)-linalol protegeu contra o aumento da concentração de nitrito pela 6-OHDA nas 3 doses estudadas em ambas as áreas cerebrais [$F(4,49)=9,09$; $p < 0,0001$] e [$F(4,40)=16,54$; $p < 0,0001$], respectivamente (Figuras 37 e 38).

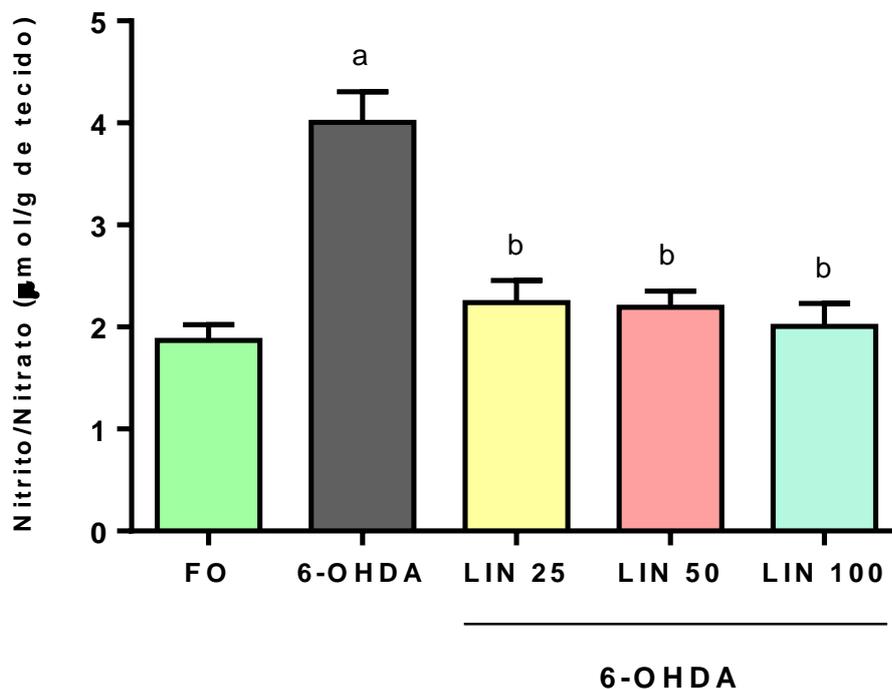
Quanto ao CED (lesionado), o grupo 6-OHDA não tratado apresentou aumento da concentração de nitrito quando comparado ao grupo FO (concentração de nitrito em $\mu\text{mol/g}$ de tecido: FO: $1,28 \pm 0,13$; 6-OHDA: $4,91 \pm 0,21$; $p < 0,0001$). O (-)-linalol protegeu contra o aumento da concentração de nitrito pela 6-OHDA nas 3 doses estudadas (concentração de nitrito em $\mu\text{mol/g}$ de tecido: 6-OHDA + LIN25: $2,30 \pm 0,15$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN50: $2,19 \pm 0,29$; $p < 0,0001$; 6-OHDA + LIN100: $1,83 \pm 0,19$; $p < 0,0001$) [$F(4,36)=46,06$; $p < 0,0001$], ver Figura 39.

Figura 37 - Efeito do (-)-linalol nos níveis de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



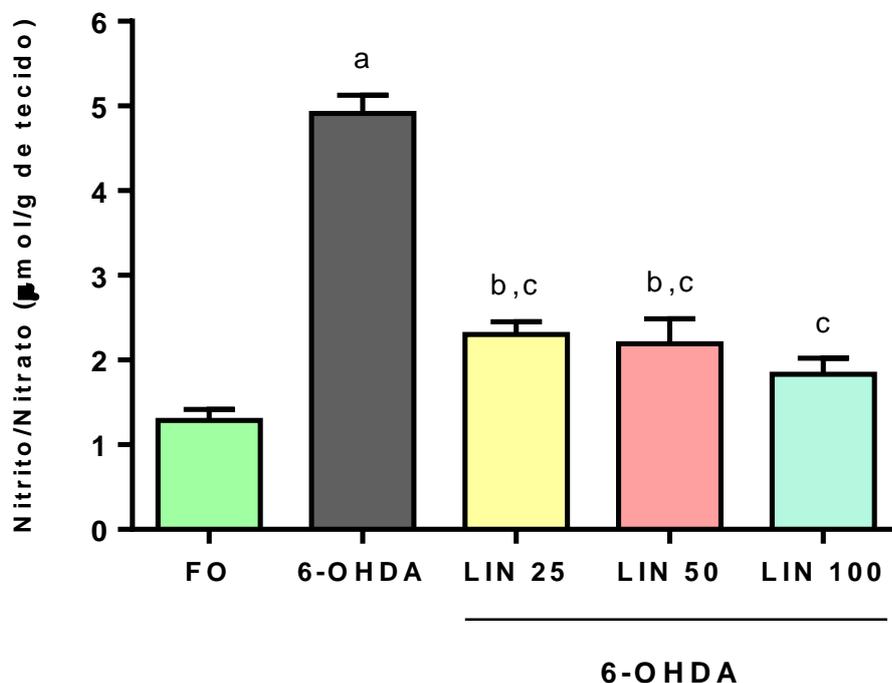
As barras representam os níveis de nitrito/nitrato no CPF, em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 10 a 12 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 38 - Efeito do (-)-linalol nos níveis de nitrito/nitrato no hipocampo (HC) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam os níveis de nitrito/nitrato no HC, em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 8 a 10 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 39 - Efeito do (-)-linalol nos níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



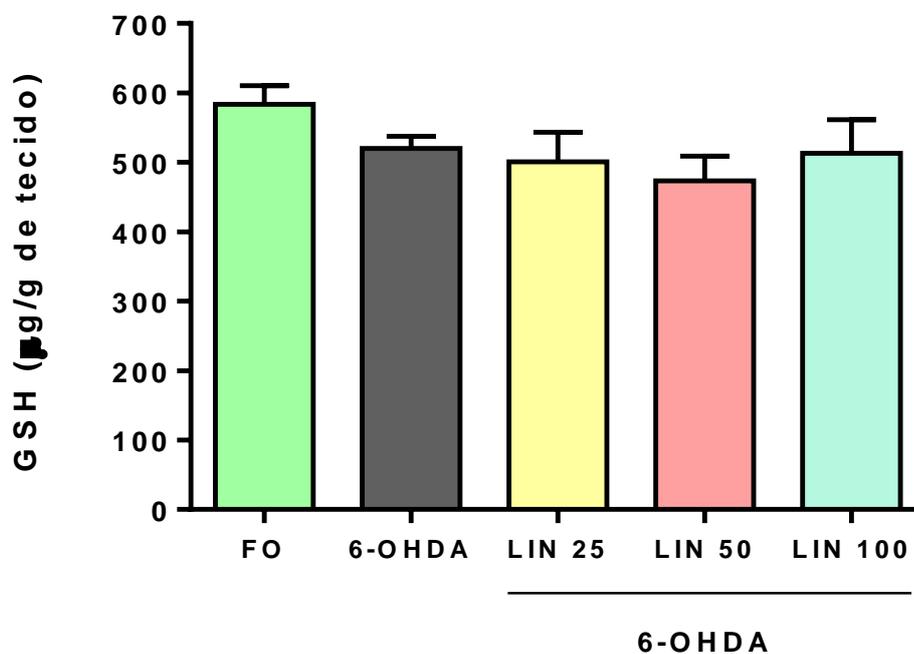
As barras representam os níveis de nitrito/nitrato no CED, em $\mu\text{mol/g}$ de tecido. Foram utilizados 8 a 9 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. FO, $p < 0,05$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.9.3 Efeito do (-)-linalol nos níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) em tecidos cerebrais de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

Os resultados mostraram que os níveis de GSH no CPF dos animais não variaram entre os grupos estudados ($p > 0,05$) [$F(4,34)=1,25$; $p < 0,3076$], ver Figura 40. Já os níveis de GSH no HC dos animais do grupo 6-OHDA não tratado, estavam reduzidos quando comparado ao grupo FO (concentração de GSH em $\mu\text{g/g}$ tecido: 6-OHDA: $809,5 \pm 100,2$; FO: $1293,0 \pm 83,88$; $p < 0,001$). O tratamento com (-)-linalol preveniu a redução de GSH pela 6-OHDA somente na dose de 25 mg/kg (v.o.), aumentando estatisticamente a concentração de GSH (concentração de GSH em $\mu\text{g/g}$ tecido: 6-OHDA + LIN25: $1126,0 \pm 32,91$; $p < 0,05$; 6-OHDA + LIN50: $1027,0 \pm 44,19$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN100: $1073,0 \pm 49,43$; $p > 0,05$) [$F(4,34)=6,68$; $p < 0,0004$], ver Figura 41.

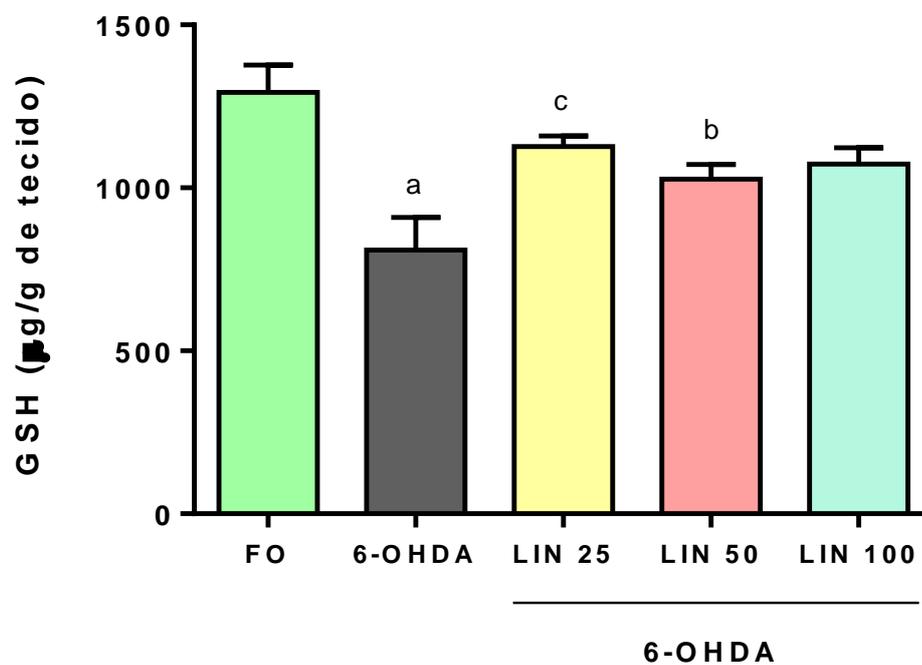
Quanto ao CED (lesionado), o grupo 6-OHDA não tratado apresentou redução de GSH em relação ao grupo FO (concentração de GSH em $\mu\text{g/g}$ tecido: 6-OHDA: $686,87 \pm 56,91$; FO: $1073,25 \pm 123,29$; $p < 0,05$). O (-)-linalol preveniu a redução de GSH pela 6-OHDA nas doses de 50 e 100 mg/kg (v.o.), aumentando estatisticamente as concentrações de GSH para valores próximos ao grupo FO (concentração de GSH em $\mu\text{g/g}$ tecido: 6-OHDA + LIN25: $798,59 \pm 57,23$; $p > 0,05$; 6-OHDA + LIN50: $1144,24 \pm 82,69$; $p < 0,01$; 6-OHDA + LIN100: $1030,86 \pm 63,10$; $p < 0,05$) [$F(4,34)=5,80$; $p < 0,0011$], ver Figura 42.

Figura 40 - Efeito do (-)-linalol nos níveis de GSH no córtex pré-frontal (CPF) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



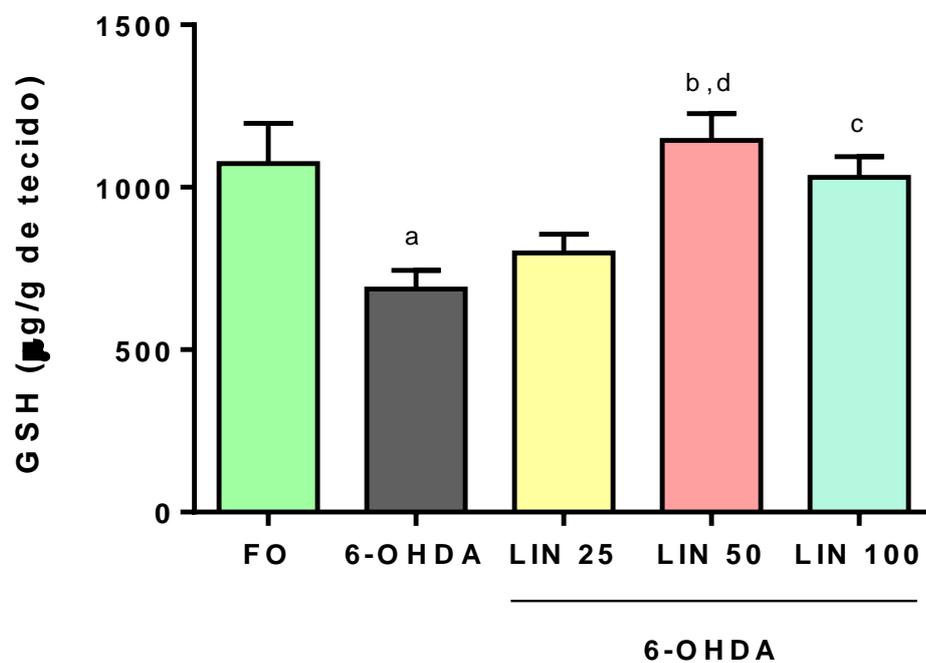
As barras representam os níveis de GSH no CPF, em µg/g de tecido. Foram utilizados 5 a 9 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 41 - Efeito do (-)-linalol nos níveis de GSH no hipocampo (HC) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam os níveis de GSH no HC, em µg/g de tecido. Foram utilizados 5 a 9 animais por grupo. Os valores estão representados como média ± EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. FO, $p < 0,05$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

Figura 42 - Efeito do (-)-linalol nos níveis de GSH no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



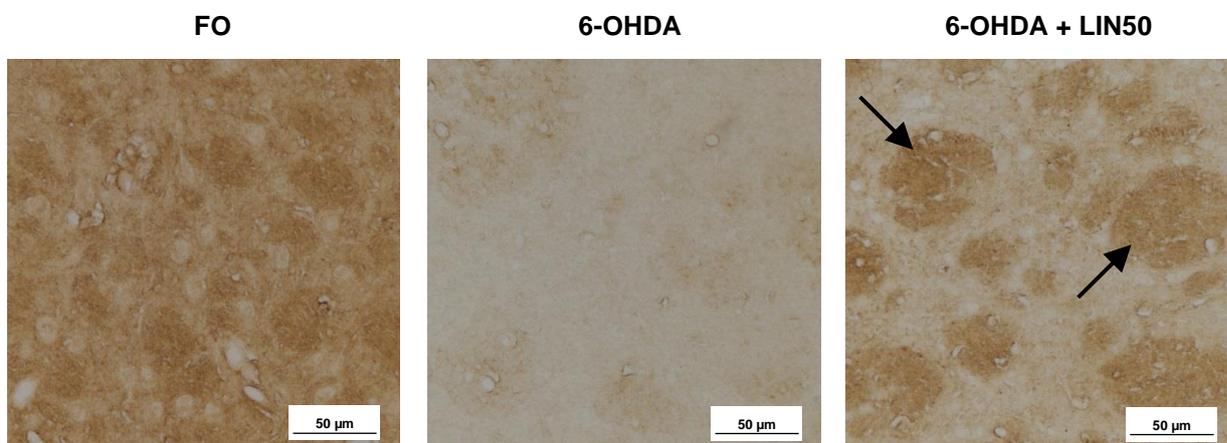
As barras representam os níveis estriatais de GSH, em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Foram utilizados 7 a 8 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,05$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,01$; c vs. 6-OHDA, $p < 0,05$; d vs. 6-OHDA + LIN25, $p < 0,05$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.10 Análise imunohistoquímica do efeito do (-)-linalol no modelo de DP

5.10.1 Efeito do (-)-linalol sobre a imunorreatividade para a Tirosina Hidroxilase (TH) no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

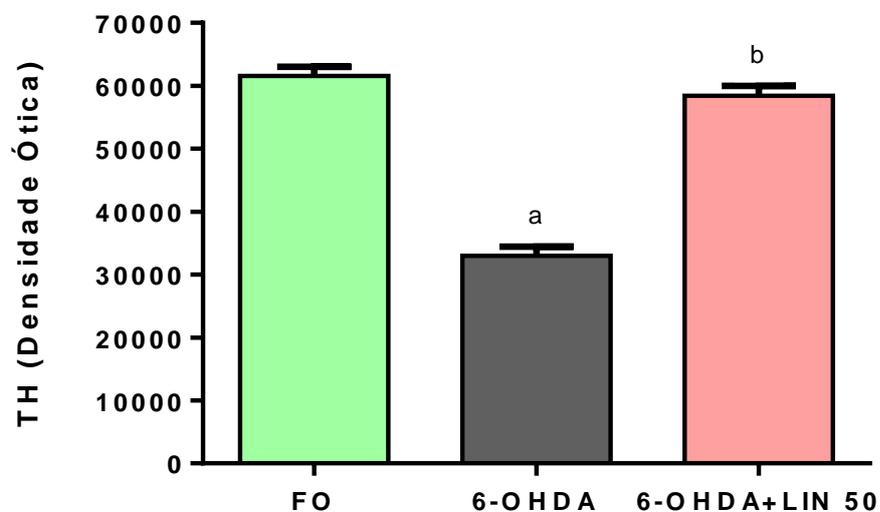
Como pode ser observado nas figuras 43 e 44, os animais do grupo 6-OHDA não tratado apresentaram uma redução média de 46% na imunorreatividade para TH no CE lesionado quando comparado aos animais FO. Por outro lado, o tratamento com (-)-linalol na dose de 50 mg/kg (v.o.) promoveu um aumento médio de 43,5% na imunorreatividade para TH em relação ao grupo com hemiparkinsonismo (6-OHDA) [F(2,37)=94,74; p<0,0001]. Assim, ficando evidente a ação neuroprotetora do (-)-linalol contra a degeneração de neurônios dopaminérgicos no CED de ratos hemiparkinsonianos, ver Figuras 43 e 44.

Figura 43 - Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a imunomarcção para a TH no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



Fotomicrografias da imunomarcção para TH em secções coronais do CED de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA e tratados por 15 dias com (-)-linalol. Coloração marron representa células imunorreativas a TH no CED (seta). Escala 50 µm.

Figura 44 - Densidade ótica da imunomarcção para TH no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

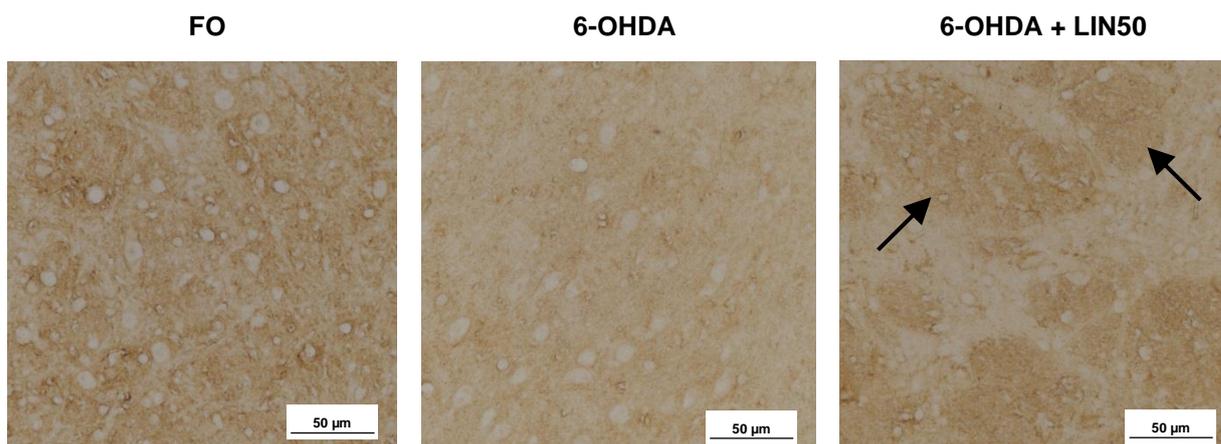


As barras representam a análise semi-quantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para TH. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,0001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,0001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.10.2 Efeito do (-)-linalol sobre a imunorreatividade para o Transportador de Dopamina (DAT) no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

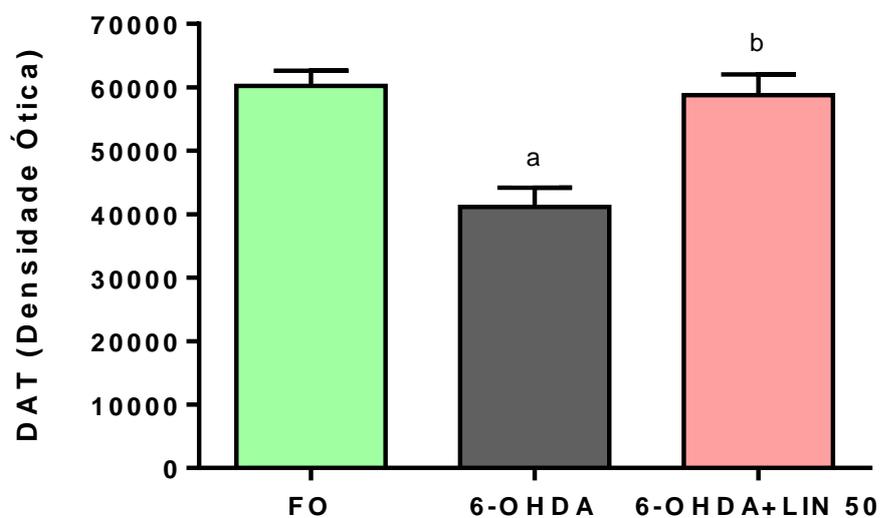
As figuras 45 e 46 mostram que a 6-OHDA provocou uma redução média de 31,6% na imunorreatividade para DAT nos neurônios dopaminérgicos no CED do grupo 6-OHDA não tratado em relação ao grupo FO. O tratamento com (-)-linalol na dose de 50 mg/kg (v.o.), promoveu um aumento médio de 30% na imunorreatividade para DAT em relação ao grupo hemiparkinsoniano (6-OHDA) [F(2,35)=11,74; $p < 0,0001$], prevenindo a degeneração dos neurônios expostos à toxicidade da 6-OHDA, ver Figuras 45 e 46.

Figura 45 - Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a imunomarcção para DAT no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



Fotomicrografias da imunomarcção para DAT em secções coronais do CED de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA e tratados por 15 dias com (-)-linalol. Coloração marron representa células imunorreativas a DAT no CED (seta). Escala 50 µm.

Figura 46 - Densidade ótica da imunomarcção para DAT no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



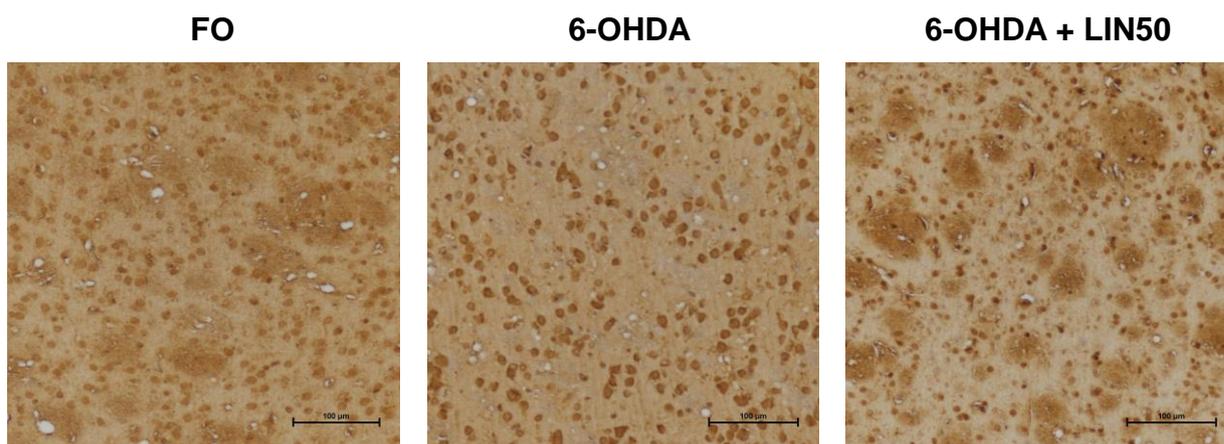
As barras representam a análise semi-quantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para DAT. Foram utilizados 4 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.11 Análise imunohistoquímica para TNF- α e COX-2

5.11.1 Efeito do (-)-linalol sobre os níveis de TNF- α no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

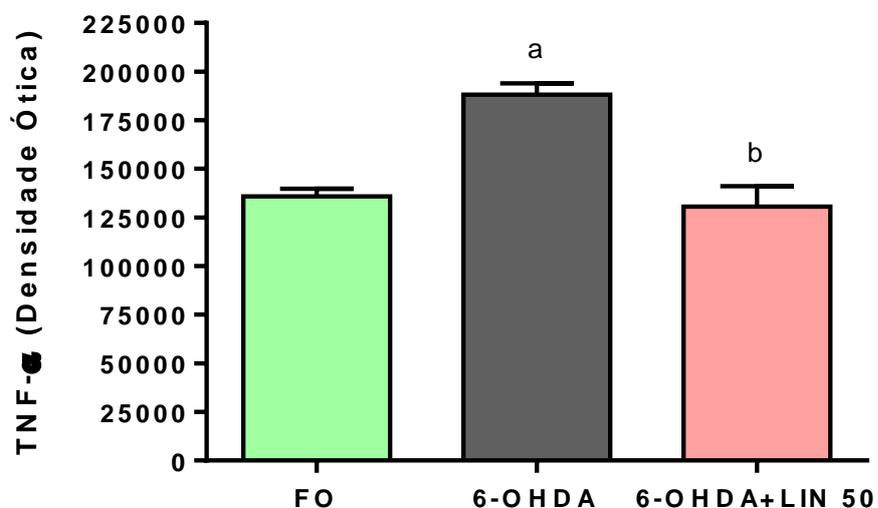
Os nossos resultados mostraram que a imunomarcção para TNF- α no CED foi mais intensa nos animais do grupo 6-OHDA não tratado em comparação ao grupo FO, enquanto os animais tratados com (-)-linalol na dose de 50 mg/kg v.o., apresentaram menor imunomarcção em relação aos animais hemiparkinsonianos [F(2,12)=19,15; p<0,0002], revertendo o aumento dessa citocina, alcançando números semelhantes ao grupo FO (Figuras 47 e 48).

Figura 47 - Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a imunomarcção para TNF- α no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



Fotomicrografias da imunomarcção para TNF- α em secções coronais do CED de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA e tratados por 15 dias com (-)-linalol. Escala 100 μ m.

Figura 48 - Densidade ótica da imunomarcção para TNF- α no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

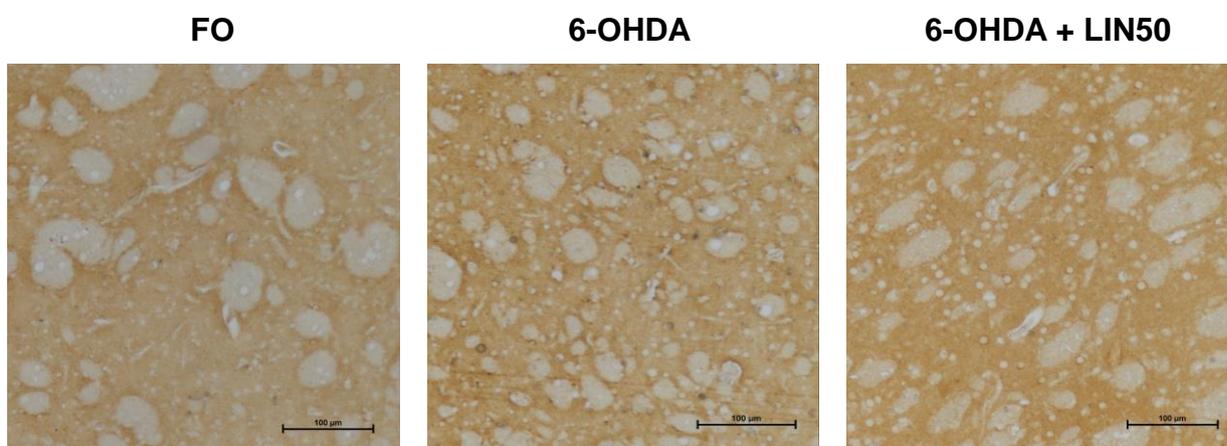


As barras representam a análise semi-quantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para TNF- α . Foram utilizados 3 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

5.11.2 Efeito do (-)-linalol sobre os níveis de COX-2 no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA

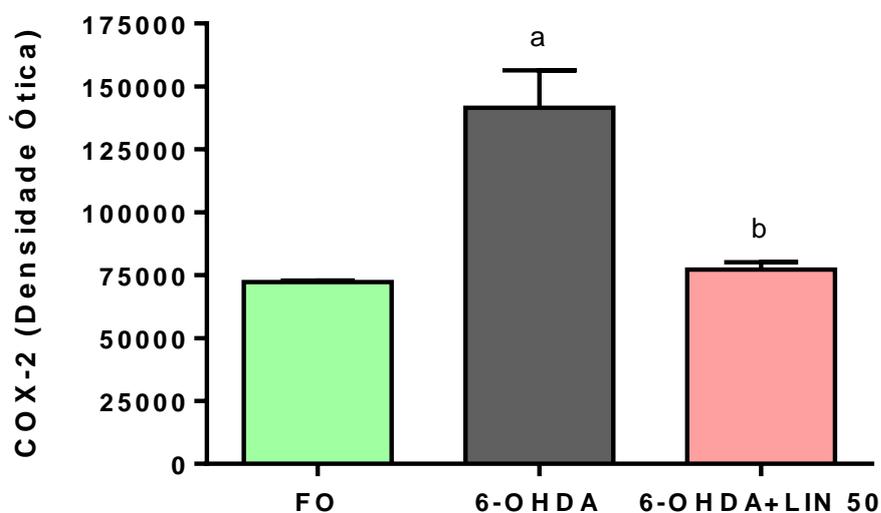
Os nossos resultados mostraram que a imunomarcção para COX-2 no CED foi mais intensa nos animais do grupo 6-OHDA não tratado em comparação ao grupo FO, enquanto os animais tratados com (-)-linalol na dose de 50 mg/kg v.o., apresentaram menor imunomarcção em relação aos animais hemiparkinsonianos [F(2,11)=24,77; p<0,0001], ver Figuras 49 e 50.

Figura 49 - Fotomicrografias representativas do efeito do (-)-linalol sobre a imunomarcção para COX-2 no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



Fotomicrografias da imunomarcção para COX-2 em secções coronais do CED de ratos com lesão unilateral por 6-OHDA e tratados por 15 dias com (-)-linalol. Escala 100 µm.

Figura 50 - Densidade ótica da imunomarcção para COX-2 no corpo estriado direito (CED) de ratos com lesão estriatal unilateral por 6-OHDA



As barras representam a análise semi-quantitativa da densidade ótica no CED imunomarcado para COX-2. Foram utilizados 3 animais por grupo. Os valores estão representados como média \pm EPM. As letras acima das barras indicam diferença significativa: a vs. FO, $p < 0,001$; b vs. 6-OHDA, $p < 0,001$. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey.

6 DISCUSSÃO

A DP é uma doença neurodegenerativa complexa que inclui sintomas cognitivos, psiquiátricos e motores, com fatores etiológicos ainda não completamente elucidados, e, atualmente, com tratamentos baseados em cuidados sintomáticos e medicamentos paliativos. Essas observações reforçam a necessidade de estudos de terapias de neuroproteção que produzam benefícios duradouros, e que ajam diretamente na etiologia da doença, minimizando a morte neuronal e a expressiva redução de DA estriatal.

Com o objetivo de investigar um novo agente neuroprotetor capaz de prevenir a neurodegeneração na DP, o presente trabalho estudou o efeito neuroprotetor do (-)-linalol em um modelo experimental de DP induzido pela injeção estereotáxica da neurotoxina 6-OHDA, em ratos.

Classicamente, o modelo de “hemiparkinsonismo” produzido pela lesão unilateral da neurotoxina 6-OHDA é um modelo robusto, reproduzível, que leva a uma assimetria motora evidenciada após a administração de agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina, resultando em um comportamento rotacional contralateral à lesão (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970). O teste rotacional induzido por apomorfina continua sendo a referência inicial para determinação da magnitude da perda de neurônios dopaminérgicos. No presente estudo, os animais do grupo 6-OHDA não tratado apresentaram aumento das rotações contralaterais à lesão, quando desafiados com apomorfina, validando o experimento. Corroborando nosso resultado, diversos estudos na literatura (CARMO et al., 2014; LIMA et al., 2017; COSTA et al., 2017) já demonstram que lesões extensas promovidas pela 6-OHDA acarretam este tipo de comportamento durante a realização do teste. Este comportamento rotatório ocorre porque receptores pós-sinápticos dopaminérgicos estão hipersensibilizados no CE lesionado, apresentando uma *up-regulation* dos receptores D1 (BETARBET et al., 2002; DA CUNHA et al., 2008). Esse fenômeno ocorre somente após lesões maiores que 80% dos neurônios dopaminérgicos (UNGERSTEDT; ARBUTHNOTT, 1970; DEUMENS et al., 2002).

O tratamento com (-)-linalol foi capaz de prevenir contra o aumento das rotações contralaterais nos animais hemiparkinsonianos tratados nas três doses testadas, o que indica um possível efeito neuroprotetor da substância, mediado pela

preservação dos níveis de DA no CE lesionado, comprovado pelos resultados dos níveis estriatais apresentados no HPLC.

A lesão estriatal por 6-OHDA pode causar alterações na atividade locomotora do animal, refletindo na sua atividade exploratória. E isto foi constatado no presente estudo no teste do campo aberto, onde os animais do grupo 6-OHDA não-tratado tiveram déficit na atividade locomotora horizontal (avaliada pelo número de *crossings*), bem como na exploração vertical (avaliada pelo número de *rearings*). Corroborando nossos dados, estudos prévios já mostraram que ratos lesionados por 6-OHDA apresentam déficits motores como consequência da depleção dopaminérgica, de maneira similar à hipocinesia que ocorre em humanos (BROWN et al., 2011; COSTA et al., 2017). De forma interessante, esses efeitos foram prevenidos nos animais hemiparkinsonianos tratados com (-)-linalol nas três doses estudadas.

As manifestações motoras da DP são atribuíveis à degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, resultando em esgotamento DA e desorganização de algumas vias nigrais, como a via nigroestriatal, por exemplo (AGUIAR et al., 2006; WINNER et al., 2009; LIMA et al., 2017; COSTA et al., 2017). A prevenção do comprometimento motor nesse modelo pelo (-)-linalol, sugere uma ação neuroprotetora da substância. Nossa hipótese é reforçada por alguns estudos que mostraram que o (-)-linalol, apesar de uma ação sedativa dose dependente, não compromete a atividade locomotora dos animais (BUCHBAUER et al., 1993; GUZMÁN-GUTIÉRREZ et al., 2012; DOS SANTOS et al., 2018).

Além dos déficits na atividade locomotora, a 6-OHDA é responsável por promover um déficit crônico na função sensório-motora, somatossensorial e na utilização do membro contralateral, gerando uma assimetria na utilização das patas dianteiras no teste do cilindro, o que implica em maior utilização do membro ipsilateral a lesão (SCHALLERT et al., 2000). Nesse estudo, observamos que os animais hemiparkinsonianos não-tratados utilizaram mais frequentemente a pata dianteira ipsilateral a lesão, indicando comprometimento na atividade motora fina. A utilização máxima e exclusiva do membro ipsilateral a lesão, também é um indicativo de depleção dos níveis de DA na via nigroestriatal (SCHALLERT et al., 2000).

O (-)-linalol foi capaz de promover uma melhora da função motora fina, uma vez que, os animais hemiparkinsonianos tratados com esse monoterpene nas três doses estudadas, tocaram mais vezes a parede do cilindro com a pata contralateral a

lesão. Na clínica, pacientes com DP também demonstram um importante comprometimento na atividade motora fina, quando avaliados a função das extremidades, através da avaliação das atividades da vida diária (AVD), da coordenação fina dos movimentos da mão e da marcha (RAH et al., 2009).

A proteção da função motora fina pelo (-)-linalol, sugere uma ação neuroprotetora da substância, já, que da mesma forma que o teste rotacional por apomorfina, o teste do cilindro também é utilizado para previsão da perda de DA estriatal em modelos animais unilaterais da DP (HENDERSON et al., 2003; IANCU et al., 2005). Assim, acreditamos que o uso da pata contralateral a lesão é um indicativo de menos neurodegeneração, levando a liberação de mais DA na via nigroestriatal (LUNDBLAD et al., 2004).

Apesar de tradicionalmente a DP ser reconhecida como uma doença do movimento, nas últimas décadas, vários estudos comprovam o envolvimento de sintomas não-motores característicos (TOLOSA et al., 2007; TADAIESKY et al., 2008; MEIRELES; MASSANO, 2012; KADASTIK-EERME et al., 2016; TAYLOR et al., 2016; BUTALA et al., 2019; GUO et al., 2019), incluindo déficits cognitivos como já mencionado anteriormente. Mostramos que, no modelo do labirinto em Y, que avalia a memória operacional ou de trabalho e, portanto, a disfunção do córtex pré-frontal (CPF), ocorreu prejuízo nesse tipo de memória nos animais hemiparkinsonianos não-tratados, em relação ao grupo FO. Em ratos, estruturas cerebrais relacionadas aos processos de aprendizado e memória, como o HC, o CPF e o CE, são inervadas por neurônios dopaminérgicos (BAULAC et al., 1986; SEAMANS et al., 1998). A disfunção dopaminérgica nestas áreas está relacionada ao prejuízo seletivo das memórias espacial, operacional e de procedimento, respectivamente (GASBARRI et al., 1996; DA CUNHA et al., 2003). O tratamento com (-)-linalol nas três doses estudadas preveniu o prejuízo na memória operacional, sugerindo uma ação neuroprotetora do (-)-linalol para os neurônios dopaminérgicos para o CPF, garantindo melhor desempenho dos animais.

Ainda em relação aos déficits cognitivos, utilizamos a tarefa de reconhecimento de objetos (TRO) para avaliar memória de curta e longa duração. Os animais hemiparkinsonianos não-tratados tiveram prejuízos na aquisição da memória de curta duração. A TRO é um teste comportamental utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido

(IZQUIERDO et al., 1998). O tratamento com (-)-linalol nas doses de 25 e 50 mg/kg conseguiu prevenir o prejuízo na aquisição da memória de curta duração.

Quanto a memória de longa duração, os animais não conseguiram discriminar entre o objeto novo e o familiar, após às 24 h. Estudo desenvolvido por Coelho et al. (2011), com o modelo de TRO, utilizando animais tratados com (-)-linalol nas doses de 50 e 100 mg/kg, encontraram resultados semelhantes aos nossos. Assim, nosso resultado é corroborado por esse estudo, que sugere que o (-)-linalol prejudica a aquisição de memória de longa duração sem interferir na memória de curta duração.

Estudos já demonstraram que o (-)-linalol modula a ativação do glutamato *in vitro* e *in vivo* por antagonismo aos receptores ionotrópicos do tipo NMDA (SILVA BRUM et al., 2001a,b; ELISABETSKY; SILVA BRUM, 2003). O glutamato é um neurotransmissor excitatório que promove mudanças na atividade sináptica associadas aos mecanismos responsáveis pela formação da memória (RIEDEL et al., 2003; CAMMAROTA et al., 2004). Assim, acreditamos que o (-)-linalol pode prejudicar a aquisição de memória em ratos, devido à sua ação antagonista aos receptores glutamatérgicos NMDA, uma vez que outros antagonistas do glutamato também parecem afetar a memória (WINTERS; BUSSEY, 2005; LIMA et al., 2005; BARKER et al., 2006).

A depressão é o transtorno neuropsiquiátrico mais comum na DP (GAENSLEN et al., 2011), variando entre 30% a 40% nos casos de DP (AARSLAND et al., 2011; CHEN; MARSH, 2013). Para avaliar a atividade do (-)-linalol, realizamos o teste do nado forçado, que permite avaliar o comportamento tipo-depressivo em animais, bem como o efeito de drogas antidepressivas. Os animais hemiparkinsonianos não-tratados apresentaram um comportamento tipo-depressivo. Estudos prévios já demonstram que a 6-OHDA é capaz de induzir esse comportamento em roedores (NEVES et al., 2015; HSUEH et al., 2018; LIMA et al., 2018). O tratamento com (-)-linalol nas três doses estudadas conseguiu prevenir o comportamento tipo-depressivo, através da redução do tempo de imobilidade. Esta diminuição é indicativa de efeito antidepressivo da droga.

Corroborando nossos resultados, o estudo de Cioanca et al. (2014) mostrou que o óleo de coentro (*Coriandrum sativum* L.), com cerca de 70% de (-)-linalol, foi capaz de reverter a imobilidade no teste do nado forçado induzida pelo peptídeo β -amilóide, no modelo de Doença de Alzheimer em ratos.

Guzmán-Gutiérrez et al. (2012; 2015), também avaliaram a ação antidepressiva do (-)-linalol (100 e 300 mg/kg) no teste do nado forçado, e verificaram que o tempo de imobilidade dos animais foi semelhante ao do controle positivo (imipramina 30 mg/kg). Esses mesmos autores avaliaram o mecanismo de ação antidepressivo do (-)-linalol através do uso de drogas antagonistas dos receptores serotoninérgicos, dopaminérgicos e noradrenérgicos. Verificou-se que o efeito antidepressivo do (-)-linalol ocorre através de sua interação com a via serotoninérgica através dos receptores pós-sinápticos 5-HT_{1A} e o sistema adrenérgico através dos receptores α_2 . O efeito antidepressivo do (-)-linalol também foi relatado em um teste de suspensão da cauda, em que os animais que receberam (-)-linalol (100 e 200 mg/kg) tiveram uma redução no tempo de imobilidade quando comparados ao grupo controle (COELHO et al., 2013).

De fato, há evidências fisiopatológicas de alterações serotoninérgicas na depressão associada à DP (SCHRAG, 2004), de forma que uma “hipótese serotoninérgica” foi proposta para explicar a depressão na DP (MAYEUX, 1990). As alterações nos sistemas dopaminérgico, noradrenérgico e serotoninérgico estriatais sugerem, deste modo, que um ou mais desses sistemas de neurotransmissores desempenha um importante papel no comportamento tipo-depressivo neste modelo de DP, fornecendo suporte à teoria de que esses neurotransmissores estejam envolvidos na depressão associada à DP (SCHRAG, 2004). Lee et al. (2015) demonstraram que a destruição do sistema dopaminérgico causa a redução da concentração de serotonina (5-HT), resultando na expressão do comportamento tipo-depressivo.

O comprometimento olfatório é uma manifestação precoce da DP, os pacientes relatam que não apresentam mais a capacidade de diferenciar os odores (GEORGIOPOULOS et al., 2017). No presente estudo, observamos que a 6-OHDA provocou prejuízo olfatório nos animais hemiparkinsonianos não tratados. Corroborando nossos dados, o estudo de Prediger e colaboradores (2010), com camundongos tratados com a neurotoxina MPTP intranasal, observou que a depleção temporária nos níveis de monoaminas nas terminações nervosas pode provocar prejuízo olfatório. Os animais que receberam o tratamento com (-)-linalol nas três doses estudadas mantiveram a capacidade olfatória, conseguindo distinguir entre o objeto com cheiro de fêmea e o objeto com cheiro neutro. Até onde se sabe,

não foi encontrada na literatura nenhuma referência com o (-)-linalol avaliando este tipo de deficiência olfatória.

Estudos prévios, em roedores, demonstraram um prejuízo na função olfatória em consequência de tratamentos que deprimem a neurotransmissão dopaminérgica, como MPTP (DLUZEN; KREUTZBERG, 1993) e reserpina (PREDIGER et al., 2004). É sugerido que a DA é importante para os processos de aprendizado e memória olfatória, uma vez que seus níveis cerebrais aumentam durante o aprendizado olfatório (BRENNAN; KEVERNE, 1997). Essa hipótese é sustentada por estudos que demonstraram que a depleção de DA ou a administração de antagonistas dopaminérgicos prejudicam a memória olfatória (DLUZEN; KREUTZBERG, 1993; PREDIGER et al., 2004).

O presente estudo mostrou que a neurotoxicidade da 6-OHDA causou uma diminuição significativa nas concentrações de DA, DOPAC e HVA, quando comparadas ao grupo FO. Em estudos anteriores do nosso grupo demonstramos estas alterações nas concentrações de monoaminas no corpo estriado direito (CED) com 6-OHDA (NEVES et al., 2015; COSTA et al., 2017; LIMA et al., 2018). Os nossos resultados também são corroborados por outros estudos (DEUMENS et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2013; CARMO et al., 2014; MARCON et al., 2019; ANGELOPOULOU et al., 2020). O tratamento com (-)-linalol nas três doses estudadas protegeu os neurônios contra o efeito neurotóxico da 6-OHDA, uma vez que foi observado o aumento nas concentrações de DA e DOPAC, seu principal metabólito cerebral, não apresentando diferença nos níveis de HVA. Além disso, não observamos resposta dose dependente, o que nos faz acreditar que o (-)-linalol já produz seu efeito máximo na dose de 25 mg/kg.

Esse efeito sugere uma ação neuroprotetora do (-)-linalol e seu potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a DP. O presente estudo é o primeiro que estudou o tratamento com (-)-linalol no modelo experimental de DP, produzindo aumento do conteúdo cerebral de DA, que diminui significativamente na SNpc de pacientes com a doença.

Além de proteger contra a depleção nos níveis estriatais de DA e de DOPAC (seu principal metabólito) nos animais hemiparkinsonianos, o (-)-linalol impediu o aumento das concentrações estriatais de glutamato nas 3 doses estudadas. Sabe-se que o glutamato exerce um importante papel na fisiopatologia da DP. Com a depleção dopaminérgica nigroestriatal, as projeções glutamatérgicas do núcleo

subtalâmico (NST) para os demais núcleos da base tornam-se hiperativas, ocorrendo alterações regulatórias nos receptores de glutamato, nestas regiões. Existem, também, evidências de atividade glutamatérgica aumentada no CE, em modelos animais, e o bloqueio de receptores glutamatérgicos atenua as manifestações motoras da DP (BLANDINI et al., 1996).

Atualmente, acredita-se que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNpc na DP, se deva a uma complexa interação de fatores, incluindo a excitotoxicidade glutamatérgica, mediada principalmente pela ativação excessiva dos receptores ionotrópicos de glutamato, particularmente o subtipo NMDA (VERNON et al., 2005). Esse desequilíbrio na excitação glutamatérgica na DP pode acelerar os processos excitotóxicos, representando então um alvo potencial para terapias neuroprotetoras (AMALRIC et al., 2013).

Estudos já demonstraram que o (-)-linalol modula a ativação do glutamato *in vitro* e *in vivo* por antagonismo aos receptores ionotrópicos do tipo NMDA (SILVA BRUM et al., 2001a,b; ELISABETSKY; SILVA BRUM, 2003). Assim, acreditamos que o (-)-linalol pode reduzir a sinalização glutamatérgica excessiva, devido à sua ação antagonista aos receptores glutamatérgicos NMDA, dessa forma minimizando os efeitos deletérios da excitotoxicidade glutamatérgica nos neurônios dopaminérgicos na SNpc (VERNON et al., 2005).

O presente estudo mostrou que a injeção estriatal unilateral de 6-OHDA causou uma diminuição significativa na concentração de taurina, quando comparada ao grupo FO. Estudo recente mostrou que os níveis de taurina no plasma de pacientes com DP estão diminuídos e estão associados a comprometimentos motores mais severos (ZHANG et al., 2016a), revelando um papel benéfico da taurina na DP. O (-)-linalol impediu a redução das concentrações de taurina nos animais tratados nas 3 doses estudadas, mantendo valores próximos aos do grupo FO.

A taurina, um dos principais β -aminoácido intracelular livre nos tecidos de mamíferos, está associado a várias funções fisiológicas, como processos antioxidantes e anti-inflamatórios (MENZIE et al., 2014; MARCINKIEWICZ; KONTNY, 2014). Che e colaboradores (2018), mostraram que camundongos tratados com paraquat e maneb apresentaram neurodegeneração dopaminérgica progressiva e déficits motores, que foram significativamente melhorados pela taurina. A taurina também atenuou a agregação de α -sinucleína nos animais, e

suprimiu a ativação microglial induzida pelo paraquat e maneb. Além disso, demonstrou-se que a taurina é capaz de inibir a ativação da enzima fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase (NOX2), interferindo na translocação da membrana da subunidade citosólica, via p47^{phox} e fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), dois fatores-chave para o início e manutenção da resposta inflamatória microglial (CHE et al., 2018).

Quanto aos aminoácidos inibitórios, o presente estudo mostrou que a toxicidade da 6-OHDA aumentou significativamente a concentração estriatal de GABA nos animais hemiparkinsonianos. O tratamento com (-)-linalol impediu o aumento dos níveis de GABA nos animais tratados nas 3 doses estudadas. Corroborando nossos resultados, o estudo de Yao et al. (2014), usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para medir o conteúdo de GABA no córtex de ratos com DP, mostrou que a concentração de GABA no córtex lesionado com 6-OHDA era maior do que no lado controle (não lesionado) e no grupo controle. Esse achado é consistente com os resultados de autópsias que mostram concentrações aumentadas de GABA no estriado de pacientes com DP (OZ et al., 2010).

Da mesma forma, estudo recente desenvolvido por Huang e colaboradores (2019), com modelo de DP em macacos primatas, que são mais próximos aos humanos em termos de estrutura e função cerebral do que outras espécies, mostrou através da técnica de HPLC, que a concentração de GABA no estriado lesionado dos macacos tratados com MPTP era estaticamente maior do que no estriado contralateral (não lesionado) e no grupo controle, confirmando que o aumento da concentração de GABA no estriado lesionado era intimamente relacionado à patogênese da DP.

Quanto a glicina, estudos clínicos acerca da utilização de antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA no tratamento da DP, têm resultados desapontadores e pode estar associado a efeitos adversos graves. Assim, estudos recentes mostram que a seletividade de ação do antagonista no receptor NMDA é pré-requisito para a sua eficácia. Logo, foi proposto que a estimulação glutamatérgica de receptores NMDA deva ser realizada através de modulação alostérica, via sítio modulatório da glicina. Esta hipótese fundamenta-se nos seguintes resultados: 1) metanálise em pacientes esquizofrênicos, indicam que agonistas nos sítios da glicina, incluindo a própria glicina e a D-serina, aliviam

sintomas parkinsonianos induzidos por antipsicóticos; 2) observações de estudos clínicos, indicam que a hipofunção de receptores NMDA está associada a distúrbios motores; 3) resultados preliminares com D-serina, em pacientes com DP; 4) dados indicando a eficácia da glicina em um modelo de discinesia tardia, em ratos; e 5) ausência de dados indicativos de excitotoxicidade, após uso crônico de elevadas doses de glicina como suplemento nutricional (HERESCO-LEVY et al., 2013).

O presente estudo mostrou que a toxicidade da 6-OHDA diminuiu significativamente a concentração estriatal de tirosina nos animais hemiparkinsonianos. Apenas (-)-linalol na dose de 100 mg/kg v.o., conseguiu impedir a redução dos níveis de tirosina nos animais tratados. A tirosina é um aminoácido não essencial, o principal precursor da tirosina hidroxilase (TH), que é limitante na síntese dos neurotransmissores DA e noradrenalina (NA) (GOLAN et al., 2014). Modelos animais mostraram que níveis elevados de tirosina plasmática impediram a depleção de NA e aumentaram a pressão arterial em ratos hipotensos saturando a enzima TH (CONLAY et al., 1981), que se encontra reduzida na DP (ZHU et al., 2012a). Estudos prévios demonstraram que a administração oral de tirosina, aumentou a sua concentração plasmática permitindo atravessar a barreira hematoencefálica, elevando sua disponibilidade para a síntese de catecolaminas (GROWDON et al., 1982). Dado isso, estudo recente mostrou que o tratamento oral com tirosina na dose de 1.000 mg/dia (500 mg, 2 vezes ao dia) por 7 dias, é segura e bem tolerada em indivíduos que recebem terapia com DA e outros medicamentos antiparkinsonianos, aumentando a sua concentração plasmática nos pacientes com DP (DIFRANCISCO-DONOGHUE et al., 2014).

Evidências crescentes sugerem que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na fisiopatologia da DP. Já se sabe, que o próprio metabolismo da DA pode contribuir para o estresse oxidativo, assim como a disfunção mitocondrial e a ativação das células gliais (HWANG, 2013; BLESA et al., 2015). Mostramos que a injeção estriatal de 6-OHDA promoveu um aumento significativo das concentrações de MDA e dos níveis de nitrito no CED nos animais hemiparkinsonianos. Outro dado importante, é que a lesão oxidativa não ficou restrita apenas a esta área cerebral, mas apresentou um efeito deletério no CPF e HC.

Em estudos anteriores do nosso grupo, demonstramos esta alteração no estresse oxidativo no CED com 6-OHDA (COSTA et al., 2017; LIMA et al., 2018). Nossos resultados também são corroborados por outros estudos (KHAN et al., 2010;

AHMAD et al., 2012). O tratamento com (-)-linalol foi capaz de prevenir o aumento das concentrações de MDA e de nitrito nas três áreas estudadas (CPF, HC e CED). Já, o tratamento com (-)-linalol foi capaz de prevenir a depleção dos níveis de GSH pela toxicidade da 6-OHDA no HC, apenas na dose de 25 mg/kg, e no CED nas doses de 50 e 100 mg/kg. Não conseguindo prevenir o efeito deletério da 6-OHDA no CPF.

Estudos prévios já demonstraram que a 6-OHDA apresenta efeitos oxidativos sobre várias áreas cerebrais, tais como CPF, cerebelo e HC, sendo este último o primeiro a sofrer os efeitos deletérios da oxidação da 6-OHDA, mesmo antes do surgimento do comprometimento motor decorrente da perda neuronal dopaminérgica na via nigroestriatal (MATSUMOTO et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Celik e Ozkaya (2002) mostraram propriedades antioxidantes do (-)-linalol no cérebro de cobaias após a administração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Mehri e colaboradores (2015), demonstraram a atividade neuroprotetora do (-)-linalol contra a neurotoxicidade induzida pela acrilamida, um potente neurotóxico, através da análise do estresse oxidativo (medições de GSH e peroxidação lipídica), no tecido cerebral de ratos.

Outros (PARK et al., 2016) mostraram os efeitos neuroprotetores do (-)-linalol na lesão neuronal cortical induzida pela privação de oxigênio-glucose, que é um modelo *in vitro* de acidente vascular cerebral isquêmico. Esses autores concluem que o (-)-linalol tem efeitos neuroprotetores, o que pode ser devido às suas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. Os efeitos neuroprotetores do (-)-linalol também foram demonstrados para déficits neuropatológicos e cognitivos induzidos por β -amilóide, em modelos animais de doença de Alzheimer em camundongos (SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2016; PAN et al., 2017). Além disso, efeitos neuroprotetores do nerolidol, um álcool sequeiterpeno, foram observados em um modelo experimental de DP induzido por rotenona (JAVED et al., 2016). Vale ressaltar, que somos o primeiro estudo a mostrar os efeitos neuroprotetores do (-)-linalol, em um modelo de doença neurodegenerativa induzido pela 6-OHDA, uma das principais neurotoxinas utilizadas em pesquisas com o modelo experimental de DP. Sugerimos que o (-)-linalol diminui significativamente o estresse oxidativo em ratos hemiparkinsonianos, devido os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios relacionados a ação neuroprotetora da substância.

Corroborando os nossos achados em relação a depleção dopaminérgica no CE lesionado dos animais hemiparkinsonianos. A aplicação da 6-OHDA resultou em uma redução de 46,4% e 31,6% na marcação de imunohistoquímica para TH e DAT, respectivamente, nos animais hemiparkinsonianos em comparação com o grupo FO. O tratamento com (-)-linalol na dose de 50 mg/kg (v.o.), promoveu proteção dos neurônios estriatais após lesão pela 6-OHDA, confirmada pelo aumento significativo da imunomarcação para TH e DAT. Estes resultados estão de acordo com estudos que utilizam o mesmo modelo e que apontam uma perda considerável de neurônios dopaminérgicos observada através de imunohistoquímica para TH e DAT (ZHU et al., 2012b; COSTA et al., 2017; GOES et al., 2018).

O (-)-linalol elevou os níveis de DA e de DOPAC, assim como aumentou a imunomarcação para TH e DAT no estriado, mostrando maior integridade dos neurônios e, portanto uma atividade neuroprotetora, o que ainda foi endossado pelos resultados do estresse oxidativo e de inflamação.

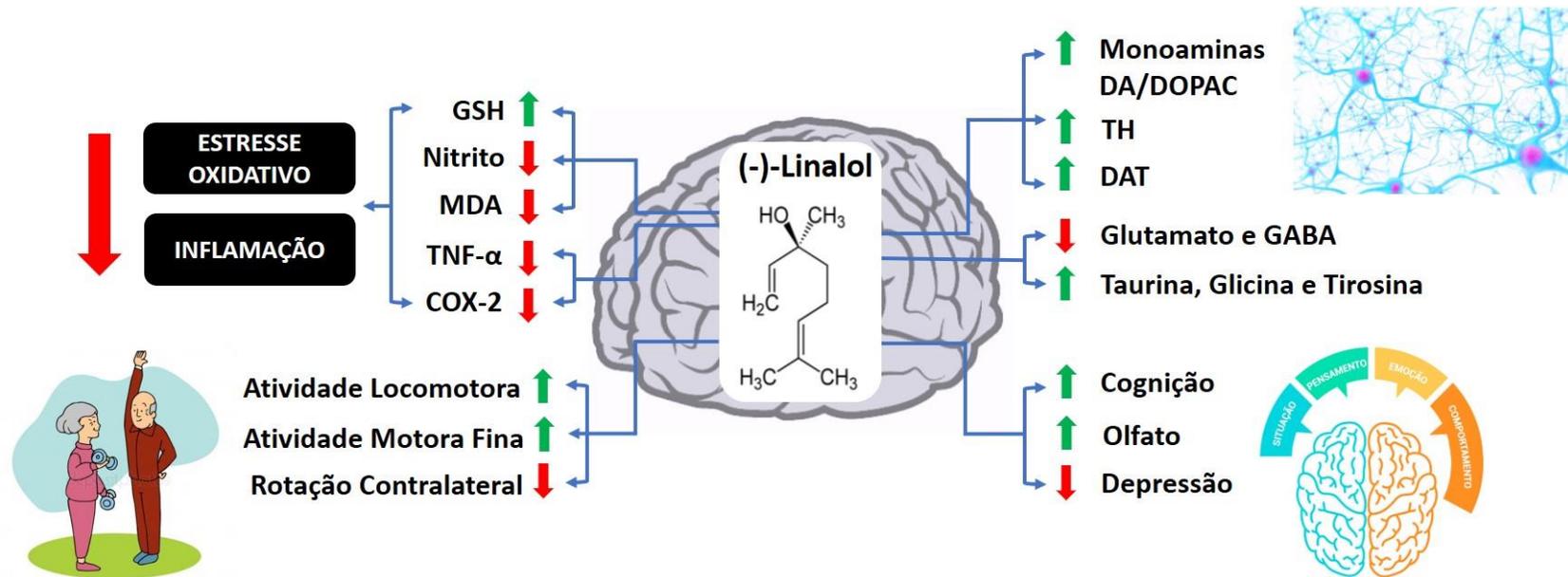
Pesquisas apontam que cérebros de pacientes com DP têm níveis aumentados de COX-2 e TNF- α , e isso pode ser reproduzido também no modelo em rato com a 6-OHDA (OKUNO et al., 2005; KOPPULA et al., 2012; FISCHER; MAIER, 2015). A COX-2 parece ser a principal responsável pela síntese de PGE2 em resposta à inflamação, e na DP ela está envolvida diretamente na neuroinflamação (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Já, o TNF- α é altamente tóxico para neurônios dopaminérgicos tanto *in vitro* (McGUIRE et al., 2001) como *in vivo* (CARVEY et al., 2003). No presente estudo, comprovamos um aumento na imunomarcação estriatal para COX-2 e TNF- α nos animais do grupo 6-OHDA em comparação ao grupo FO. O (-)-linalol (50 mg/kg, v.o.) protegeu do aumento dos níveis do mediador inflamatório COX-2, além de suprimir os níveis da citocina pro-inflamatória TNF- α . Assim, acreditamos que os efeitos neuroprotetores são devido a suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

A regulação da COX-2 e o seu metabolito PGE2 estão implicados em várias doenças inflamatórias, inclusive as neurodegenerativas como a DP (TSAI et al., 2017). Sabogal-Guáqueta et al. (2016), demonstraram o efeito anti-inflamatório do (-)-linalol em modelo animal de doença Alzheimer em camundongos transgênicos (3xTg-AD) e camundongos não transgênicos, com diminuição dos níveis de COX-2 no cérebro dos animais. Park et al. (2016) mostraram o efeito anti-inflamatório do (-)-linalol na lesão neuronal cortical induzida pela privação de oxigênio-glucose,

restaurando as atividades diminuídas de SOD e catalase, que se correlacionaram com a redução dos níveis de EROs nas células neuronais. Além disso, os efeitos anti-inflamatórios do nerolidol, um álcool sequiterpeno, foram observados em um modelo experimental de DP induzido por rotenona, através da inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e mediadores inflamatórios (COX-2 e iNOS) (JAVED et al., 2016).

O presente estudo é o primeiro a mostrar um efeito neuroprotetor do (-)-linalol, em um modelo de doença neurodegenerativa induzido pela 6-OHDA, uma das principais neurotoxinas utilizadas em pesquisas com o modelo experimental de DP. Sugerimos que o (-)-linalol diminui significativamente a neuroinflamação em ratos hemiparkinsonianos, devido aos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios relacionados a ação neuroprotetora da substância.

Figura 51 - Modelo esquemático da ação farmacológica do (-)-linalol no modelo experimental de DP induzido por 6-OHDA



No modelo esquemático pode-se observar que o (-)-linalol apresenta um efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade da 6-OHDA em ratos, evidenciado por meio da redução de MDA, Nitrito, TNF- α , COX-2 e aumento de GSH. O (-)-linalol também aumentou a população neuronal no corpo estriado, aumentando as concentrações de DA e DOPAC, bem como, a imunomarcagem para TH e DAT, e melhorou os sintomas motores e não motores. Legenda- COX-2: Ciclooxigenase 2; DA: Dopamina; DAT: Transportador de dopamina; DOPAC: Ácido 3,4-diidroxifenilacético; GSH: Glutathiona reduzida; MDA: Malondialdeído; TH: Tirosina hidroxilase; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa.

7 CONCLUSÃO

O (-)-linalol, composto monoterpênico, encontrado em diversas espécies de plantas da flora brasileira, demonstrou, através desse estudo, um efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade induzida no modelo de hemiparkinsonismo induzido por 6-OHDA em ratos por:

- Reduzir o comportamento rotacional induzido pela apomorfina;
- Antagonizar as alterações comportamentais e cognitivas;
- Aumentar a população de neurônios dopaminérgicos, demonstrado pelo aumento dos níveis de dopamina e DOPAC; bem como, da imunomarcação para a tirosina hidroxilase (TH) e o transportador de dopamina (DAT), no corpo estriado direito (lesionado);
- Proteger contra o aumento nos níveis estriatais dos aminoácidos glutamato e GABA; bem como a diminuição nos níveis de taurina, glicina (dose de 25 mg/kg) e tirosina (na dose de 100 mg/kg), no corpo estriado direito;
- Diminuir o estresse oxidativo, demonstrado pela redução da lipoperoxidação e dos níveis de nitrito/nitrato, no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado direito; bem como, aumentar as concentrações de GSH no hipocampo (dose de 25 mg/kg) e corpo estriado direito (doses de 50 e 100 mg/kg);
- Diminuir a neuroinflamação por reduzir à imunomarcação para COX-2 e TNF- α , no corpo estriado direito.

Assim, os resultados indicam que o (-)-linalol devido aos seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante, demonstra promissora ação neuroprotetora para o tratamento da DP.

REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D.; BRONNICK, K.; WILLIAMS-GRAY, C.; et al. Mild cognitive impairment in Parkinson disease: a multicenter pooled analysis. **Neurology**, 75:1062-1069, 2010.
- AARSLAND, D.; PAHLHAGEM, S.; BALLARD, C. G.; et al. Depression in Parkinson disease-epidemiology, mechanisms and management. **Nature Reviews Neurology**, 8:35-47, 2011.
- ABEL, E. L.; BILITZKE, P. J. A possible alarm substance in the forced swimming test. **Physiology & Behavior**, 48:233-239, 1990.
- ABOU-SLEIMAN, P. M.; HEALY, D. G.; QUINN, N.; et al. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 54:283-286, 2003.
- AGUIAR, L. M.; NOBRE, H. V. JR.; MACÊDO, D. S.; et al. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 84:415-419, 2006.
- AHMAD, S.; KHAN, M. B.; HODA, M. N.; et al. Neuroprotective effect of sesame seed oil in 6-hydroxydopamine induced neurotoxicity in mice model: cellular, biochemical and neurochemical evidence. **Neurochemical Research**, 37:516-526, 2012.
- AHMED, S. S.; SANTOSH, W. Metallomic profiling and linkage map analysis of early Parkinson's disease: a new insight to aluminum marker for the possible diagnosis. **PLoS One**, 5:e11252, 2010.
- AÏD, S.; BOSETTI, F. Targeting cyclooxygenases-1 and-2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. **Biochimie**, 93:46-51, 2011.
- AJSUVAKOVA, O. P.; TINKOV, A. A.; WILLKOMMEN, D.; et al. Assessment of copper, iron, zinc and manganese status and speciation in patients with Parkinson's disease: a pilot study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2019.
- ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends in Neurosciences**, 13:266-271, 1990.
- AMALRIC, M.; LOPEZ, S.; GOUDET, C.; et al. Group III and subtype 4 metabotropic glutamate receptor agonists: Discovery and pathophysiological applications in Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, 66:53-64, 2013.
- ANDRADE, L. A. D.; BARBOSA, E. R.; CARDOSO, F.; TEIVE, H. A. G. **Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento**. 2. ed. São Paulo: Seguimento Farma, 2006.

ANGELOPOULOU, E.; PYRGELIS, E. -S.; PIPERI, C. Neuroprotective potential of chrysin in Parkinson's disease: Molecular mechanisms and clinical implications. **Neurochemistry International**, 132:104612, 2020.

ANJOS, P. J. C.; LIMA, A. O.; CUNHA, P. S.; et al. Cardiovascular effects induced by Linalool in normotensive and hypertensive rats. **Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences**, 68:181-190, 2013.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, 21:205-235, 1973.

ARKINSON, C.; WALDEN, H. Parkin function in Parkinson's disease. **Science**, 360:267-268, 2018.

ASCHERIO, A.; CHEN, H.; WEISSKOPF, M. G.; et al. Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 60:197-203, 2006.

ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: Risk factors and prevention. **The Lancet Neurology**, 15:1257-1272, 2016.

BA, F.; MARTIN, W. R. W. Dopamine transporter imaging as a diagnostic tool for parkinsonism and related disorders in clinical practices. **Parkinsonism and Related Disorders**, 21:87-94, 2015.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils- A review. **Food and Chemical Toxicology**, 46:446-475, 2008.

BALLANGER, B.; KLINGER, H.; ECHE, J.; et al. Role of serotonergic 1A receptor dysfunction in depression associated with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 27:84-89, 2012.

BARBOSA, E. R. **Tratamento das complicações neuropsiquiátricas na doença de Parkinson**. In: Andrade, L. A. F.; Barbosa, R. E.; Cardoso, F.; Teive, H. A. G. Doença de Parkinson: estratégias atuais de tratamento. 2 ed. São Paulo: Segmento Farma, 2006. p. 143-53.

BARKER, G. R.; WARBURTON, E. C.; KODER, T.; et al. The different effects on recognition memory of perirhinal kainate and NMDA glutamate receptor antagonism: implications for underlying plasticity mechanisms. **The Journal of Neuroscience**, 26:3561-3566, 2006.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nature Reviews Drug Discovery**, 3:205-214, 2004.

BARTELS, A. L.; LEENDERS, K. L. Cyclooxygenase and neuroinflammation in Parkinson's disease neurodegeneration. **Current neuropharmacology**, 8:62-68, 2010.

- BASTIDE, M. F.; MEISSNER, W. G.; PICCONI, B.; et al. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, 132:96-168, 2015.
- BATISTA, P. A.; WERNER, M. F. P.; OLIVEIRA, E. C.; et al. Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalool in mice. **Neuroscience Letters**, 440:299-303, 2008.
- BATISTA, P. A.; WERNER, M. F. P.; OLIVEIRA, E. C.; et al. The antinociceptive effect of (-)-linalool in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice. **The Journal of Pain**, 11:1222-1229, 2010.
- BATTISTI, C.; FORMICHI, P.; RADII, E.; FEDERICO, A. Oxidative-stress-induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson disease secondary to alpha-synuclein mutation. **Journal of the Neurological Sciences**, 267:120-124, 2008.
- BAULAC, M.; VERNEY, C.; BERGER, B. Dopamine innervation of the parahippocampal and hippocampal regions in the rat. **Revue Neurologique (Paris)**, 142:895-905, 1986.
- BENKLER, M.; AGMON-LEVIN, N.; HASSIN-BAER, S.; et al. Immunology, autoimmunity, and autoantibodies in Parkinson's disease. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, 42:164-171, 2012.
- BERG, D.; POSTUMA, R. B.; BLOEM, B.; et al. Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 29:454-462, 2014.
- BETARBET, R.; SHERER, T. B.; GREENAMYRE, J. T. Animal models of Parkinson's disease. **BioEssays**, 24:308-318, 2002.
- BLANDINI, F.; ARMENTERO, M. -T.; MARTIGNONI, E. The 6-hydroxydopamine model: News from the past. **Parkinsonism and Related Disorders**, 14:S124-S129, 2008.
- BLANDINI, F.; PORTER, R. H.; GREENAMYRE, J. T. Glutamate and Parkinson's disease. **Molecular Neurobiology**, 12:73-94, 1996.
- BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in Neuroanatomy**, 8:1-12, 2014.
- BLESA, J.; TRIGO-DAMAS, I.; QUIROGA-VARELA, A.; JACKSON-LEWIS, V. R. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, 9:91, 2015.
- BOUABID, S.; TINAKOUA, A.; LAKHDAR-GHAZAL, N.; BENZAOUZ, A. Manganese neurotoxicity: behavioral disorders associated with dysfunctions in the basal ganglia and neurochemical transmission. **Journal of Neurochemistry**, 136:677-691, 2016.

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

BOVÉ, J.; PROU, D.; PERIER, C.; PRZEDBORSKI, S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. **NeuroRx**, 2:484-494, 2005.

BOVOLENTA, T. M.; FELICIO, A. C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein** (São Paulo), 14:7-9, 2016.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K.; RUB, U.; et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, 24:197-211, 2003.

BRADLEY, B. F.; STARKEY, N. J.; BROWN, S. L.; LEA, R. W. The effects of prolonged rose odor inhalation in two animal models of anxiety. **Physiology & Behavior**, 92:931-938, 2007.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology**, 51:457-481, 1997.

BROADHURST, P. L. **Experiments in psychogenetics: applications of biometrical genetics to the inheritance of behaviour**. In: Eysenk, H. J. Experiments in personality: psychogenetics and psychopharmacology. London: Routledge & Kegan Paul, 1960. p. 30-71.

BRODACKI, B.; STASZEWSKI, J.; TOCZYŁOWSKA, B.; et al. Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. **Neuroscience Letters**, 441:158-162, 2008.

BROWN, A. R.; ANTLE, M. C.; TESKEY, G. C. High frequency stimulation of the subthalamic nucleus acutely rescues motor deficits and neocortical movement representations following 6-hydroxydopamine administration in rats. **Experimental Neurology**, 231:82-90, 2011.

BRUNDIN, P.; LI, J. Y.; HOLTON, J. L.; et al. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. **Nature Reviews Neuroscience**, 9:741-745, 2008.

BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; JAGER, W.; et al. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 82:660-664, 1993.

BUTALA, A.; SHEPARD, M.; PONTONE, G. Neuropsychiatric aspects of Parkinson disease psychopharmacology: Insights from circuit dynamics. **Handbook of Clinical Neurology**, 165:83-121, 2019.

CALNE, D. A definition of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, 11:S39-S40, 2005.

CALOPA, M.; BAS, J.; CALLÉN, A.; MESTRE, M. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes in Parkinson patients. **Neurobiology of Disease**, 38:1-7, 2010.

- CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L. R. M.; BONINI, J. S.; et al. Hippocampal glutamate receptors in fear memory consolidation. **Neurotoxicity Research**, 6:205-212, 2004.
- CARLESÌ, C.; CALDARAZZO, I. E.; PIAZZA, S.; et al. Oxidative stress modulation in neurodegenerative diseases. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, 4:219-225, 2011.
- CARMO, M. R. S.; MENEZES, A. P. F.; NUNES, A. C. L.; et al. The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. **Neuropharmacology**, 81:142-152, 2014.
- CARVEY, P. M.; CHANG, Q.; LIPTON, J. W.; LING, Z. Prenatal exposure to the bacteriotoxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: a potential, new model of Parkinson's disease. **Frontiers in Bioscience**, 8:826-837, 2003.
- CASSANO, T.; SERVIDDIO, G.; GAETANI, S.; et al. Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, 33:1121.e1-1121.e12, 2012.
- CAUDLE, W. M.; ZHANG, J. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. **Experimental Neurology**, 220:230-233, 2009.
- CEBRIAN, C.; LOIKE, J. D.; SULZER, D. Neuroinflammation in Parkinson's disease animal models: a cell stress response or a step in neurodegeneration? **Current Topics in Behavioral Neurosciences**, 22:237-270, 2015.
- CELIK, S.; OZKAYA, A. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H₂O₂. **Journal of biochemistry and molecular biology**, 35:547-552, 2002.
- CERSOSIMO, M. G.; BENARROCH, E. E. Estrogen actions in the nervous system: complexity and clinical implications. **Neurology**, 85:263-273, 2015.
- CHANG, D.; NALLS, M. A.; HALLGRÍMSDÓTTIR, I. B.; et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies 17 new Parkinson's disease risk loci. **Nature Genetics**, 49:1511-1516, 2017.
- CHARCOT, J. M. **De la paralysie agitante**. Cinquième leçon. In Charcot JM. Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière. Adrien Delahaye et E. Paris: Lecrosnier Éditeurs, 1880.
- CHEN, J. J.; MARSH, L. Depression in Parkinson's disease: Identification and management. **Pharmacotherapy**, 33:972-983, 2013.

CHE, Y.; HOU, L.; SUN, F.; et al. Taurine protects dopaminergic neurons in a mouse Parkinson's disease model through inhibition of microglial M1 polarization. **Cell Death and Disease**, 9:435, 2018.

CHEN, Y.; MAO, Y.; ZHOU, D.; et al. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. **Behavioural Brain Research**, 212:49-55, 2010.

CHENG, X.; SHEN, Y.; LI, R. Targeting TNF: a therapeutic strategy for Alzheimer's disease. **Drug Discovery Today**, 19:1822-1827, 2014.

CHENG, X.; YANG, L.; HE, P.; et al. Differential activation of tumor necrosis factor receptors distinguishes between brains from Alzheimer's disease and non-demented patients. **Journal of Alzheimer's Disease**, 19:621-630, 2010.

CHERTOFF, M.; DI PAOLO, N.; SCHOENEBERG, A.; et al. Neuroprotective and neurodegenerative effects of the chronic expression of tumor necrosis factor alpha in the nigrostriatal dopaminergic circuit of adult mice. **Experimental Neurology**, 227:237-251, 2011.

CHHILLAR, N.; SINGH, N. K.; BANERJEE, B. D.; et al. Organochlorine pesticide levels and risk of Parkinson's disease in North Indian Population. **International Scholarly Research Notices Neurology**, Article ID 371034, 6 pages, 2013.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Nitrosylation and nitration of mitochondrial complex I in Parkinson's disease. **Free Radical Research**, 45:53-58, 2011.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Redox imbalance in Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1780:1362-1367, 2008.

CHOI, J.; SULLARDS, M. C.; OLZMANN, J. A.; et al. Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer diseases. **Journal of Biological Chemistry**, 281:10816-10824, 2006.

CHUNG, K. K.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. The role of the ubiquitin-proteasomal pathway in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, 24:S7-S14, 2001.

CIOANCA, O.; HRITCU, L.; MIHASAN, M.; et al. Inhalation of coriander volatile oil increased anxiolytic-antidepressant-like behaviors and decreased oxidative status in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease. **Physiology & Behavior**, 131:68-74, 2014.

COELHO, V. R.; GIANESINI, J.; VON BOROWSKI, R.; et al. (-)-Linalool, a naturally occurring monoterpene compound, impairs memory acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. **Phytomedicine**, 18:896-901, 2011.

COELHO, V.; MAZZARDO-MARTINS, L.; MARTINS, D. F.; et al. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice. **Journal of Natural Medicines**, 67:876-880, 2013.

CONLAY, L. A.; MAHER, T. J.; WURTMAN, R. J. Tyrosine increases blood pressure in hypotensive rats. **Science**, 212:559-560, 1981.

COSTA, R. O.; GADELHA-FILHO, C. V. J.; COSTA, A. E. M.; et al. The treadmill exercise protects against dopaminergic neuron loss and brain oxidative stress in Parkinsonian rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017:ID 2138169, 2017.

CRISPIM JUNIOR, C. F.; PEDERIVA, C. N.; BOSE, R. C.; et al. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. **Computers in Biology and Medicine**, 42:257-264, 2012.

CRYAN, J. F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, 23:238-245, 2002.

CZABOTAR, P. E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 15:49-63, 2014.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, E. C.; FERRO, M. M.; et al. Hemiparkinsonian rats rotate toward the side with the weaker dopaminergic neurotransmission. **Behavioral Brain Research**, 189:364-372, 2008.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI, S.; WIETZIKOSKI, E. C.; et al. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiology of Learning and Memory**, 79:236-242, 2003.

DA SILVA, F. L.; COELHO CERQUEIRA, E.; DE FREITAS, M. S.; et al. Vitamins K interact with N-terminus α -synuclein and modulate the protein fibrillization in vitro. Exploring the interaction between quinones and α -synuclein. **Neurochemistry International**, 62:103-112, 2013.

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

DAVIS, A. A.; RACETTE, B. Parkinson disease and cognitive impairment: five new things. **Neurology Clinical Practice**, 6:452-458, 2016.

De ALMEIDA, R. N.; ARAÚJO, D. A.; GONÇALVES, J. C.; et al. Rosewood oil induces sedation and inhibits compound action potential in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 124:440-443, 2009.

DE LELLA EZCURRA, A. L.; CHERTOFF, M.; FERRARI, C.; et al. Chronic expression of low levels of tumor necrosis factor- α in the substantia nigra elicits

progressive neurodegeneration, delayed motor symptoms and microglia/macrophage activation. **Neurobiology of Disease**, 37:630-640, 2010.

DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. Review: sporadic Parkinson's disease: development and distribution of α -synuclein pathology. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, 42:33-50, 2016.

DEHAY, B.; FERNAGUT, P. O. Alpha-synuclein-based models of Parkinson's disease. **Revue Neurologique**, 172:371-378, 2016.

DEMAAGD, G.; PHILIP, A. Parkinson's disease and its management: Part 1: Disease entity, risk factors, pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis. **Pharmacy and Therapeutics**, 40:504-532, 2015.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, 175:303-317, 2002.

DEVINE, M. J.; GWINN, K.; SINGLETON, A.; HARDY, J. Parkinson's disease and alpha-synuclein expression. **Movement Disorders**, 26:2160-2168, 2011.

DIAMOND, A. Executive Function. **Annual Review of Psychology**, 64:135-168, 2013.

DIFRANCISCO-DONOGHUE, J.; RABIN, E.; LAMBERG, E. M.; WERNER, W. G. Effects of tyrosine on Parkinson's Disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Movement Disorders Clinical Practice**, 1:348-353, 2014.

DI MONTE, D. A.; LAVASANI, M.; MANNING-BOG, A. B.; et al. Environmental factors in Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, 23:487-502, 2002.

DLUZEN, D. E.; KREUTZBERG, J. D. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. **Brain Research**, 609:98-102, 1993.

DOHERTY, K. M.; VAN DE WARRENBURG, B. P.; PERALTA, M. C.; et al. Postural deformities in Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, 10:538-549, 2011.

DORSEY, E. R.; CONSTANTINESCU, R.; THOMPSON, J. P.; et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, 68:384-386, 2007.

DOS SANTOS, É. R. Q.; MAIA, C. S. F.; FONTES JUNIOR, E. A.; et al. Linalool-rich essential oils from the Amazon display antidepressant-type effect in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, 212:43-49, 2018.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 186:421-431, 1990.

DU, K.; LIU, M. -Y.; PAN, Y. -Z.; et al. Association of circulating manganese levels with Parkinson's disease: A meta-analysis. **Neuroscience Letters**, 665:92-98, 2018.

DUFEK, M.; REKTOROVA, I.; THON, V.; et al. Interleukin-6 may contribute to mortality in Parkinson's disease patients: a 4-year prospective study. **Parkinson's Disease**, 2015:898192, 2015.

DUNCAN, A. J.; HEALES, S. J. Nitric oxide and neurological disorders. **Molecular Aspects of Medicine**, 26:67-96, 2005.

DUNNETT, S. B.; LELOS, M. Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. **Progress in Brain Research**, 184:35-51, 2010.

DUSEK, P.; ROOS, P. M.; LITWIN, T.; et al. The neurotoxicity of iron, copper and manganese in Parkinson's and Wilson's disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 31:193-203, 2015.

DUTTA, G.; ZHANG, P.; LIU, B. The lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 22:453-464, 2008.

ELBAZ, A.; CLAVEL, J.; RATHOUZ, P. J.; et al. Professional exposure to pesticides and Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 66:494-504, 2009.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L. F. S.; SOUZA, D. O. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, 6:107-113, 1999.

ELISABETSKY, E.; MARSCHNER J.; SOUZA, D. O. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral-cortex. **Neurochemical Research**, 20:461-465, 1995.

ELISABETSKY, E.; SILVA BRUM, L. F. Linalool as active component of traditional remedies: anticonvulsant properties and mechanisms of action. **Curare**, 26:45-52, 2003.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioral Brain Research**, 31:47-59, 1988.

ENNACEUR, A.; MICHALIKOVA, S.; BRADFORD, A.; AHMED, S. Detailed analysis of the behavior of Lister and Wistar rats in anxiety, object recognition and object location tasks. **Behavioural Brain Research**, 159:247-266, 2005.

ENNACEUR, A.; NEAVE, N.; AGGLETON, J. P. Spontaneous object recognition and object location memory in rats: The effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. **Experimental Brain Research**, 113:509-519, 1997.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, 2011:1-9, 2011.

FERRAZ, H. B. Agonistas Dopaminérgicos no tratamento da Doença de Parkinson. **Revista Neurociências**, 12:192-197, 2004.

FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015:610813, 2015.

FLEMING, S. M. Mechanisms of gene-environment interactions in Parkinson's disease. **Current Environmental Health Reports**, 4:192-199, 2017.

FOX, S. H.; KATZENSCHLAGER, R.; LIM, S. Y.; et al. The movement disorder society 7045 evidence-based medicine review update: treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 26:S2-S41, 2011.

FUNCHAL, C. S.; DANI, C. **Neurociências: modelos experimentais em animais**. Porto Alegre: EdiPUCRS, Editora Universitária Metodista, 2014. p. 185.

FUKUSHIMA, T.; TAN, X.; LUO, Y.; KANDA, H. Relationship between blood levels of heavy metals and Parkinson's disease in China. **Neuroepidemiology**, 34:18-24, 2010.

GAENSLEN, A.; SWID, I.; LIEPELT-SCARFONE, I.; et al. The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 26:653-658, 2011.

GALHARDO, M. M. A. M. C.; AMARAL, A. K. F. J.; VIEIRA, A. C. C. Caracterização dos distúrbios cognitivos na Doença de Parkinson. **Revista CEFAC** (São Paulo), 11:S251-S257, 2009.

GALVAN, A.; DEVERGNAS, A.; WICHMANN, T. Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. **Frontiers in Neuroanatomy**, 9:1-21, 2015.

GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of parkinsonism. **Clinical Neurophysiology**, 119:1459-1474, 2008.

GARCIA-MUNOZ, M.; CARRILLO-REID, L.; ARBUTHNOTT, G. W. Functional anatomy: dynamic states in basal ganglia circuits. **Frontiers in Neuroanatomy**, 4:1-7, 2010.

GARCIA RUIZ, P. J.; CATALÁN, M. J.; FERNÁNDEZ CARRIL, J. M. Initial motor symptoms of Parkinson disease. **Neurologist**, 17:S18-S20, 2011.

GASBARRI, A.; SULLI, A.; INNOCENZI, R.; et al. Spatial memory impairment induced by lesions of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. **Neuroscience**, 74:1037-1044, 1996.

GEORGIPOULOS, C.; WARNTJES, M.; DIZDAR, N.; et al. Olfactory impairment in Parkinson's disease studied with diffusion tensor and magnetization transfer imaging. **Journal of Parkinson's Disease**, 7:301-311, 2017.

GEORGIPOULOS, C.; WITT, S. T.; HALLER, S.; et al. A study of neural activity and functional connectivity within the olfactory brain network in Parkinson's disease. **NeuroImage: Clinical**, 23:101946, 2019.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, 103:987-1041, 1996.

GESI, M.; SANTINAMI, A.; RUFFOLI, R.; et al. Novel aspects of dopamine oxidative metabolism (confounding outcomes take place of certainties). **Pharmacology and Toxicology**, 89:217-224, 2001.

GETNET, D.; GROSSO, J. F.; GOLDBERG, M. V.; et al. A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. **Molecular Immunology**, 47:1595-1600, 2010.

GHAHARI, L.; SAFARI, M.; JABERI, K. R.; et al. Mesenchymal stem cells with granulocyte colony-stimulating factor reduce stress oxidative factors in Parkinson's Disease. **Iranian Biomedical Journal**, 24:89-98, 2020.

GHOSH, A.; LANGLEY, M. R.; HARISCHANDRA, D. S.; et al. Mitoapocynin treatment protects against neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in a preclinical animal model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 11:259-278, 2016.

GIROTTO, S.; STURLESE, M.; BELLANDA, M.; et al. Dopamine-derived quinones affect the structure of the redox sensor DJ-1 through modifications at Cys-106 and Cys-53. **Journal of Biological Chemistry**, 287:18738-18749, 2012.

GLINKA, Y.; PRUD'HOMME, G. J. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor β -1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. **Journal of Leukocyte Biology**, 84:302-310, 2008.

GLUCK, M. R.; ZEEVALK, G. D. Inhibition of brain mitochondrial respiration by dopamine and its metabolites: implications for Parkinson's disease and catecholamine-associated diseases. **Journal of Neurochemistry**, 91:788-795, 2004.

GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M. G.; DEL TREDICI, K.; BRAAK, H. 100 years of Lewy pathology. **Nature Reviews Neurology**, 9:13-24, 2013.

GOES, A. T. R.; JESSE, C. R.; ANTUNES, M. S.; et al. Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: involvement of neuroinflammation and neurotrophins. **Chemico-Biological Interactions**, 279:111-120, 2018.

GOETZ, C. G.; BONDUELLE, M.; GELFAND, T. **Charcot: constructing neurology**. New York: Oxford University Press, 1995. p. 113-120.

GOETZ, C. G. **Charcot: the clinician. the tuesday lessons**. New York: Raven Press, 1987. p. 123-140.

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Principios de farmacología: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

GÓMEZ, R.; HUDSON, L.; VENEGAS, P. Trastornos autonómicos en enfermedad de Parkinson. **Revista Médica de Chile**, 139:100-106, 2011.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, J.; PRIETO-TEDEJO, R.; VELASCO-PALACIOS, L.; et al. Trastornos digestivos en la enfermedad de Parkinson: disfagia y sialorrea. **Revista Neurología**, 50:S51-S54, 2010.

GRABLI, D.; KARACHI, C.; WELTER, M. L.; et al. Normal and pathological gait: what we learn from Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, 83:979-985, 2012.

GREENAMYRE, J. T.; PORTER, R. H. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. **Neurology**, 44:S7-S13, 1994.

GREEN, D. R. Apoptotic Pathways: Ten minutes to dead. **Cell**, 121:671-674, 2005.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, 126:131-138, 1982.

GRILLNER, S.; HELLGREN, J.; MÉNARD, A.; et al. Mechanisms for selection of basic motor programs--roles for the striatum and pallidum. **Trends in Neurosciences**, 28:364-370, 2005.

GROWDON, J. H.; MELAMED, E.; LOGUE, M.; et al. Effects of oral l-tyrosine administration on CSF tyrosine and homovanillic acid levels in patients with Parkinson's disease. **Life Sciences**, 30:827-832, 1982.

GULLEY, J. M. Individual differences in novelty- and cocaine-induced locomotor activity as predictors of food-reinforced operant behavior in two outbred rat strains. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 86:749-757, 2007.

GULLEY, J. M.; ZAHNISER, N. R. Rapid regulation of dopamine transporter function by substrates, blockers and presynaptic receptor ligands. **European Journal of Pharmacology**, 479:139-152, 2003.

GUO, Y.; XU, W.; LIU, F. -T.; et al. Modifiable risk factors for cognitive impairment in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. **Movement Disorders**, 34:876-883, 2019.

GUPTA, A.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. What causes cell death in Parkinson's disease? **Annals of Neurology**, 64:S3-S15, 2008.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L.; BONILLA-JAIME, H.; GÓMEZ-CANSINO, R.; REYES-CHILPA, R. Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. **Life Sciences**, 128:24-29, 2015.

GUZMÁN-GUTIÉRREZ, S. L.; GÓMEZ-CANSINO, R.; GARCÍA-ZEBADÚA, J. C.; et al. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of β -pinene and linalool as active principles. **Journal of Ethnopharmacology**, 143:673-679, 2012.

HALESTRAP, A. P.; MCSTAY, G. P.; CLARKE S. J. The permeability transition pore complex: another view. **Biochimie**, 84:153-166, 2002.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, 18:385-403, 1934.

HATCHER, J. M.; RICHARDSON, J. R.; GUILLOT, T. S.; et al. Diethylstilbestrol exposure induces oxidative damage in the mouse nigrostriatal dopamine system. **Experimental Neurology**, 204:619-630, 2007.

HAUSER, D. N.; DUKES, A. A.; MORTIMER, A. D.; HASTINGS, T. G. Dopamine quinone modifies and decreases the abundance of the mitochondrial selenoprotein glutathione peroxidase 4. **Free Radical Biology and Medicine**, 65:419-427, 2013.

HAWEL, M.; FURON, E.; CANOVA, C.; et al. Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. **Brain Research Reviews**, 48:220-233, 2005.

HAYES, M. W.; FUNG, V. S.; KIMBER, T. E.; O'SULLIVAN, J. D. Updates and advances in the treatment of Parkinson disease. **Medical Journal of Australia**, 1-7, 2019.

HECHTNER, M. C.; VOGT, T.; ZOLLNER, Y.; et al. Quality of life in Parkinson's disease patients with motor fluctuations and dyskinesias in five European countries. **Parkinsonism & Related Disorders**, 20:969-974, 2014.

HELY, M. A.; REID, W. G.; ADENA, M. A.; et al. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. **Movement Disorders**, 23:837-844, 2008.

HENDERSON, J. M.; WATSON, S.; HALLIDAY, G. M.; et al. Relationships between various behavioural abnormalities and nigrostriatal dopamine depletion in the unilateral 6-OHDA-lesioned rat. **Behavioural Brain Research**, 139:105-113, 2003.

HERESCO-LEVY, U.; GELFIN, G.; BLOCH, B.; et al. A randomized add-on trial of high-dose D-cycloserine for treatment-resistant depression. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, 16:501-506, 2013.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **The Lancet Neurology**, 8:382-397, 2009.

HIRSCH, E. C.; VYAS, S.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, 18:S210-S212, 2012.

HOEKSTRA, J. G.; COOK, T. J.; STEWART, T.; et al. Astrocytic dynamin-like protein 1 regulates neuronal protection against excitotoxicity in Parkinson disease. **The American Journal of Pathology**, 185:536-549, 2015.

HOZUMI, I.; HASEGAWA, T.; HONDA, A.; et al. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, 303:95-99, 2011.

HSUEH, S. -C.; CHEN, K. -Y.; LAI, J. -H.; et al. Voluntary physical exercise improves subsequent motor and cognitive impairments in a rat model of Parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, 19:508-520, 2018.

HUANG, L.; REN, Y.; ZENG, Z.; et al. Comparative study of striatum GABA concentrations and magnetic resonance spectroscopic imaging in Parkinson's disease monkeys. **BMC Neuroscience**, 20:42, 2019.

HUMMEL, T.; WITT, M.; REICHMANN, H.; et al. Immunohistochemical, volumetric, and functional neuroimaging studies in patients with idiopathic Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, 289:119-122, 2010.

HUO, M.; CUI, X.; XUE, J.; et al. Anti-inflammatory effects of linalool in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model. **Journal of Surgical Research**, 180:e47-e54, 2013.

HWANG, O. Role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Experimental Neurobiology**, 22:11-17, 2013.

HYND, M. R.; SCOTT, H. L.; DODD, P. R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, 45:583-595, 2004.

IANCU, R.; MOHAPEL, P.; BRUNDIN, P.; PAUL, G. Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, 162:1-10, 2005.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D. M.; MELLO e SOUZA, T.; et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, 393:635-636, 1998.

JANA, S.; SINHA, M.; CHANDA, D.; et al. Mitochondrial dysfunction mediated by quinone oxidation products of dopamine: implications in dopamine cytotoxicity and pathogenesis of Parkinson's disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1812:663-673, 2011.

JAVED, H.; AZIRNULLAH, S.; KHAIR, S. B. A.; et al. Neuroprotective effect of nerolidol against neuroinflammation and oxidative stress induced by rotenone. **BMC Neuroscience**, 17:58, 2016.

JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. Human alpha-synuclein overexpression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. **Neuroscience Letters**, 320:146-150, 2002.

KADASTIK-EERME, L.; MULDMAA, M.; LILLES, S.; et al. Nonmotor features in Parkinson's disease: what are the most important associated factors? **Parkinson's Disease**, 2016:1-8, 2016.

KALIA, L. V.; KALIA, S. K. α -synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, 28:375-381, 2015.

KANNARKAT, G. T.; BOSS, J. M.; TANSEY, M. G. The role of innate and adaptive immunity in Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, 3:493-514, 2013.

KATZENSCHLAGER, R.; SAMPAIO, C.; COSTA, J.; LEES, A. Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2:CD003735, 2003.

KAUFMANN, H.; GOLDSTEIN, D. S. Autonomic dysfunction in Parkinson disease. **Handbook of Clinical Neurology**, 117:259-278, 2013.

KAUR, K.; GILL, J. S.; BANSAL, P. K.; DESHMUKH, R. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, 381:308-314, 2017.

KEW, J. N.; KEMP, J. A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology (Berl)**, 179:4-29, 2005.

KHAN, M. M.; AHMAD, A.; ISHRAT, T.; et al. Resveratrol attenuates 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage and dopamine depletion in rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**, 1328:139-151, 2010.

KIM, Y. S.; LEE, K. J.; KIM, H. Serum tumour necrosis factor- α and interleukin-6 levels in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. **Psychogeriatrics**, 17:224-230, 2017.

KINCSES, Z. T.; VECSEI, L. Pharmacological therapy in Parkinson's disease: focus on neuroprotection. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, 17:345-367, 2011.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BJÖRKLUND, A. Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intraestriatal 6-hydroxydopamine in the rat. **Experimental Neurology**, 152:259-277, 1998.

KIRIK, D.; ROSENBLAD, C.; BURGER, C.; et al. Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. **The Journal of Neuroscience**, 22:2780-2791, 2002.

KOPPULA, S.; KUMAR, H.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. Reactive oxygen species and inhibitors of inflammatory enzymes, NADPH oxidase, and iNOS in experimental models of Parkinson's disease. **Mediators of Inflammation**, 2012:823902, 2012.

KOUCHAKI, E.; KAKHAKI, R. D.; TAMTAJI, O. R.; et al. Increased serum levels of TNF- α and decreased serum levels of IL-27 in patients with Parkinson disease and

their correlation with disease severity. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, 166:76-79, 2018.

KOZLOWSKI, H.; JANICKA-KLOSB, A.; BRASUN, J.; et al. Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation). **Coordination Chemistry Reviews**, 253:2665-2685, 2009.

KOZLOWSKI, H.; LUCZKOWSKI, M.; REMELLI, M.; VALENSIN, D. Copper, zinc and iron in neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's and prion diseases). **Coordination Chemistry Reviews**, 256:2129-2141, 2012.

KRAVITZ, A. V.; FREEZE, B. S.; PARKER, P. R.; et al. Regulation of parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of basal ganglia circuitry. **Nature**, 466:622-626, 2010.

KREITZER, A. C.; MALENKA, R. C. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. **Neuron**, 60:543-554, 2008.

KUHN, D. M.; ARTHUR, R. E.; THOMAS, D. M.; ELFERINK, L. A. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, 73:1309-1317, 1999.

LAN, A. P.; CHEN, J.; CHAI, Z. F.; HU, Y. The neurotoxicity of iron, copper and cobalt in Parkinson's disease through ROS-mediated mechanisms. **Biometals**, 29:665-678, 2016.

LANCIEGO, J. L.; LUQUIN, N.; OBESO, J. A. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2:a009621, 2012.

LEAL, S. S.; BOTELHO, H. M.; GOMES, C. M. Metal ions as modulators of protein conformation and misfolding in neurodegeneration. **Coordination Chemistry Reviews**, 256:2253-2270, 2012.

LEE, C. S.; SONG, E. H.; PARK, S. Y.; HAN, E. S. Combined effect of dopamine and MPP+ on membrane permeability in mitochondria and cell viability in PC12 cells. **Neurochemistry International**, 43:147-154, 2003.

LEE, M.; RYU, Y. H.; CHO, W. G.; et al. Relationship between dopamine deficit and the expression of depressive behavior resulted from alteration of serotonin system. **Synapse**, 69:453-460, 2015.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's Disease. **The Lancet**, 373:2055-2066, 2009.

LEMKE, M. R. Depressive symptoms in Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, 15:s21-s25, 2008.

LESZEK, J.; BARRETO, G. E.; GAŚIOROWSKI, K.; et al. inflammatory mechanisms and oxidative stress as key factors responsible for progression of neurodegeneration: Role of brain innate immune system. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, 15:329-336, 2016.

LEV, N.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Apoptosis and Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 27:245-250, 2003.

LI, X. J.; YANG, Y. J.; LI, Y. S.; et al. α -Pinene, linalool, and 1-octanol contribute to the topical anti-inflammatory and analgesic activities of frankincense by inhibiting COX-2. **Journal of Ethnopharmacology**, 179:22-26, 2016.

LIM, H. -S.; KIM, J. -S.; MOON, B. C.; et al. Cicadidae periostracum, the cast-off skin of cicada, protects dopaminergic neurons in a model of Parkinson's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019:1-17, 2019.

LIMA, F. A. V.; JOVENTINO, I. P.; JOVENTINO, F. P.; et al. Neuroprotective activities of spirulina platensis in the 6-OHDA model of Parkinson's disease are related to its anti-inflammatory effects. **Neurochemical Research**, 42:3390-3400, 2017.

LIMA, L. A. R.; LOPES, M. J. P.; COSTA, R. O.; et al. Vitamin D protects dopaminergic neurons against neuroinflammation and oxidative stress in hemiparkinsonian rats. **Journal of Neuroinflammation**, 15:1-11, 2018.

LIMA, M. N. M.; LARANJA, D. C.; BROMBERG, E.; et al. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. **Behavior Brain Research**, 156:139-143, 2005.

LINCK, V. M.; SILVA, A. L.; FIGUEIRÓ, M.; et al. Effects of inhaled linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice. **Phytomedicine**, 17:679-683, 2010.

LINCK, V. M.; SILVA, A. L.; FIGUEIRÓ, M.; et al. Inhaled linalool-induced sedation in mice. **Phytomedicine**, 16:303-307, 2009.

LIU, C.; LIANG, M. C.; SOONG, T. W. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. **Frontiers in neuroscience**, 13:1-10, 2019.

LIU, K.; CHEN, Q.; LIU, Y.; et al. Isolation and biological activities of decanal, linalool, valencene, and octanal from sweet orange oil. **Journal of Food Science**, 77:C1156-C1161, 2012.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nature Reviews Neuroscience**, 3:932-942, 2002.

LOTIA, M.; JANKOVIC, J. New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. **Expert Opin Pharmacother**, 17:895-909, 2016.

LUBBE, S.; MORRIS, H. R. Recent advances in Parkinson's disease genetics. **Journal of Neurology**, 261:259-266, 2014.

LULL, M. E.; BLOCK, M. L. Microglial activation and chronic neurodegeneration. **Neurotherapeutics**, 7:354-365, 2010.

LUNDBLAD, M.; PICCONI, B.; LINDGREN, H.; CENCI, M. A. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of Disease**, 16:110-123, 2004.

LUO, J.; PADHI, P.; JIN, H.; et al. Utilization of the CRISPR-Cas9 gene editing system to dissect neuroinflammatory and neuropharmacological mechanisms in Parkinson's disease. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, 1-13, 2019.

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

MAELE-FABRY, G. V.; HOET, P.; VILAIN, F.; LISON, D. Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **Environment International**, 46:30-43, 2012.

MALIK, A. R.; WILLNOW, T. E. Excitatory amino acid transporters in physiology and disorders of the Central Nervous System. **International Journal of Molecular Sciences**, 20:1-37, 2019.

MARCINKIEWICZ, J.; KONTNY, E. Taurine and inflammatory diseases. **Amino Acids**, 46:7-20, 2014.

MARCON, G.; MANGANOTTI, P.; TETTAMANTI, M. Is Parkinson's disease a very rare pathology in centenarians? A clinical study in a cohort of subjects. **Journal of Alzheimer's Disease**, Pre-press:1-4, 2019.

MARTINEZ-FINLEY, E. J.; GAVIN, C. E.; ASCHNER, M.; GUNTER, T. E. Manganese neurotoxicity and the role of reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, 62:65-75, 2013.

MARTINEZ-MARTIN, P.; RODRIGUEZ-BLAZQUEZ, C.; KURTIS, M. M.; CHAUDHURI, K. R. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 26:399-406, 2011.

MARTINEZ-RAMIREZ, D.; RODRIGUEZ-VIOLANTE, M.; RAMIREZ-ZAMORA, A. Gait in Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, 2019:1-3, 2019.

MARTINEZ, T. N.; GREENAMYRE, J. T. Toxin models of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Antioxid Redox Signal**, 16:920-934, 2012.

MATSUMOTO, Y.; MURAKAMI, H.; HATTORI, N.; et al. Excessive expression of hippocampal ezrin is induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 34:1753-1758, 2011.

MAYEUX, R. The "serotonin hypothesis" for depression in Parkinson's disease. **Advances in neurology**, 53:163-166, 1990.

McCOY, M. K.; TANSEY, M. G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **Journal of neuroinflammation**, 5:45, 2008.

MCGEER, P. L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B. E.; MCGEER, E. G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, 38:1285-1291, 1988.

McGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Glial reactions in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 23:474-483, 2008.

McGUIRE, S. O.; LING, Z. D.; LIPTON, J. W.; et al. Tumor necrosis factor alpha is toxic to embryonic mesencephalic dopamine neurons. **Experimental neurology**, 169:219-230, 2001.

MENZIE, J.; PAN, C.; PRENTICE, H.; WU, J. Y. Taurine and central nervous system disorders. **Amino Acids**, 46:31-46, 2014.

MEHRI, S.; MESHKI, M. A.; HOSSEINZADEH, H. Linalool as a neuroprotective agent against acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**, 38:162-166, 2015.

MEHTA, S. H.; TANNER, C. M. Role of neuroinflammation in Parkinson disease: The enigma continues. **Mayo Clinic Proceedings**, 91:1328-1330, 2016.

MEIRELES, J.; MASSANO, J. Cognitive impairment and dementia in Parkinson's disease: clinical features, diagnosis, and management. **Frontiers in Neurology**, 3:1-15, 2012.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, 52:711-760, 1983.

MELO, M. S.; SENA, L. C.; BARRETO, F. J.; et al. Antinociceptive effect of citronellal in mice. **Pharmaceutical Biology**, 48:411-416, 2010.

MEREDITH, G. E.; TOTTERDELL, S.; BEALES, M.; MESHUL, C. K. Impaired glutamate homeostasis and programmed cell death in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, 219:334-340, 2009.

MIDDLETON, F. A.; STRICK, P. L. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. **Brain Research Reviews**, 31:236-250, 2000.

MILLER, R. L.; JAMES-KRACKE, M.; SUN, G. Y.; SUN, A. Y. Oxidative and inflammatory pathway in Parkinson's disease. **Neurochemical Research**, 34:55-65, 2009.

MIYASAKI, J. M.; SHANNON, K.; VOON, V.; et al. Practice parameter: evaluation and treatment of depression, psychosis, and dementia in Parkinson's disease (an evidence-based review): report of Quality Standards Subcommittee of American Academy of Neurology. **Neurology**, 66:996-1002, 2006.

MOISAN, F.; SPINOSI, J.; DELABRE, L.; et al. Association of Parkinson's disease and its subtypes with agricultural pesticide exposures in men: A case-control study in France. **Environmental Health Perspectives**, 123:1123-1129, 2015.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 48:254-260, 1955.

MOSLEY, A. D.; ROMAINE, D. S.; SAMII, A. **The Encyclopedia of Parkinson's Disease**. New York: Facts on File, 2010.

MOSLEY, R. L.; BENNER, E. J.; KADIU, I.; et al. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's Disease. **Clinical Neuroscience Research**, 6:261-281, 2006.

MOUSSAWI, K.; RIEGEL, A.; NAIR, S.; KALIVAS, P. W. Extracellular glutamate: functional compartments operate in different concentration ranges. **Frontiers in Systems Neuroscience**, 5:1-9, 2011.

MURATA, M. Levodopa in the early treatment of Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, 15:17-20, 2009.

MUSLIMOVIĆ, D.; POST, B.; SPEELMAN, J. D.; SCHMAND, B. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. **Neurology**, 65:1239-1245, 2005.

NASROLAHI, A.; SAFARI, F.; FARHOUDI, M.; et al. Immune system and new avenues in Parkinson's disease research and treatment. **Reviews in the Neurosciences**, 30:709-727, 2019.

NEVES, K. R. T.; NOBRE, H. V.; LEAL, L. K. A. M.; et al. Pentoxifylline neuroprotective effects are possibly related to its anti-inflammatory and TNF-alpha inhibitory properties, in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Parkinson's Disease**, 2015:1-15, 2015.

NICARETTA, D. H.; ROSSO, A. L.; MATTOS, J. P. Disautonomia na doença de Parkinson. Revisão da literatura. **Revista Brasileira de Neurologia**, 47:25-29, 2011.

OBESO, J. A.; RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; STAMELOU, M.; et al. The expanding universe of disorders of the basal ganglia. **The Lancet**, 384:523-531, 2014.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, 95:351-358, 1979.

OKOJIE, A. K.; OYEKUNLE, O. A. Depo-Provera effects on Wistar rat performance in the Y-maze. **Metabolic Brain Disease**, 29:529-531, 2013.

OKUNO, T.; NAKATSUJI, Y.; KUMANOGOH, A.; et al. Loss of dopaminergic neurons by the induction of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 via CD 40: relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Research**, 81:874-882, 2005.

ORTH, M.; TABRIZI, S. J.; TOMLINSON, C.; et al. G209A mutant alpha synuclein expression. specifically enhances dopamine induced oxidative damage. **Neurochemistry International**, 45:669-676, 2004.

ORTIZ, G .G.; MORÁLES-SÁNCHEZ, E. W.; PACHECO-MOISÉS, F. P.; et al. Efecto de la administración de melatonina sobre la actividad de la ciclooxigenasa-2, la concentración sérica de metabolitos del óxido nítrico, los lipoperóxidos y la actividad de la glutatión peroxidasa en pacientes con enfermedad de Parkinson. **Gaceta Médica de México**, 153:S72-S81, 2017.

OZ, G.; TERPSTRA, M.; TKÁC, I.; et al. Proton MRS of the unilateral substantia nigra in the human brain at 4 tesla: detection of high GABA concentrations. **Magnetic Resonance in Medicine**, 55:296-301, 2010.

PALMA, J. A.; KAUFMANN, H. Autonomic disorders predicting Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, 20:S94-S98, 2014.

PAN, X.; KEZHU, W.; CONG, L.; et al. The protective effect of lavender essential oil and its main component linalool against the cognitive deficits induced by d-galactose and aluminum trichloride in mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2017, Article ID 7426538, 11 pages, 2017.

PARK, H.; SEOL, G. H.; RYU, S.; CHOI, I. Y. Neuroprotective effects of (-)-linalool against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury. **Archives of Pharmacal Research**, 39:555-564, 2016.

PARKINSON, J. **An essay on the shaking palsy**. London: Whittingham and Rowland, 1817.

PASCHEN, L.; SCHMIDT, N.; WOLFF, S.; et al. The olfactory bulb volume in patients with idiopathic Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, 22:1068-1073, 2015.

PAULSON, H. L.; STERN, B. M. **Clinical Manifestations of Parkinson's Disease**. In Watts, R. L.; Koller, W. C. *Movement Disorders Neurologic Principles and Practice*. New York: MacGraw, 2004.

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

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; CHESSA, M. L.; et al. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **European Journal of Pharmacology**, 460:37-41, 2003.

PEANA, A. T.; D'AQUILA, P. S.; PANIN, F.; et al. D. Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. **Phytomedicine**, 9:721-726, 2002.

PEANA, A. T.; DE MONTIS, M. G.; NIEDDU, E.; et al. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. **European Journal of Pharmacology**, 485:165-174, 2004a.

PEANA, A. T.; DE MONTIS, M. G.; SECHI, S.; et al. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E2. **European Journal of Pharmacology**, 497:279-284, 2004b.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Sciences**, 78:719-723, 2006b.

PEANA, A. T.; RUBATTU, P.; PIGA, G. G.; et al. Involvement of adenosine A1 and A2A receptors in (-)-linalool-induced antinociception. **Life Sciences**, 78:2471-2474, 2006a.

PEARCE, J. M. S. **Parkinson's disease and its management**. Oxford: Oxford University Press, 1992.

PEIXOTO-NEVES, D.; SILVA-ALVES, K. S.; GOMES, M. D. M.; et al. Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, 24:341-350, 2010.

PERES, T. V.; SCHETTINGER, M. R. C.; CHEN, P.; et al. Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies. **BMC Pharmacology and Toxicology**, 17:57, 2016.

PERRY, V. H. Innate inflammation in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 2(9):a009373, 2012.

PETROVSKA, S.; DEJANOVA, B.; JURISIC, V. Estrogens: mechanisms of neuroprotective effects. **Journal of Physiology and Biochemistry**, 68:455-460, 2012.

PINTO, N. V.; ASSREUY, A. M.; COELHO-DE-SOUSA, A. N.; et al. Endothelium dependent vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Alpinia zerumbet* and its main constituent 1,8-cineole in rats. **Phytomedicine**, 16:1151-1155, 2009.

POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, 3:17013, 2017.

POLYMEROPOULOS, M. H.; LAVEDAN, C.; LEROY, E.; et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science**, 276:2045-2047, 1997.

PONSEN, M. M.; STOFFERS, D.; BOOIJ, J.; et al. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 56:173-181, 2004.

PORSOLT, R. D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. **European Journal of Pharmacology**, 47:379-391, 1978.

PREDIGER, R. D. S.; AGUIAR Jr, S. A.; ROJAS-MAYORQUIN, A. E.; et al. Single intranasal administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, 17:114-129, 2010.

PREDIGER, R. D. S.; BATISTA, L. C.; MIYOSHI, E.; TAKAHASHI, R. N. Facilitation of short-term social memory by ethanol in rats is mediated by dopaminergic receptors. **Behavioural Brain Research**, 153:149-157, 2004.

PRZEDBORSKI, S. Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis. **Movement Disorders**, 25:S55-S57, 2010.

PRZEDBORSKI, S.; LEVIVIER, M.; JIANG, H.; et al. Dose-dependent lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway induced by intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine. **Neuroscience**, 67:631-647, 1995.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; et al. Plants with anticonvulsant properties: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18:798-819, 2008.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BARRETO, R. S.; MENEZES, P. P.; et al. β -Cyclodextrin-complexed (-)-linalool produces antinociceptive effect superior to that of (-)-linalool in experimental pain protocols. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, 113:167-172, 2013.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 115:5839-5848, 2018.

RAH, U. W.; BAIK, J. S.; JANG, S. H.; PARK, D. S. Development of the Korean Academy of Medical Sciences Guideline for rating the impairment in the brain injured and brain diseased persons with motor dysfunction. **Korean Academy of Medical Sciences**, 24:S247-S251, 2009.

REALE, M.; IARLORI, C.; THOMAS, A.; et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, 23:55-63, 2009.

REALE, M.; PESCE, M.; PRIYADARSHINI, M.; et al. Mitochondria as an easy target to oxidative stress events in Parkinson's disease. **CNS and Neurological Disorders—Drug Targets**, 1:430-438, 2012.

REICHMANN, H. Clinical criteria for the diagnosis of Parkinson's disease. **Neurodegenerative Diseases**, 7:284-290, 2010.

REINER, A.; LEVITZ, J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron**, 98:1080-1098, 2018.

REPICI, M.; GIORGINI, F. DJ-1 in Parkinson's Disease: Clinical Insights and Therapeutic Perspectives. **Journal of Clinical Medicine**, 8:1377, 2019.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**. 140:1-47, 2003.

RINALDI, N. M. **Efeito de dica auditiva na marcha livre e adaptativa em pacientes com doença de Parkinson**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Motricidade) - Instituto de Biociências – Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, 2011.

RIZVI, S. J.; PIZZAGALLI, D. A.; SPROULE, B. A.; KENNEDY, S. H. Assessing anhedonia in depression: potentials and pitfalls. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 65:21-35, 2016.

ROCHA, M. S. G. **Doença de Parkinson: aspectos neuropsicológicos**. In: Andrade, V. M.; Santos, F. H.; Bueno, O. F. A.; organizadores. Neuropsicologia hoje. São Paulo: Artes Médicas, 2004. p. 349-370.

RODRIGUEZ-OROZ, M. C.; JAHANSHAHI, M.; KRACK, P.; et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **The Lancet Neurology**, 8:1128-1139, 2009.

ROMMELFANGER, K. S.; WICHMANN, T. Extrastriatal dopaminergic circuits of the basal ganglia. **Frontiers in Neuroanatomy**, 4:1-17, 2010.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; et al. Antileishmanial activity of a Linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47:1895-1901, 2003.

ROSSO, A. L. Z.; NICARETTA, D. N.; MATTOS, J. P. Correlações anatomo-clínicas na doença de Parkinson. **Revista Brasileira de Neurologia**, 44:41-47, 2008.

SABOGAL-GUÁQUETA, A. M.; OSORIO, E.; CARDONA-GÓMEZ, G. P. Linalool reverses neuropathological and behavioral impairments in old triple transgenic Alzheimer's mice. **Neuropharmacology**, 102:111-120, 2016.

SAITO, Y.; SHIOYA, A.; SANO, T.; et al. Lewy body pathology involves the olfactory cells in Parkinson's disease and related disorders. **Movement Disorders**, 31:135-138, 2016.

SANCHEZ-GUAJARDO, V.; FEBBRARO, F.; KIRIK, D.; ROMERO-RAMOS, M. Microglia acquire distinct activation profiles depending on the degree of alpha-synuclein neuropathology in a rAAV based model of Parkinson's disease. **PLoS One**, 5:e8784, 2010.

SARKAR, S.; MALOVIC, E.; HARISHCHANDRA, D. S.; et al. Mitochondrial impairment in microglia amplifies NLRP3 inflammasome proinflammatory signaling in cell culture and animal models of Parkinson's disease. **NPJ Parkinson's Disease**, 3:30, 2017.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; MAIA, J. G. S.; MOURÃO, R. H. V. Antibacterial activity of the Rosewood (*Aniba rosaeodora* and *A. parviflora*) linalool-rich oils from the Amazon. **European Journal of Medicinal Plants**, 12:1-9, 2016.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and antagonist β -carboline. **Psychopharmacology**, 94:491-495, 1988.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35:275-280, 2004.

SCALZO, P.; KÜMMER, A.; CARDOSO, F.; TEIXEIRA, A. L. Increased serum levels of soluble tumor necrosis factor- α receptor-1 in patients with Parkinson's disease. **Journal of Neuroimmunology**, 216:122-125, 2009.

SCHALLERT, T.; FLEMING, S. M.; LEASURE, J. L.; et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, 39:777-787, 2000.

SCHAPIRA, A. H.; JENNER, P. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 26:1049-1055, 2011.

SCHNEIDER, M. B.; MURRIN L. C.; PFEIFFER R. F.; DEUPREE J. D. Dopamine receptors: effects of chronic L-dopa and bromocriptine treatment in an animal model of Parkinson's disease. **Clinical Neuropharmacology**, 7:247-257, 1984.

SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease: an update. **Journal of Neurology**, 251:795-804, 2004.

SCHRAG, A.; SIDDIQUI, U. F.; ANASTASIOU, Z.; et al. Clinical variables and biomarkers in prediction of cognitive impairment in patients with newly diagnosed Parkinson's disease: a cohort study. **The Lancet Neurology**, 16:66-75, 2017.

SCHRAG, A. Testing the MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 3:1518-1520, 2018.

SCHWARTING, R. K.; HUSTON, J. P. Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of meso-striatal dopamine neurons and their physiological sequelae. **Progress in Neurobiology**, 49:215-266, 1996.

SEAMANS, J. K.; FLORESCO, S. B.; PHILLIPS, A. G. D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. **The Journal of Neuroscience**, 18:1613-1621, 1998.

SEDLAK, J., LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, 25:192-205, 1968.

SEGURA-AGUILAR, J.; PARIS, I.; MUÑOZ, P.; et al. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, 129:898-915, 2014.

SEIDL, S. E.; POTASHKIN, J. A. The promise of neuroprotective agents in Parkinson's disease. **Frontiers in Neurology**, 2:1-19, 2011.

SHAW, D.; ANNETT, J. M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J. C. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. **Phytomedicine**, 14:613-620, 2007.

SIGMA-ALDRICH. Ficha de Informações de Produtos Químicos. **Linalool**, Referência do produto: L2602. Sigma-Aldrich Brasil Ltda, 2018.

SILVA BRUM, L. F.; ELISABETSKY, E.; SOUZA, D. Effects of linalool on [(3)H] MK801 and [(3)H] muscimol binding in mouse cortical membranes. **Phytotherapy Research**, 15:422-425, 2001b.

SILVA BRUM, L. F.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O.; ELISABETSKY, E. Effects of linalool glutamate release and uptake in mouse cortical synaptosomes. **Neurochemical Research**, 26:191-194, 2001a.

SILVEIRA-MORIYAMA, L.; HOLTON, J. L.; KINGSBURY, A.; et al. Regional differences in the severity of Lewy body pathology across the olfactory cortex. **Neuroscience Letters**, 453:77-80, 2009.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, 11:151-167, 2007.

SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson disease epidemiology, pathology, genetics, and pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, 36:1-12, 2020.

SIXTEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Pharmacia Brasileira**, 16:74-77, 2005.

SNOWDON, C. T.; BELL, D. D.; HENDERSON, N. D. Relationship between heart rate and open-field behavior. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 58:423-426, 1964.

SONG, C.; CHARLI, A.; LUO, J.; et al. Mechanistic interplay between autophagy and apoptotic signaling in endosulfan-induced dopaminergic neurotoxicity: relevance to the adverse outcome pathway in pesticide neurotoxicity. **Toxicological Sciences**, 169:333-352, 2019.

SOUTO-MAIOR, F. N.; de CARVALHO, F. L.; de MORAIS, L. C.; et al. Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 100:259-263, 2011.

SPILLANTINI, M. G.; SCHMIDT, M. L.; LEE, V. M.; et al. α -Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, 388:839-840, 1997.

SRIRAM, K.; MATHESON, J. M.; BENKOVIC, S. A.; et al. Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- α . **The FASEB Journal**, 20:670-682, 2006.

SULZER, D.; ZECCA, L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. **Neurotoxicity Research**, 1:181-195, 2000.

SUTACHAN, J. J.; CASAS, Z.; ALBARRACIN, S. L.; et al. Cellular and molecular mechanisms of antioxidants in Parkinson's disease. **Nutritional Neuroscience**, 15:120-126, 2012.

TADAIESKY, M. T.; DOMBROWSKI P. A.; FIGUEIREDO C. P.; et al. Emotional, cognitive and neurochemical alterations in a premotor stage model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, 156:830-840, 2008.

TAN, Y.; SGOBIO, C.; ARZBERGER, T.; et al. Loss of fragile X mental retardation protein precedes Lewy pathology in Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica**, In press: 1-27, 2019.

TAYLOR, J.; ANDERSON, W. S.; BRANDT, J.; et al. Neuropsychiatric complications of Parkinson disease treatments: Importance of multidisciplinary care. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, 24:1171-1180, 2016.

TEISMANN, P. COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. **Biofactors**, 38:395-397, 2012.

TEISMANN, P.; TIEU, K.; CHOI, D. K.; et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100:5473-5478, 2003.

TEIVE, H. A. G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 56:141-145, 1998.

TEIXEIRA, M. D.; SOUZA, C. M.; MENEZES, A. P.; et al. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 110:1-7, 2013.

THIELE, S. L.; WARRE, R.; NASH, J. E. Development of a unilaterally-lesioned 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, 60:1-8, 2012.

TILLERSON, J. L.; CAUDLE, W. M.; PARENT, J. M.; et al. Olfactory discrimination deficits in mice lacking the dopamine transporter or the D2 dopamine receptor. **Behavioural Brain Research**, 172:97-105, 2006.

TILLERSON, J. L.; COHEN, A. D.; CAUDLE, W. M.; et al. Forced nonuse in unilateral Parkinsonian rats exacerbates injury. **The Journal of Neuroscience**, 22:6790-6799, 2002.

TILLERSON, J. L.; COHEN, A. D.; PHILHOWER, J.; et al. Forced limb-use effects on the behavioral and neurochemical effects of 6-hydroxydopamine. **The Journal of Neuroscience**, 21:4427-4435, 2001.

TISSINGH, G.; BERENDSE, H. W.; BERGMANS, P.; et al. Loss of olfaction in de novo and treated Parkinson's disease: possible implications for early diagnosis. **Movement Disorders**, 16:41-46, 2001.

TOLOSA, E.; COMPTA, Y.; GAIG, C. The premotor phase of Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 13:S2-S7, 2007.

TOLOSA, E.; POEWE, W. Premotor Parkinson disease. **Neurology**, 72:S1, 2009.

TOYAMA, T.; SHINKAI, Y.; YAZAWA, A.; et al. Glutathione-mediated reversibility of covalent modification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 by 1,2-naphthoquinone through Cys152, but not Lys4. **Chemico-Biological Interactions**, 214:41-48, 2014.

TRUONG, D. D.; BHIDAYASIRI, R.; WOLTERS, E. Management of non-motor symptoms in advanced Parkinson disease. **Journal of the Neurological Sciences**, 266:216-228, 2008.

TSAI, M-H.; HSU, L-F.; LEE, C-W.; et al. Resveratrol inhibits urban particulate matter-induced COX-2/PGE2 release in human fibroblast-like synoviocytes via the inhibition of activation of NADPH oxidase/ROS/NF- κ B. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 88:113-123, 2017.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission (Vienna)**, 124:901-905, 2017.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European Journal of Pharmacology**, 5:107-110, 1968.

UNGERSTEDT, U. 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigrostriatal dopamine pathway: the turning syndrome. **Pharmacology e Therapeutics**, 2:37-40, 1976.

UNGERSTEDT, U.; ARBUTHNOTT, G. W. Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. **Brain Research**, 24:485-493, 1970.

USTA, J.; KREYDIYYEH, S.; KNIO, K.; et al. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. **Chemico-Biological Interactions**, 180:39-46, 2009.

VALKO, M.; LEIBIFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 39:44-84, 2007.

VERMA, A. K.; KESHARI, A. K.; RAJ, J.; et al. Prolidase-associated trace elements (Mn, Zn, Co, and Ni) in the patients with Parkinson's disease. **Biological Trace Element Research**, 171:48-53, 2016.

VERNON, A. C.; PALMER, S.; DATLA, K. P.; et al. Neuroprotective effects of metabotropic glutamate receptor ligands in a 6-hydroxydopamine rodent model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, 22:1799-1806, 2005.

VILA, M.; JACKSON-LEWIS, V.; GUEGAN, C.; et al. The role of glial cells in Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, 14:483-489, 2001.

VILLALBA, R. M.; MATHAI, A.; SMITH, Y. Morphological changes of glutamatergic synapses in animal models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, 9:1-16, 2015.

WALDMEIER, P. C.; TATTON, W. G. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? **Drug Discovery Today**, 9:210-218, 2004.

WANG, K. K.; YANG, Z.; SARKIS, G.; et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCH-L1) as a therapeutic and diagnostic target in neurodegeneration, neurotrauma and neuro-injuries. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 21:627-638, 2017.

WANG, Q.; LIU, Y.; ZHOU, J. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. **Translational Neurodegeneration**, 4:19, 2015.

WHITEHEAD, R. E.; FERRER, J. V.; JAVITCH, J. A.; JUSTICE, J. B. Reaction of oxidized dopamine with endogenous cysteine residues in the human dopamine transporter. **Journal of Neurochemistry**, 76:1242-1251, 2001.

WILLIAMS-GRAY, C. H.; EVANS, JR.; GORIS, A.; et al. The distinct cognitive syndrome of Parkinson's disease: 5 year follow-up of the CamPaIGN cohort. **Brain**, 132:2958-2969, 2009.

WINNER, B.; DESPLATS, P.; HAGL, C.; et al. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. **Experimental Neurology**, 219:543-552, 2009.

WINTERS, B. D.; BUSSEY, T. J. Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. **The Journal of Neuroscience**, 25:4243-4251, 2005.

XIA, R.; MAO, Z. H. Progression of motor symptoms in Parkinson's disease. **Neuroscience Bulletin**, 28:39-48, 2012.

XIMENES, J. C. M.; NEVES, K. R. T.; LEAL, L. K. A. M.; et al. Valproic acid neuroprotection in the 6-OHDA model of Parkinson's disease is possibly related to its anti-inflammatory and HDAC inhibitory properties. **Journal of Neurodegenerative Diseases**, 2015:1-14, 2015.

XU, L.; PU, J. Alpha-synuclein in Parkinson's Disease: from pathogenetic dysfunction to potential clinical application. **Parkinson's Disease**, 2016:1720621, 2016.

YAMADA, K.; NODA, Y.; HASEGAWA, T.; et al. The role of nitric oxide in dizocilpine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 276:460-466, 1996.

YANG, Q.; FANG, F.; LI, Y.; YE, Y. Neuroprotective effects of the nanoparticles of Zinc Sapogenin from Seeds of *Camellia oleifera*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, 17:2394-2400, 2017.

YAO, S. Y.; LIU, J. S.; JIN, T.; ZHENG, D. Y. Changes in the content of γ -aminobutyric acid A receptor β subunit in the cortex of aged rats with Parkinson's disease. **Chinese Journal of Gerontology**, 19:5526-5528, 2014.

YEO, L.; SINGH, R.; GUNDETI, M.; et al. Urinary tract dysfunction in Parkinson's disease: a review. **International Urology and Nephrology**, 44:415-424, 2012.

ZHANG, L.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. **Pharmacology Therapy**, 109:33-41, 2006.

ZHANG, L.; YUAN, Y.; TONG, Q.; et al. Reduced plasma taurine level in Parkinson's disease: association with motor severity and levodopa treatment. **International Journal of Neuroscience**, 126:630-636, 2016a.

ZHANG, N.; ZHANG, L.; FENG, L.; YAO, L. The anxiolytic effect of essential oil of *Cananga odorata* exposure on mice and determination of its major active constituents. **Phytomedicine**, 23:1727-1734, 2016b.

ZHANG, Q. J.; LI, L. B.; NIU, X. L.; et al. The pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex show decreased response to 5-hydroxytryptamine-3 receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. **Brain Research**, 1384:69-79, 2011.

ZHANG, T. M.; YU, S. Y.; GUO, P.; et al. Nonmotor symptoms in patients with Parkinson disease: A cross-sectional observational study. **Medicine**, 95:e5400, 2016c.

ZHAO, H. W.; LIN, J.; WANG, X. B.; et al. Assessing plasma levels of selenium, copper, iron and zinc in patients of Parkinson's disease. **PLoS One**, 8(12):e83060, 2013.

ZHAO, Z. -H.; CHEN, Z. -T.; ZHOU, R. -L.; et al. Increased DJ-1 and α -synuclein in plasma neural-derived exosomes as potential markers for Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, 10:1-8, 2019.

ZHOU, C.; HUANG, Y.; PRZEDBORSKI, S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1147:93-104, 2008.

ZHOU, Z. D.; REFAI, F. S.; XIE, S. P.; et al. Mutant PINK1 upregulates tyrosine hydroxylase and dopamine levels, leading to vulnerability of dopaminergic neurons. **Free Radical Biology and Medicine**, 68:220-233, 2014.

ZHU, X.; LIBBY, R. T.; De VRIES, W. N.; et al. Mutations in a P-type ATPase gene cause axonal degeneration. **PLOS Genetics**, 8(8):e1002853, 2012a.

ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZENG, Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. **CNS & Neurological Disorders-Drug Targets**, 11:350-358, 2012b.

ZUCCA, F. A.; BASSO, E.; CUPAIOLI, F. A.; et al. Neuromelanin of the human substantia nigra: an update. **Neurotoxicity Research**, 25:13-23, 2014.

ANEXO I – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "EFEITOS DO (-)-LINALOL EM RATOS COM PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR 6-HIDROXIDOPAMINA: UM ESTUDO COMPORTAMENTAL, NEUROQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO.", protocolo nº64/2015, sob responsabilidade do Prof. Dr. Glauce Socorro de Barros Viana, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	01/03/2016 a 28/02/2019
Espécie/Linhagem	Ratos heterogênico Wistar
Nº de Animais	80
Peso/Idade	250 - 300g 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016


 Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siapa: 1520734