



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
FACULDADE DE MEDICINA CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

FRANCISCO JOSÉ GOMES

EFEITOS DO BETA-CARIOFILENO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
BIOQUÍMICAS E NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA: AVALIAÇÃO DO
EIXO CÉREBRO-INTESTINO

SOBRAL
2021

FRANCISCO JOSÉ GOMES

EFEITOS DO BETA-CARIOFILENO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
BIOQUÍMICAS E NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA: AVALIAÇÃO DO EIXO
CÉREBRO-INTESTINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará/Campus Sobral, como requisito parcial para obtenção de Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

Co-orientador: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça

SOBRAL
2021

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)

G614e Gomes, Francisco José.

Efeitos do Beta-cariofileno nas alterações comportamentais, bioquímicas e na motilidade gastrintestinal de ratos submetidos ao modelo de doença de Parkinson induzida por 6-OHDA: avaliação do eixo cérebro-intestino / Francisco José Gomes. – 2021.

76 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar.

Coorientação: Prof. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça.

1. Doença de Parkinson . 2. Alterações gastrointestinais. 3. Teste comportamental. 4. Beta-cariofileno. 5. Estress Oxidativo. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO JOSÉ GOMES

EFEITOS DO BETA-CARIOFILENO NAS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS,
BIOQUÍMICAS E NA MOTILIDADE GASTRINTESTINAL DE RATOS SUBMETIDOS AO
MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA: AVALIAÇÃO DO EIXO
CÉREBRO-INTESTINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Farmacologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^º. Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça (Co-orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^º. Dr. Luiz Vieira da Silva Neto

Universidade Estadual Vale do Acaraú (UEVA)

Prof^ª. Dra. Cleane Gomes Moreira

UFC - Externo à Instituição

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me dado forças e coragem para concluir esse trabalho, me guiando diante dos obstáculos. Minha gratidão por mais uma etapa concluída.

Aos meus pais, Eugênio Salvador e Maria Gomes, por seus ensinamentos da vida e nos Estudos. Aos meus irmãos, por acreditarem e confiar no meu potencial. Aos meus colegas de trabalho “Família UFC/Sobral”, que estiveram comigo em todos os momentos, acreditando em mim, me apoiando, me ajudando em tudo que era possível. Sou grato a Deus por tê-los em minha vida.

À minha orientadora, Profra. Dra. Lissiana Magna, por, de forma tão acolhedora, me receber e me orientar. Obrigada por todas as palavras de apoio, por todos os ensinamentos, elogios e acima de tudo por ter acreditado e confiando em mim. Tenho grande admiração pela sua trajetória.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. José Ronaldo Graça, por, ter acreditado no trabalho, me receber. Obrigada por todas as palavras de apoio, elogios e acima de tudo por ter acreditado e confiando em mim.

Ao Prof. Dr. Luiz Viera e Dra. Cleane Gomes, por aceitarem o convite para participar da banca e estarem dispostos a contribuir.

A todos que compõem a equipe do Laboratório de Fisiologia e Neurociência. Sem vocês eu não teria conseguido! Meus agradecimentos em especial a essa equipe maravilhosa, que sempre esteve presente em todas etapas do trabalho: Ana Clara, Carol Leal, Isaac Carioca, Joaquim Francisco, Mateus Esmeraldo, Nickolas Souza. Aos alunos de Iniciação Científica, Bárbara, Marília, Flávia, por terem me ajudado nos experimentos, pois sem vocês eu não conseguiria executar esse trabalho árduo. Obrigado!

A minha companheira de experimentos, colega de turma do mestrado Lysrayane, por sua relevante colaboração nos experimentos desse trabalho, por estar sempre disposto a ajudar de forma rápida e eficaz, e por ter se tornando uma amiga.

À pos-doutoranda, bióloga e amiga, Cleane Moreira, por sempre estar disposta a dar sugestões e pelo apoio dado nos experimentos neuroquímicos.

Ao Biotério Central e Setorial da UFC/Sobral, pelo fornecimento dos ratos.

À minha turma do mestrado, pela partilha e momentos vividos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (UFC/Sobral) e ao Prof. Dr. Francisco Walber, Ciências da Saúde, por todos os ensinamentos e colaborações durante o mestrado.

Aos Ratos, que sem escolha, tiveram suas vidas ceifadas para fundamentarem a realização dessa pesquisa.

A todos que me ajudaram de uma forma direta ou indireta, minha gratidão.

Eu fiz da esperança o meu caminho certo,
cheguei muito perto de onde eu sonhei, cai
muitas vezes, não posso mentir, mais posso
dizer, que as quedas que tive, não foram
derrotas, eu cai quando estava a subir.

Pe. Zezinho SCJ.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma condição neurodegenerativa associada com tremor, rigidez, demência e sintomas gastrintestinais, como constipação, disfagia, náusea e vômito. Esses sinais e sintomas estão relacionados com a morte dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra *pars compacta* do sistema nervoso central (SNC), responsável pelo distúrbio de movimento característico e a disfunção do nervo vago. Embora existam tratamentos disponíveis, eles estão restritos ao alívio dos sintomas e não apresentam efeitos na recuperação da lesão ou bloqueio da progressão da doença. Pesquisas apontam o uso de compostos de origem vegetal, como uma alternativa promissora nesse aspecto. O beta-cariofileno (BCP), um importante canabinoide derivado de óleos essenciais de diferentes espécies, tem apresentado propriedades farmacológicas em diferentes tipos de células e tecidos. No entanto, seus efeitos na doença de Parkinson ainda não foram devidamente demonstrados. O presente estudo tem como objetivo estudar os efeitos do BCP no modelo de DP induzida por 6-OHDA em ratos, abordando as alterações na motilidade gastrointestinal. Ratos Wistar machos (250-300g) foram submetidos a injeção unilateral intraestriatal de 6-OHDA (21 µg) ou salina 0,9% (6µl/ animal) no grupo Sham. O tratamento foi iniciado 1 hora depois da cirurgia, os animais receberam BCP (15, 50 e 100mg/kg) ou salina via gavagem por 21 dias. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (campo aberto, apomorfina e rotarod). Ao final dos testes, após 24 horas da última administração de BCP ou salina, os animais foram sacrificados para realizar o esvaziamento gástrico e a retirada das áreas cerebrais (hipocampo (HC), córtex pré-frontal (CPF), corpo estriado direito (CED) e corpo estriado esquerdo (CEE)) para os ensaios neuroquímicos (peroxidação lipídica (TBARS), dosagem de glutatona reduzida (GSH) e dosagem de nitrito/nitrato). Os resultados mostraram que a 6-OHDA reduziu o número de cruzamentos e aumentou o tempo de imobilidade dos animais no teste do campo aberto, quando comparado ao Sham, o tratamento com BCP, principalmente na dose de 15mg/kg foi capaz de reduzir alguns desses efeitos. No teste rotacional 6-OHDA aumentou significativamente o número de rotações contralaterais quando comparado ao Sham, comprovando a indução do modelo, o BCP em todas as doses foi capaz de reverter esse parâmetro. No rotarod 6-OHDA reduziu o tempo de latência da primeira queda e o tempo de permanência na barra giratória e esse efeito foi revertido significativamente apenas com o tratamento com BCP na menor dose (15 mg/kg). A lesão com 6-OHDA provocou aumento da peroxidação lipídica e do estresse oxidativo, assim como reduziu os níveis de GSH, em todas as áreas cerebrais testadas, o tratamento com BCP, principalmente nas menores doses reduziu esses efeitos. Os efeitos no SNC repercutiram no trato gastrointestinal (TGI) dos animais lesionados, onde verificou-se aumento do tempo de retenção, que foi revertido no tratamento com BCP nas doses de 15 e 100 mg/kg. Esses efeitos na motilidade do TGI podem estar correlacionados com o aumento do estresse oxidativo nessa região e novamente o BCP promoveu redução desses parâmetros, especialmente da peroxidação lipídica. Conclui-se que são necessários mais estudos para se obter dados mais consistentes, entretanto há indícios de que BCP possa ser eficaz em relação a melhora dos danos motores provocados pela neurotoxina 6-OHDA, sendo, portanto, um agente promissor na busca por novos tratamentos farmacológicos para a Doença de Parkinson.

palavras-chave: doença de Parkinson; Alterações gastrointestinais; teste comportamental; beta-cariofileno; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder associated with tremor, rigidity, dementia, and gastrointestinal symptoms (eg, constipation, dysphagia, nausea, vomiting). These signs and symptoms relate to the dopaminergic neuronal death of the substantia nigra pars compacta in the central nervous system, which causes characteristic movement disorders and vagus nerve dysfunction. Although there are available treatments for PD, they are restricted to symptom relief and have no effects on lesion recovery or disease progression. Researches indicate the use of plant-derived compounds as a promising alternative on this subject. The beta-caryophyllene (BCP), an important cannabinoid derived from essential oils of different species, has demonstrated pharmacological properties in different types of cells and tissues. However, its effects on PD have not been properly demonstrated. This study aims to analyse the BCP effects on the 6-OHDA-induced PD model in rats, by addressing alterations of gastrointestinal motility. Male Wistar rats (250-300g) underwent unilateral intrastriatal injection of 6-OHDA (21 µg) in the experimental groups or 0.9% saline (6µl/rat) in the Sham group. One hour after surgery, the rats received BCP (15, 50, and 100 mg/kg) or 0.9% saline via oral gavage for 21 days. On the 14th day of treatment, the rats underwent behavioural tests (open field, apomorphine, and rotarod). Finally, 24 hours after the final administration of BCP or 0.9% saline, the rats were sacrificed in order to perform gastric emptying and brain areas removal (hippocampus, prefrontal cortex, and striatum) for neurochemical assays (lipid peroxidation, reduced glutathione, and nitrite/nitrate determination). In the open field test, 6-OHDA reduced the number of crossings and raised the time of immobility; the administration of BCP, mainly at 15 mg/kg, reduced some of these effects, when compared to the Sham group. In the apomorphine-induced rotation test, 6-OHDA raised the number of contralateral rotations, when compared to the Sham group; the administration of BCP at all doses reversed this effect. In the rotarod test, 6-OHDA reduced the latency time to fall and duration of permanence in the revolving bar; the administration of BCP only at the lowest dose (15 mg/kg) reversed this effect significantly. In all tested brain areas, 6-OHDA raised the lipid peroxidation/oxidative stress and diminished the reduced glutathione levels; the administration of BCP, mainly at low doses, reversed these effects. The central nervous system alterations reverberated in the gastrointestinal tract of the injured rats, in which a raise of transit time occurred; the administration of BCP at 15 and 50 mg/kg reversed this effect. These gastrointestinal alterations may be associated with the rise of oxidative stress locally; the administration of BCP also reduced these parameters, especially lipid peroxidation. A rise of studies are of utmost importance for more consistent results, though BCP appears to be effective in reducing motor disorders which were induced by the neurotoxin 6-OHDA. The BCP is a promising factor in the search for new pharmacological treatments for PD

Key-words: Parkinson's disease; Gastrointestinal changes; behavioral testing; beta-caryophyllene; oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).....	25
Figura 2.	Esquema do protocolo experimental.....	26
Figura 3.	Teste Rotacional induzido por Apomorfina.....	26
Figura 4.	Teste de Rotarod em ratos	27
Figura 5.	Teste de Campo aberto para ratos	28
Figura 6.	Esquema do Esvaziamento Gástrico	32
Figura 7.	Análise do número de cruzamentos (atividade locomotora espontânea) durante o teste do campo aberto dos animais.....	33
Figura 8.	Análise do número de <i>rearings</i> durante o teste do campo aberto dos animais.....	34
Figura 9.	Análise do número de <i>groomings</i> durante o teste do campo aberto dos animais.....	35
Figura 10.	Análise do tempo de imobilidade durante o teste do campo aberto dos animais.....	36
Figura 11.	Análise das rotações contralaterais a cada 60 minutos durante o teste rotacional dos animais.....	37
Figura 12.	Análise da latência de primeira queda, do RPM da primeira queda, do tempo de permanência e do RPM final durante o teste do rotarod dos animais.....	38
Figura 13.	Análise dos níveis da concentração de Nitrito/Nitrato no hipocampo (HC) dos animais.....	40
Figura 14.	Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado direito (CED) dos animais.....	40
Figura 15.	Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado esquerdo (CEE) dos animais.....	41
Figura 16.	Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal (CPF) dos animais.....	42
Figura 17.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no hipocampo (HC) dos animais.....	43
Figura 18.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no corpo estriado direito (CED) dos animais.....	44
Figura 19.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no corpo estriado esquerdo (CEE) dos animais.....	45
Figura 20.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no córtex pré-frontal (CPF) dos animais.....	45
Figura 21.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo (HC).....	47
Figura 22.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no corpo estriado direito (CED).....	47
Figura 23.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no corpo estriado esquerdo (CEE).....	48
Figura 24.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal (CPF).....	49
Figura 25.	Análise da retenção fracionada (10 minutos pós-prandial) no estômago durante o esvaziamento gástrico dos animais.....	50

Figura 26.	Análise da retenção fracionada (10 minutos pós-prandial) nas porções proximal, medial e distal do intestino durante o esvaziamento intestinal dos animais.....	51
Figura 27.	Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no tecido estomacal dos animais.....	52
Figura 28.	Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato na porção proximal do TGI dos animais.	53
Figura 29.	Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato na porção medial do TGI dos animais.....	54
Figura 30.	Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato na porção distal do TGI dos animais.....	55
Figura 31.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no tecido estomacal dos animais.....	56
Figura 32.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) na porção proximal do TGI dos animais.....	57
Figura 33.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) na porção medial do TGI dos animais.....	58
Figura 34.	Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) na porção distal do TGI dos animais.....	59
Figura 35.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no tecido estomacal dos animais.....	60
Figura 36.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) na porção proximal do TGI dos animais.....	61
Figura 37.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) na porção medial do TGI dos animais.....	62
Figura 38.	Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) na porção distal do TGI dos animais.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Animais utilizados no teste das doses do BCP.....	24
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT4	5-Hidroxitriptamina (Serotonina)
µG	Miligrama
µL	Microlitros
µM	Micromolar
5-HTR4	5-hidroxitriptamina4
6-OHDA	6-Hidroxidopamina
ABS	Absorbância
ANOVA	Análise de Variância
AP	Antero Posterior
BCP	Beta-cariofileno
CB2	Receptor Canabinoide Tipo 2
CED	Corpo Estriado Direito
CEE	Corpo Estriado Esquerdo
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
COMT	Catecol-Orto-Metiltransferase
CPF	Corpo Pré-frontal
DA	Dopamina
DP	Doença de Parkinson
Dt	Distal
DV	Dorço Ventral
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EG	Esvaziamento Gástrico
ERO	Especie Reativa de Oxigênio
Et	Estômago
GSH	Glutationa Reduzida
HC	Hipocampo
KCL	Cloreto de Potássio
L-DOPA	Levodopa
LPS	Lipopolissacarídeos
M	Média
MAO	Monoamina
MDA	Micromol de Malonildialdeído
mG	Miligramas
ML	Médio Lateral
mL	Microlitro
MPO	Mieloperoxidase
MPTP	1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NaOH	Hidróxido de Sódio
NO	Oxido Nítrico
°C	Grau Celsius
P	Proximal
RCBs	Receptores Canabinóides
RPM	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superoxido Dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
TGI	Trato gastrointestinal
TH	Tirosina Hidroxilase
VF	Vermelho de Fenol
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	A Doença de Parkinson	15
1.2	Doença de Parkinson e as alterações gastrointestinais	17
1.3	Modelo animal da Doença de Parkinson em roedores induzido com 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA)	18
1.4	Beta-cariofileno e doença de Parkinson	20
2.	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3.	METODOLOGIA	23
3.1	Materiais	23
3.2	Animais	24
3.3	Delineamento experimental	24
3.4	Testes Comportamentais	26
3.4.1	<i>Teste Rotacional</i>	26
3.4.2	<i>Teste do RotaRod</i>	27
3.4.3	<i>Teste do Campo aberto</i>	27
3.5	Análises Neuroquímicas	28
3.5.1	<i>Dissecação das áreas cerebrais</i>	28
3.5.2	<i>Determinação da concentração de nitrito</i>	28
3.5.3	<i>Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)</i>	29
3.5.4	<i>Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)</i>	29
3.6	Protocolo de estudo do Esvaziamento Gástrico (EG)	30
3.7	Análises estatísticas	32
4.	RESULTADOS	33
4.1	Resultados da Primeira Etapa: Análises Comportamentais.....	33
4.1.1	<i>Campo aberto</i>	33
4.1.1.1	<i>Número de Cruzamentos</i>	33
1		
4.1.1.1.	<i>Número de Rearing</i>	34
2		
4.1.1.1.	<i>Número de Grooming</i>	35
3		
4.1.1.1.	<i>Tempo de Imobilidade</i>	35
4		
4.1.2	<i>Teste rotacional com Apomorfina</i>	36
4.1.3	<i>Teste do Rotarod</i>	37
4.2	Avaliação das Dosagens Neuroquímicas.....	39
4.2.1	<i>Determinação da concentração de Nitrito/Nitrato</i>	39
4.2.2	<i>Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)</i>	42
4.2.3	<i>Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)</i>	46
4.3	Resultados da segunda etapa: Análises das alterações no TGI.....	49
4.3.1	<i>Análise do Esvaziamento Gástrico: Estômago</i>	49
4.3.2	<i>Análise do Esvaziamento Gástrico: Porção Proximal</i>	50
4.3.3	<i>Análise do Esvaziamento Gástrico: Porção Medial</i>	51
4.3.4	<i>Análise do Esvaziamento Gástrico: Porção Distal</i>	51

4.4	Resultados bioquímicos do TGI.....	52
4.4.1	<i>Determinação da concentração de nitrito/nitrato.....</i>	52
4.4.2	<i>Determinação dos níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS).....</i>	55
4.4.3	<i>Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH).....</i>	59
5	DISCUSSÃO.....	65
6	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	75
	ANEXO II – POSTER APRESENTADO MOSTRANDO AS ADERÊNCIAS ENCONTRADAS NOS ANIMAIS TRATADOS POR VIA INTRAPERITONEAL.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma das desordens neurodegenerativas relacionadas com a idade mais prevalentes, sendo a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer, estima-se que aproximadamente sete a 10 milhões de pessoas sofrem de DP em todo o mundo. A faixa de prevalência para esta doença na quarta década (30-39 anos) é de aproximadamente 41 indivíduos por 100.000 e aumenta para aproximadamente 1900 indivíduos por 100.000 entre os critérios de idade de 80 anos ou mais. Estima-se que os homens sejam afetados com DP 1,5 vezes mais que as mulheres (PAUL E YADAV, 2020).

Com relação a mortalidade da DP, ela não aumenta, comparada com indivíduos não afetados na primeira década após o diagnóstico de DP, mas aumenta a partir daí. À medida que a população global envelhece, espera-se que a prevalência de DP aumente dramaticamente, dobrando nas próximas 2 décadas. Acompanhando esse aumento, o ônus social e econômico da DP aumentará, a menos que sejam identificados tratamentos, curas ou meios de prevenção mais eficazes (SIMON et al., 2020).

Costuma instalar-se de forma lenta e progressiva, em geral em torno dos 60 anos de idade, embora 10% dos casos ocorram antes dos 40 anos (parkinsonismo de início precoce) e até em menores de 21 anos (parkinsonismo juvenil). Afeta ambos os sexos e todas as raças e é caracterizada pela morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos localizados na substância negra *pars compacta* no sistema nervoso central (SNC). Esses neurônios são produtores do neurotransmissor dopamina, envolvida na coordenação no sistema motor. Apesar da etiologia desta doença ser desconhecida, todos os pacientes com DP apresentam no sistema nervoso central e periférico os chamados "corpos de Lewy", que são agregados intracelulares de α -sinucleína mal dobradas (MAZZETTI et al., 2015).

A destruição dos neurônios dopaminérgicos resulta nas características fundamentais da doença: disfunção motora, incluindo a lentidão dos movimentos, tremor de repouso, rigidez, distúrbios da marcha e instabilidade postural. A extensão da perda é profunda, com destruição de pelo menos 70% dos neurônios quando aparecem pela primeira vez os sintomas; com frequência, observa-se uma perda de cerca de 95% dos neurônios na necropsia (WU; HALLETT; CHAN, 2015).

A DP normalmente afeta um lado do corpo antes de progredir e envolver o outro lado. Há um constante agravamento dos sintomas ao longo do tempo, e se não tratada, leva à deficiência com imobilidade severa. Embora os sintomas motores da DP dominem o quadro clínico, e até mesmo definam a síndrome parkinsoniana, muitos pacientes com DP têm outras queixas que foram classificadas como não-motoras. Estas incluem fadiga, depressão, ansiedade, distúrbios do sono, constipação, disfagia, incontinência urinária e outros distúrbios autonômicos (sexuais, gastrointestinais), queixas sensoriais, diminuição da motivação e apatia, lentidão no pensamento (bradifrenia), e um declínio cognitivo que pode evoluir para demência (OU et al., 2016).

A maioria dos casos de DP provavelmente tem uma etiologia multifatorial, resultante dos efeitos combinados de fatores ambientais e genéticos. A exposição a produtos químicos tóxicos e traumatismos cranianos pode aumentar o risco de DP, enquanto certos fatores no estilo de vida podem diminuir o risco. Os fatores de suscetibilidade genética podem modificar os efeitos das exposições ambientais. Embora mutações identificáveis em certos genes causem DP em cerca de 5% a 10% dos casos, essas mutações estão ausentes na maioria das pessoas com DP. Além disso, as mutações genéticas associadas à DP mais comuns têm apenas uma parcela dos portadores com o fenótipo correspondente, indicando que outros fatores ambientais ou genéticos estão envolvidos. Um estudo comparando taxas de concordância em gêmeos monozigóticos e dizigóticos estimou a herdabilidade da DP em apenas 30%, sugerindo que a maioria do risco de DP está relacionada a fatores ambientais e comportamentais (SIMON et al., 2020; GOLDMAN et al., 2019).

A DP é um distúrbio complexo, com fatores ambientais e genéticos convergindo para um conjunto comum de vias que levam a lesão neuronal, incluindo disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, agregação de proteínas, autofagia prejudicada e neuroinflamação (BHAT et al., 2015; KWAKYE et al., 2017).

A doença de Parkinson (DP), embora seja a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente, ainda não tem um tratamento definitivo. Os tratamentos atuais são geralmente focados na elevação do nível de dopamina DA no cérebro e a levodopa (LD) é a droga considerada padrão-ouro no tratamento da DP. No entanto, seus efeitos benéficos são percebidos principalmente nos primeiros anos de tratamento, necessitando aumento da dose à medida que a doença progride. E efeitos colaterais como sintomas gastrointestinais, movimentos involuntários e hipotensão ortostática são inevitáveis ao longo do tratamento. Além disso, muitas vezes surgem complicações em pacientes com DP quando diferentes tipos de resposta motora ocorrem em magnitude variada, como a discinesia (um movimento

involuntário comum no tratamento a longo prazo com LD) ou os fenômenos de flutuação motora, como o *on-off* e o *wearing off* (BALESTRINO E SCHAPIRA, 2020).

Agonistas da dopamina (DA), inibidor da Catecol-Orto-MetilTransferase (COMT), anticolinérgicos e inibidor da monoamina (MAO) são outras drogas usadas na DP. Mas os efeitos colaterais associados a essas drogas e muitas vezes a resposta terapêutica insatisfatória por vezes impossibilitam um tratamento adequado (PAUL E YADAV, 2020). Além disso, existem muitos desafios na administração de medicamentos aos pacientes com DP, por vezes decorrentes das alterações gastrintestinais que modificam a farmacocinética das drogas (PAUL E YADAV, 2020).

1.2 Doença de Parkinson e as alterações gastrintestinais

Estima-se que cerca de 30% dos pacientes com DP sofrem de distúrbios gastrintestinais. Embora distúrbios da motilidade do estômago e do cólon sejam frequentes, qualquer porção do trato gastrintestinal pode ser afetada. Curiosamente, o início da constipação geralmente precede os sintomas motores da DP e piora com a progressão da doença. Tempos de trânsito colônico prolongados foram documentados na doença e são consistentes com sintomas de constipação. Além disso, o desenvolvimento da constipação é independente da idade ou atividade física (LIDDLE, 2018).

Parece haver uma relação cronológica e anatômica da progressão da DP. A identificação de alterações patológicas nos neurônios olfativos no nervo vago sugeriu que a DP pode acometer vários locais antes de afetar o cérebro (BRAAK et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a α -sinucleína é transportada nas direções anterógrada e retrógrada no vagonervo, favorecendo a hipótese de que o acúmulo aberrante de α -sinucleína começa no intestino e progride através do nervo vago para o cérebro levando à DP (ULUSOY et al., 2017). Como a patogênese da DP ainda permanece desconhecida, no entanto, há consideráveis evidências de que o sistema nervoso entérico é um local de início precoce da doença (REICHMANN, 2011).

Com relação as possíveis causas do acúmulo de α -sinucleína no trato gastrintestinal, uma das mais estudadas é a alteração da microbiota intestinal. Recentemente, foi demonstrado que a composição do microbioma intestinal difere entre pacientes saudáveis e indivíduos com DP (UNGER et al., 2016). Além disso, essas alterações da microbiota intestinal podem estar correlacionadas com sintomas de DP e associadas a um envolvimento mais extenso da α -sinucleína no sistema nervoso entérico. No entanto, não se sabe se as

alterações da microbiota intestinal encontradas em pacientes com DP desempenham um papel causal na patogênese da doença ou são simplesmente uma consequência da doença (KLINGELHOEFER E REICHMANN, 2015).

Os sintomas associados às disfunções gastrintestinais em pacientes com DP podem ser variados, embora os mais comuns sejam a constipação, disfagia, dificuldade de mastigação, retardo do esvaziamento gástrico, boca seca ou excesso de salivação e o refluxo gastroesofágico. A constipação é um dos sintomas não motores mais prevalentes, afeta mais de 50% dos portadores da DP e 87 % dos que sofrem de problemas gastrintestinais. Como consequência, podem sofrer com inchaço abdominal, dores e náuseas. Além disso, a constipação se manifesta entre 10 a 20 anos antes dos sintomas motores da DP (CERSOSIMO et al., 2012).

A disfagia pode estar relacionada aos problemas motores e também ao comprometimento da motilidade da faringe e do esôfago. Na DP, o retardo no esvaziamento gástrico pode causar náuseas, desconforto abdominal e contrações estomacais anormais e podem alterar a absorção da L-DOPA e facilitar a absorção de neurotoxinas. Os sintomas gastrintestinais não melhoram com a terapia dopaminérgica convencional, portanto, o tratamento farmacológico para a constipação inclui uso de laxantes diariamente (ex: polietilenoglicol), agonistas do receptor 5-HT₄, antagonistas dos receptores dopaminérgicos periféricos, colinomiméticos e misoprostol (WOLTERS, 2009). Portanto, a descoberta de agentes que possam auxiliar no tratamento da doença de Parkinson modulando as alterações no TGI são de suma importância.

Com isso, apesar da comprovação de que a DP altera a motilidade gastrointestinal, ainda não se tem conhecimento do impacto dessa alteração na absorção e secreção de moléculas no TGI. Muitos estudos afirmam que há influência negativa sobre a terapia oral antiparkinsoniana, como má absorção causada pelo esvaziamento gástrico tardio e/ou tempos de transporte prolongados, o que pode levar a perda de efeito de medicação, acumulação de doses ou até flutuações motoras. Além disso, a desnutrição é outro fator associado à DP, o que pode estar relacionado também às modificações no controle da absorção e secreção de moléculas pelo TGI (CHAUDHURI et al., 2016).

1.3 Modelo animal da Doença de Parkinson em roedores induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

O uso de animais e células para mimetizar diferentes aspectos da Doença de Parkinson possibilita o estudo tanto da progressão da doença, como também permite explorar

possíveis tratamentos. Embora, nenhum dos modelos animais ou celulares atuais de DP contemplem todas as características fisiopatologias prevalentes desta doença em humanos, eles têm contribuído amplamente para o conhecimento da Doença de Parkinson. Atualmente existem modelos animais e celulares induzidos por toxinas e modelos genéticos (JAGMAG et al., 2016).

A 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA), é um metabólito hidroxilado de dopamina, com efeito seletivo sobre neurônios catecolaminérgicos, devido a sua analogia estrutural às catecolaminas. Desta forma a 6-OHDA é captada por estes neurônios através do sistema de transporte de alta afinidade presente em seus terminais (DAT), que transporta a toxina dentro dos neurônios dopaminérgicos, produzindo peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e radicais hidroxila durante a sua auto-oxidação, conduzindo à geração de espécies reativas de oxigênio e, em última análise, a citotoxicidade relacionada com o stress oxidativo (PERLBARG et al., 2018).

A 6-OHDA causa neurotoxicidade dopaminérgica, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO), quinonas e, finalmente, causa a progressão da DP mediada por neuroinflamação. Geralmente o 6-OHDA é usada mais comumente por injeção unilateral no feixe do cérebro anterior do rato. Cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos da tirosina hidroxilase (TH) são mortos devido a essa injeção unilateral, responsável pela perda de terminais positivos para TH no estriado do circuito dos gânglios da base. Para testar a hipótese de degeneração retrógrada, vários pesquisadores injetaram esse composto diretamente no estriado. O 6-OHDA cria um comportamento motor assimétrico devido à sua injeção unilateral, que costumava ser chamada de modelo de Hemiparkinsonismo e pode ser verificada através de testes, como o teste rotacional utilizando apomorfina como agonista dopaminérgico (RAI E SINGH, 2020).

A lesão causada pela 6-OHDA imita muitas características cruciais de neurônios em degeneração observada em amostras de DP humanos, que incluem oxidação e nitração de proteínas, a inibição do proteassoma, o aumento da ubiquitinação de proteínas, a depleção de glutatona reduzida (GSH), e o acúmulo de proteínas de sinalização ativadas (ZHANG et al., 2015).

O modelo com 6-OHDA é um dos modelos mais utilizados, além de induzir alterações não motoras que não são bem compreendidas, podendo assim, ser utilizado para estudar a fisiopatologia do distúrbio no TGI na DP e possíveis intervenções farmacológicas.

1.4 Beta-cariofileno e doença de Parkinson

O beta-cariofileno (β -cariofileno ou BCP), é um sesquiterpeno bicíclico presente em óleos essenciais de espécies vegetais como o manjeriço (*Ocimum spp*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), maconha (*Cannabis sativa*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta-do-reino (*Piper guineense*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Esse composto apresenta um odor “amadeirado” e picante, e é empregado em produtos de panificação, condimentos, doces e bebidas alcólicas e não-alcólicas. O BCP apresenta baixa solubilidade em água, o que sugere sua elevada afinidade pela membrana celular e capacidade de transposição da barreira hematoencefálica (FIDYT et al., 2016).

Estudos mostram que o BCP pode agir como agonista do receptor canabinoide tipo 2 (CB2R) por uma ligação seletiva. Evidências crescentes relatam que o CB2R é distribuído no sistema nervoso central (SNC), incluindo neurônios e células da glia (GERTSCH et al., 2008).

Existe um amplo consenso que o estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, disfunção ubiquitina-proteassoma, resposta inflamatória, toxicidade excitatória de aminoácidos e apoptose tem demonstrado participar da patogênese da DP. Nos últimos anos, os receptores canabinoídes (RBCs) surgiram como um alvo terapêutico promissor para várias doenças neurológicas. O potencial papel neuroprotetor dos RBCs gerou muitos interesses em várias doenças neurodegenerativas, incluindo DP. De fato, a ativação de RBCs demonstrou atenuar respostas inflamatórias; um dos fatores desencadeantes da patogênese da DP (JIANG E DICKSON, 2018; HAN et al., 2020).

Alguns pesquisadores descobriram que os ratos exibiram intensa regulação positiva dos receptores CB2 quando receberam injeção de lipopolissacarídeo (LPS) no SN. Estudos confirmaram que os receptores CB2 ativados diminuíram a ativação da microglia, atenuando a neuroinflamação e a degeneração progressiva dos neurônios dopaminérgicos nigrostriatais associados à DP (GARCIA et al., 2011). Além disso, alguns ligantes seletivos dos receptores CB2, como JWH-015 e BML-190, podem reduzir a neurotoxicidade dos sobrenadantes das células THP-1 com a adição da combinação estimulante de LPS e IFN- γ (KLEGERIS et al., 2003).

Gomez-Gálvez e colaboradores (2016) mostraram o papel anti-inflamatório do CB2R ativado usando o agonista seletivo HU-308 em camundongos transgênicos lesionados com lipopolissacarídeo (LPS). A injeção intrastriatal de LPS resultou na ativação da microglia e expressão de CD68, o que causou uma resposta inflamatória nos camundongos.

Além disso, a ativação de CB2R atenuou a expressão de CD68 no estriado, juntamente com a regulação negativa da tirosina hidroxilase (TH) e iNOS estriatal.

Nesse sentido, diversos estudos utilizando o beta-cariofileno foram desenvolvidos. Gertsch e colaboradores (2008) relataram que o tratamento com β -cariofileno (BCP), um agonista natural do receptor CB2, demonstrou atenuar a degeneração do neurônio DA do SNpc e estriado, e a regulação negativa de citocinas inflamatórias e iNOS em um modelo de DP induzido por rotenona em camundongos.

Javed e colaboradores (2016), mostraram que o β -cariofileno atenuou a degeneração do neurônio DA do SNPC e do estriado, juntamente com a ativação das células gliais e a regulação negativa de citocinas inflamatórias e iNOS em um modelo de camundongo induzido por rotenona. Além disso, a regulação positiva da atividade da glutatona (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase devido à ativação do CB2R mostrou exibir efeito neuroprotetor. Camundongos tratados com 6-iodopravadolina (AM630), um antagonista do CB2R, mostraram a regulação negativa desses mediadores neuroprotetores e aumento da peroxidação lipídica.

Em outros estudos o CB2R ativado pelo β -cariofileno exibiu um efeito neuroprotetor no modelo murino induzido por MPTP, em que a disfunção motora foi atenuada pela prevenção da perda neuronal da SNPC, que diminuiu ainda mais a resposta inflamatória (VIVEROS-PAREDES et al., 2017; FLORES-SOTO et al., 2021). Chung e colaboradores (2016), também utilizando o modelo de MPTP em camundongo, mostraram que a ativação do CB2R pelo JW-133 atenuou a degeneração neuronal principalmente por meio da supressão de danos à barreira hematoencefálica no sangue. Também foi observada baixa regulação da expressão astrogliar de mieloperoxidase (MPO), iNOS, citocinas inflamatórias e atenuação da ativação microglial. BCP também mostrou efeitos neuroprotetores contra a DP induzida por rotenona e estes efeitos podem ser atribuídos às suas potentes atividades antioxidantes e antiinflamatórias (OJHA et al., 2016).

Além disso, foi demonstrado que o BCP exerce efeitos profiláticos e / ou curativos contra doenças inflamatórias intestinais por meio de sua ação antioxidante e / ou antiinflamatória (CHO et al., 2007).

Dado os efeitos neuroprotetores do BCP, é importante estudar melhor seus efeitos na doença de Parkinson e analisar uma possível influência na melhora da absorção no TGI, auxiliando a assimilação de nutrientes e dos fármacos, o que contribuiria para uma melhor qualidade de vida dos pacientes que apresentam DP.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos do BCP no modelo de DP induzido por 6-OHDA em ratos

2.2 Objetivos específicos

- Investigar as alterações da motilidade gastrintestinal dos animais submetidos ao modelo de DP.
- Avaliar os efeitos do BCP sobre o desempenho motor através do teste do campo aberto, teste rotacional e rotarod em animais submetidos ao modelo de DP;
- Analisar os efeitos do BCP sobre a peroxidação lipídica, formação de nitrito/nitrato e GSH nas áreas cerebrais dos animais submetidos ao modelo de DP.

3. METODOLOGIA

3.1 Materiais

Para indução da D.P, foi utilizado a **6-Hidroxiopamina** – 6-OHDA(Sigma-Aldrich) (Agente Oxidante), Ácido ascórbico(Sigma-Aldrich), diluídos em salina 0.9%, armazenado em Eppdorff na cor amba.

Para anestésico foram utilizados uma solução de Ketamina(Syntec), 100mg/Kg com Xilazina(Konig) 50mg/Kg em uma proporção de 2/1.

Para o tratamento, foram utilizados o Beta-Cariofileno(Sigma-Aldrich) nas doses de 15, 50 e 100 Mg/kg diluído em **TWEEN 80 P.S (Polissorbato)**(Sigma-Aldrich) com solução salina 0,9% e a Solução salina no grupo Sham.

Para o teste comportamental Rotacional, foram utilizados Apomorfina(Sigma-Aldrich) 3mg/Kg, Ác. Ascórbico(Sigma-Aldrich) diluídos em Água destilada (H₂O destilada).

Para o Esvaziamento Gástrico, foi utilizado uma solução glicosada de Vermelho de Fenol(Sigma-Aldrich) 0,50 mg/mL e Glicose a 5% do volume, como corante marcador e Hidróxido de Sódio NaOH(Sigma-Aldrich) nas proporções 0.1N, 0.5N diluído em H₂O destilada e Ácido Tricloracético(Sigma-Aldrich) a 50%.

Solução Fosfato 150 mM para Homogêneos de Nitrito/Nitrato e TBARS, foram utilizados: Fosfato de Potássio Monobásico(Sigma-Aldrich), Fosfato de Potássio Dibásico(Sigma-Aldrich) e H₂O destilada.

Para a determinação da produção de nitrito, foram utilizados os seguintes reagentes: Ácido Fosfórico(Sigma-Aldrich) a 5%, Sulfonilamida(Sigma-Aldrich) 1% e NEED 1% - (N-(1-Naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride)(Sigma-Aldrich), H₂O.

Para determinação da produção de TBARS foram utilizados os seguintes reagentes: Fosfato de Potássio Monobásico (Sigma-Aldrich), Fosfato de Potássio Dibásico (Sigma-Aldrich) e H₂O destilada. Ácido perclórico (Sigma-Aldrich) 35%, Ácido Tiobarbitúrico (Sigma-Aldrich) 1,2% e H₂O.

Para a determinação da concentração da Glutathiona Reduzida – GSH, foram utilizados os seguintes reagentes: EDTA (Sigma-Aldrich) 0.02M, TRIS HCL (Sigma-Aldrich) 0,4M, Ácido tricloracético – TCA (Sigma-Aldrich) 50%, DTNB (Sigma-Aldrich) 0.01M, metanol P.A-ACS (Sigma-Aldrich), Glutathiona (Sigma-Aldrich) para curva padrão e H₂O.

3.2 Animais

Foram utilizados 80 ratos Wistar machos (Quadro 1) pesando entre 250 –300g (n = 08 por grupo), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os mesmos foram acondicionados em caixas grandes de armazenamento padrão para ratos e com capacidade máxima de 06 animais por caixa à temperatura média de $\pm 22^{\circ}\text{C}$ em ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

O projeto foi submetido sob protocolo n° 15/18 e aprovado pelo CEUA da UFC/campus Sobral.

Quadro 1. Animais utilizados no teste das doses do BCP

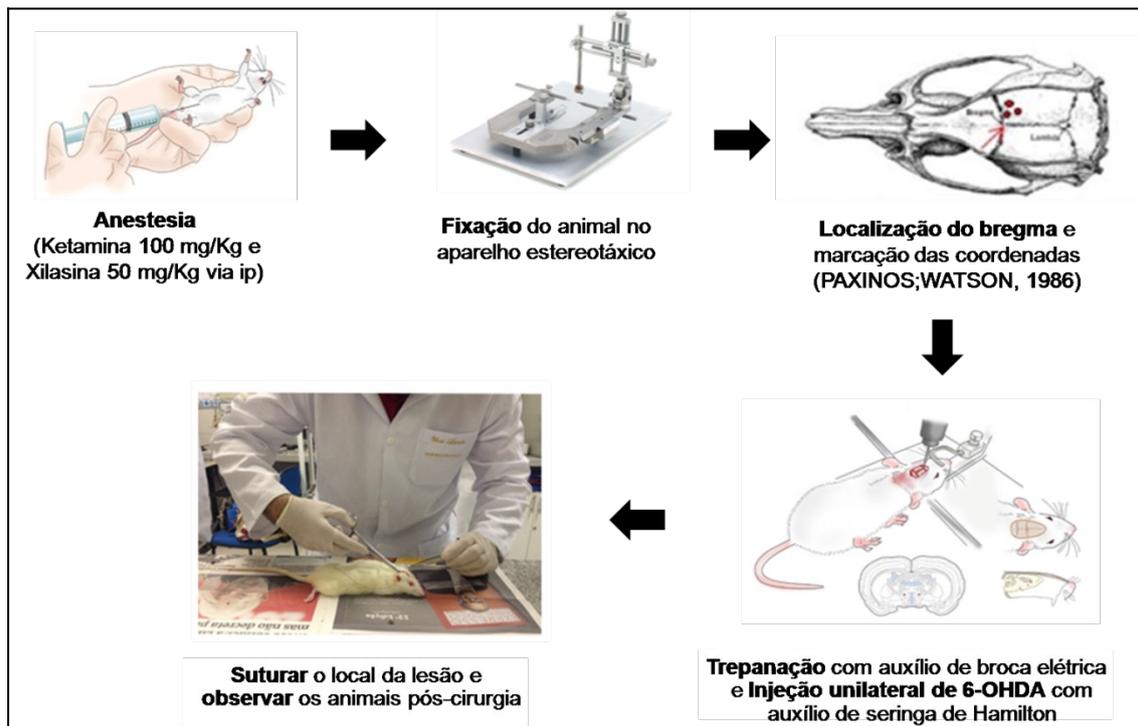
Testes	Grupos					Total
	Sham	6-OHDA	BCP15	BCP50	BCP100	
Nitrito/nitrato e TBARS	8	8	8	8	8	40
GSH	8	8	8	8	8	40
Total						80

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Delineamento experimental

Para avaliar os efeitos da DP foi realizado o modelo de indução por injeção unilateral 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Para isso, os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 08 animais e anestesiados através da administração de ketamina (20 mg/kg, i.p.) e xilasina (10 mg/kg, i.p.) e, logo em seguida, submetidos à injeção intraestriatal de 6-OHDA (18 μg / animal) para indução da lesão de neurônios dopaminérgicos com auxílio de coordenadas estereotáxicas (AP 0,9/1,4; ML 3,8; DV 3,3 a partir do bregma), de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON 1986), usando uma seringa Hamilton. A seringa ficou fixada no local de aplicação por 3 minutos para assegurar que todo o seu conteúdo tenha sido injetado corretamente. A diluição da 6-OHDA foi realizada associada com ácido ascórbico e Salina 0,9%. Nos animais do grupo Sham foram realizados os mesmos procedimentos, utilizando solução salina 0,9% intraestriatal (KIM et al, 1998). Na Figura 1, pode-se observar um esquema experimental de indução do modelo de DP.

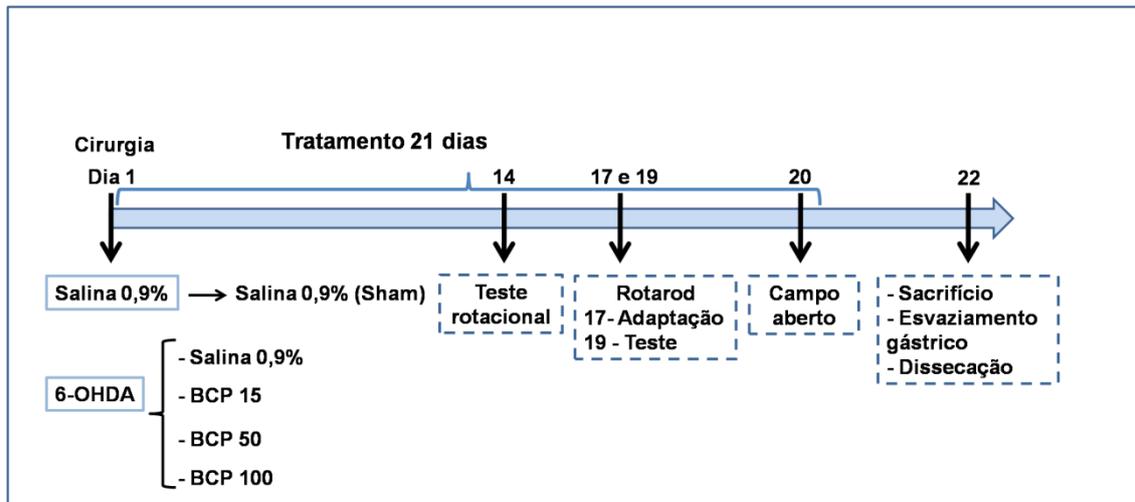
Figura 1. Modelo de Doença de Parkinson induzido por injeção unilateral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA).



Fonte: Elaborado pelo Autor.

O tratamento foi iniciado 1 hora depois da cirurgia, os animais receberam BCP (15, 50 e 100mg/kg) ou salina via gavagem por 21 dias. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (apomorfina, rotarod e campo aberto) em dias alternados. Após 24 horas da última administração de BCP ou salina, os animais foram sacrificados para realizar o esvaziamento gástrico e a retirada das áreas cerebrais (hipocampo (HC), córtex pré-frontal (CPF), e corpo estriado direito (CED) e corpo estriado esquerdo (CEE)) e porções do TGI (E, P, M e D) para os ensaios bioquímicos peroxidação lipídica (TBARS), dosagem de glutatona reduzida (GSH) e dosagem de nitrito/nitrato, como ilustrada na Figura 2.

Figura 2. Esquema do protocolo experimental



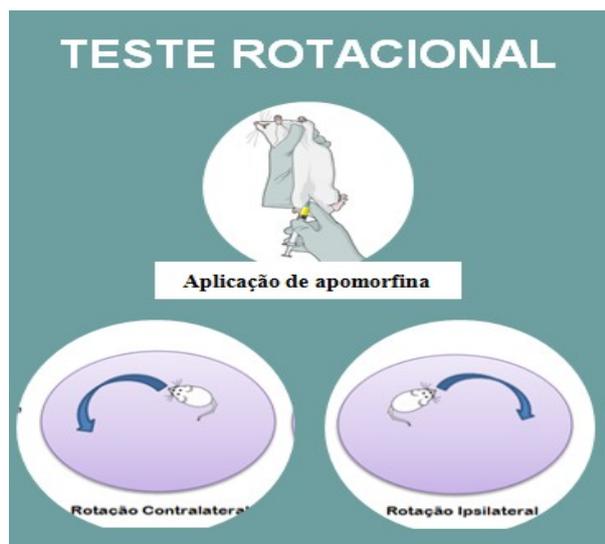
Elaborado pelo autor.

3.4 Testes Comportamentais

3.4.1 Teste Rotacional

Os animais foram submetidos ao teste rotacional nos 14^o dias de tratamento com o BCP ou Salina a 0.9%. O comportamento rotacional foi determinado através do monitoramento das rotações induzidas pela apomorfina (3 mg/kg, i.p.), que induz um comportamento rotacional na direção contrária à lesão (lado contralateral) e o número de rotações completas em volta do próprio eixo (Y lateral), após receberem a dose de Apomorfina, os mesmos foram colocados em um recipiente observados durante 60 minutos (KIM et al., 1998)(Figura 3).

Figura 3. Teste Rotacional induzido por Apomorfina



3.4.2 Teste do RotaRod

Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm, por um período de 300 segundo (5 min) (Figura 4). Os seguintes parâmetros são registrados: tempo de latência (segundos) e tempo de permanência na barra giratória (segundos). Os animais foram adaptados ao equipamento no 17º dia antes da avaliação com uma rotação de 4 a 15 rpm e o teste de validação no 19º dia de tratamento com o BCP ou Salina a 0.9% com uma rotação de 4 a 40 rpm (DUNHAM; MIYA, 1957).

Figura 4. Teste de Rotarod em ratos



3.4.3 Teste do campo aberto

Este teste foi realizado 20° para analisar a atividade exploratória do animal, bem como o comportamento emocional (ARCHER, 1973). O aparato para ratos é feito de madeira formicada (paredes brancas e piso preto, 60 x 60 x 60 cm) e dividido em 16 quadrantes iguais. Após o tratamento por gavagem, os animais, um por vez, foram colocados no centro do campo aberto e observado o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea), o número de levantamentos com as patas traseiras sem encostar nas paredes (*rearing*), o número de movimentos de autolimpeza (*grooming*) e o tempo de imobilidade foram registrados durante um tempo de 300 seg (5 minutos) (Figura 5).

Figura 5. Teste de Campo aberto para ratos



3.5 Análises Neuroquímicas e Bioquímicas

3.5.1 Dissecação das áreas cerebrais

Os animais foram devidamente eutanasiados por decaptação e após, as áreas cerebrais hipocampo, corpo estriado direito, corpo estriado esquerdo e córtex pré-frontal foram removidos dos encéfalos e armazenados em -80°C até o uso, realização das dosagens neuroquímicas, como da mesma forma, foram armazenadas as porções do TGI, Estômago, parte proximal, medial e distal do intestino delgado, para as dosagens bioquímicas.

3.5.2 Determinação da concentração de nitrito

Para a determinação da produção de nitrito, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . A partir das diluições, foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN et al.,1981). Para a determinação da concentração de nitrito em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais e do TGI a 10% (1:9) em solução de tampão fosfato 150 mM. Após centrifugação a 11000 rpm a 4°C por 15 minutos, os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 50 μL do sobrenadante foi incubada com 50 μL do reagente de Griess (ácido fosfórico 5% + sulfonilamida 1% diluída em ácido fosfórico 5% + NEED (N-1-naftiletilenodiamono dicloridrato) 0,1% + água destilada, na proporção de [1:1:1:1]) sob temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em leitor de placa de ELISA no comprimento de onda de 570 nm. A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 e os resultados foram expressos em micromolar (μM) de nitrito/nitrato por grama de tecido.

3.5.3 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais e do TGI dos ratos foram medidas através da determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl). Um volume de 0,25 mL do homogeneizado colocado em banho maria por 1 hora a 37°C , em seguida precipitado com 0,4 mL de ácido perclórico a 37% e centrifugado (14000 rpm/15 min/ 4°C), o sobrenadante foi transferido e adicionado 0,2 mL de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Após agitação, essa mistura foi mantida em um banho maria ($95-100^{\circ}\text{C}$) por 30 min. O conteúdo de TBARS foi determinado em espectrofotômetro a 535 nm. Os resultados foram expressos

em micromol de malonildialdeído (MDA) por grama de tecido, tendo por base uma curva padrão.

3.5.4 Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)

Para a determinação da atividade antioxidante, nas áreas cerebrais do TGI dos ratos foi determinada a concentração da GSH. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412 nm. Para a determinação da concentração de GSH, foi construída uma curva padrão com soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada e a cada tubo das soluções de GSH será acrescentado de 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Para a determinação da equação da curva padrão de GSH, foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01 M) e, logo após, feita a leitura da absorbância a 412 nm. A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em µM de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

3.6 Protocolo de estudo do Esvaziamento Gástrico (EG)

Para a avaliação da taxa de EG foi utilizada a técnica de retenção fracional de corante, não absorvível ou secretado pelo trato gastrointestinal, originalmente descrita por Reynel e Spray (1956), e bastante utilizada pelo Laboratório de Fisiologia da UFC – *Campus de Sobral*.

Após 12h de jejum alimentar, os animais, receberam 1,5ml de uma refeição-teste composta por vermelho fenol (VF) na dose de 0,5 mg/ml e solução de glicose a 5%, mediante gavagem ou infusão via cânula duodenal.

Decorridos 10 minutos, os animais foram sacrificados através da decapitação e, então, submetidos à laparotomia mediana com exposição das vísceras abdominais (estômago e intestino delgado). Para tanto, foram realizadas ligaduras obstrutivas, primeiramente, ao nível da região pilórica, com intuito de não mais permitir a passagem da refeição teste para o duodeno, seguido por uma segunda ligadura do esôfago abdominal ao nível da cárdia. Após as duas primeiras ligaduras, o estômago e o intestino delgado foram, então, cuidadosamente removidos (exérese) e posteriormente estendidos sobre uma prancha, com intuito de se determinar sua extensão, mensurado em cm.

Finalmente, uma terceira ligadura foi colocada no íleo terminal, ao nível da junção íleocecal. As vísceras expostas foram divididas em quatro segmentos consecutivos: Estômago (Et), Intestino proximal (P – inicial), intestino medial (M – intermediário) e Intestino distal (Dt –final).

O intestino foi dividido nas seguintes proporções: P (40%), M (30%) e Dt (30%). Para determinação dos volumes das vísceras, foi utilizada uma simples diferença volumétrica, como mostra a fórmula abaixo:

$$\text{VOL. (v)} = \text{VOL. (t)} - \text{VOL. (p)}$$

Onde:

Vol. (v) = Volume visceral.

Vol. (p) = Volume da proveta contendo 100ml.

Vol. (t) = Volume total [Vol. (p) + víscera].

Após determinação dos volumes, os segmentos viscerais, juntamente com o NaOH 0.1M foram fragmentados através de homogeneização utilizando um mixer. Após repouso de 20 min em temperatura ambiente, foram retirados 10ml do sobrenadante para uma primeira centrifugação à 2800rpm durante 10min. Dessa primeira centrifugação, foram retirados 5ml para que as proteínas contidas nesse volume sejam precipitadas em 0,5ml de ácido tricloroacético 20% (TCA) e, posteriormente, centrifugadas por 20min a 2800rpm. Por fim, 3ml desse mais novo sobrenadante foram adicionados a 4ml de NaOH a 0,5N para determinação, por espectrofotometria, da absorbância (ABS) das amostras em 560nm de comprimento de onda (Figura 6).

A retenção percentual (%) da refeição teste (vermelho-fenol + glicose 5%) em cada segmento foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Retenção no segmento X} = \frac{\text{Quantidade de VF recuperado no segmento X}}{\Sigma \text{ da quantidade de VF recuperada nos segmentos do TGI}}$$

Σ – Somatório; VF – Vermelho de fenol

A retenção fracional de corante em cada segmento foi utilizada para estimar o trânsito intestinal da refeição de acordo com o método do centro geométrico. De acordo com este princípio, o produto da retenção fracional de cada segmento (estômago, delgado 2, delgado 3, delgado 4) é obtido pelo dígito identificador do respectivo segmento: (1, 2, 3, 4,

respectivamente). A somatória destes valores indica o centro geométrico da refeição propulsa ao longo do intestino, aos moldes do centro de massa dos objetos.

A retenção fracional da refeição pelo trato gastrointestinal, dada pelo somatório das contagens dos segmentos (estômago, delgado II, III, IV), sendo a retenção fracional de cada segmento expressa como a percentagem desse total. O somatório dos valores do produto entre a retenção fracional de cada segmento pelo seu dígito identificador (respectivamente 1, 2, 3, 4) determina a posição do centro geométrico da refeição.

Figura 6. Esquema do Esvaziamento Gástrico



3.7 Análises estatísticas

Para avaliar as diferenças estatísticas foi utilizado o teste “t” de Student e ANOVA seguido do teste de Tukey para análises comportamentais e neuroquímicas. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o Software GraphPad Prism versão 8.0.

4 RESULTADOS

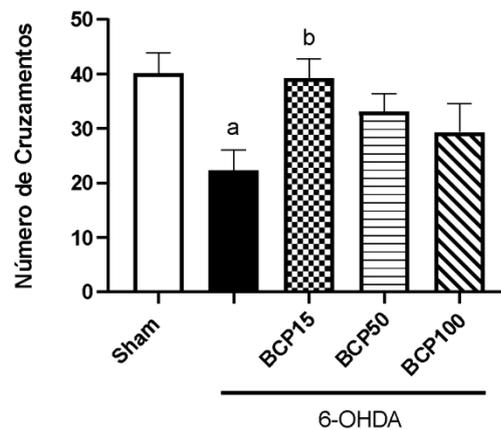
4.1 Resultados da Primeira Etapa: Análises Comportamentais

4.1.1 *Campo aberto*

4.1.1.1 *Número de Cruzamentos*

A 6-OHDA reduziu significativamente o número de cruzamentos (atividade locomotora espontânea) dos animais, quando comparado ao grupo Sham, mostrando que provavelmente os animais desenvolveram um déficit motor decorrente da lesão estriatal [Figura 7. Sham: $40,15 \pm 3,78$ (13); 6-OHDA: $22,33 \pm 3,82$ (15) com $p < 0,05$]. O tratamento com BCP conseguiu reverter significativamente os efeitos da 6-OHDA apenas na dose de 15 mg/kg [Figura 7. BCP15: $39,25 \pm 3,56$ com $p < 0,05$]. Entretanto, não conseguiu reverter os efeitos da 6-OHDA nas doses de 50 e 100 mg/kg [Figura 7. BCP50: $33,18 \pm 3,29$ (11); BCP100: $29,33 \pm 5,3$ (9)].

Figura 7. Análise do número de cruzamentos (atividade locomotora espontânea) durante o teste do campo aberto dos animais.



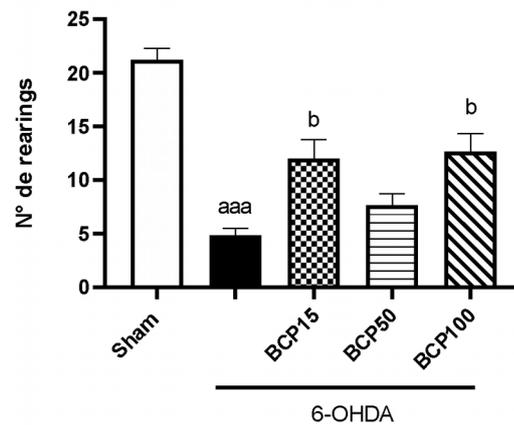
Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (campo aberto, apomorfina e rotarod) em dias alternados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. One-way ANOVA, teste de Tukey. Onde: a vs SHAM com $p < 0,05$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

4.1.1.2 Número de Rearing

O 6-OHDA reduziu significativamente o número de *rearings* dos animais, quando comparado ao Sham, mostrando que provavelmente os animais desenvolveram um déficit motor decorrente da lesão estriatal [Figura 8. Sham: $21,20 \pm 1,07$ (5); 6-OHDA: $4,83 \pm 0,70$ (6) com $p < 0,0001$]. O tratamento com BCP reverteu significativamente os efeitos da 6-OHDA nas doses de 15 e 100 mg/kg [Figura 8. BCP15: $12,00 \pm 1,75$ (6) com $p < 0,05$; BCP100: $12,67 \pm 1,68$ (6) com $p < 0,05$]. Entretanto, os resultados não foram significativos quanto à reversibilidade dos efeitos da 6-OHDA na dose de 50 mg/kg [Figura 8. BCP50: $7,66 \pm 1,05$ (6)].

Figura 8. Análise do número de *rearings* durante o teste do campo aberto dos animais.



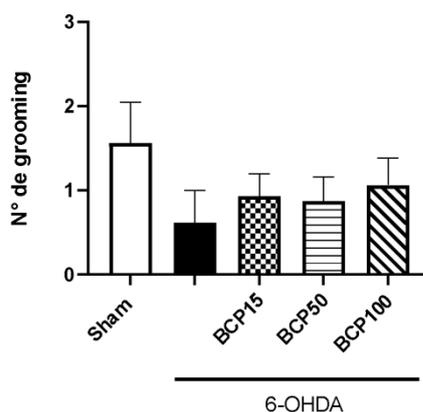
Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (campo aberto, apomorfina e rotarod) em dias alternados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. One-way ANOVA, teste de Tukey. Onde: aaa vs SHAM com $p < 0,0001$; b vs 6OHDA com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

4.1.1.3 Número de Grooming

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com relação ao número de *groomings* [Figura 9. Sham: $1,56 \pm 0,48$ (16); 6-OHDA: $0,61 \pm 0,38$ (13); BCP15: $0,93 \pm 0,26$ (15); BCP50: $0,87 \pm 0,28$ (16); BCP100: $1,06 \pm 3,2$ (16)].

Figura 9. Análise do número de *groomings* durante o teste do campo aberto dos animais.



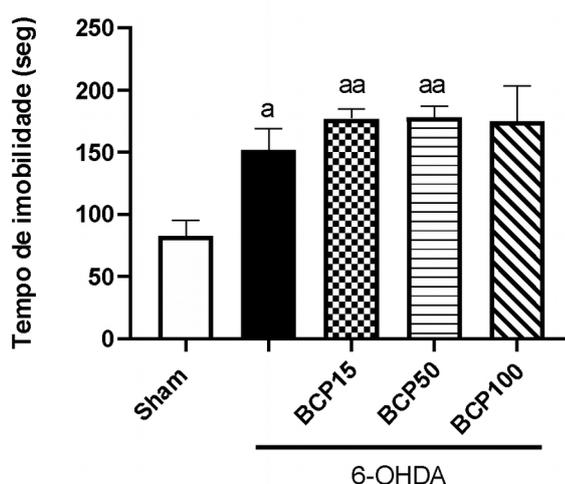
Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (campo aberto, apomorfina e rotarod) em dias alternados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. One-way ANOVA, teste de Tukey. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

4.1.1.4 Tempo de Imobilidade

O 6-OHDA aumentou significativamente o tempo de imobilidade dos animais, quando comparado ao grupo Sham, mostrando que provavelmente os animais desenvolveram um déficit motor decorrente da lesão estriatal [Figura 10. Sham: $82,77 \pm 12,76$ (13); 6-OHDA: $152,1 \pm 16,90$ (13) com $p < 0,05$]. O tratamento de BCP conseguiu reverter os efeitos da 6-OHDA nas doses de 15 e 50 mg/kg [Figura 10. BCP15: $177,3 \pm 7,67$ (12); BCP50: $178,5 \pm 8,73$ (13) com $p < 0,005$]. Entretanto, não conseguiu reverter os efeitos da 6-OHDA na dose de 100 mg/kg [Figura 10. BCP100: $175,3 \pm 28,29$ (12)].

Figura 10. Análise do tempo de imobilidade durante o teste do campo aberto dos animais.



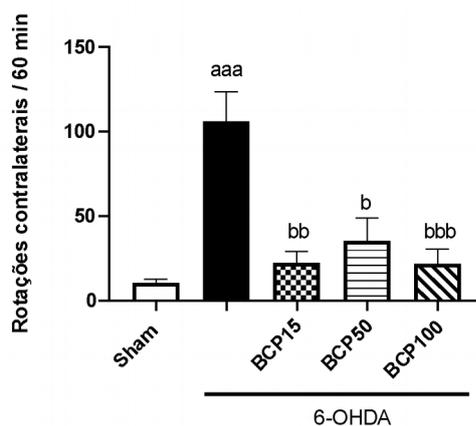
Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (campo aberto, apomorfina e rotarod) em dias alternados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. One-way ANOVA, teste de Tukey. Onde: a vs SHAM com $p < 0,05$; aa vs SHAM com $p < 0,005$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

4.1.2 Teste rotacional com Apomorfina

A 6-OHDA aumentou significativamente o número de rotações contralaterais induzidas por apomorfina, quando comparado ao Sham, evidenciando a lesão no corpo estriado dos animais e a indução do modelo de DP [Figura 11. Sham: $10,54 \pm 2,09$ (13); 6-OHDA: $106,0 \pm 17,66$ (7) com $p < 0,0001$]. O tratamento de BCP conseguiu reverter os efeitos da 6-OHDA em todas as doses testadas [Figura 11. BCP15: $22,42 \pm 6,76$ (12) com $p < 0,005$; BCP50: $35,19 \pm 13,77$ (16) com $p < 0,05$; BCP100: $21,77 \pm 8,70$ (13) com $p < 0,0001$].

Figura 11. Análise das rotações contralaterais a cada 60 minutos durante o teste rotacional dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (campo aberto, apomorfina e rotarod) em dias alternados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. One-way ANOVA, teste de Tukey. Onde: aaa vs SHAM com $p < 0,0001$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$; bb vs 6-OHDA com $p < 0,005$; bbb vs 6-OHDA $p < 0,0001$. Considerou-se estatisticamente significativa $P < 0,05$.

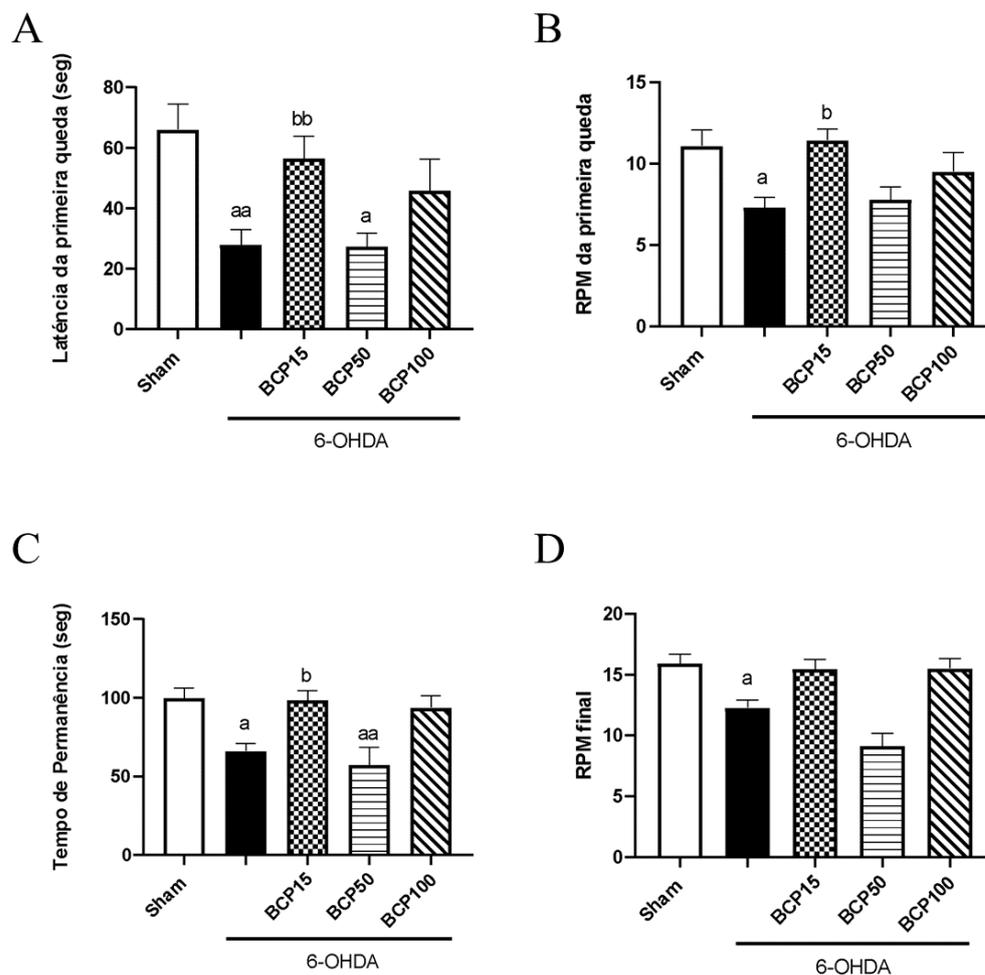
Fonte: Dados do autor.

4.1.3 Teste do Rotarod

Foi realizado o teste do rotarod com o intuito de avaliar melhor o déficit motor dos animais. Como mostra a Figura 8A, a 6-OHDA reduziu significativamente o tempo de latência da primeira queda, quando comparado ao Sham [Figura 12A. Sham: $66,0 \pm 8,52$ (10); 6-OHDA: $27,9 \pm 5,11$ (10) com $p < 0,005$]. Somente o tratamento com BCP na menor dose conseguiu reverter este efeito [Figura 12A. BCP15: $56,50 \pm 7,38$ (8) com $p < 0,05$; BCP50: $27,38 \pm 4,46$ (8); BCP100: $45,83 \pm 10,46$ (6)]. Outro parâmetro avaliado foi o valor de RPM no instante da primeira queda (Figura 12B), no qual observou-se que no grupo 6-OHDA houve redução significativa desse parâmetro quando comparado ao grupo Sham [Figura 12B. Sham: $11,08 \pm 0,98$ (12); 6-OHDA: $7,3 \pm 0,63$ (10) com $p < 0,05$] e, novamente, apenas a dose de 15mg/kg do BCP conseguiu aumentar o valor de RPM da primeira queda quando comparado ao grupo 6-OHDA [Figura 12B. BCP15: $11,43 \pm 0,71$ (7) com $p < 0,05$; BCP50: $7,77 \pm 0,81$ (9); BCP100: $9,5 \pm 1,17$ (6)]. Na Figura 12C, a 6-OHDA reduziu o tempo de permanência na barra

giratória, quando comparada ao Sham [Figura 12C. Sham: $99,75 \pm 6,42$ (12); 6-OHDA: $66,0 \pm 15,08$ (10) com $p < 0,005$] e apenas BCP na dose de 15 mg/kg conseguiu reverter significativamente esse efeito [Figura 12C. BCP15: $98,25 \pm 6,27$ (8) com $p < 0,05$; BCP50: $57,33 \pm 11,29$ (9); BCP100: $93,67 \pm 7,7$ (9)]. Além disso, o valor de RPM final do teste também foi avaliado no rotarod (Figura 12D), no qual observou-se que a 6-OHDA reduziu o RPM final que os animais conseguiram andar na barra giratória quando comparado ao grupo Sham [Figura 12D. Sham: $15,92 \pm 0,77$ (12); 6-OHDA: $12,27 \pm 0,66$ (11) com $p < 0,05$). Nesse parâmetro, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com BCP e o grupo 6-OHDA, em nenhuma das doses testadas [Figura 12D. BCP15: $15,44 \pm 8,3$ (9); BCP50: $9,14 \pm 1,05$ (7); BCP100: $15,50 \pm 0,84$ (6)].

Figura 12. Análise da latência de primeira queda, do RPM da primeira queda, do tempo de permanência e do RPM final durante o teste do rotarod dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 14º dia de tratamento, foram iniciados os testes comportamentais (campo aberto, apomorfina e rotarod) em dias alternados. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. One-way ANOVA, teste de Tukey. Onde: a vs SHAM com $p < 0,05$; aa vs SHAM com $p < 0,005$; b vs SHAM com $p < 0,05$; bb vs SHAM com $p < 0,005$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

4.2 Avaliação das Dosagens Neuroquímicas

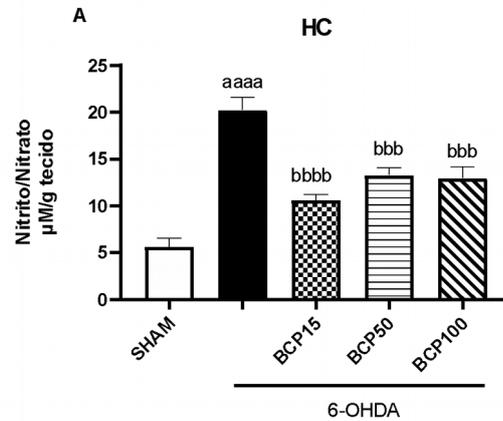
4.2.1 Determinação da concentração de Nitrito/Nitrato

Os resultados da análise do Nitrito/Nitrato indicaram um aumento significativo ($p < 0,05$) em todas as áreas cerebrais avaliadas em que o modelo animal de doença de Parkinson foi induzido por 6-OHDA e tratado com salina em comparação ao grupo Sham, representando a elevação dos níveis de estresse oxidativo. Segue os valores obtidos por áreas cerebrais: HC [Figura 13; SHAM: $5,61 \pm 0,90$ (8) $\mu\text{Mol/g}$; 6-OHDA: $20,23 \pm 1,33$ (8) $\mu\text{Mol/g}$ com $p < 0,0001$]; CED [Figura 14. $27,60 \pm 3,30$ (6) $\mu\text{Mol/g}$, com $p < 0,005$]; CPF [Figura 16. $16,41 \pm 1,22$ (8) $\mu\text{Mol/g}$, com $p < 0,05$].

Apenas no hipocampo dos animais tratados com beta-carbocriptina, na dosagem de BCP 15 mg/kg, houve redução estatisticamente significativa das concentrações de Nitrito/Nitrato [$10,60 \pm 0,62$ (6) $\mu\text{Mol/g}$ com $p < 0,0001$]. Já em relação à redução dos níveis de Nitrito/Nitrato nas dosagens de BCP 50 mg/kg e 100 mg/kg, foram significativos os resultados: hipocampo [Figura 13. BCP50: $13,27 \pm 0,79$ (6), com $p < 0,001$; BCP100: $12,96 \pm 1,20$ com $p < 0,001$] e corpo estriado esquerdo [Figura 15. BCP50: $18,98 \pm 4,49$, com $p < 0,05$; BCP100 $10,70 \pm 1,50$, com $p < 0,01$].

Os resultados da análise da área cerebral do CPF não demonstraram redução significativa dos níveis de Nitrito/Nitrato em qualquer uma das doses de BCP. Onde: CEE [SHAM: $10,98 \pm 1,36$; BCP 15: $18,98 \pm 4,49$]; CED [SHAM $6,51 \pm 0,75$; BCP 100 $23,10 \pm 6,28$]; CPF: [SHAM: $8,26 \pm 0,58$; BCP15: $12,03 \pm 0,30$; BCP 50 $17,10 \pm 3,10$; BCP 100: $15,24 \pm 1,22$].

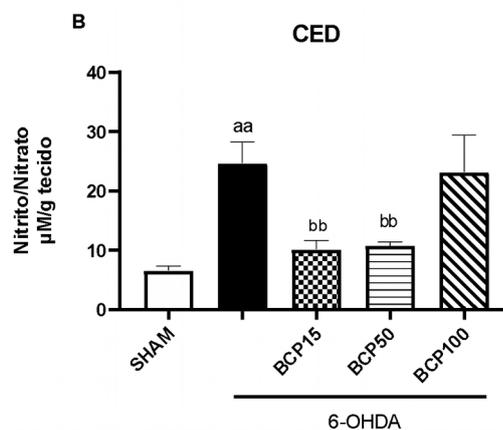
Figura 13. Análise dos níveis da concentração de Nitrito/Nitrato no hipocampo (HC) dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de Nitrito/Nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaaa vs Sham com $p < 0,0001$; bbb vs 6-OHDA com $p < 0,001$; bbbb vs 6-OHDA com $p < 0,0001$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

Figura 14. Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado direito (CED) dos animais.

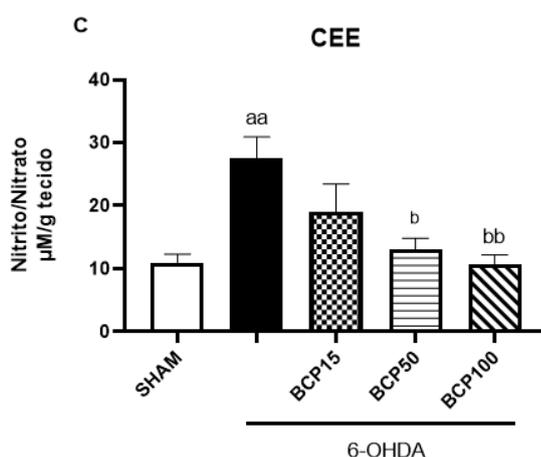


Legenda:

Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de Nitrito/Nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aa vs Sham com $p < 0,005$; bb vs 6-OHDA com $p < 0,01$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$

Fonte: Dados do autor.

Figura 15. Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no corpo estriado esquerdo (CEE) dos animais.

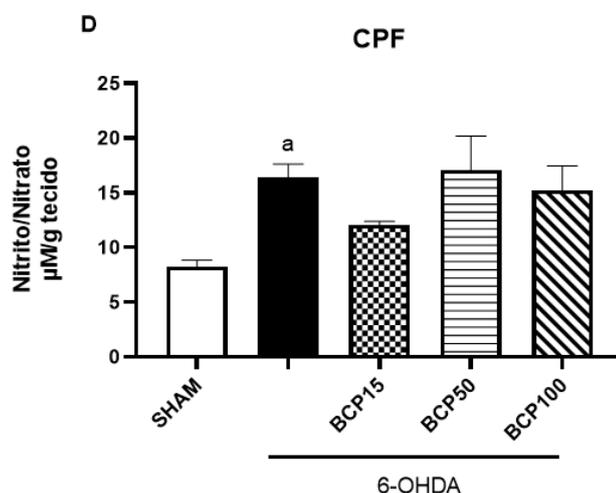


Legenda:

Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de Nitrito/Nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aa vs Sham com $p < 0,005$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$; bb vs 6-OHDA com $p < 0,01$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$

Fonte: Dados do autor.

Figura 16. Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal (CPF) dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de Nitrito/Nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: a vs Sham com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

4.2.2 Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

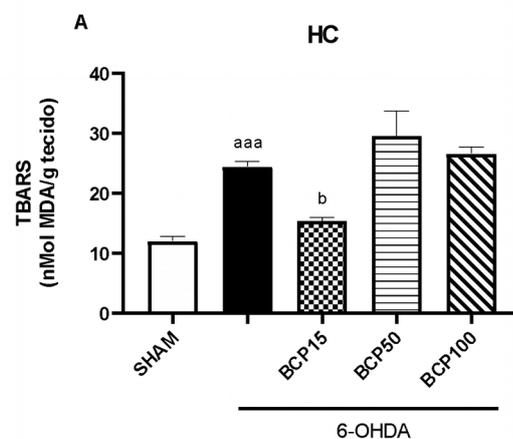
Para a avaliação da peroxidação lipídica em modelo animal de DP induzida pela 6-OHDA e do possível efeito antioxidante do tratamento com BCP, utilizou-se o teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos (TBARS). O teste detectou, com estatística significativa ($p < 0,05$), elevação dos níveis de malondialdeído (MDA), um dos principais produtos da peroxidação lipídica, em todas as áreas cerebrais analisadas. Sendo assim, a lesão induzida pela 6-OHDA provocou aumento significativo da peroxidação lipídica, quando comparado ao grupo SHAM, em todas as áreas cerebrais analisadas: HC [Figura 17; SHAM: $12,01 \pm 0,76$ (8); 6-OHDA: $24,43 \pm 0,88$ (7) com $p < 0,0005$], CED [Figura 18; SHAM: $5,45 \pm 0,50$ (8); 6-OHDA: $26,79 \pm 0,29$ (8)

com $p < 0,0001$], CEE [Figura 19; SHAM: $9,85 \pm 1,67$ (8); 6-OHDA: $25,47 \pm 0,83$ (8) com $p < 0,0001$] e CPF [Figura 20; SHAM: $14,26 \pm 0,49$ (8); 6-OHDA: $21,67 \pm 1,50$ (8) com $p < 0,05$].

O BCP na dose de 15mg/Kg, avaliada no respectivo teste, foi capaz de reverter significativamente os níveis de peroxidação lipídica induzidos pela 6-OHDA em comparação ao grupo controle (6-OHDA) nas áreas cerebrais do Hipocampo, Corpo Estriado Direito e Corpo Estriado Esquerdo: HC [Figura 17; BCP15: $15,38 \pm 0,59$ (8) com $p < 0,05$], CED [Figura 18; BCP15: $14,78 \pm 0,79$ (8) com $p < 0,001$] e CEE [Figura 19; BCP15: $14,10 \pm 0,41$ (8) com $p < 0,001$].

Em relação aos grupos de animais tratados com BCP na dose de 50 mg/Kg também houve redução significativa dos níveis de MDA em comparação ao grupo 6-OHDA no CPF [Figura 20; BCP50: $10,03 \pm 1,57$ (6) com $p < 0,0001$]. No entanto, para esta dose de BCP 50 mg/Kg não houve redução significativa nos níveis de MDA para as demais áreas cerebrais: HC [Figura 17; BCP 50: $29,60 \pm 4,15$ (7)], CED [Figura 18; BCP 50: $25,99 \pm 3,78$ (6)], CEE [Figura 19; BCP 50: $27,35 \pm 3,46$ (7)]. No que diz respeito à dose administrada de BCP 100 mg/Kg, não houve redução significativa da peroxidação lipídica em todas as áreas cerebrais analisadas: HC [Figura 17; BCP 100: $26,63 \pm 1,08$ (7)], CED [Figura 18; BCP 100: $34,71 \pm 2,51$ (6)], CEE [Figura 19; BCP 100: $27,65 \pm 0,83$ (7)] e CPF [Figura 20; BCP 100: $31,29 \pm 3,04$ (6)].

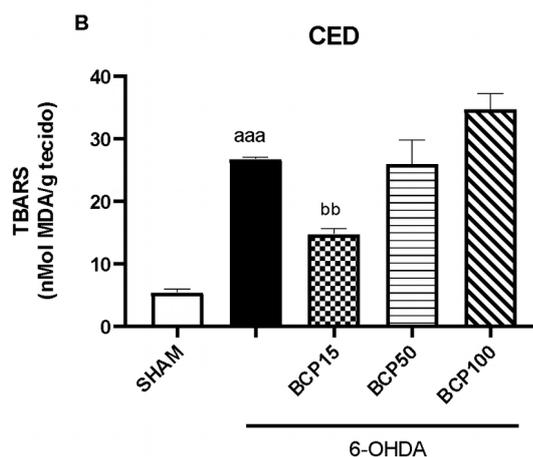
Figura 17. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no hipocampo (HC) dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 22º dia, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS). One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,0005$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor

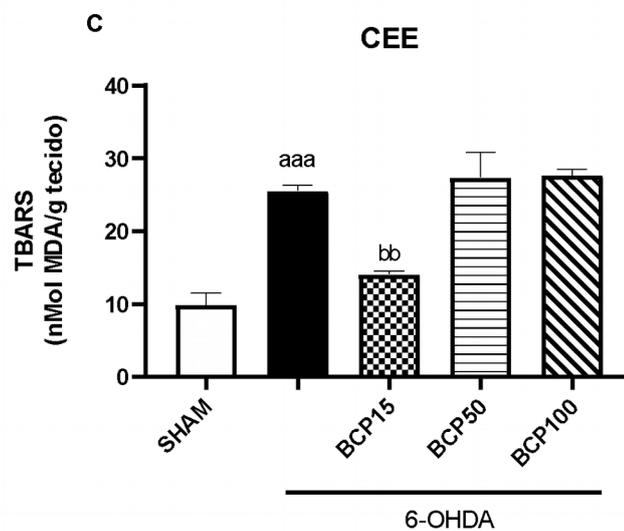
Figura 18. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no corpo estriado direito (CED) dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 22º dia, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS).. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,0001$; bb vs 6-OHDA com $p < 0,001$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

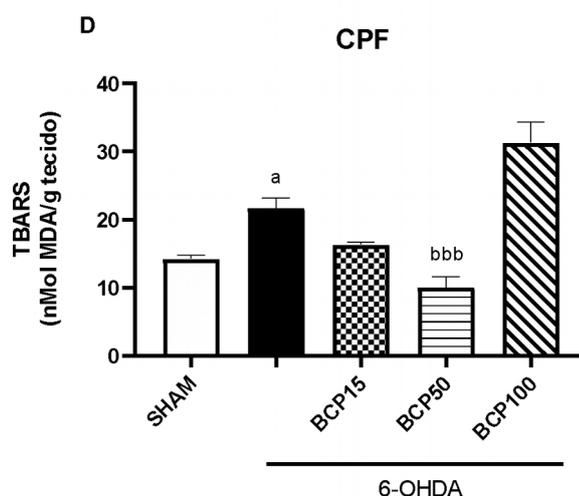
Figura 19. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no corpo estriado esquerdo (CEE) dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 22º dia, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS). One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,0001$; bb vs 6-OHDA com $p < 0,001$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

Figura 20. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no córtex pré-frontal (CPF) dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias, após cirurgia estereotáxica. No 22º dia, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS). One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: a vs Sham com $p < 0,05$; bbb vs 6-OHDA com $p < 0,0001$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

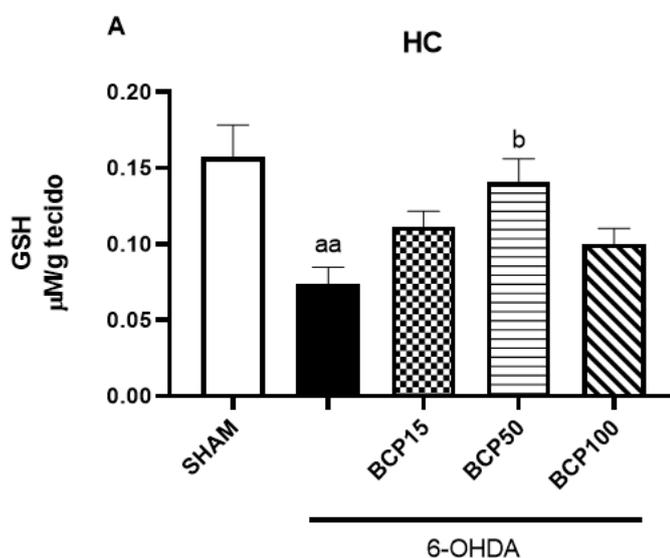
4.2.3 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

A diminuição significativa do GSH, em todas as áreas cerebrais, dos animais 6-OHDA é sugestivo da indução do estresse oxidativo produzido pela administração da 6-OHDA no corpo estriado esquerdo. Foi observado uma diminuição significativa de GSH em todas as áreas cerebrais, em relação ao grupo Sham, com $p < 0,05$. Onde: HC [Figura 21. SHAM: $0,157 \pm 0,021$ (6); OHDA: $0,074 \pm 0,011$ (6), com $p < 0,005$]; CED [Figura 22. SHAM: $0,148 \pm 0,024$ (6); 6-OHDA: $0,048 \pm 0,009$ (6), com $p < 0,005$]; CEE [Figura 23. SHAM: $0,175 \pm 0,036$ (8); 6-OHDA: $0,033 \pm 0,004$ (8), com $p < 0,005$]; CPF [Figura 24. SHAM: $0,112 \pm 0,011$ (8); 6-OHDA: $0,045 \pm 0,007$ (7), com $p < 0,0005$].

Dos ratos que receberam tratamento com beta-cariofileno, obteve-se significância estatística na dosagem de 50mg no hipocampo [Figura 21. $0,140 \pm 0,016$ (8), com $p < 0,05$] e

no corpo estriado direito [Figura 22. CED: $0,133 \pm 0,030$ (6, com $p < 0,05$)]. Nas outras dosagens de BCP (15 e 100 mg/kg), o aumento do antioxidante (GSH) não foi estatisticamente significativo, onde: HC [Figura:21. BCP15: $0,111 \pm 0,010$ (6); BCP100: $0,100 \pm 0,010$ (6)], CED [Figura 22. BCP15 $0,031 \pm 0,003$ (7); BCP100 $0,040 \pm 0,007$ (6)]. O corpo estriado esquerdo (Figura 23) e o córtex pré-frontal (Figura 24), em nenhuma das dosagens do BCP, apresentaram significância estatística. Onde: CEE [Figura 23; BCP15 $0,040$ (7) $\pm 0,009$; BCP50 $0,093 \pm 0,021$ (7); BCP100 $0,04 \pm 0,01$ (5)] E CPF [Figura 24. BCP15 $0,054 \pm 0,008$ (5); BCP50 $0,068 \pm 0,007$ (8); BCP100 $0,048 \pm 0,008$ (5)].

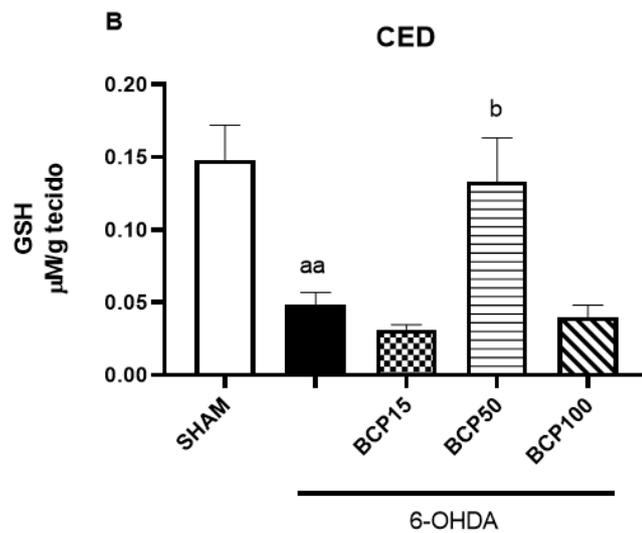
Figura 21. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo (HC).



Legenda: Os ratos ($n=8$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis da glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aa vs Sham com $p < 0,005$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

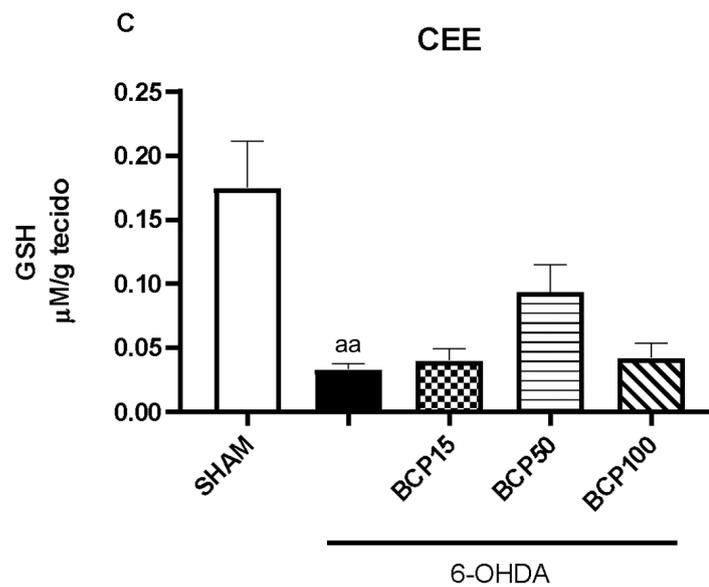
Figura 22. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no corpo estriado direito (CED).



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis da glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aa vs Sham com $p < 0,005$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

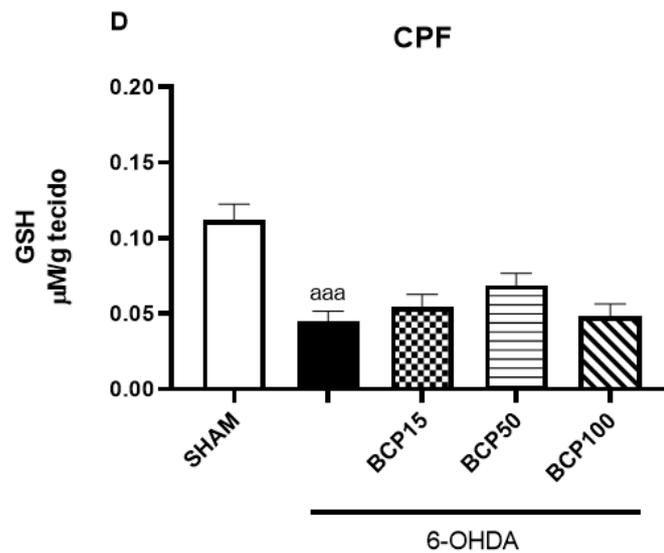
Figura 23. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no corpo estriado esquerdo (CEE).



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis da glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aa vs Sham com $p < 0,005$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

Figura 24. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal (CPF).



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis da glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,0005$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

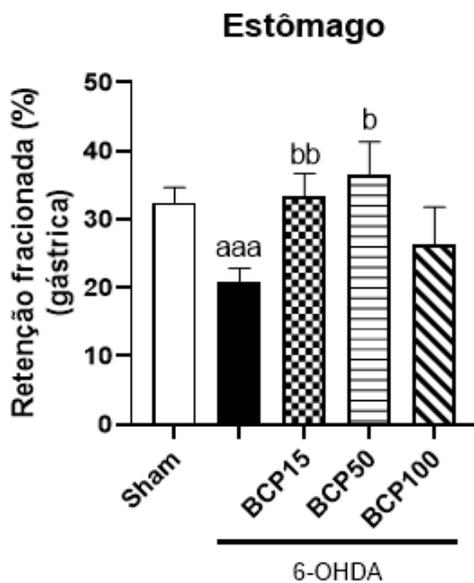
Fonte: Dados do autor.

4.3 Resultados da segunda etapa: Análises das alterações no TGI

4.3.1 Análise do Esvaziamento Gástrico: Estômago

Houve uma redução significativa na retenção fracionada estomacal após administração de 6-OHDA, quando comparado ao grupo Sham [Figura 25. Sham: $32,49 \pm 2,17$ (9); 6-OHDA: $20,92 \pm 1,95$ (12) com $p < 0,0001$]. Em relação aos grupos de animais tratados com BCP nas doses 15 mg/Kg e 50 mg/Kg, houve um aumento significativo da retenção fracionada estomacal. Não foram observadas diferenças significativas na dose de BCP 100 mg/kg [Figura 25. BCP15: $33,43 \pm 3,32$ (10) com $p < 0,005$; BCP50: $36,61 \pm 4,71$ com $p < 0,05$ (16); BCP100: $26,33 \pm 5,45$ (14)].

Figura 25. Análise da retenção fracionada (10 minutos pós-prandial) no estômago durante o esvaziamento gástrico dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis da glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,0001$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$; bb vs 6-OHDA com $p < 0,005$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

4.3.2 Análise do Esvaziamento Gástrico: Porção Proximal

Na porção proximal do intestino, foi observado um aumento da retenção fracionada no grupo 6-OHDA quando comparado ao grupo Sham [Figura 26. Sham: $50,38 \pm 3,32$ (9); 6-OHDA: $60,22 \pm 2,80$ (12), com $p < 0,05$]. Esse efeito foi revertido com o tratamento com BCP nas doses de 15 e 100 mg/kg, porém não foram observadas diferenças significativas com a dose de 50 mg/kg [Figura 26. BCP15: $49,46 \pm 6,50$ (10); BCP50: $50,47 \pm 4,73$ (16); BCP100: $38,12 \pm 4,52$ (14), com $p < 0,005$].

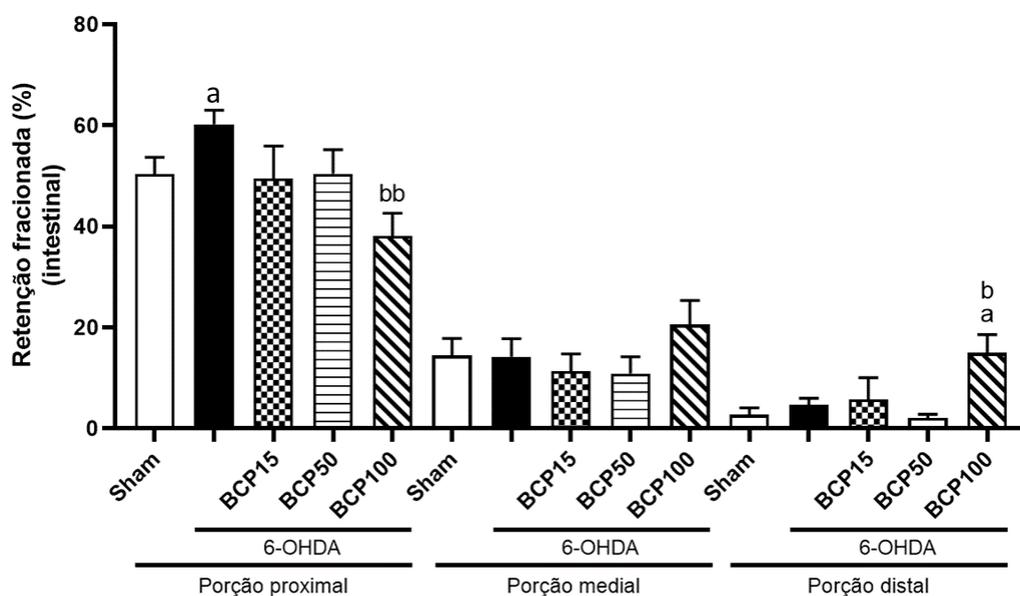
4.3.3 Análise do Esvaziamento Gástrico: Porção Medial

Na porção medial do intestino, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos testados [Figura 26. Sham: $14,44 \pm 3,40$ (9); 6-OHDA: $14,24 \pm 3,51$ (12); BCP15: $11,36 \pm 3,41$ (10); BCP50: $10,89 \pm 3,28$ (16); BCP100: $20,58 \pm 4,75$ (14)].

4.3.4 Análise do Esvaziamento Gástrico: Porção Distal

Na porção distal do intestino, apenas BCP na dose de 100 mg/kg aumentou significativamente a retenção fracionada quando comparado aos grupos Sham e 6-OHDA, não sendo observadas diferenças significativas entre os demais grupos [Figura 26. Sham: $2,68 \pm 1,42$ (9); 6-OHDA: $4,63 \pm 1,36$ (12); BCP15: $5,75 \pm 4,31$ (10); BCP50: $2,04 \pm 0,73$ (16); BCP100: $14,96 \pm 3,65$ (14) com $p < 0,05$].

Figura 26. Análise da retenção fracionada (10 minutos pós-prandial) nas porções proximal, medial e distal do intestino durante o esvaziamento intestinal dos animais.



Legenda: Os ratos ($n=8$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e os cérebros dissecados para determinação dos níveis da glutatona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: a vs Sham com $p < 0,05$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$; bb vs 6-OHDA com $p < 0,005$. Considerou-se estatisticamente significativo $p < 0,05$.

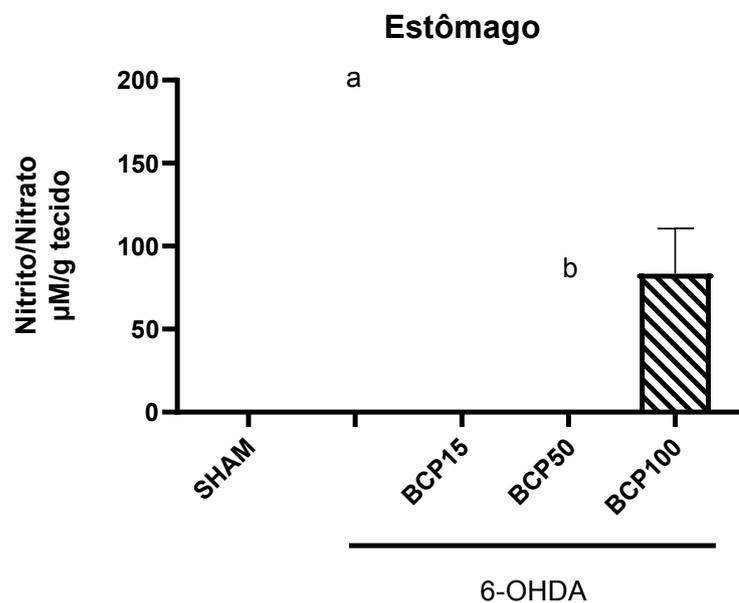
Fonte: Dados do autor.

4.4 Resultados bioquímicos do TGI

4.4.1 Determinação da concentração de nitrito/nitrato

A determinação dos níveis de concentração de nitrito/nitrato foi outro parâmetro utilizado para avaliar o estresse oxidativo. Na análise do tecido estomacal foi observado uma elevação dos índices do grupo 6-OHDA de $P < 0,05$ quando comparado ao controle SHAM (SHAM: $77,35 \pm 7,84$ [8]; 6-OHDA: $158,1 \pm 29,61$ [7]) e quando comparado ao grupo 6-OHDA, somente o grupo BCP50 apresentou redução significativa de $P < 0,05$ (BCP15: $159,2 \pm 21,94$ [7], BCP50: $65,27 \pm 4,52$ [6]; BCP100: $83,43$ [6]), apresentado na Figura 27.

Figura 27. Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato no tecido estomacal dos animais.



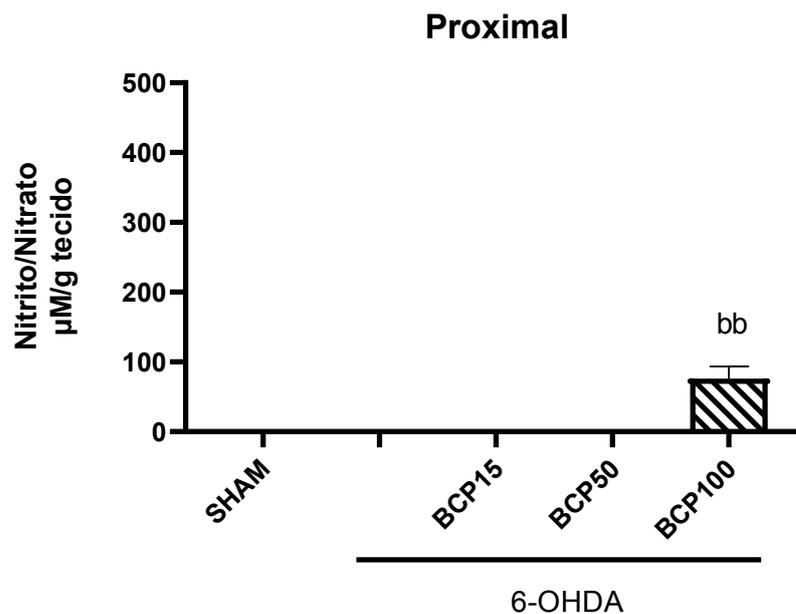
Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e o tecido estomacal foi utilizado para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão

expressos em médias \pm EPM. Onde: a vs Sham com $p < 0,05$; b vs 6-OHDA com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

Na região proximal do intestino foi observado uma redução significativa de $P < 0,005$ nos níveis de nitrito/nitrato do grupo BCP100 quando comparado ao grupo 6-OHDA (6-OHDA: $369,3 \pm 31,93$ [5]; BCP100: $75,93 \pm 17,42$ [6]), os demais grupos não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (SHAM: $218,3 \pm 19,25$ [5]; BCP15: $176,7 \pm 16,06$ [8]; BCP50: $298,2 \pm 92,05$ [7]) (Figura 28)

Figura 28. Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato na porção proximal do TGI dos animais.

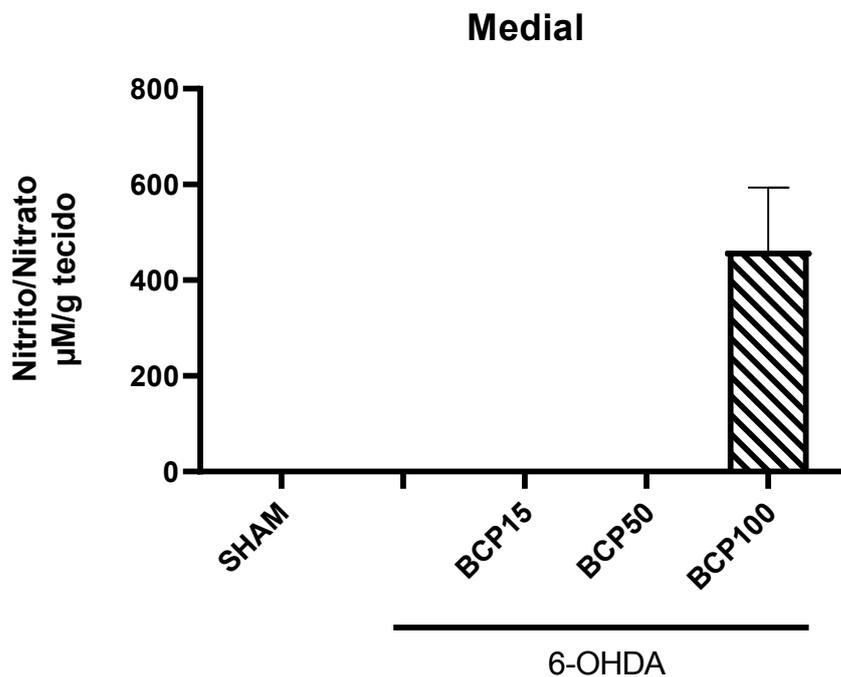


Legenda: Os ratos ($n=8$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção proximal do TGI foi utilizado para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: bb vs 6-OHDA com $p < 0,01$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

Na avaliação da porção medial do intestino não foram verificadas não foram verificadas alterações significativas (SHAM: $222,9 \pm 7,63$ [5]; 6-OHDA: $368,8 \pm 45,89$ [6]; BCP15: $278,1 \pm 36,87$ [6]; BCP50: $351,4 \pm 51,23$ [8]; BCP100: $461,5 \pm 131,9$ [7]) entre os grupos nos níveis de nitrito/nitrato na comparação entre os grupos (Figura 29).

Figura 29. Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato na porção medial do TGI dos animais.

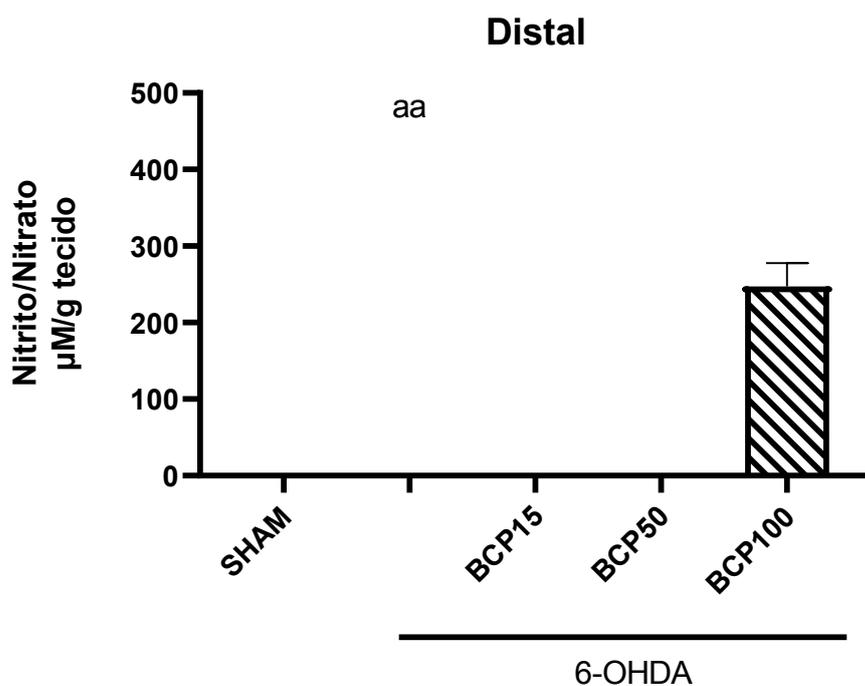


Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção medial do TGI foi utilizado para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

A análise da porção distal do intestino apresentou uma alteração significativa dos níveis de nitrito/nitrato na comparação do grupo 6-OHDA com o grupo SHAM, com valor de $P < 0,005$ (SHAM: $112,8 \pm 23,43$ [6]; 6-OHDA: $383,1 \pm 55,55$), os outros grupos não apresentaram redução significativa na comparação com o grupo 6-OHDA (BCP15: $261,8 \pm$

19,88 [6]; BCP50: 272,6 ± 18,03 [6]; BCP100: 247,3 ± 30,32 [6]), resultados apresentados na Figura 30.

Figura 30. Análise dos níveis da concentração de nitrito/nitrato na porção distal do TGI dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção distal do TGI foi utilizado para determinação dos níveis de nitrito/nitrato. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias ± EPM. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

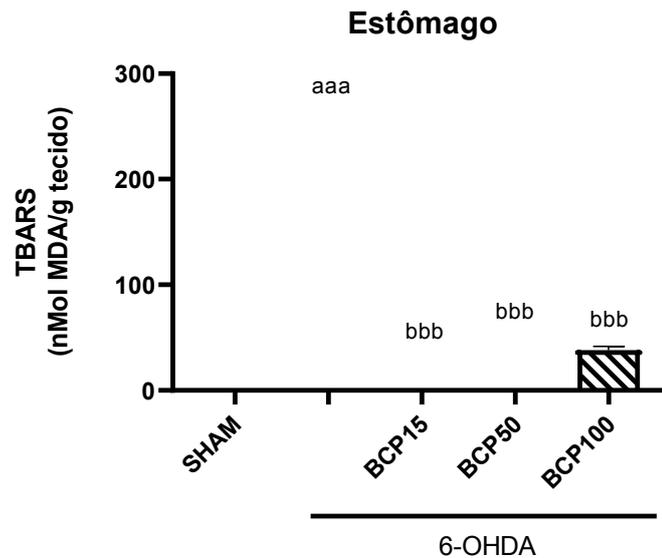
Fonte: Dados do autor.

4.4.2 Determinação dos níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)

Para a caracterização da peroxidação lipídica das partes do trato gastrointestinal analisadas foi avaliado os índices de malondialdeído nos tecidos estudados. Quando o estomago dos animais estudados foi avaliado, foi observado uma diferença significativa entre o grupo 6-OHDA e o grupo SHAM com o valor de $P < 0,0001$ (SHAM: 19,74 ± 3,38 [8]; 6-OHDA: 260,0 ± 5,50 [8]). Na análise dos grupos tratados com BCP foi possível observar uma

grande redução dos níveis de peroxidação em todos os grupos no valor de $P < 0,0001$ (BCP15: $21,07 \pm 2,17$ [7]; BCP50 $37,83 \pm 4,00$ [8]; BCP100: $38,12 \pm 3,39$ [7]), (Figura 31)

Figura 31. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) no tecido estomacal dos animais.

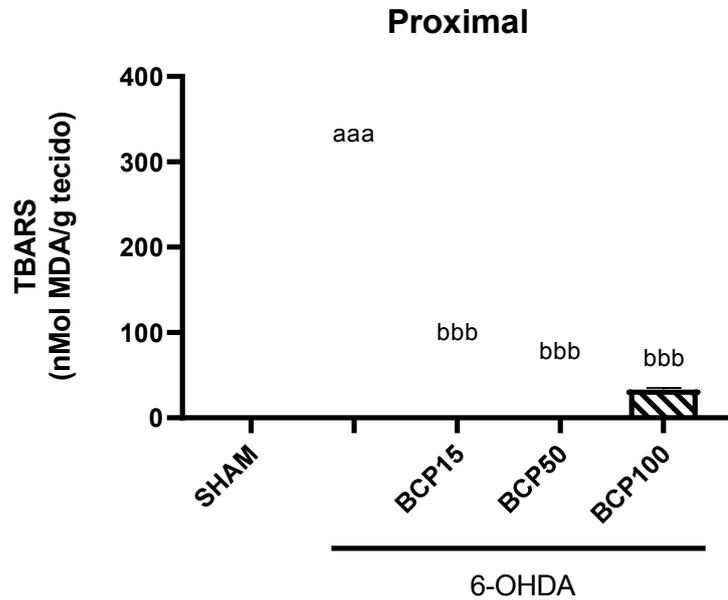


Legenda: Os ratos ($n=8$ por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e o tecido estomacal foi utilizado para determinação dos índices de malondialdeído. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,001$; bbb vs 6-OHDA com $p < 0,001$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Fonte: Dados do autor.

Na análise da área proximal do intestino, foi observado um resultado similar ao do estômago, onde o grupo 6-OHDA apresentou uma diferença no valor de $P < 0,0001$ quando comparado ao controle SHAM (SHAM: $32,78 \pm 3,05$ [8]; 6-OHDA: $289,9 \pm 5,46$ [8]). Com relação aos grupos tratados com BCP, quando comparados ao grupo controle 6-OHDA foi observado uma redução com valor de $P < 0,0001$ (BCP15: $54,30 \pm 5,46$ [8]; BCP50: $35,84 \pm 4,92$ [8]; BCP100: $33,23 \pm 2,01$ [7]) (Figura 32)

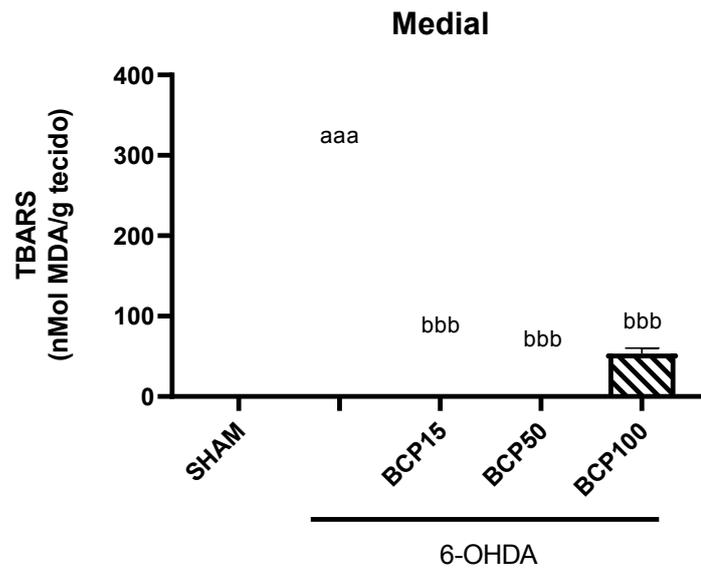
Figura 32. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) na porção proximal do TGI dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção proximal do TGI foi utilizado para determinação dos índices de malondialdeído. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,001$; bbb vs 6-OHDA com $p < 0,001$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Na análise da porção medial do intestino foi avaliada o mesmo padrão foi observado, o grupo 6-OHDA apresentou um aumento quando comparado ao SHAM no valor de $P < 0,0001$ (SHAM: $32,39 \pm 2,14$ [8]; 6-OHDA: $281,4 \pm 8,17$ [8]), os grupos do tratamento com BCP conseguiram reduzir os níveis de peroxidação quando comparados ao grupo 6-OHDA (BCP15: $52,99 \pm 4,52$ [8]; BCP50: $36,35 \pm 4,39$ [8]; BCP100: $53,59 \pm 6,50$ [7]) (Figura 33).

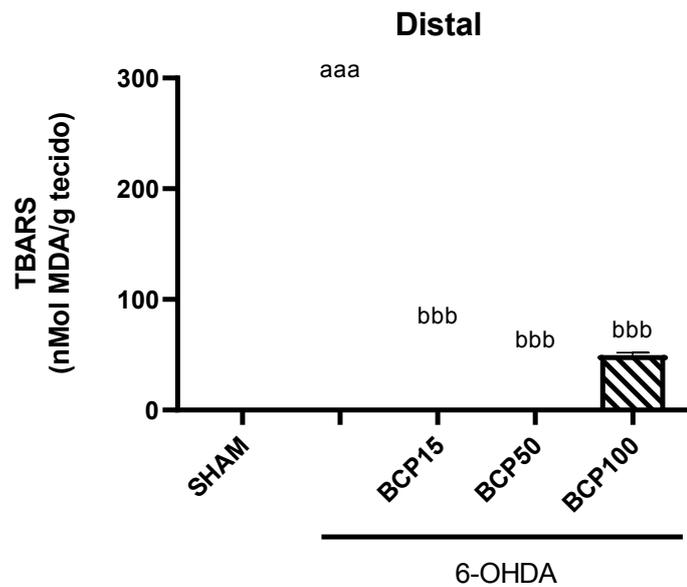
Figura 33. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) na porção medial do TGI dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção medial do TGI foi utilizado para determinação dos índices de malondialdeído. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,001$; bbb vs 6-OHDA com $p < 0,001$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

A última parte do intestino avaliada seguiu o mesmo padrão observado pelas outras partes com um aumento nos níveis de peroxidação do grupo 6-OHDA quando comparados ao grupo SHAM, com $P < 0,0001$ (SHAM: $48,74 \pm 6,86$ [8]; 6-OHDA: $277,5 \pm 6,86$ [8]) e o grupos de tratamento com BCP demonstraram uma redução de $P < 0,001$ (BCP15: $52,75 \pm 4,01$ [8]; BCP50: $34,38 \pm 2,76$ [8]; BCP100: $49,53 \pm 2,25$ [7]) (Figura 34)

Figura 34. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) na porção distal do TGI dos animais.

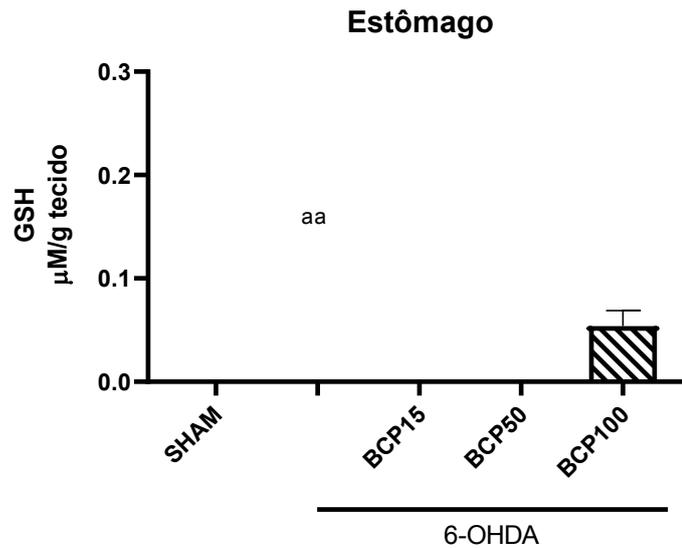


Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção distal do TGI foi utilizado para determinação dos índices de malondialdeído. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aaa vs Sham com $p < 0,001$; bbb vs 6-OHDA com $p < 0,001$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

4.4.3 Determinação da Concentração da Glutathiona Reduzida (GSH)

Para avaliar a ação da defesa antioxidante, a concentração de glutathiona reduzida foi contabilizado nos tecidos do TGI. No tecido estomacal, a única alteração estatisticamente significante observada foi a redução da quantidade de GSH no tecido do grupo 6-OHDA quando comparado ao grupo SHAM com valor de $P < 0,005$ (SHAM: $0,263 \pm 0,021$ [6]; 6-OHDA: $0,121 \pm 0,010$ [7]; BCP15: $0,147 \pm 0,253$ [8]; BCP50: $0,162 \pm 0,035$ [8]; BCP100: $0,053 \pm 0,014$ [6]). Resultados apresentados na Figura 35.

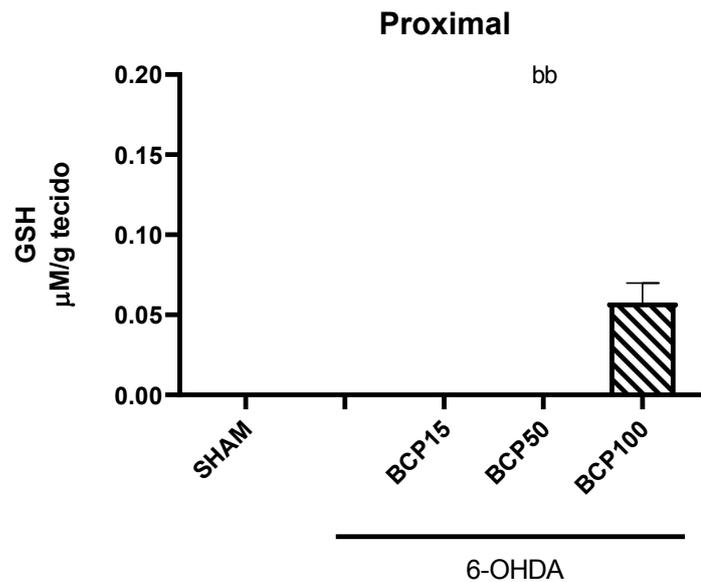
Figura 35. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) no tecido estomacal dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e o tecido estomacal foi utilizado para determinação da concentração de glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: aa vs Sham com $p < 0,01$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Os resultados da análise da porção proximal do intestino demonstraram um aumento significativo do índice de GSH no grupo BCP50 no valor de $P < 0,005$ quando comparado ao grupo 6-OHDA (6-OHDA: $0,048 \pm 0,005$ [6]; BCP50: $0,164 \pm 0,019$ [5]), os demais grupos não apresentaram alterações significativas (SHAM: $0,111 \pm 0,031$ [7]; BCP15: $0,047 \pm 0,007$ [7]; BCP100: $0,057 \pm 0,012$ [6]), apresentado na Figura 36.

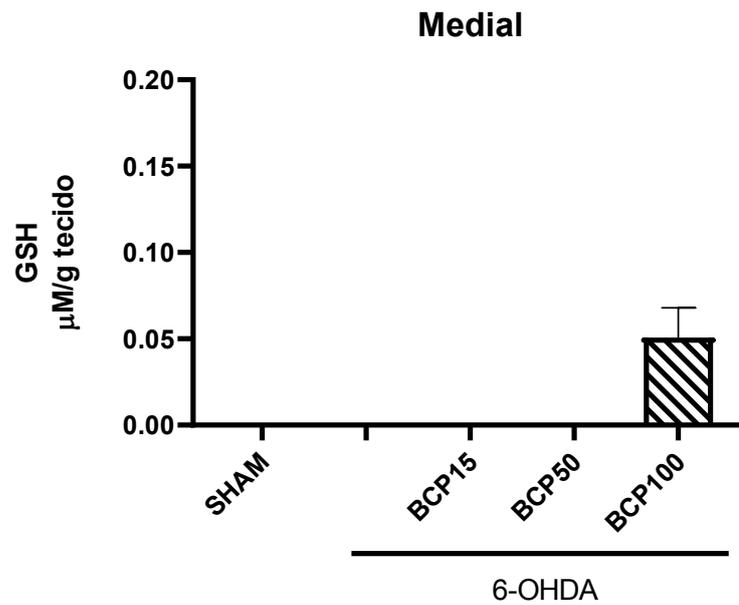
Figura 36. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) na porção proximal do TGI dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção proximal do TGI foi utilizado para determinação da concentração de glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: bb vs 6-OHDA com $p < 0,01$. Considerou-se estatisticamente significativa $p < 0,05$.

Na análise da porção medial do intestino não foi observado alterações significativas dos níveis de GSH nos tecidos quando foram feitas comparações entre os grupos (SHAM: $0,115 \pm 0,036$ [5]; 6-OHDA: $0,068 \pm 0,018$ [6]; BCP15: $0,101 \pm 0,012$ [6]; BCP50: $0,088 \pm 0,017$ [7]; BCP100: $0,050 \pm 0,017$ [5]. Resultados apresentados na Figura 37.

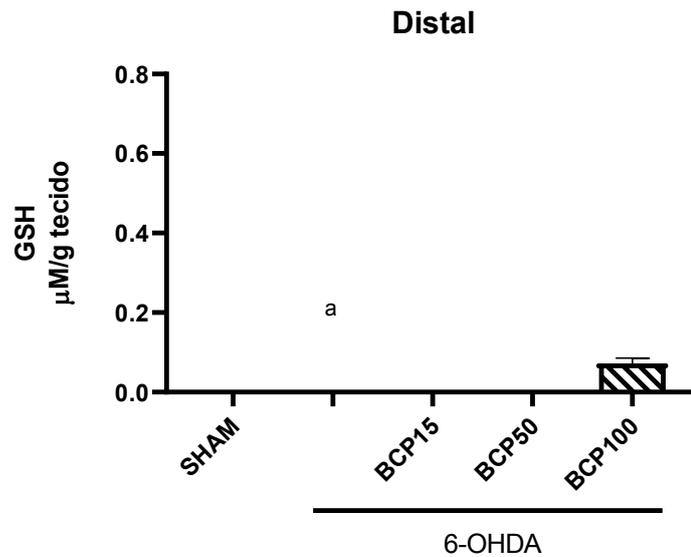
Figura 37. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) na porção medial do TGI dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção medial do TGI foi utilizado para determinação da concentração de glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

Por fim, a última parte avaliada do intestino, a porção distal, apresentou diferença significativa somente na comparação entre os grupos controles SHAM e 6-OHDA, com uma diferença no valor de $P < 0,05$ (SHAM: $0,501 \pm 0,210$ [5]; 6-OHDA: $0,126 \pm 0,026$ [7]), os grupos tratados com BCP não apresentaram alteração significativa (BCP15: $0,226 \pm 0,066$ [7]; BCP50: $0,154 \pm 0,016$ [8]; BCP100: $0,072 \pm 0,013$ [6]), resultados representados na Figura 38.

Figura 38. Análise dos níveis da concentração de glutathiona reduzida (GSH) na porção distal do TGI dos animais.



Legenda: Os ratos (n=8 por grupo, machos, pesando aproximadamente 250-300g) foram tratados com BCP nas dosagens de 15, 50 e 100 mg/kg, via gavagem (VO), durante 21 dias. Após esse período, esses animais foram eutanasiados e a porção distal do TGI foi utilizado para determinação da concentração de glutathiona. One-way ANOVA, Teste de Tukey. Os dados estão expressos em médias \pm EPM. Onde: a vs Sham com $p < 0,05$. Considerou-se estatisticamente significante $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, a lesão unilateral com 6-OHDA nos ratos produziu destruição de neurônios dopaminérgicos no lado direito, como supersensibilidade dos receptores do lado contrário a lesão, evidenciada pelo aumento do número de rotações induzidas por apomorfina, comprovando a indução do modelo. Esses movimentos contralaterais refletem a depleção nigroestriatal de DA. Além disso, verificamos que o tratamento com BCP diminuiu significativamente o comportamento rotacional em todas as doses testadas. Indicando um possível mecanismo antioxidante e neuromodulador do BCP, porque o comportamento rotacional está diretamente relacionado a perda neuronal dopaminérgica estriatal.

De fato, existe uma ampla divulgação de dados na literatura que comprovam as alterações comportamentais e bioquímicas que estão intimamente relacionadas à gravidade da doença de Parkinson e cujas manifestações também foram observadas em ratos após lesão com a neurotoxina 6-OHDA, sendo um dos modelos animais mais empregados nos estudos pré-clínicos dessa doença (ANTUNES et al., 2014; ALEXOUDI et al., 2018).

Estudos mostram que as alterações comportamentais que ocorrem em ratos após a lesão com 6-OHDA imitam as alterações motoras como rigidez, tremores e discinesia, relatadas clinicamente em pacientes com DP (CARVALHO et al., 2013, FUENTES et al., 2010). Da mesma forma, neste estudo, o déficit de coordenação motora foi confirmado a partir da redução da atividade locomotora horizontal, através da redução no número de cruzamentos, aumento da imobilidade e redução do rearing (considerada como atividade locomotora vertical) no teste do campo aberto e também na piora do desempenho no teste do rotarod. Esses efeitos foram atenuados com o tratamento com BCP, especialmente na menor dose testada, onde foi verificada uma redução do déficit motor e melhora dos parâmetros analisados em todos os testes comportamentais utilizados.

Várias evidências experimentais têm mostrado que o sistema endocanabinoide pode modular o sistema de neurotransmissão dopaminérgica, aumentando a disponibilidade de dopamina no corpo estriado, portanto, uma ativação de CB2R através de BCP poderia aumentar a disponibilidade de dopamina e inibir a morte celular, juntamente com déficits dopaminérgicos e motores (TANDA et al., 1997; HAN et al., 2020; FLORES-SOTO et al., 2021).

Um dos principais mecanismos fisiopatológicos subjacentes à DP é o aumento do estresse oxidativo na substância negra *pars compacta* (SNpc) e no corpo estriado. Recentemente, aumentos na formação de radicais livres e mecanismos de defesa antioxidantes alterados têm sido implicados no desenvolvimento da fisiopatologia da DP (INNAMORATO et al., 2010; FLORES-SOTO et al., 2021). Sabe-se que há um aumento da oxidação de lipídeos, proteínas e DNA na SNpc de pacientes com DP, e uma diminuição na expressão e atividade de enzimas antioxidantes (BOSCO et al., 2006; NAKABEPPU et al., 2007; ZEEVALK et al., 2008).

O estresse oxidativo e a falha mitocondrial foram relatados em vários modelos animais de DP, como 6-OHDA, MPTP e rotenona. Foi demonstrado que uma vez administrada, a 6-OHDA age aumentando a produção de radicais livres como o H₂O₂ e espécies de hidroxila altamente reativas, com redução do conteúdo de glutathiona (GSH) e aumentados níveis de TBARS e nitrito levando a danos neuronais (DIAS et al., 2013, RAJAEI et al., 2016). Essas espécies altamente reativas contribuem para a oxidação de lipídios, destruição de proteínas, danos ao DNA e, finalmente, morte de neurônios dopaminérgicos na DP (RODRIGUEZ et al., 2015, FU et al., 2014).

Nosso estudo mostrou que a lesão de 6-OHDA aumentou os níveis de TBARS e nitrito nos animais lesionados sendo significativamente melhorados com a administração do BCP nas três doses testadas. Da mesma forma, verificamos alteração no mecanismos antioxidante endógeno com redução dos níveis de glutathiona em todas as áreas cerebrais testadas, porém a recuperação só foi significativa com o tratamento com BCP na dose de 50 mg/kg. Esses resultados indicam que o tratamento com BCP pode melhorar o funcionamento neuronal, apresentando efeito neuroprotetor contra a neurodegeneração induzida por 6-OHDA, podendo ser um adjuvante útil na DP.

Nesse contexto, LIU e colaboradores (2015) relataram que um pré-tratamento de dois dias com β -cariofileno atenuou o aumento induzido pelo ácido cáínico nos níveis de TBARS e a diminuição das atividades da superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase. Recentemente, FLORES-SOTO e colaboradores (2021) verificaram que o BCP protege os neurônios dopaminérgicos do dano induzido pelo MPTP e eles atribuíram esse efeito a capacidade desse fitocanabinóide de aumentar a expressão e a atividade da NQO1 após o dano, já que essa enzima desempenha um papel importante na neuroproteção das células dopaminérgicas.

De fato, estudos recentes têm demonstrado que o canabidiol aumenta a expressão de agentes antioxidantes heme oxigenase-1, glutathiona S-transferase, glutathiona S-transferase

peroxidase, NAD (P) H quinona oxidoreductase e glutamato-cisteína ligase, geralmente pela regulação da expressão do fator nuclear 2 (NRF-2) e que esse efeito pode estar relacionado à possíveis efeitos neuroprotetores. Este mecanismo é apoiado por evidências de que a ativação do CB2R melhora a fibrose miocárdica e o estresse oxidativo cardíaco por meio da ativação da via do Nrf2(JUKNAT et al., 2012; JUKNAT et al., 2013; LI et al., 2016).

A principal descoberta desse trabalho foi a relação observada entre o estresse oxidativo que ocorre nas áreas cerebrais e no trato digestório dos animais submetidos a lesão unilateral induzida por 6-OHDA. De acordo com o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a relatar os efeitos do BCP nas alterações gastrintestinais induzidas por 6-OHDA e correlacioná-las às alterações cerebrais dos animais, a fim de fornecer evidências para o tratamento neuroprotetor mais eficiente.

A sintomatologia gastrointestinal precoce associada a presença de alfa-sinucleína gastrointestinal e inflamação em pacientes com DP fomentou a pesquisa sobre o possível papel do eixo intestino-cérebro na doença. O eixo intestino-cérebro é um sistema de comunicação bidirecional que consiste em conexões neurais anatômicas "hard-wired" (sistema nervoso entérico, vias parassimpáticas e simpáticas e o cérebro), componentes humorais fornecidos pelos sistemas neuroendócrino e imunológico e o epitélio/microbioma intestinal. Como um todo, essas observações demonstram que alguns dos principais componentes do eixo intestino-cérebro são disfuncionais na DP. Essas pesquisas, embora novas e interessantes, são preliminares e o papel preciso do eixo intestino-cérebro no desenvolvimento da doença ainda não foi determinado(ROUAUD et al., 2020; RANI & MONDAL, 2021).

Além disso, verificamos também as repercussões desses efeitos na motilidade gastrintestinal dos animais e nossos resultados mostraram aumento do estresse oxidativo, especialmente nos níveis de TBARS no estômago, e intestino (regiões proximal, medial e distal) dos animais lesionados com 6-OHDA, assim como uma redução dos níveis de glutathione no estômago e na porção distal do intestino. Verificamos ainda que o tratamento com BCP em todas as doses foi capaz de reduzir os níveis de TBARS em todas as porções do TGI testadas. Mostrando que as ações deletérias da neurotoxina não se restringem ao SNC e tão pouco as ações benéficas do BCP.

De fato a literatura mostra dados consistentes entre alterações da motilidade gastrintestinal e pacientes com doença de parkinson, sendo constipação a principal queixa desses pacientes. Disfunções gastrintestinais são comuns em todos os estágios da DP, onde distúrbio de motilidade, como prisão de ventre e constipação, é um dos principais sintomas

gastrointestinais associados a DP (COLUCCI, et al., 2012). Essas disfunções gastrointestinais fazem parte do quadro clínico da doença já que a constipação, que muitas vezes precede o início dos sintomas motores, e é considerada um marcador precoce da doença (MARRINAN, et al., 2014).

Neste estudo corroboramos dados anteriores do nosso grupo de estudo onde animais experimentais, ratos Wistar machos, apresentaram modificação do esvaziamento gástrico quando submetidos ao modelo de doença de Parkinson induzida por 6-OHDA (ALBUQUERQUE, 2015). De fato mostramos nesse trabalho que os animais apresentam, de forma controversa ao trabalho anterior uma aceleração do esvaziamento gástrico, enquanto o trânsito intestinal se mostra retardado, fato que justifica a sintomatologia apresentada pelo pacientes com Doença de Parkinson em estados iniciais e mais acentuadamente nos pacientes com doença avançada (MARRINAN et al, 2014; COLUCCI, et al., 2012).

Mostramos também em primeira mão que o trato gastrintestinal dos animais submetidos ao modelo de doença de Parkinson por 6-OHDA apresentam aumento de compostos redutores com redução de glutatona e presenças de nitritos e nitratos no trato gastrintestinal, o que pode justificar as alterações da motilidade gastrintestinal nestes animais.

Diversos mecanismos podem modificar a motilidade gastrintestinal, acelerando ou retardando o esvaziamento gástrico e/ou o trânsito gastrintestinal (GUYTON & HALL, 2017). Desta feita esses compostos redutores aumentados nos animais submetidos ao modelo de doença de Parkinson com 6-OHDA ajudam a compreender as alterações da motilidade tendo em vista o efeito sobre a contratilidade da musculatura gastrintestinal destes compostos como mostrado por Coluci e colaboradores (2012).

Mostramos ainda de forma inovadora que o pós-tratamento desses animais com betacarofeno uma substância sabidamente antioxidante reverteu as alterações da motilidade gastrintestinal observadas nos animais submetidos ao modelo da doença de Parkinson com 6-OHDA. Este efeito se deu tanto sobre o esvaziamento gástrico bem como sobre o trânsito intestinal de líquidos em ratos.

Portanto, observamos que provavelmente, as alterações que ocorrem no SNC dos animais lesionados com 6-OHDA de fato repercutem no TGI, e assim como acontece nos pacientes portadores de DP, há alteração da motilidade e essas alterações podem estar correlacionadas com o aumento do estresse oxidativo nessa região. O mais interessante é que o tratamento com BCP foi capaz não só de reverter os danos oxidativos no SNC, mas também no TGI.

6 CONCLUSÃO

Os efeitos neuroprotetores e antioxidantes do BCP são evidentes no modelo de DP com 6-OHDA testado, revertendo inclusive alterações no TGI. O fitocanabinóide BCP reduziu o déficit motor e o estresse oxidativo, potencialmente representando um alvo farmacológico interessante para proteger neurônios dopaminérgicos de danos. Portanto, o BCP pode representar um agente promissor no tratamento da DP.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, J. C. S Alterações na motilidade gastrointestinal no modelo de doença de Parkinson induzida por 6-OHDA em ratos. 2015. 73 f. **Dissertação de mestrado**(Mestrado em Biotecnologia) – Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2015.
- ALEXOUDI, A.; ALEXOUDI, I.; GATZONIS, S. Parkinson's disease pathogenesis, evolution and alternative pathways: A review. **Revue neurologique**, v. 174, n. 10, p. 699-704, 2018.
- ANTUNES, M. S. et al. Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. **Nutrition**, v. 30, n. 11-12, p. 1415-1422, 2014.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, n.2, p. 205-235, 1973.
- BALESTRINO, R; SCHAPIRA, A HV. Doença de Parkinson. **European journal of neurology**, v. 27, n. 1, p. 27-42, 2020.
- BHAT, A. H. et al. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101-110, 2015.
- BOSCO, D. A. et al. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate α -synuclein fibrilization. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 5, p. 249-253, 2006.
- BRAAK, H. et al. Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. **Neuroscience letters**, v. 396, n. 1, p. 67-72, 2006.
- CARVALHO, M. M. et al. Behavioral characterization of the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2013.
- CERSOSIMO, M. G. et al. Gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease: prevalence and occurrence before motor symptoms. **Journal of neurology**, v. 260, n. 5, p. 1332-1338, 2012.
- CHAUDHURI, K. R. *et al.* Non-oral dopaminergic therapies for Parkinson's disease: current treatments and the future. **Nature Partner Journals Parkinson's Disease**, v. 2, 2016.
- CHO, J. Y. et al. Amelioration of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by oral administration of β -caryophyllene, a sesquiterpene. *Life sciences*, v. 80, n. 10, p. 932-939, 2007.
- CHUNG, Y. C. *et al.* CB2 receptor activation prevents glial-derived neurotoxic mediator production, BBB leakage and peripheral immune cell infiltration and rescues dopamine neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. **Experimental & molecular medicine**, v. 48, n. 1, p. e205-e205, 2016.

COLUCCI, M. et al. Intestinal dysmotility and enteric neurochemical changes in a Parkinson's disease rat model. **Autonomic Neuroscience**, v. 169, n. 2, p. 77-86, 2012.

DIAS, V.; JUNN, E.; MOURADIAN, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 3, n. 4, p. 461-491, 2013.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation Original Research Article. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 421-431, 1990.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S.; EDWARDS, L. D. The pharmacological activity of a series of basic esters of mono- and dialkylmalonic acids. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 1, p. 64-66, 1957.

FIDYT, K. et al. β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide — natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FLORES-SOTO, M. E. et al. β -Caryophyllene exerts protective antioxidant effects through the activation of NQO1 in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, v. 742, p. 135534, 2021.

FU, S. P et al. BHBA suppresses LPS-induced inflammation in BV-2 cells by inhibiting NF- κ B activation. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

FUENTES, R.; PETERSSON, P.; NICOLELIS, M. A. L. Restoration of locomotive function in Parkinson's disease by spinal cord stimulation: mechanistic approach. **European Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 7, p. 1100-1108, 2010.

GARCIA, C. *et al.* Symptom-relieving and neuroprotective effects of the phytocannabinoid Δ 9-THCV in animal models of Parkinson's disease. **British journal of pharmacology**, v. 163, n. 7, p. 1495-1506, 2011.

GERTSCH, J. *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GOLDMAN, S. M. *et al.* Concordance for Parkinson's disease in twins: A 20-year update. **Annals of neurology**, v. 85, n. 4, p. 600-605, 2019.

GÓMEZ-GÁLVEZ, Y. *et al.* Potential of the cannabinoid CB2 receptor as a pharmacological target against inflammation in Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 200-208, 2016.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56-58, 1981.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia médica**. 13ª ed. Elsevier Brasil,— 2017. (cap 63).

HAN, Q. W.; YUAN, Y. H.; CHEN, N. H. The therapeutic role of cannabinoid receptors and its agonists or antagonists in Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 96, p. 109745, 2020.

- INNAMORATO, N. G. et al. Different susceptibility to the Parkinson's toxin MPTP in mice lacking the redox master regulator Nrf2 or its target gene heme oxygenase-1. **PloS one**, v. 5, n. 7, p. e11838, 2010.
- JAGMAG, S. A. *et al.* Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Front Neurosci**, v. 9, n. 503, 2016.
- JAVED, H et al. Cannabinoid type 2 (CB2) receptors activation protects against oxidative stress and neuroinflammation associated dopaminergic neurodegeneration in rotenone model of Parkinson's disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, p. 321, 2016.
- JIANG, P; DICKSON, D. W. Parkinson's disease: experimental models and reality. **Acta neuropathologica**, v. 135, n. 1, p. 13-32, 2018.
- JUKNAT, A. et al. Differential transcriptional profiles mediated by exposure to the cannabinoids cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in BV-2 microglial cells. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 8, p. 2512-2528, 2012.
- JUKNAT, A. et al. Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61462, 2013.
- KIM, Y. S. et al Melatonin protects against 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport*, v. 9, p. 2387-2390, 1998.
- KLEGERIS, A; BISSONNETTE, C. J.; MCGEER, P. L. Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor. **British journal of pharmacology**, v. 139, n. 4, p. 775-786, 2003.
- KLINGELHOEFER, L.; REICHMANN, H. Pathogenesis of Parkinson disease—the gut–brain axis and environmental factors. **Nature Reviews Neurology**, v. 11, n. 11, p. 625-636, 2015.
- KWAKYE, G. F.; MCMINIMY, R. A.; ASCHNER, M. Disease-toxicant interactions in Parkinson's disease neuropathology. **Neurochemical research**, v. 42, n. 6, p. 1772-1786, 2017.
- LI, X. et al. Activation of cannabinoid receptor type II by AM1241 ameliorates myocardial fibrosis via Nrf2-mediated inhibition of TGF- β 1/Smad3 pathway in myocardial infarction mice. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 4, p. 1521-1536, 2016.
- LIDDLE, Rodger A. Parkinson's disease from the gut. **Brain research**, v. 1693, p. 201-206, 2018.
- LIU, H. et al. Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. *Neurochemical Research*, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

MARRINAN, S.; EMMANUEL, A. V.; BURN, D. J. Delayed gastric emptying in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, v. 29, n. 1, p. 23-32, 2014.

MAZZETTI, A. P. *et al.* Glutathione transferases and neurodegenerative diseases. *Neurochemistry International*, v. 82, p. 10-18, 2015.

NAKABEPPU, Y. *et al.* Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *Journal of neuroscience research*, v. 85, n. 5, p. 919-934, 2007.

OHJA, S. *et al.* β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 418, n. 1, p. 59-70, 2016.

OU, R. *et al.* Progression of non motor symptoms in Parkinson's disease among different age populations: A two-year follow-up study. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 360, p. 72-77, 2016.

PAUL, A; YADAV, K. S. Parkinson's disease: Current drug therapy and unraveling the prospects of nanoparticles. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, p. 101790, 2020.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: **Academic Press**, 2nd Edn, 1986.

PERLBARG, V. *et al.* Alterations of the nigrostriatal pathway in a 6-OHDA rat model of Parkinson's disease evaluated with multimodal MRI. *PLoS One*, v. 13, n. 9, p. e0202597, 2018.

RAI, S. N; SINGH, P. Advancement in the modelling and therapeutics of Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 104, p. 101752, 2020.

RAJAEI, Z.; HOSSEINI, M.; ALAEI, H. Efeitos da crocina no dano oxidativo cerebral e na memória aversiva em um modelo 6-OHDA de doença de Parkinson. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 74, n. 9, p. 723-729, 2016.

RANI, L.; MONDAL, A. C. Unravelling the role of gut microbiota in Parkinson's disease progression: Pathogenic and therapeutic implications. *Neuroscience Research*, 2021.

REICHMANN, H. View point: etiology in Parkinson's disease. Dual hit or spreading intoxication. *Journal of the neurological sciences*, v. 310, n. 1-2, p. 9-11, 2011.

REYNELL, P. C.; SPRAY, G. H. A technique for the simultaneous measurement of gastrointestinal transit and intestinal absorption in rats. *J. Physiol.* v. 131, p. 452-62, 1956.

RODRÍGUEZ-VIOLANTE, M. *et al.* Factores asociados a la calidad de vida de sujetos con enfermedad de Parkinson y la carga en el cuidador. *Neurología*, v. 30, n. 5, p. 257-263, 2015.

ROUAUD, T. *et al.* Pathophysiology of Parkinson's disease: Mitochondria, alpha-synuclein and much more.... *Revue Neurologique*, 2020.

SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease epidemiology, pathology, genetics and pathophysiology. **Clinics in geriatric medicine**, 2020 .

TANDA, G.; PONTIERI, F. E.; DI CHIARA, G. Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common μ 1 opioid receptor mechanism. **Science**, v. 276, n. 5321, p. 2048-2050, 1997.

ULUSOY, A. et al. Brain-to-stomach transfer of α -synuclein via vagal preganglionic projections. **Acta neuropathologica**, v. 133, n. 3, p. 381-393, 2017.

UNGER, M. M. et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. **Parkinsonism & related disorders**, v. 32, p. 66-72, 2016.

VIVEROS-PAREDES, J. M. et al. Neuroprotective effects of β -caryophyllene against dopaminergic neuron injury in a murine model of Parkinson's disease induced by MPTP. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 3, p. 60, 2017.

WOLTERS, E. C. H. Non-motor extranigral signs and symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism RelatDisord**, v. 15 Suppl 3, p. S6-12, Dez 2009.

WU, T.; HALLETT, M.; CHAN, P. Motor automaticity in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, n. 6, p. 1-9, 2015.

ZEEVALK, G. D.; RAZMPOUR, R.; BERNARD, L. P. Glutathione and Parkinson's disease: is this the elephant in the room?. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, n. 4, p. 236-249, 2008.

ZHANG, X. S. *et al.* Tanshinone IIA protects dopaminergic neurons against 6-OHDA induced neurotoxicity through miR153/Nrf2/ARE signaling pathway. **Neuroscience**, v. 1, p. 1-14, 2015.



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Comte. Maurocélvio Rocha Pontes, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **EFEITOS DO β -CARIOFILENO NA MOTILIDADE GASTROINTESTINAL EM MODELO DE DOENÇA DE PARKINSON INDUZIDA POR 6-OHDA EM RATOS**, registrada com o nº 15/18, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 26/02/2019.

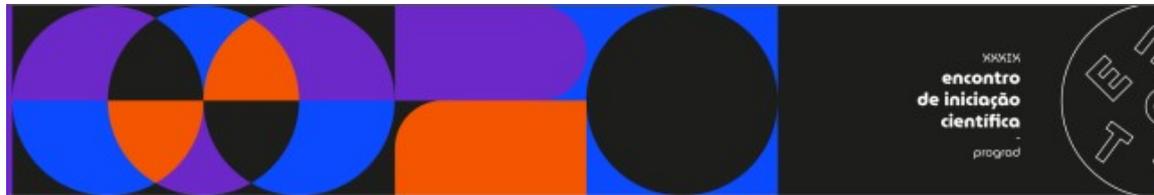
Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	26/02/2019 até 15/12/2021
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos <i>Wistar</i>
Nº de animais	Ratos: 138.
Peso/Idade	Ratos: 250-300g/2-3meses
Sexo	Ratos: 138♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 24 de abril de 2019.

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva
 Vice-coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

PARECER DO COMITE DE ETICA

ANEXO II – POSTER APRESENTADO MOSTRANDO AS ADERÊNCIAS ENCONTRADAS NOS ANIMAIS TRATADOS POR VIA INTRAPERITONEAL



EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE β -CARIOFILENO, VIA INTRAPERITONEAL, EM DOSES REPETIDAS, EM RATOS.

Carol Leal de Miranda¹; Mateus Aragão Esmeraldo¹; Francisco José Gomes²; Cleane Gomes Moreira³; José Ronaldo Vasconcelos da Graça⁴; Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar⁴.

Laboratório de Fisiologia e Neurociências
Universidade Federal do Ceará – UFC campus Sobral

INTRODUÇÃO

O β -cariofileno (BCP) é um sesquiterpeno bícíclico natural comumente encontrado na composição de óleos essenciais extraídos de algumas plantas, como a *Eugenia caryophyllata*. Na última década, intensificou-se o desenvolvimento de estudos relacionados ao BCP, devido à importância farmacológica deste fitocanabinoide na ação anti-inflamatória e no efeito protetor em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson (DP).

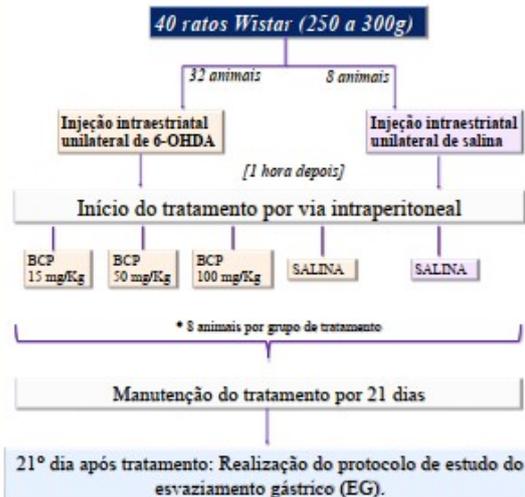
OBJETIVO

Relatar a observação de aderências intestinais em ratos tratados com BCP via intraperitoneal (i.p.), em doses repetidas, durante pesquisa sobre os efeitos do BCP na motilidade gastrointestinal de ratos submetidos ao modelo animal de DP induzida por 6-Hidroxi dopamina (6-OHDA).

METODOLOGIA

Condições de experimento e hospedaria:
Temperatura: 25°C \pm 2°
Raço e Água – Adequados
Ciclo claro/escuro – 12/12h

Protocolo nº15/18 –
CEUA (UFC – Sobral)



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o protocolo de EG, realizou-se a laparotomia mediana com exposição das vísceras abdominais (estômago e intestino) e foi observado a presença de aderências intestinais nos animais dos três grupos que receberam o tratamento com BCP (vide figura 1). Ademais, pôde-se verificar a piora das adesões intestinais quanto maior foi a concentração de BCP e a inexistência de alterações nos grupos SALINA.

Figura 1. Adesões intestinais, em ratos, observadas após laparotomia mediana.



CONCLUSÃO

As aderências intestinais secundárias ao uso subcrônico de BCP via i.p. não foram mencionadas nas referências analisadas e inviabilizaram o prosseguimento do estudo. Por isso, optou-se pela via oral em substituição, também respaldada pela literatura como livre de efeitos toxicológicos graves.

REFERÊNCIAS

- SCHMITT, D., LEVY, R., CARROLL, R. Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil: Subchronic Toxicity in Rats. *International Journal of Toxicology*. 1-10, 2016. DOI: 10.1177/1091518116655303
- MANSOURI, S.A., OJHA, S., MEMARI, E.A., AMERI, M.A., NURULAIN, S.M., BAHU, A. The cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene, reduced voluntary alcohol intake and attenuated ethanol-induced place preference and sensitivity in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.06.025>
- JAVED, H., AZIMULLAH, S., HAQUE, M. E., OJHA S. K. Cannabinoid Type 2 (CB2) Receptors Activation Protects against Oxidative Stress and Neuroinflammation Associated Dysenergetic Neurodegeneration in Ratonic Model of Parkinson's Disease. 2016. doi: 10.3389/fpsyg.2016.00327
- MEERAN, M.F., TAEF, H.A., AZIMULLAH, S., TARIQ, S., ADEGHATE, E., OJHA, S. β -Caryophyllene, a natural bicyclic sesquiterpene attenuates dantrolene-induced chronic cardiotoxicity via activation of myocardial cannabinoid type-2 (CB2) receptors in rats. 2019. 158-167. *Chemico-Biological Interactions*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2019.02.028>

LABORANTE DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – CAMPUS SOBRAL;
EQUÍVOCOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UFC – CAMPUS SOBRAL;
ALUNA DE PÓS-DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA UFC – CAMPUS SOBRAL;
DOCENTE DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – CAMPUS SOBRAL.

@ufcinforma

/ufcinforma

www.encontrosuniversitarios.ufc.br



