

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FARMACOLOGIA**

**SARAH MARTINS PRESTI DA SILVA**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ROSMARÍNICO EM  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOTORES EM MODELO PRÉ  
CLÍNICO DA DOENÇA DE PARKINSON**

VITÓRIA  
2018

SARAH MARTINS PRESTI DA SILVA

EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDO ROSMARÍNICO EM  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOTORES EM MODELO PRÉ  
CLÍNICO DA DOENÇA DE PARKINSON

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Farmacologia.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rita Gomes Wanderley Pires

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cristina Martins e Silva

VITÓRIA

2018

**ESPAÇO RESERVADO PARA ATA DA DEFESA**

Espaço reservado aos dados internacionais de catalogação, elaborados pela Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo.

**Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental situado no Departamento de Fisiologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio financeiro das seguintes instituições:**

- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES)**
- Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior (CAPES)**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por ter me capacitado para desenvolver este trabalho, por ser meu refúgio, minha fortaleza, auxílio sempre presente na adversidade.

A minha amada mãe Maria José pelo exemplo de luta, amor incondicional e generosidade. Por sempre ter uma palavra de calma, por ser um exemplo de profissional para mim. Ao meu amado pai Levi, que me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos, apesar das adversidades. Vocês são meu exemplo de vida.

Ao meu querido marido Ricardo, pelo amor, apoio incondicional, compreensão, companheirismo e palavras de incentivo. Por todas as vezes que ele cuidou da nossa filha quando eu precisei me ausentar pelos estudos e pelos experimentos. Obrigada por sonhar o meu sonho.

A minha pequena filha Naomí, minha companheira e fonte de inspiração. Por muitas vezes me acompanhar no laboratório aos finais de semana e nos estudos, quando o pai estava viajando. Seu amor puro me dá motivação para alcançar meus objetivos.

A minha orientadora, professora Rita Gomes Wanderley Pires, por me possibilitar realizar um trabalho tão bonito, por acreditar que eu seria capaz de fazê-lo, por me ensinar a ser pesquisadora, acreditar e descobrir a ciência básica, mas acima de tudo, por me orientar de forma tão humana e pela simpatia que sempre me presenteou.

A minha co-orientadora, professora Cristina Martins e Silva, pelo conhecimento transferido a mim em cada experimento, por todas as vezes que me ensinou a dissecar a substância negra, a trabalhar com MPTP, a cortar amostras no criostato e por ser sempre tão paciente comigo. Obrigada por ter compartilhado comigo tanto conhecimento. Eu admiro muito o seu ofício na docência.

Aos colegas do Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental (LNMC): Vocês contribuíram de forma decisiva para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao professor Adair, por ter cedido a substância alvo do meu estudo.

Ao professor Alexandre Santos e Evaldo Pereira, pela imensa contribuição com as análises por HPLC.

Ao Laboratório de Análise Biomolecular (LABIOM) e Laboratório de Histologia Molecular e Imunohistoquímica (LHMI) pela utilização dos equipamentos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Farmacologia (UFES), pela amizade e conhecimentos compartilhados.

A todos os funcionários do Centro de Ciências da Saúde da UFES, por toda ajuda sempre que necessária.

A todos que me apoiaram e contribuíram para que eu chegasse ao fim dessa etapa.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	Doença de Parkinson	15
1.2	Fisiopatologia da DP	16
1.3	Núcleos da Base	18
1.4	Etiologia da DP	24
1.4.1	Excitotoxicidade	27
1.4.2	Fatores ambientais	28
1.5	Modelos experimentais para a DP	28
1.5.1	Modelo do MPTP	29
1.6	Tratamento	31
1.7	Ácido Rosmarínico	34
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
3.1	Objetivo Geral	41
3.2	Objetivo Específico	41
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>42</b>
	<b>Rosmarinic acid improves motor and biochemical changes in a Parkinson's disease mouse model induced by the neurotoxin MPTP</b>	<b>59</b>



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Principais marcadores patológicos da DP

**Figura 2:** Circuitaria de controle motor dos núcleos da base

**Figura 3:** Neurotransmissão dopaminérgica

**Figura 4:** Mecanismo de ação da toxina parkinsoniana MPTP

**Figura 5:** Espécies herbáceas ricas em AR

**Figura 6:** Fórmula molecular do AR ( $C_{18}H_{16}O_8$ )

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3-MT** 3-metoxitiramina
- 5-HT** Serotonina
- 6-OHDA** 6-hidroxi-dopamina
- AMPc** 3´5´-adenosina-monofosfato-cíclico
- AR** Ácido Rosmarínico
- CAT** Catalase
- COM-T** catecol-O-metil-transferase
- COX1** Ciclooxygenase 1
- COX2** Ciclooxygenase2
- DA** Dopamina
- DAT** Transportador de dopamina
- DCNT** Doenças crônicas não transmissíveis
- DDC** L-Dopa descarboxilase
- DDP** Dopa descarboxilase periférica
- DOPAC** Ácido 3,4-di-hidroxi-fenilacético
- DP** Doença de Parkinson
- Gi** Proteína G inibitória
- GPI** Globo pálido interno
- GPe** Globo pálido externo
- Gs** Proteína G estimulatória
- GSH** Glutathiona reduzida
- GSH-px** Glutathiona peroxidase
- HVA** Ácido homovanílico
- IFN-G** interferon-gama
- IL-1B** interleucina 1-B

**iNOS** Óxido nítrico sintase

**MAO** Monoamino oxidase

**MPDP+** 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina

**MPP+** 1-metil-4-fenilpiridínico

**MPTP** 1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina

**OH•** Radical hidroxila

**L-DOPA** 3,4-dihidroxi-fenilalanina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrogênio

**ROS** Espécies reativas de oxigênio

**SNC** Sistema Nervoso Central

**SN<sub>pc</sub>** Substância negra parte compacta

**SN<sub>pr</sub>** Substância negra parte reticulada

**STN** Núcleo subtalâmico

**SOD** Superóxido dismutase

**TNF-GMA** fator de necrose tumoral

**TH** Tirosina hidroxilase

**VMAT** Transportador vesicular de monoaminas

**WHO** Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em todo mundo. Atualmente, a principal estratégia farmacológica no tratamento da DP alivia apenas os sintomas motores, porém não previne ou diminui a neurodegeneração. O Ácido Rosmarínico (AR) é um éster dos ácidos cafeico, e 3,4-dihidroxifenil lático, obtido de muitas espécies vegetais nativas da flora como a *Salvia officinales L.* (sálvia) e a *Rosmarinus officinales* (alecrim). Esse composto apresenta potencial medicinal vasto com amplo espectro de ação biológica, sendo as atividades antioxidantes e de sequestro de radicais livres fatores chaves nos resultados *in vivo* reportados para o AR. Entretanto, a literatura é escassa em trabalhos mostrando os efeitos do AR em animais saudáveis e animais tratados com MPTP para a geração das alterações semelhantes à DP. No presente estudo, os camundongos foram aleatoriamente separados em 4 grupos distintos: Grupo controle/salina (CN), Ácido Rosmarínico/ veículo (AR); MPTP (1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina)/salina; MPTP e AR (MPTP +AR). O AR (ou veículo) foi administrado oralmente por via intragástrica uma vez ao dia durante 14 dias, uma hora antes do MPTP ou solução salina. Os grupos MPTP e MPTP+AR receberam administração intraperitoneal de MPTP na dose de 30 mg/kg uma vez ao dia durante 5 dias (no 4-8 dia do experimento). Nos parâmetros motores, um comportamento de hiperlocomoção foi observado em animais tratados somente com MPTP, tal efeito foi significativamente prevenido pelo tratamento com AR. No contexto bioquímico, mostramos que o tratamento com AR pode aumentar a neurotransmissão dopaminérgica e serotoninérgica em animais saudáveis, uma vez que houve aumento no conteúdo das monoaminas, porém não houve a normalização das disfunções dos neurotransmissores observados nos camundongos parkinsonianos. A análise das alterações do mRNA nos componentes do sistema dopaminérgico no estriado mostrou up-regulation da expressão da enzima catecol-O-metil-transferase (COM-T) no grupo MPTP+AR, enquanto a expressão normal desta enzima foi observado nos demais grupos. Nosso estudo evidencia um potencial neuroprotetor do AR, na prevenção da alteração locomotora induzida pelo tratamento com MPTP e demonstra um potencial de prevenção do início da DP por elevar o conteúdo de dopamina e serotonina no estriado em animais saudáveis.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, MPTP, Ácido Rosmarínico, neuroproteção.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide. Currently, the main therapeutic approach relieves only motor symptoms, however, it does not prevent or stop the neurodegeneration. Rosmarinic Acid (RA) is an ester of caffeic and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids obtained from many plant species such as *Salvia officinalis* L. (sage) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). This compound has a wide collection of biological activities, antioxidant and free radical scavenging being key factors in the in vivo outcomes reported for RA, however, the literature is scarce in studies showing the effects of RA on healthy animals and MPTP treated animals. Herein, in the present study the mice were randomly separated into 4 distinct groups: Control/ saline group (CN), Rosmarinic acid/ vehicle (RA); MPTP (1-methyl-4-phenyltetrahydropyridine)/ saline; MPTP and AR (MPTP+AR). RA (or vehicle) was administered orally intragastrically for 14 days, one hour prior to MPTP or saline. The MPTP and MPTP+AR group received intraperitoneal administration of MPTP at the dose of 30 mg/kg once daily for 5 days (at 4-8 day of experiment). In motor parameters, a hyperlocomotion behavior was observed in animals treated with MPTP only, such effect was significantly prevented by treatment with RA. In the biochemical context, we showed that RA treatment increased dopaminergic and serotonergic content in healthy animals, but there was no normalization of the neurotransmitter dysfunctions observed in the parkinsonian mice. Analysis of the mRNA alterations in dopaminergic system components in the striatum showed that catechol-O-methyl-transferase (COM-T) expression was increased in MPTP+AR group. Overall, this report brings new evidence of the potential neuroprotective properties of RA in preventing the motor alterations induced by MPTP and demonstrates a potential for preventing the onset of PD by improving dopaminergic and serotonergic content in striatum of healthy animals.

Keywords: Parkinson's disease, MPTP, rosmarinic acid, neuroprotection

## 1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento gradativo da população mundial é um novo cenário que se vislumbra no século XXI. Saímos de um quadro em que as doenças infecciosas e parasitárias eram causas importantes de comorbidade e alta mortalidade. Atualmente, passamos a conviver com as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), as quais são de origem multifatorial, desenvolvem-se no decorrer da vida e são de longa duração (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (WHO), em 2008 as DCNT foram responsáveis por 63% dos óbitos no mundo, e são consideradas, sobretudo, um sério problema de saúde pública. Nesse contexto, é possível classificar as DCNT de natureza metabólica, como as dislipidemias, aterosclerose e diabetes, e as neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (DP) (WHO, 2017).

### 1.1 Doença de Parkinson

A DP originalmente descrita por James Parkinson, em sua monografia clássica “Essay on the Shaking Palsy” em 1817, é a segunda doença neurodegenerativa mais comum do Sistema Nervoso Central (SNC) e destaca-se como a desordem do movimento mais frequentemente observada (Parkinson, 2002; TYSNES; STORSTEIN, 2017).

A DP apresenta distribuição universal e atinge todos os grupos étnicos e classes socioeconômicas (KANDEL; SQUARE, 2003). O envelhecimento é um fator de risco para desenvolver esta doença, e o início do quadro clínico ocorre frequentemente na faixa etária entre 55-60 anos (TWELVES; PERKINS; COUNSELL, 2003). A prevalência da DP tem sido estimada entre 100 a 200 casos por 100.000 habitantes. A prevalência e a incidência aumentam exponencialmente com a idade (TANNER, 1997; DRIVER et al., 2009).

Com o aumento da expectativa de vida, além da maior exposição a agentes ambientais que podem desencadear a DP, o número de indivíduos

acometidos por essa doença aumentará substancialmente nos próximos anos. Um estudo projetou um número de indivíduos com a DP para os próximos anos baseado em dados de prevalência publicados. Foram avaliados os cinco países mais populosos da Europa ocidental e dez países mais populosos do mundo, incluindo o Brasil, constatando que o número de indivíduos com a DP nesses países era cerca de 4.1 milhões em 2005 e duplicará para 9,3 milhões até 2030 (DORSEY et al, 2007).

O diagnóstico da DP é baseado primariamente na presença das alterações motoras parkinsonianas características. Os critérios clínicos mais amplamente aceitos atualmente são os que foram introduzidos pela *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank criteria* (HUGHES; DANIEL; LEES, 1992). A DP é definida pela presença dos sinais cardinais: tremores em repouso, bradicinesia, rigidez muscular. Posteriormente, podem aparecer sinais adicionais, como instabilidade postural em fases mais avançadas da doença (KALIA; LANG, 2015).

Embora a DP seja tradicionalmente considerada uma desordem do sistema motor, essa enfermidade degenerativa é considerada uma condição complexa, com características clínicas diversas, que incluem: manifestações neuropsiquiátricas, disfunção olfativa, alterações do sono, depressão e ansiedade (LANGSTON, 2006; MARTINEZ et al., 2011; DUNCAN et al., 2014;). Essa desordem é resultante do comprometimento da via nigro-estriatal, que é uma conexão dopaminérgica entre a parte compacta da substância negra (SN<sub>pc</sub>) e a parte dorsal do estriado. (PAULSON, 2004; SINGH, A., 2018)

## 1.2 Fisiopatologia da DP

A principal característica patológica da DP é a progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SN<sub>pc</sub>, e tal morte neuronal leva a redução dos terminais dopaminérgicos do estriado dorsal, levando a uma perda de dopamina (DA) estriatal profunda e irreversível (HORNYKIEWICZ ; KISH, 1987).

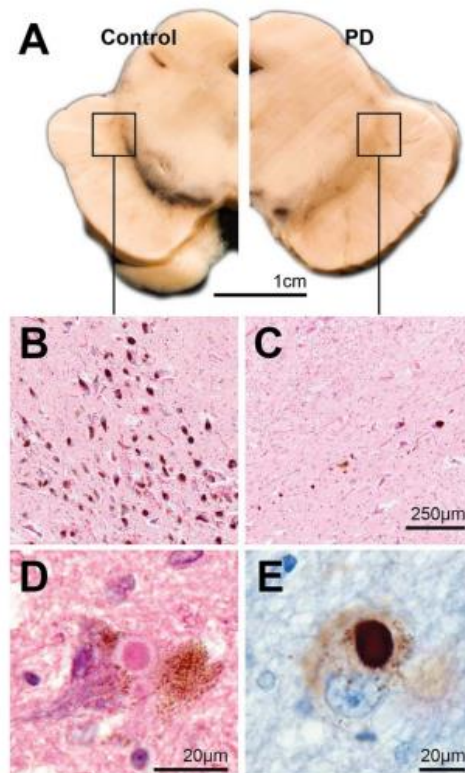
Dados obtidos de modelos matemáticos demonstram que de 100-200 neurônios da SN<sub>pc</sub> degeneram por dia na DP (CLARKE, 2000; ORR, 2002).



Entretanto, outras regiões além da SNpc podem ser afetadas, como o locus coeruleus, núcleos da rafe e núcleo basal de Meynert. Porém, a depleção dopaminérgica da via nigro-estriatal é o mediador predominante das manifestações motoras envolvidas na DP (FAHN; PRZEDBORSKI, 2000). As alterações nigroestriatais são clinicamente evidenciadas após a perda de 50-60% de neurônios dopaminérgicos (FEARNLEY;LEES, 1990), o que corresponde a uma depleção de aproximadamente 70% de DA estriatal (EHRINGER; HORNYKIEWICZ, 1960).

A DP também é caracterizada patologicamente pela presença de agregados intracitoplasmáticos conhecidos como Corpos de Lewy e neuritos de Lewy nos neurônios remanescentes (Figura 1B) (OBESO et al, 2017). Estas estruturas são inclusões intracelulares de corpos de proteínas agregadas, a principal delas é a proteína  $\alpha$ -sinucleína (VILA; PRZEDBORSKI, 2004). A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína pré-sináptica, e acredita-se que esteja envolvida no tráfico vesicular, liberação de neurotransmissores e regulação da neurotransmissão (CLAYTON;GEORGE, 1999; FUJIWARA et al., 2002).

A  $\alpha$ -sinucleína é uma proteína solúvel e pertencente à família de proteínas de forma nativa “desenrolada” (*unfolded*). Em condições patológicas, a  $\alpha$ -sinucleína adquire uma mudança conformacional, assume uma estrutura em folha  $\beta$ , tendendo a se agregar com outras moléculas de  $\alpha$ -sinucleína e com proteínas adicionais, incluindo a sinfilina-1, ubiquitina e neurofilamentos (VILA; PRZEDBORSKI, 2004). Esse processo patológico é fundamental para a patogênese da DP e está relacionado à morte neuronal dopaminérgica (MOSLEY, 2006). A razão pela qual as células neuronais não são capazes de eliminar rapidamente a proteína anormal via sistema ubiquitina proteassoma, ainda é pouco claro (MCKAUGHT, 2003).



**Figura 1: Principais marcadores patológicos da DP** (A): Seção transversal do mesencéfalo de um indivíduo sadio (esquerda) e um indivíduo com a DP (direita), indicando a perda da pigmentação da região da *SNpc*. (B) Seções coradas com hematoxilina e eosina (HE) das regiões identificadas em A, mostrando em maior magnitude os neurônios pigmentados da *SNpc* no indivíduo controle e (C) a perda dos neurônios em uma pessoa com a DP (D): Presença de Corpos de Lewy intracitoplasmático em neurônios remanescentes da *SNpc* do paciente com a DP, mostrando o núcleo eosinofílico e halo pálido e (E) a agregação da proteína  $\alpha$ -sinucleína, utilizando imunoperoxidase com contra marcação de violeta de cresyl.

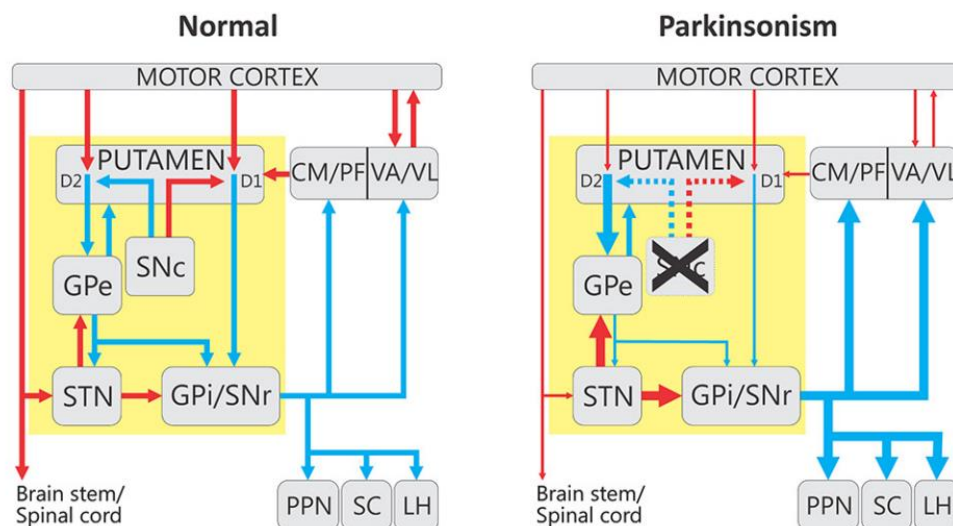
Fonte: OBESO et al., 2017

### 1.3 Núcleos da Base

Os núcleos da base são um conjunto de núcleos subcorticais que formam uma rede complexa de conexões paralelas que se integram com o córtex cerebral para regular a função motora, cognitiva e afetiva (OBESO et al., 2000). Doenças relacionadas aos núcleos da base resultam em um espectro de distúrbios do movimento, variando de doenças caracterizadas pela hipocinesia, como na DP, para aquelas que produzem hipercinesia, como a coréia e a distonia (MINK, 2003).

As estruturas que compõem os núcleos da base são: complexo estriado (putâmen e caudado), globo pálido, o qual é dividido em segmento interno (GPi) e externo (GPe), núcleo subtalâmico (STN), parte reticulada da substância negra (SNpr) e SNpc (GERFEN; SURMEIER, 2011), sua organização está ilustrada no esquema da figura 2.

A deficiência de DA, interfere diretamente nos núcleos da base, que são estruturas responsáveis por controlar as atividades motoras (OBESO et al, 2000). O principal integrador das informações corticais e talâmicas aos núcleos da base é o estriado, o qual recebe densa inervação de DA, oriunda dos neurônios da SNpc, exercem um papel crucial na coordenação da atividade do circuito motor (BOLAM et al., 2000; GRAYBIEL, 2005).



**Figura 2: Circuitaria de controle motor dos núcleos da base.** A caixa amarela mostra os núcleos da base interligados, que recebem entrada extrínseca de regiões corticais e talâmicas via estriado. O painel esquerdo, indica os circuitos no estado “sadio”, e o direito mostra as mudanças globais na atividade desse circuito na DP. A DA liberada pelos neurônios da SNpc é um crítico neuromodulador da atividade estriatal, através dos receptores do tipo D1(expressos nos neurônios que dão origem a via direta) e do tipo D2(expressos nos neurônios que originam a via indireta). As setas azuis indicam conexões inibitórias e as setas vermelhas indicam conexões excitatórias. A espessura das setas corresponde à sua atividade presumida. CM,PF,VA,VL= núcleos talâmicos: centromedial, parafascicular, ventral anterior e ventral lateral respectivamente, D1 e D2=subtipos de receptor de dopamina, GPe= segmento externo do globo pálido, GPi= segmento interno do globo pálido, SNr=

substância negra parte reticulada, LH= lateral habênula, PPN= núcleo pedunculopontino, SC= colículo superior SNc= substância negra parte compacta, STN= núcleo subtalâmico.

FONTE: GALVAN;WICHMANN et al., 2015.

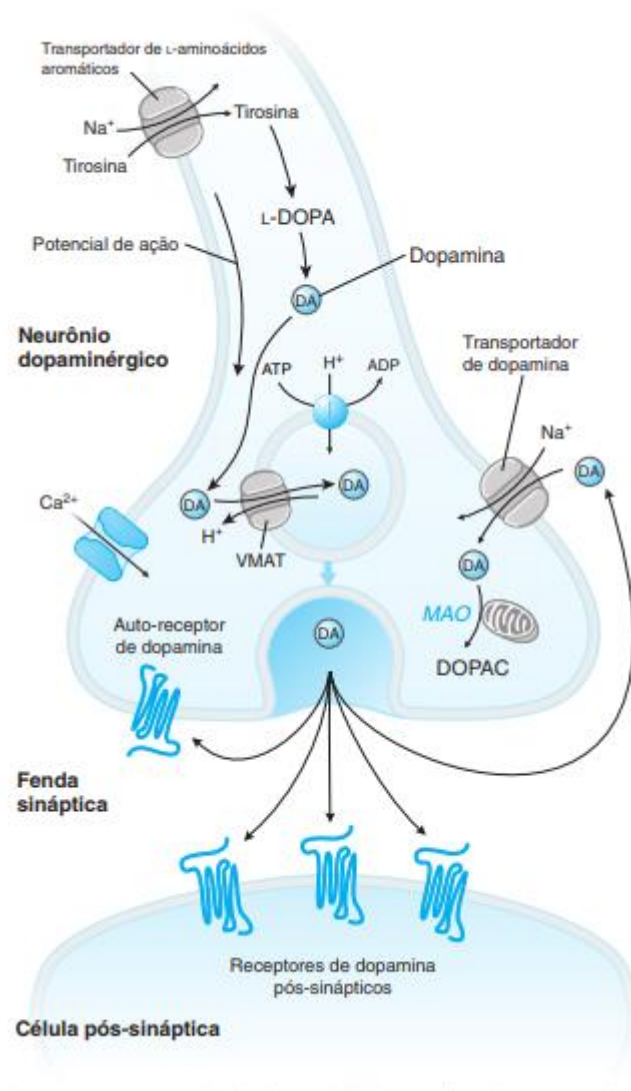
O complexo estriado é a estrutura aferente primária dos núcleos da base e recebe projeções excitatórias glutamatérgicas de áreas motoras corticais. O estriado é composto de neurônios de projeção espinhosos médio GABAérgicos, os quais constituem 90% da população neuronal estriatal. Estes neurônios dão origem a duas vias eferentes que conectam o estriado aos núcleos de saída GPi e SNpr. (CHEVALIER, DENIAU, 1990; GERFEN; SURMEIER, 2011). Uma característica proeminente da arquitetura dos núcleos da base é a separação das informações recebidas, através dessas duas vias, denominadas via direta e via indireta (MINK, 1999).

Os neurônios da via direta se projetam diretamente do putamen para o GPi/SNr. Eles expressam receptores dopaminérgicos do tipo D1, providenciam um efeito inibitório direto nos neurônios do GPi/SNr, resultando em uma menor inibição do tálamo e, conseqüentemente, aumento da atividade tálamo-cortical, condição que facilita o movimento. Os neurônios estriatais da via indireta fazem conexões com o GPe e STN. Eles contêm receptores do tipo D2 além do peptídeo encefalina. As projeções do putamen para o GPe, do GPe para o STN, são inibitórias. Os neurônios originários do STN são excitatórios glutamatérgicos, geram estímulos eferentes para o GPi e SNpr, levando à redução da saída dos estímulos excitatórios do tálamo para o córtex, desfavorecendo o movimento. Portanto, a atividade de saída dos núcleos basais é influenciada pelos efeitos opostos dos insumos inibitórios da via direta e das entradas excitatórias da via indireta (CHEVALIER, DENIAU, 1990; GERFEN; SURMEIER, 2011). Na DP com a perda do controle dopaminérgico, ocorre a hiperatividade da via inibitória indireta, o que induz bradicinesia, o principal sintoma dessa doença (OBESO et al, 2000).

Como ilustrado na figura 3, a DA é sintetizada nos terminais pré-sinápticos à partir da hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA (L -3,4-dihidroxifenilalanina ou levodopa) por ação da enzima tirosina hidroxilase (TH). A hidroxilação da TH é a etapa limitante de velocidade na síntese da DA. A L-DOPA

sofre descarboxilação, é então convertida a DA por ação da enzima L-DOPA descarboxilase(DDC) e, a seguir, é armazenada em vesículas pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT), para liberação. Com o estímulo da célula dopaminérgica, a vesícula de armazenamento funde-se com a membrana plasmática, liberando a DA na fenda sináptica. Esta, pode ligar-se tanto a receptores de DA pós-sinápticos( receptores do tipo D1 e do tipo D2) quanto a auto-receptores de DA pré-sinápticos (GOLAN, 2009).

No interior dos neurônios dopaminérgicos, a DA é degradada em Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) por ação da monoamina oxidase A (MAO-A), o metabólito DOPAC se difunde para fora das células dopaminérgicas, onde é convertido a ácido homovanílico (HVA) por ação da enzima catecol-O-metil transferase(COM-T). A DA não recaptada é degradada pelas células da glia, que a convertem em 3-metoxitiramina(3-MT), que posteriormente sofre oxidação pela monoamina oxidase B MAO-B para formar HVA (OERTEL, 2016).



**Figura 3: Neurotransmissão dopaminérgica**

FONTE: Adaptado de GOLAN;TASHJIAN, 2009.

Os receptores dopaminérgicos fazem parte da família de proteínas acopladas à proteína G. A sinalização da DA é mediada por cinco receptores (D1R-D5R), os quais são agrupados em duas classes, baseado na proteína G que eles são acoplados. Os receptores D1R e D5R(família D1), são acoplados a proteína  $G_{s/olf}$  enquanto os receptores da família D2 (D2R;D3R;D4R) estimulam a proteína inibitória  $G_0$  e  $G_i$  ( NEVE; SEAMANS; MTRANTHAM-DAVIDSON,2004).

Todos os cinco receptores dopaminérgicos são expressos no estriado, mas os receptores da família D1 e D2 são os mais abundantes (GOLAN, 2009; GERFEN et al., 1990). Esses receptores atuam de forma oposta quando ligados a

DA, proporcionando efeitos opostos, de acordo com o impacto em mensageiros intracelulares, gerando mudanças consecutivas na excitação celular (FRANK, 2005). O receptor excitatório D1 é expresso pelos neurônios que originam a via direta, enquanto o receptor inibitório D2 é expresso nos neurônios que dão origem via indireta (GERFEN et al., 1990).

A regulação da formação do segundo mensageiro ( $AMP_c$ ) constitui a principal característica que delimita as classes dos receptores dopaminérgicos. A ativação dos receptores da classe D1 gera um aumento do  $AMP_c$ , enquanto a ativação dos receptores da classe D2, inibe a produção do  $AMP_c$ .

Os receptores da família D1 estão associados a proteína G estimulatória ( $G_s$ ), a abertura de canais iônicos de cálcio e a consequente despolarização da célula, levando à excitação neuronal e propagação do impulso elétrico. Por outro lado, os receptores da família D2 são considerados inibitórios, pois atuam hiperpolarizando o neurônio através de proteínas G inibitórias ( $G_i$ ), impedindo a propagação do impulso nervoso (CALLIER et al., 2003; KEBABIAN; CALNE, 1979; SIBLEY; MONSMA, 1992).

Os sistemas de neurotransmissores não atuam isoladamente, mas são integrados de forma anatômica e funcional, como uma rede de maneira direta ou indireta através de conexões multisinápticas (HATTORI et al., 1976; BUNNEY AND AGHAJANIAN, 1976). As doenças neuropsiquiátricas e neurodegenerativas são atribuídas ao comprometimento de um sistema de neurotransmissão, porém, a sua progressão pode influenciar e modular diferentes vias neuronais. O sistema motor extrapiramidal, por exemplo, depende de um equilíbrio entre a DA e a acetilcolina, e a ruptura nesse equilíbrio resulta também em anormalidades motoras (TSUKADA et al., 2000).

Apesar de a DP ser caracterizada primariamente como uma desordem das vias dopaminérgicas nigroestriatais, as mudanças patológicas na DP também envolvem outros neurotransmissores não-dopaminérgicos como a serotonina (5-HT) (FOX ; BROTHIE; LANG, 2008). Nas últimas décadas, têm aumentado a apreciação dos múltiplos papéis que a 5-HT pode desempenhar na DP (FOX et al., 2009). A neurotransmissão serotoninérgica, está envolvida em muitos aspectos das funções dos núcleos da base. Em condições fisiológicas, há uma densa inervação serotoninérgica, para os núcleos da base a partir do núcleo da rafe, particularmente

o núcleo da rafe dorsal. Estes núcleos enviam projeções para o córtex pré-frontal, sistema límbico e diencéfalo. Em particular, o estriado e as regiões de saída dos núcleos da base, a SNpr e o globo pálido medial, recebem uma inervação serotoninérgica densa, o que sugere que esse sistema também desempenha um papel potencial na DP (LAVOUIE, 1990). O processo neurodegenerativo associado a DP resulta em perda da entrada serotoninérgica do núcleo da rafe dorsal para o estriado, porém essa perda ocorre em menor magnitude que a perda da entrada dopaminérgica via SNpc no estriado (CARTA et al., 2007).

Estudos post-mortem de pacientes com a DP, demonstram que ocorre o esgotamento da serotonina (5-HT) no estriado, também como no hipotálamo e córtex pré-frontal, embora não na mesma extensão que a depleção de DA (FAHN, 1971; SCATON, 1983; SHANNA et al., 1994). De fato, Kish et al 2008, confirmaram alguns desses achados, mostrando que na DP ocorre depleção de 66% de 5-HT (preferencialmente na região do caudado), enquanto que a depleção dopaminérgica é relativamente maior, sendo em torno de 98% (KISH; TONG; HORNYKIEWICZ, 2008). Estudos de imagem em humanos com a DP, mostram uma diminuição da ligação do rádio ligante [11C](+)Mcn5652 ao transportador da serotonina SERT no estriado, o que mostra que na DP também ocorre o esgotamento da inervação de 5-HT estriatal (KERENYI et al., 2003). A perda de 5-HT estriatal pode ser secundária a neurodegeneração nos núcleos da rafe. Os corpos de Lewy também são detectados nos neurônios dos núcleos da rafe e são associados a perda dessas células (D'AMATO et al., 1987; BRAAK et al., 2003; HALLIDAY et al., 1990, PAULUS.; JELLINGER, 1991).

#### **1.4 Etiologia da DP**

O cenário da pesquisa da DP apresenta inúmeros progressos nas últimas décadas, entretanto, a etiopatogenia da doença ainda não está completamente elucidada, sendo que 90-95% dos casos são idiopáticos (OLANOW, et al, 1998; MIZUNO et al., 1997, GIBB; LEES, 1994, OERTEL et al., 2017). Muitas evidências apontam que o processo fisiopatológico dessa desordem é multifatorial. (HERNÁNDEZ-MONTIEL, 2006; SING; DIKSHIT, 2007; REALE et al, 2009). As principais hipóteses pontuam que algumas fontes de estresse oxidativo como:



metabolismo da DA, neuroinflamação e a disfunção mitocondrial, podem desempenhar um papel importante no processo de morte celular (BLESA et al., 2015).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas e a habilidade do sistema biológico em detoxificar esses intermediários reativos, criando um estado que contribui para o dano celular (HWANG, 2013). A extensiva produção de ROS no cérebro pode fornecer uma explicação para a magnitude do papel que essas moléculas reativas desempenham na DP. O cérebro consome aproximadamente 20% do fornecimento de oxigênio e uma significativa porção deste é convertido em ROS (JOHNSON ; WILSON- DELFOSSE; MIEYAL, 2012). Análises *post mortem* de cérebros de pacientes com a doença, revelam que a SNpc desses pacientes, apresentam níveis aumentados de proteínas, lipídeos e DNA oxidados, enquanto que os níveis de glutathiona reduzida (GSH) encontram-se diminuídos (BOSNO et al., 2006; NAKABEPPU, 2007, ZEVALK; RAZMPOUR; BERNARD, 2008). As ROS podem ser geradas no SNC através de diversas vias, tanto em neurônios como nas células da glia, sendo a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial a maior contribuidora para os níveis dessas espécies. (YAN; WANG; ZHU, 2012).

O cérebro é considerado sensível ao dano oxidativo , devido ao alto consumo de glicose e de O<sub>2</sub> e por apresentar baixos níveis de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GSH-px) e catalase (CAT) (FLOYD, 1999). A neurodegeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos sugere que estas células são mais vulneráveis as ROS, mas esse mecanismo ainda não é completamente esclarecido (TSANG; CHUNG, 2009). Uma das possíveis explicações para o dano oxidativo localizado nessas células está diretamente ligado ao próprio metabolismo da DA, que durante seu processo de degradação, gera a formação de radicais livres, processo que acontece através da catálise enzimática da monoamino oxidase (MAO) ou por meio da decomposição espontânea pelo processo de auto-oxidação, com liberação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e DA-quinona. Níveis elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podem levar a liberação de íons férricos dos grupos prostéticos de hemo proteínas, tais como a hemoglobina e citocromos, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por sua vez, é reduzido a radical hidroxila (OH•), que é o

radical mais reativo observado *in vivo*. O  $\text{OH}\cdot$  pode aumentar os danos a biomoléculas (DNA, lipídeos e proteínas), e esses danos quando não reparados, geram comprometimento do funcionamento da célula, levando a morte celular por apoptose ou necrose. (BARBOSA et al, 2006, ZHOU et al, 2008).

Evidências sugerem que tanto o estresse oxidativo, como a neuroinflamação podem contribuir para a degeneração neuronal observada na DP (HIRSCH, 2009; VARCIM et al., 2012).

No SNC, a micróglia também é uma fonte importante de ROS, através de peroxidases intracelulares, processos oxidativos na mitocôndria e a atividade da NADPH oxidase na superfície da membrana das células ( BLOCK.; HONG, 2007).

Em processos inflamatórios iniciais, o sistema imune inato leva a ativação de uma cascata de eventos que causam o recrutamento do sistema imune adaptativo, levando a neurodegeneração. Na DP, com a formação dos corpúsculos de Lewy ou com a morte neuronal, a ação neurotóxica do sistema imune inato é ativada, esta resposta está relacionada principalmente com linhagens de células mielóide, que são a defesa primária contra injúria cerebral( MOSLEY et al, 2006). A ativação das células da micróglia gera secreção de uma infinidade de citocinas pró-inflamatórias como: interferon-gama (IFN-G), fator de necrose tumoral (TNF-GMA), interleucina 1-B(IL-1B) (MOSLEY et al, 2006), desencadeia também a *up-regulation* do mRNA de enzimas como a óxido nítrico sintase (iNOS) e cicloxigenase 1 e 2 (COX 1 E COX2) (KNOTT et al., 2000; TEISMANN, 2003). Os processos inflamatórios relacionados a um aumento na expressão gênica do mRNA da enzima COX-2 e as altas concentrações de prostaglandinas estão implicados nos efeitos deletérios e na cascata de eventos que conduzem a neurodegeneração. Neste contexto, a expressão de COX-2 tem sido relacionada com a degeneração neuronal dopaminérgica da SNpc em humanos e também em modelos animais para estudo da DP (LIMA et al, 2006; TEISMANN et al, 2003).

### 1.4.1 Excitotoxicidade

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, sendo o mais abundante do SNC (PRYBYLOWSKI et al, 2004 ; HERNÁNDEZ-MONTIEL, 2006 e BARBOSA et al, 2006). De fato, o glutamato desempenha um papel multivariado na fisiopatologia da DP. A redução da estimulação dopaminérgica nos receptores estriatais D1 e D2, produz uma super estimulação secundária glutamatérgica do Gpi e SNpc. Como resultado da maior ativação glutamatérgica, ocorre uma inibição severa dos núcleos talâmicos, resultando em uma redução da estimulação cortical motora, tais efeitos contribuem para as perturbações motoras que ocorrem na DP. Adicionalmente, a maior liberação de glutamato, exerce um papel essencial nos mecanismos relacionados a excitotoxicidade (CARRILO-MORA;SILVA-ADAYA; VILLASENOR-AGUAYO, 2013).

A excitotoxicidade pode contribuir e aumentar o processo neurodegenerativo. A morte celular e alterações metabólicas, como as que acontecem na DP, podem gerar um aumento de glutamato extracelular, o que pode levar a insuficiência na captação do glutamato pelos astrócitos, ocasionando um acúmulo desse neurotransmissor na fenda sináptica. Isto pode exercer efeitos prolongados nos seus receptores, gerando uma despolarização excessiva da terminação nervosa pós-sináptica e desencadeando um processo excitotóxico. Este processo acarreta distúrbios da homeostasia iônica e energética, enzimas líticas mediadas por cálcio são ativadas, o que gera aumento dos radicais livres, lesão mitocondrial e edema osmótico, e pode ocorrer a lise celular e morte neuronal (HERNÁNDEZ-MONTIEL, 2006; BARBOSA et al, 2006; CHEN;LE, 2006).

É importante salientar que a maioria dos casos da DP são idiopáticos, entretanto, pacientes com DP que apresentam um histórico familiar da doença, representam aproximadamente 10 % dos casos (MARTINEZ-MARTIN et al., 2011). Até o momento, já foram identificados diversos genes implicados nas diferentes formas da doença, destacando-se as alterações nos genes: PARK2 (associado a herança autossômica recessiva, relacionado aos casos juvenis), LRRK2 e SNC, ambos associados ao padrão de herança autossômica dominante. (TAYLOR; MAIN; CRACK, 2013). Adicionalmente, mutações nos genes supracitados, já foram

reportadas em casos da DP esporádica, sugerindo uma influência na progressão e na idade de início da doença (KUMARI AND TAN, 2009; MOORE, et al., 2005).

#### **1.4.2 Fatores ambientais**

A exposição a determinados fatores ambientais como: metais, toxinas, pesticidas e herbicidas são apontados como importante fator de aumento no risco em desenvolver a DP. Os pesticidas e herbicidas, rotenona e o paraquat, geram inibição da função mitocondrial, acarretam em uma disfunção do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, culminando na morte celular (HERNÁNDEZ-MONTEL, 2006).

#### **1.5 Modelos pré clínico para os estudos da DP**

Para compreender os mecanismos patogênicos da DP e auxiliar no desenvolvimento novas estratégias terapêuticas para o tratamento, modelos animais que mimetizam as características críticas da doença, são essenciais para que os fármacos e novos métodos de tratamento sejam estudados antes de testados clinicamente (BEAL, 2001; BETARBET, 2002).

Na busca de modelos que possam mimetizar a doença em parte ou no todo, foram desenvolvidos modelos animais modificados geneticamente ou com o uso de neurotoxinas. A neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) foi o primeiro composto descoberto que induz seletivamente a morte dos neurônios catecolaminérgicos. (JONSSON; SACHS, 1975; THOENEN; UNGERSTEDT, 1968). A 6-OHDA induz danos específicos via estresse oxidativo, através do sistema de transporte da DA. Este composto, não atravessa a barreira hematoencefálica e é administrado intracerebral para exercer seus efeitos tóxicos, (ESLAMBOLI, 2003; PARK et al., 2018).

A rotenona um composto lipofílico de ocorrência natural, extraído de algumas raízes de plantas, é amplamente utilizada como pesticida ou inseticida de amplo espectro de ação, é também empregada para gerar modelos animais da DP (BEAL, 2001). Este composto interfere no complexo I da cadeia transportadora de

elétrons mitocondrial, ao inibir a transferência de elétrons pode levar ao aumento das ROS no meio intracelular (CICCHETTI et al, 2009; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003, CANNON et al., 2009 ).

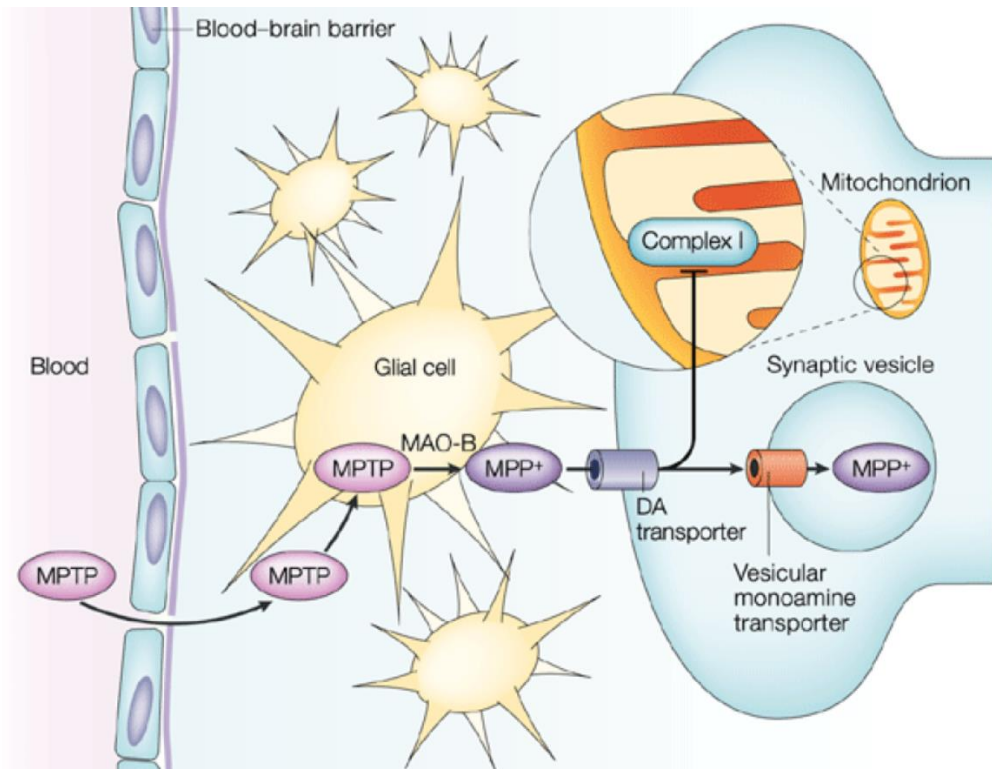
A infusão de lipopolissacarídeo é outro modelo experimental utilizado para os estudos da DP, essa endotoxina encontrada na membrana externa das bactérias gram negativas gera a ativação de algumas vias intracelulares, transcrição gênica de genes relacionados com a geração de ROS e ocorre também maior expressão de citocinas pró-inflamatórias. Neste modelo, ocorre a infusão do LPS na SNpc, gerando uma neurodegeneração semelhante a aquela observada nos casos da DP( LIMA et al, 2006).

### **1.5.1 Modelo do MPTP**

Atualmente, uma das ferramentas farmacológicas mais utilizadas nos estudos pré-clínicos da DP é a toxina 1-metil-4-fenil-tetrahidropiridina (MPTP). Este composto é um inibidor do complexo I mitocondrial que foi descoberto em uma exposição acidental a humanos (DAVIS et al, 1979; LANGSTON et al., 1983). Em meados de 1980, alguns jovens usuários de drogas desenvolveram parkinsonismo severo, após o consumo de uma nova substância conhecida como “heroína sintética”. Quando analisada, percebeu-se que essa droga continha mais de 2,9 % de MPTP, um subproduto da sua síntese oriundo da síntese incompleta da heroína (LANGSTON et al., 1983). Posteriormente, foi observado que o MPTP produzia a síndrome do parkinsonismo em primatas humanos e não humanos, de forma bastante semelhante aos sintomas da DP tanto do ponto de vista clínico como neuropatológico (LANGSTON; IRWIN, 1986). Este composto é altamente lipofílico e cruza a barreira hematoencefálica facilmente. Os animais mais utilizados para estudo com MPTP são camundongos e macacos, enquanto que ratos são relativamente insensíveis à ação sistêmica do MPTP. (GIOVANNI et al., 1994).

Uma vez no encéfalo, a pró-toxina MPTP é oxidada a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPDP+) pela MAO B presente nas células da glia, onde ocorre a conversão desse intermediário a 1-metil-4-fenilpiridínico (MPP+), provavelmente por oxidação espontânea, como ilustrado na figura 3.

A molécula do MPP<sup>+</sup> é polar, esse intermediário é um substrato de alta afinidade para o transportador de dopamina (DAT). No interior dos neurônios dopaminérgicos, o metabólito ativo se concentra na mitocôndria, inibe o complexo I da cadeia respiratória, impedindo a transferência de elétrons para a ubiquinona, (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003), esta ação prejudica o fluxo de elétrons ao longo da cadeia respiratória, levando a produção diminuída de ATP, e a geração de ROS, como os radicais superóxidos. Tais efeitos provavelmente são responsáveis pela iniciação de vias de sinalização relacionadas à morte celular, como p38 ativada por mitógeno, c-jun quinase e bax. Tais alterações já foram demonstrados *in vivo*, após o tratamento com MPTP e podem contribuir para a morte celular por apoptose (JACKSON-LEWIS et al., 1995).



**Figura 4: Mecanismo de ação da toxina parkinsoniana MPTP.**

Mecanismo de ação do MPTP. O MPTP é uma toxina lipossolúvel, capaz de cruzar a barreira hematoencefálica. Quando é administrada por via parental ou infusão direta na SNpc, o MPTP é oxidado a 1-metil-4-fenil-2,3-diidropiridina (MPDP<sup>+</sup>) pela enzima MAO-B presente nas células da glia, então esse intermediário é convertido a MPP<sup>+</sup>, possivelmente por oxidação espontânea. O MPP<sup>+</sup> é captado através do transportador de DA (DAT) dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. No interior do neurônio, o MPP<sup>+</sup> se acumula na mitocôndria, e compromete a respiração mitocondrial pela inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons,

FONTE: VILA; PRZEDBORSKI, 2003.

Um vez que muitos dos mecanismos supracitados também são características da DP, este modelo mostra um alto grau de validade de construção (DUTY; JENNER, 2011). Os camundongos tratados sistemicamente com MPTP produzem uma degeneração bilateral do trato nigro-estriatal, e isto reflete o que é observado na DP (GUDEHITHLU et al., 1991). O modelo do MPTP mimetiza muitas das características bioquímicas conhecidas dessa doença, por exemplo: a redução da DA e TH estriatal, elevação dos níveis estriatais de pró-encefalina(PPE-A) (GUDEHITHLU, et al., 1991) e acetilcolina (HADJICONSTANTINO, et al., 1985). Adicionalmente, em relação aos núcleos da base, os níveis extracelulares de glutamato de camundongos tratados por MPTP encontram-se elevados na SN<sub>pc</sub>, esse aumento é associado a indução da morte celular programada (MEREDITH, et al., 2008), enquanto que os níveis da enzima antioxidante GSH-px encontram-se reduzido (FERRARO et al., 1986), refletindo o que já foi observado em estudos post-mortem com cérebros de pacientes com a DP (SOFIC et al., 1992). Camundongos tratados com MPTP apresentam um aumento de marcadores inflamatórios na SN e no estriado tais como TNF- $\alpha$ , IL- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA et al., 1999; HEBERT et al., 2003). O MPTP é uma boa estratégia para estudar processos inflamatórios seguido de neurodegeneração tóxica, pois os marcadores inflamatórios são elevados como resultado da migroglia reativa, processo que também acontece na DP humana, dando suporte à validade de face deste modelo animal (DUTY ; JENNER, 2011).

Atualmente não existe um modelo animal ideal para a DP que apresente todas as características associadas à condição clínica, como: I) presença de todas as alterações locomotoras envolvidas no parkinsonismo, II) perda seletiva e gradual dos neurônios dopaminérgicos com o avanço da idade, III) presença de inclusões intracitoplasmáticas. Apesar do modelo do MPTP compartilhar algumas dessas limitações, ele têm sido de grande valia na elucidação dos mecanismos moleculares associados à neurodegeneração verificada na DP e na avaliação de novos agentes farmacológicos (SHIMOHAMA et al., 2003).

## 1.6 Tratamento da DP

Até o presente momento, não há fármacos capazes de prevenir ou impedir a progressão da degeneração neuronal que acontece na DP. As opções de tratamento disponíveis para os pacientes diagnosticados baseiam-se principalmente, na reposição nos níveis de DA. O precursor dopaminérgico 3,4-dihidroifenilalanina (L-DOPA), em associação a carbidopa, um inibidor da dopa descarboxilase periférica(DDP), por décadas, continua a ser o tratamento sintomático padrão-ouro para essa doença. A carbidopa inibe a DDP na circulação sistêmica, permitindo maior distribuição da L-DOPA no SNC (revisado em HAUSER, 2018). Essa abordagem terapêutica, fornece o maior benefício antiparkinsoniano para os sinais e sintomas motores, com o menor número de efeitos adversos em curto prazo, no entanto, seu uso a longo prazo, está associado ao desenvolvimento de flutuações motoras e discinesias (MARSDEN; PARKES, 1977), tais efeitos colaterais, ocorrem, em parte, pelas variações nas concentrações plasmática de L-DOPA, induzindo uma estimulação pulsátil dos receptores dopaminérgicos no estriado e uma sobrecarga de dopamina estriatal, o que ocorre em fases mais avançadas da doença em decorrência do tratamento crônico (KALIA; LANG, 2015).

Estratégias farmacológicas adicionais como os agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAO-B, inibidores da catecol-O-metil-transferase(COM-T), não geram as flutuações nas concentrações de DA e também são opções no tratamento em monoterapia ou em associação a L-DOPA. Entretanto, estes fármacos também apresentam muitos efeitos colaterais e não diminuem a progressão da doença (KALIA; LANG, 2015).

Neste contexto, o principal objetivo na busca por tratamentos potenciais para a DP é testar sua capacidade em modificar o processo neurodegenerativo. A estratégia neuroprotetora na DP visa retardar, bloquear ou reverter a progressão da doença, e são definidas como aquelas que retardam a perda subjacente de neurônios dopaminérgicos, porém, até o momento, nenhuma terapia alcançou tais critérios (STOCCHI et al., 2007).

Alguns estudos epidemiológicos mostram uma associação entre o uso de antiinflamatórios e a diminuição dos casos de doenças neurodegenerativas assim como a DP (CHEN et al, 2003; MCGEER; MCGEER, 2001). Alguns estudos



mostram que os antiinflamatórios não-esteroidais evitam de modo efetivo a depleção dopaminérgica induzida pelo MPTP em camundongos (SAIRAM et al, 2003; TEISMANN; FERGER, 2001; TEISMANN et al, 2003). Adicionalmente, outros trabalhos mostram que o uso dos antiinflamatórios esteroidais podem inibir as reações das células da micróglia, gerando uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias, resultando em uma diminuição da lesão induzida pelo MPTP em murinos (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA et al, 1999).

Um estudo recente demonstrou que a Curcumina [1, 7- bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-hepta-diene-3, 5-diona], composto polifenol extraído da *Curcuma longa*, aumentou o número de neurônios imunorreativos para tirosina hidroxilase (TH) e DAT, e reduziu o número de neurônios positivos para o marcador de astrócitos, GFAP (proteína ácida fibrilar glial), no modelo animal de parkinsonismo induzido pela 6-OHDA. Neste trabalho, os autores também mostraram que a curcumina eleva os níveis da SOD e GSH-px e sugerem que este composto extraído de plantas, poderia exercer efeitos protetores contra a lesão induzida pelo estresse oxidativo, através da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenin, em ratos (WANG et al., 2017).

Dessa forma, há uma grande procura por novos agentes que possam auxiliar no tratamento da DP. Esta busca está calcada na expectativa de vida crescente da população mundial, e, portanto são necessárias formas alternativas ou adjuvantes para aliviar os sintomas motores e não motores da DP, com baixos efeitos colaterais e, principalmente, que possam exercer uma atividade neuroprotetora a fim de impedir ou diminuir a progressão do processo neurodegenerativo. Nas últimas décadas o interesse no uso de produtos naturais, principalmente aqueles derivados de plantas, cresceu significativamente. Cerca de 25% dos fármacos prescritos pelo mundo são provenientes das plantas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), dos 252 fármacos considerados essenciais, 11% são originários de plantas ou são drogas sintéticas obtidas a partir de recursos naturais. Exemplo de drogas importantes obtidas das plantas: Digoxina (*Digitalis* spp), Atropina (*Atropa beladonna*), morfina e codeína (*Papaver somniferum*) (RATES, 2001). Entre muitas substâncias originárias de plantas medicinais que

apresentam potencial para o desenvolvimento de um fitomedicamento, destaca-se o Ácido Rosmarínico.

### 1.7 Ácido Rosmarínico

O ácido Rosmarínico (AR) foi isolado pela primeira vez em 1958, das folhas da *Rosmarinus officinalis* L, de onde surgiu seu nome. (SCARPATI; ORIENTE, 1958).

Este composto de origem natural é um éster derivado do ácido cafeíco e do ácido R-(+)-3-(-3,4-dihidroxifenil) láctico que se acumula em porções altas de muitas espécies de plantas. O AR é abundante em muitas plantas da família Lamiaceae, como a *Rosmarinus officinalis* L., *Spearmint* (*Mentha* spp), e *Melissa officinalis*, e também em plantas usadas na medicina Chinesa tradicional, como a *Perilla frutescens* (L). Britton, *Salvia miltiorrhiza* Bunge e *Rabdosia rubescens* (Hemls). (AMOAHA et al., 2016). Além das espécies citadas anteriormente, o AR encontra-se em outras espécies de plantas, destacando-se: *Glechoma hederacea* (erva-terrestre), *Lavandula angustifolia* (lavanda), *Lippia alba* (erva cidreira, chá de tabuleiro), *Lippia graveolens* (orégano mexicano), *Lippia origanoides* (salva de Marajó), *Majorana hortensis* (manjerona), *Mentha arvensis* (hortelã), *Mentha piperita* (hortelã pimenta), *Mentha spicata* (hortelã-peluda) (PETERSON E SIMMONDS, 2003; KOMES et al., 2011; ROY; MUKHOPADHYAY, 2012; AYRANCI; ERKAN, 2013; SALTAS et al., 2013; STASHENKO et al., 2013).



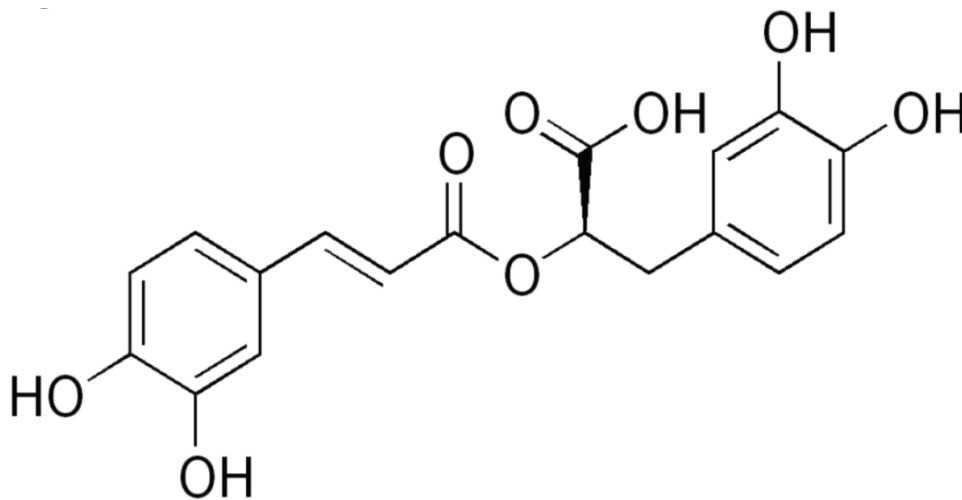
**Figura 5: Espécies herbáceas ricas em Ácido Rosmarínico.**

FONTE: ZAREI, 2014

A utilização de vegetais com a presença do AR deve-se a suas múltiplas atividades farmacológicas e biológicas interessantes. Nos últimos anos diversos estudos científicos têm explorado essas propriedades (revisado em AMOAH, et al., 2016), desde estudos *in vitro* (TOUSSAINT et al., 2008), até ensaios clínicos (LEE et al., 2008). Uma importante característica do AR é sua excepcional atividade antioxidante, bem como seus efeitos nas vias de sinalização celular e expressão gênica, contribuindo para suas principais propriedades biológicas. (AMZAD et al., 2009; SOOBRATTEE et al., 2005; SANCHEZ-CAMPILLO, 2009). O perfil antioxidante deste composto, tem sido relacionado com a sua ação neuroprotetora (CHOI et al, 2002; QIAO et al., 2005).

Os quatro hidrogênios fenólicos justificam sua habilidade em modular o sequestro de radicais livres em combinação com as duas porções catecol que promovem uma polaridade adequada para que o AR penetre em bicamadas lipídicas (GIL et al., 2013; FADEL; EL; MORANDAT, 2011). Investigações eletroquímicas

revelam que o primeiro passo na oxidação desse composto está associado com a porção do ácido cafeico, e o segundo passo corresponde à oxidação do resíduo do ácido 3,4-dihidroxifenil lático (GIL; ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2013), devido a essas combinações estruturais, o potencial antioxidante do AR é maior que dos outros derivados do ácido hidroxicinâmico (FADEL; EL; MORANDAT, 2011; CHEN; FU; WU, 1999; LAMAISON et al., 1991).



**Figura 6: Fórmula molecular do Ácido Rosmarínico (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>).**

Fonte: SIGMA ALDRICH, [Sd].

Com a comprovação de que o AR apresenta um potencial efeito antioxidante, há o crescente interesse em estudar seu efeito neuroprotetor em modelos de doenças neurodegenerativas associadas à produção de espécies reativas de oxigênio. (ALKAM et al., 2007; SHIMOJO et al., 2010). Lee e colaboradores (2008), demonstraram que o AR apresenta uma capacidade protetora contra os efeitos do estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em um modelo de células dopaminérgicas humanas (SH-SY5Y), prevenindo a morte dessas células. (LEE et al., 2008).

ZHANG et al, (2015) demonstraram que o AR é efetivo no sequestro de radicais livres, houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px e diminuição de malondialdeído, um marcador de peroxidação lipídica, efeitos observados em animais idosos e tratados com AR.

Adicionalmente, em um modelo *in vivo* para doença de Parkinson, foi demonstrado que o AR possui importante efeito neuroprotetor contra a degeneração do sistema dopaminérgico nigro-estriatal induzido pela neurotoxina 6-OHDA em ratos. Neste estudo, os autores mostraram que o AR na dose de 20 mg/kg promoveu efeitos neuroreparadores contra a neurotoxicidade induzida pela 6-OHDA, através de suas propriedades antioxidantes e antiapoptóticas, o que indica seu potencial para o tratamento da DP (WANG et al, 2012).

Mushtaq et al (2014) mostraram que o tratamento oral com AR (10mg/kg) por 21 dias reduziu significativamente a peroxidação lipídica em múltiplas áreas do cérebro em ratos diabéticos, associado a modulação da neurotransmissão colinérgica (MUSHTAQ et al, 2014). Adicionalmente, o AR também produziu efeito anti-inflamatório significativo em ratos diabéticos submetidos a modelo experimental de isquêmica cerebral(LUAN et al., 2013).

Estudos em modelo animal para doença de Alzheimer revelaram que o AR é capaz de prevenir os déficits de memória induzido pela proteína A $\beta$ 25-35, tais resultados foram observados nos testes de comportamento Y-maze e reconhecimentos de objetos. O AR também preveniu a nitração de proteínas induzida por A $\beta$ 25-35, situação que é um indicador indireto do dano oxidativo por óxido nítrico (ALKAM et al., 2007). Adicionalmente, o AR, aumentou a expectativa de vida nos camundongos transgênicos que expressam o gene SOD1(cobre zinco superóxido dismutase), modelo animal para estudo da esclerose lateral amiotrófica (SHIMOJO et al., 2010). O AR também apresenta importante efeito anticolinesterásico observado em ensaios *in vitro*, resultados importantes para explicar o efeito da melhora dos distúrbios de memória (DASTMALCHI et al., 2009).

Além disso, diversos estudos relatam um potencial efeito anti-inflamatório do AR em diferentes modelos animais. As principais propriedades anti-inflamatórias desse metabólito foram analisadas através da sua capacidade de bloquear a fixação do sistema complemento e inibição das lipooxigenases e ciclooxigenases. (KIMURA; OKUDA; OKUDA, 1987; SAHU; RAWAL; PANGBURN, 1999; KELM; NAIR; STRASBURG, 2000).

Baseado na observação das múltiplas atividades biológicas do AR já comprovadas em modelos *in vitro* e *in vivo*, especialmente sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória, este trabalho propôs investigar seu potencial efeito neuroprotetor no tratamento da DP e possíveis mecanismos envolvidos.

## 2 JUSTIFICATIVA

Com o aumento da expectativa de vida, a prevalência da DP e os altos custos econômicos associados à doença, resultando em uma necessidade dramática de novos tratamentos eficazes (STAYTE; VISSEL, 2014).

Atualmente, o tratamento dos sintomas motores dessa doença tem sido otimizado usando principalmente a farmacoterapia que envolve a L-DOPA, agonistas dopaminérgicos, inibidores da MAO, inibidores da COM-T (revisado em OERTEL, 2016). Porém, está extensivamente documentado, que o uso prolongado da terapia com a L-DOPA gera melhora da função motora, mas resulta em discinesias e flutuações motoras que são irreversíveis (BONNET, 2000; CLARK e MOORE, 2005). Esses fármacos não são capazes de deter a progressão da degeneração dopaminérgica nigroestriatal e até o momento nenhum outro composto se mostrou efetivo para diminuir o avanço da doença (STOCHI, 2014).

Diante do exposto, cresce o interesse na identificação de terapias alternativas para a DP à partir de produtos naturais e que possam apresentar atividade neuroprotetora e menos efeitos colaterais (MORAES et al, 2016). As atividades biológicas do (AR), presentes em várias plantas medicinais como o *Rosmarinus officinalis L* (alecrim), *Salvia miltiorrhiza Bunge* (sálvia), tem recebido considerável atenção uma vez que possui múltiplas atividades biológicas, como a atividade antioxidante (PETERSEN, 2013). Atualmente, muitos trabalhos têm explorado essas propriedades, em estudos *in vitro* e *in vivo* (AMOAH, 2016). Os resultados descritos na literatura para o AR na DP indicam que este composto apresenta efeitos neuroprotetores (DU et al, 2012 ; WANG et al, 2012).

No entanto, trabalhos utilizando o AR com o modelo animal do parkinsonismo induzido pela neurotoxina MPTP ainda são muito escassos. Seria vantajoso obter essas informações também a respeito do modelo parkinsoniano mais estudado atualmente de forma mais ampla. Dessa forma, o presente estudo objetiva investigar de forma pioneira se a administração de AR por via oral é efetiva para prevenir as alterações bioquímicas e motoras observadas na DP geradas pela

toxina MPTP e contribuir para o entendimento dos efeitos neuroprotetores atribuídos ao AR.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial neuroprotetor do Ácido Rosmarínico em um modelo de parkinsonismo induzido pela neurotoxina MPTP em camundongos C57BL/6.

#### 3.2 Objetivo Específico

Em animais tratados com a neurotoxina MPTP, avaliar:

- A capacidade do AR em prevenir as alterações locomotoras através do teste campo aberto.
- Se o AR é capaz de prevenir os possíveis déficits de coordenação motora e de força muscular, através dos testes: esteira rotativa (Rotarod) e teste de força de agarre (Grip Force), respectivamente.
- O possível efeito do AR na bradicinesia observado através do teste da escalada em haste (Pole test).
- O possível efeito do AR nos níveis dos neurotransmissores DA e 5-HT, bem como de seus metabólitos no estriado.
- A capacidade do AR em afetar o perfil da expressão gênica de enzimas chaves do metabolismo dopaminérgico, tais como: COM-T, MAO-A e dos receptores dopaminérgicos: D1R e D2R, no estriado.

Apresentaremos a seguir, nossos resultados em um modelo de artigo, seguindo o formato da revista **Behavioral Brain Research ISSN 0166-4328**.

## REFERÊNCIAS

ALKAM, T.; et al. A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by Abeta (25-35). **Behavioural Brain Research**, v. 180, p. 139-145, 2007.

AMOAHA, S.K.S, et al. Rosmarinic Acid – Pharmaceutical and Clinical Aspects, **Planta Med**, v. 82, p. 388-406, 2016.

AMZAD HOSSAIN, M. et al. Sinensetin, rutin, 3'-hydroxy-5, 6, 7, 4'-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of the skin of apple fruit. **Food Chemistry**, v. 113, n. 1, p. 185–190, 2009.

AYRANCI, E.; ERKAN, N. Radical scavenging capacity of methanolic Phillyrea latifolia L. extract: anthocyanin and phenolic acids composition of fruits. **Molecules**. v. 18, n. 2, p. 1798-810, 2013.

BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**, v. 29 (6), p. 1-x, 2006.

BEAL, M.F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 325– 332, 2001.

BETARBET, R. et al. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**, v. 24, p. 308– 318, 2002.

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

BLOCK, M. L.; HONG, J.-S. Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1127–1132, 2007.

BONNET, A.M. Involvement of non-dopaminergic pathways in Parkinson's disease- Pathophysiology and therapeutic implications (Review Article). **CNS Drugs**, v.13, p. 351-364, 2000.

BOSCO, D. a et al. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. **Nature chemical biology**, v. 2, n. 5, p. 249–253, 2006.

BOLAM, J.P, HANLEY, J.J, BOOTH, P.A, BEVAN, M.D. Synaptic organisation of the basal ganglia. **J Anat**, v.196 ,n. 4, p.:527–542, 2000.

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

BUNNEY, B.S, AGHAJANIAN, G.K. Dopaminergic influence in the basal ganglia: evidence for striatonigral feedback regulation. In: The basal ganglia (Yahr M, ed), **New York: Raven**, p. 249–267, 1976.

CALLIER, S. et al. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. **Biology of the cell**, v.95, n.7, p- 489-502, 2003.

CANNON, R.J, et al., A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. **Neurobiol Disor**, v. 34, n.2, p. 279-290, 2009.

CARDENAS, H.; BOLIN, L. M. Compromised reactive microgliosis in MPTP-lesioned IL-6 KO mice. **Brain Research**, v. 985, n. 1, p. 89–97, 2003.

CARRILO-MORA, P.; SILVA-ADAYA, D.; VILLASENOR-AGUAYO. **Glutamate in Parkinson's disease: Role of antiglutamatergic drugs**. *Basal ganglia* 3, p.147-157, 2013.

CARTA M.; CARLSSON, T.; KIRIK, D.; BJORKLUND, A. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-dopa-induced dyskinesia in parkinsonian rats. **Brain**, v. 130, p. 1819-1833, 2007.

CHEN, S.; FU, Y.; WU, R. Effects of rosmarinic acid on free radical production and lysosomal enzyme release from rat peritoneal neutrophils. **Yaoxue Xuebao**, v. 34, n. 12, p. 881–885, 1999.

CHEN, H.; ZHANG, S.M.; HERMAN, M.A. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of Parkinson's disease. **Arch Neurol**, v. 60, p. 1059-1064, 2003.

CHEN, S.; LE, W. Neuroprotective Therapy in Parkinson Disease. **American Journal of Therapeutics**, v.13 (5), p.445-457, 2006.

CHEVALIER, G.; DENIAU, J. M. Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. **Trends in Neurosciences**, v.13, n.7, p.277-280, 1990.

CHOI, S. S. et al. Antinociceptive mechanisms of orally administered decursinol in the mouse. **Life Science**. v. 73, n. 4, p. 471-85, 2003.

CICCHETTI, F.; DROUIN-OUELLET, J.; GROSS, R.E. Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30(9):475-83, 2009.

CLARK, G.; COLLINS, R.A.; LEAVITT, B.R et al., A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. **Nature**, v.68, p.195-9, 2000.

CLARKE, G.; MOORE, P. Parkinson's disease. **Clinical Evidence**, v.13, p. 37-45, 2005.

D'AMATO, R. J. et al. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Annals of neurology**, v. 22, n. 2, p. 229–36, 1987.

DASTMALCHI, K., et al. Acetylcholinesterase inhibitory guided fractionation of *Melissa officinalis* L. **Bioorg Med Chem**, v.17, n.2, p.867-871, 2008.

DAVIDSON, W. S.; JONAS, A; CLAYTON, D. F.; GEORGE, J. M. Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9443–9, 1998.

DAVIS, G.C.; WILLIAMS, A.C.; MARKEY, S.P.; EBERT, M.H.; CALNE, E.D.; REICHERT, C.M.; KOPIN, I.J. Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. **Psychiatry Res.**, 1:249-254, 1979.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson ' s Disease : Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889–909, 2003.

DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030, **Neurology**, v.68, n.5, p.384-386, 2007.

DRIVER, J. A. et al. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. **Neurology**, v. 72, n. 5, p. 432–438, 2009.

DU, T et al., Rosmarinic acid antagonized 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)-induced neurotoxicity in MES23.5 dopaminergic cells. **Int J Toxicol**, v.29, p.625-633, 2010.

DUNCAN, G. W. et al. Health-related quality of life in early Parkinson's disease: The impact of nonmotor symptoms. **Movement Disorders**, v. 29, n. 2, p. 195–202, 2014.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease, **British Journal of Pharmacology** , v.164, n.4, p. 1357-1391, 2011.

EHRINGER, H.; HORNYKIEWICZ, O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. **Klin Wochenschr**, v. 15, n. 38, p. 53–57, 1960.

ESLAMBOLI, A.; BAKER, H.F.; RIDLEY, R.M; ANNETT, L.E. Sensorimotor deficits in a unilateral intrastriatal 6-OHDA partial lesion model of Parkinson's disease in marmoset monkeys. **Experimental neurology**, v. 183(2), p. 418-429, 2003.

FADEL, O.; EL, K.K.; MORANDAT, S. The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. **BBA. Biomembranes**, v. 1808, p. 2973-2980, 2011.

FAHN, S., LIBSCH, L. R., CUTLER, R. W. Monoamines in the human neostriatum: Topographic distribution in normals and in Parkinson's disease and their role in akinesia, rigidity, chorea, and tremor. **Journal of the Neurological Sciences**, v.14, p. 427–455, 1971.

FAHN, S, PRZEDBORSK. Parkinsonism. **Merrit's Neurology**, p. 679–693, 2000

FEARNLEY, J. M.; LEES, A. J. Striatonigral degeneration: A clinicopathological study. **Brain**, v. 113, n. 6, p. 1823–1842, 1990.

FERRARO, T.N; GOLDEN, G.T; DEMATTEI, M., HARE, T.A, FARIELLO, R.G. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology*,n.25, p.1071–1074, 1986.

FLOYD, R. A. Antioxidants, Oxidative Stress, and Degenerative Neurological Disorders. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 222, n. 3, p. 236–245, 1999.

FOX, S.H; BROTCHE, J.M; LANG, A.E. Non-dopaminergic treatments in development for Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**,v. 7, n.10, p.927-938, 2008.

FOX, S.H, et al. Serotonin and Parkinson's disease: On Movement, mood, and madness. **Movement Disorders**, v.24, n.9, p.1255-1266, 2009.

FRANK, M. J. Dynamic Dopamine Modulation in the Basal Ganglia: A Neurocomputational Account of Cognitive Deficits in Medicated and Nonmedicated Parkinsonism. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 51–72, 2005.

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

GERFEN, C.R.; SURMEIER, D.J. Modulation of striatal projection systems by dopamine. **Annu Rev Neurosci**, v.34, p. 441-66, 2011.

GOLAN, D.; TASHJIAN, A.H. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2009.

GIBB, W.R.G.; LEES, A.J. Pathological clues to the cause of Parkinson's disease. In: Marsden CD, Fahn S, eds. **Movements Disorders**. Oxford : **Butterworth-Heinemann Ltd.**; p.145-166, 1994

GIL, E.S.; ENACHE, TA.; OLIVEIRA-BRETT, A.M.. Redox behaviour of verbascoside and rosmarinic acid. **Comb chem high throughput screen**, v. 16, p. 92-97, 2013.

GIOVANNI, A. et al. Studies on species sensitivity to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. Part 1: systemic administration. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 270: 1000–1007, 1994.

GRAYBIEL, A. M. The basal ganglia: Learning new tricks and loving it. **Current opinion in neurobiology**, v.15, n.6, p.638-634, 2005.

GUDEHITLU, K. P. et al. Preproenkephalin mRNA and methionine-enkephalin increase in mouse striatum after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment, **J Neurochem**, v.56, p.1043–1048, 1991.

HADJICONSTANTINO, M. et al. N-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Increases Acetylcholine and Decreases Dopamine in Mouse Striatum: Both

Responses Are Blocked by Anticholinergic Drugs. **Journal of Neurochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1957–1959, 1985.

HALLIDAY, G. M, et al. Neuropathology of immunohistochemically identified brainstem neurons in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 27, n. 4, p. 373–385, 1990.

HATTORI, T., SINGH, V.K, MCGEER, P.L, MCGEER, E.G. Immunohistochemical localization of choline acetyltransferase containing neostriatal neurons and their relationship with dopaminergic synapse. **Brain Res**, V.102, p.164–173, 1976.

HAUSSER, R.A. Parkinson disease treatment & management, Medscape, 2018.

HEBERT, G., et al. Time-course of the expression of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the striatum and mesencephalon of mice injected with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, a dopaminergic neurotoxin. **Neurosci Lett** , v.349, p. 191–195, 2003.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, H. L. Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de Parkinson. **Bioquímica 31**, v. 4, p. 146-158, 2006.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?, **The Lancet Neurology**, v.8, n.4, p.382-397, 2009.

HWANG, O. Role of Oxidative Stress in Parkinson's Disease. **Experimental Neurobiology**, v. 22, n. 1, p. 11, 2013.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, H. L. Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de Parkinson. **Bioquímica 31**, v. 4, p. 146-158, 2006.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?, **The Lancet Neurology**, v.8, n.4, p.382-397, 2009.

HORNYKIEWICZ O.; KISH S.J. Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. **Adv Neurol**, v.45, p.19-34, 1987.



HUGHES, A.J; DANIEL, S.E.; KILFORD, L.; LEES, A.J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinic-pathological study of 100 cases. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.55, n.3, p. 181-184, 1992.

JACKSON-LEWIS et al., Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin-1-methyl-4-phenil-1,2,3,6-tetrahydropyridine. **Neurodegeneration**, v.4, p.257-269, 1995.

JOHNSON, W.M.; WILSON-DELFOSE, A.L.; MIEYAL, J.J. Dysregulation of glutathione homeostasis in neurodegenerative diseases. **Nutrients**, v. 4, p. 1399–1440, 2012.

JONSSON, G.; SACHS, C. Actions of 6-hidroxydopamine quinines on catecholamine neurons. **Journal of Neurochemistry**. v. 25, p. 509-516, 1975.

KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912,2015.

KANDEL, E.R.; SQUIRE, L.R. **Memória: da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v.277, n.5692, p.93-96, 1979.

KERENYI, L. et al. Positron emission tomography of striatal serotonin transporters in Parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 9, p. 1223–1229, 2003.

KISH, S. J. et al. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. **Brain**, v. 131, n. 1, p. 120–131, 2008.

KNOTT, C., STERN, C., STERN, G., WILKIN, G.P. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. **Mol Cell Neurosci**, v.16, p.724–39, 2000.

KOMES, D., et al. Phenolic composition and antioxidant properties of some

traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. **Phytochemical Analysis**, v. 22, n. 2, p. 172-80, 2011.

KUMARI, U.; TAN, E. K. LRRK2 in Parkinson's disease: genetic and clinical studies from patients. **The FEBS journal**, v. 276, n. 22, p. 6455–6463, 2009.

KURKOWSKA-JASTRZE, I.; WRON, A. The Inflammatory Reaction Following. **Experimental neurology**, v. 156, p. 50–61, 1999.

LAMAISON, J. L. et al. Rosmarinic acid content and antioxidant activity in French Lamiaceae. **Fitoterapia**, v. 62, p. 166–171, 1991.

LANGSTON, J.W. et al. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog sintese. **Science**. 219:979-80, 1983.

LANGSTON, J.W., AND IRWIN, I. MPTP: current concepts and controversies. **Clinical Neuropharmacology**, 9, 485–507, 1986.

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

LAVOIE, B. ; PARENT, A. Immunohistochemical study of the serotonergic innervation of the basal ganglia in the squirrel monkey. **Journal of Comparative Neurology**, v. 299(1), p.1–16. 1990.

LEE, F. J. S.; LIU, F. Genetic factors involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Brain Research Reviews**, v. 58, n. 2, p. 354-64, 2008.

LEE, J.; et al. Effect of rosmarinic acid on atopic dermatitis, **J Dermatol**, v.35, p.768-771, 2008.

LIMA, M.M.S.; REKSIDLER, A.B.; ZANATA, S.M.; MACHADO, H.B.; TUFIK, S.; VITAL, M.A. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. **Brain Research**, v. 1101:117-125, 2006.

LUAN, H. et al. Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: Relation to inflammation response. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, 2013.

MARSDEN, C. D.; PARKES, J. D. Success and Problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's Disease, **The Lancet**, v. 309, n. 8007, p. 345–349, 1977.

MARTINEZ-MARTIN, P.; RODRIGUEZ-BLAZQUEZ, C.; KURTIS, M. M.; CHAUDHURI, K. R. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 26, n. 3, p. 399–406, 2011.

MEREDITH G. E.; SONSALLA, P.; CHESSELET .;M.F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. **Acta Neuropathol**, v.115, p. 385-398, 2008.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. **Neurobiology of aging**, v. 22, n. 6, p. 799–809, 2001

MCNAUGHT, K.S.; OLANOW, C.W. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v.53, S3, p.S73-84, 2003.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das Doenças Crônicas Não transmissíveis (DCNT) no Brasil, 2011. <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude-16008-3-4-milhoes-habitantes-tem-pelo-menos-uma-doenca-cronica>. Acesso em: 31.abr.2017

MINK, J. W. The basal ganglia and involuntary movements: Impaired inhibition of competing motor patterns. **Archives of Neurology**, v.60, p.1365-1368, 2003.

MIZUNO, Y.; IKEBE, S.I.; HATTORI, N.; et al. Etiology of Parkinson's disease. In: Watts RL, KOLLER, W.C, eds. Movement Disorders. **Neurologic Principles and Practice. New York: McGrawHill**, p.161-182, 1997.

MOORE, D. J. et al. MOLECULAR PATHOPHYSIOLOGY OF PARKINSON'S DISEASE. **Annual Review of Neuroscience**, v. 28, n. 1, p. 57–87, 2005.

MORAES, L.S.; et al, Medicinal plant *Combretum leprosum* mart ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP. **Journal Ethnopharmacology**, v. 185, p. 68-76, 2016.

MOSLEY, R. L. et al. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Clinical Neuroscience Research**, v.6, p.261-281, 2006.

MUSHTAQ, N.; et al, Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. **Cell Biochem Funct**, v. 32, p. 287-293, 2014.

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.

NEVE, K. A.; SEAMANS, J. K.; TRANTHAM-DAVIDSON, H. Dopamine Receptor Signaling. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 24, n. 3, p. 165–205, 2004.

NICE. Parkinson's Disease: National Clinical Guideline for Diagnosis and Management in Primary and Secondary Care. 2006.

OBESO, J. A. et al. Pathophysiologic basis of surgery for Parkinson's disease. **Neurology**, v. 55, n. 12 Suppl 6, p. S7-12, 2000.

OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy, **Movement Disorders**, v.32, n.9, p.1264-1310, 2017.

OERTEL, W.; SCHULZ, J.B; Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists, **Journal Neurochemistry**, v. 138, p. 71-83, 2016.

OERTEL, W. H. Recent advances in treating Parkinson's disease. **F1000Research**, v. 6, p. 260, 2017.

OLANOW, C.W.; JENNER, P.; TATTON, N.A.; TATTON, W.G. Neurodegeneration and Parkinson's disease. In: Jankovic j, Tolosa E. Parkinson's disease and Movement Disorders. Third edition. **Williams & Wilkins, Baltimore**; p.67-103, 1998.

ORR, C.F.; ROWE, D.B.; HALLIDAY, G.M. An inflammatory review of Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 325-40, 2002.

PARK, S.E. et al, Graded 6-OHDA-induced dopamine depletion in the nigrostriatal pathway evokes progressive pathological neuronal activities in the subthalamic nucleus of a hemi-parkinsonian mouse, **Behav Brain Res**, v.15, v.344, p.42-47, 2018.

PARKINSON, J. et al. An Essay on the Shaking Palsy. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v.14, n.2, p.223-236, 2002.

PAULSON, H. L.; STERN, B.M.;. Clinical Manifestations of Parkinson's Disease. In Watts RL, Koller WC. **Movement Disorders Neurologic Principles and Practice**. **New York: MacGraw**, p.233-246, 2004.

PAULUS, W.; JELLINGER, K. The neuropathologic basis of different clinical subgroups of parkinson's disease. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 50, n. 6, p. 743–755, 1991.

PERRIN, R. J.; WOODS, W. S.; CLAYTON, D. F.; GEORGE, J. M. Interaction of human alpha-Synuclein and Parkinson's disease variants with phospholipids.

Structural analysis using site-directed mutagenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 44, p. 34393–34398, 2000.

PETERSON, M.; SIMMONDS, M. S. J. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*.v. 62, p. 121–125, 2003.

PRYBYLOWSKI, K.; K. Chang.; N. Sans.; L. Kan, S. Vicini .; R. J. Wenthold . The synaptic localization of NR2B-containing NMDA receptors is controlled by interactions with PDZ proteins and AP-2. **Neuron** , v.47(6), p. 845-57, 2004.

QIAO, S. et al. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. **Free Radicals Research**. v. 39, p. 995-1003, 2005.

RATES, S.M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n.5, p. 603-613, 2001.

REALE, M.; IARLORI, C.; THOMAS, A; et al. Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, n. 1, p. 55–63, 2009.

ROY, D.; MUKHOPADHYAY, S. Enhanced rosmarinic acid production in cultured plants of two species of *Mentha*. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 50, n. 11, p. 817-25, 2012.

SÁNCHEZ-CAMPILLO, M. et al. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 2, p. 386–392, 2009.

SAIRAM, K.; SARAVANAN, K. S.; BANERJEE, R.; et al. Non-steroidal antiinflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced dopaminergic neurotoxicity in rats. **Brain research**, v. 966, n. 2, p. 245–52, 2003.

SALTAS, D. et al. Determination of Rosmarinic Acid in Lamiaceae Herbs Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and

Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 61, n. 13, p. 3235-41, 2013.

SCATTON, B., JAYOY-AGID, F., ROUQUIER, L., DUBOIS, B., AGID, Y., Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. **Brain Research**, v 275, 321–328., 1983.

SHANNAK, K. ; RAJPUT, A. ; ROZDILSKY, B. ; KISH, S. ; GILBERT, J. ; HORNYKIEWICZ, O. Noradrenaline, dopamine and serotonin levels and metabolism in the human hypothalamus: observations in Parkinson's disease and normal subjects. **Brain Res**, v. 639, p. 33–41, 1994.

SHIMOHAMA, S.; SAWADA, H.; KITAMURA, Y.; TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **Trends Mol. Med**, v.9, p. 360-365, 2003.

SHIMOJO, Y. et al. Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, p. 896-904, 2010.

SING, S.; DIKSHIT, M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide. **Brain Res Rev**, 54, 233 -250, 2007.

SINGH, A. Oscillatory activity in the cortico-basal ganglia-thalamic neural circuits in Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v.47, 2018.

SIGMA ALDRICH, 2016 – Catálogo de produtos. Disponível em: (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/536954?lang=pt&region=BR>) Acesso em 04 de setembro, 2016.

SOBRATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1–2, p. 200–213, 2005.

STASHENKO, E. E. et al. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from Lippia (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 1, p. 192-202, 2013.

STAYTE, S.; VISSEL, B. Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson disease. **Frontiers in Neuroscience**, v.22, p.8-113, 2014.

STOCCHI, F. Therapy for Parkinson's disease: what is the pipeline? **Neurotherapeutics**, v.11, p.24-33, 2014.

TANNER, C. et al. Epidemiology and genetics of Parkinson's disease. In: Movement Disorders: Neurologic principles and Practice. Watts RL, Koller WC, editors. New York: McGraw-Hill. p. 137-52. 1997.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease, **Neurochemistry International**, v. 62, n.5, p.803-819, 2013.

TEISMANN P.; FERGER B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Synapse**, v.39, n.2, pg. 167-74, 2001.

TEISMANN, P. et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5473–5478, 2003.

THOENEN, H.; TRANZER, J.P. Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine. **Naunyn Schmiedebergs Arch Experimental Pathology Pharmacol**, vol.261, p.271-288, 1968.

TOUSSAINT, J.P et al., Effect of glomus mossease on concentrations of rosmarinic acid and caffeic acids and essential oil compounds in basil inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp *basilica*, **Plant Pathol**, v.57, p.1109-1116, 2008.



TSUKADA, H.; HARADA, N.; NISHIYAMA, S. et al. Cholinergic neuronal modulation alters dopamine D2 receptor availability in vivo by regulation receptor affinity induced by facilitated synaptic dopamine turnover. positron emission tomography studies with microdialysis in the conscious monkey brain, **The Journal of Neuroscience**, v. 20, p. 7067-73, 2000.

TWELVES, D.; PERKINS, K. S.; COUNSELL, C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 18, n. 1, p. 19-31, 2003.

TSANG, A.H; CHUNG, K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica Biophysica Acta 1792**, v.7, p.643-650, 2009.

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v.124, p.901-905, 2017.

UNGERSTEDT, U. 6-Hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 5, p. 107-110, 1968.

VARCIM, M. et al. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. **Oxidative Medicine and ...**, v. 2012, p. 1–25, 2012.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Nature medicine**, v.10, p.58-62, 2004.

YAN, M.H.; WANG, X.; ZHU, X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. **Free Radic Biol Med**. v.62, p.90–101, 2012.

ZAREI, A.; et al, Comparison between effects of different doses of *Melissa officinalis* and atorvastatin on the activity of liver enzymes in hypercholesterolemia rats. **Avicenna J Phytomed**, v. 4(1), p. 15-23, 2014.

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

ZHANG, Y., et al. Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food Funct*, v. 6, n.3, p. 92731, 2015.

ZHOU, C., HUANG, Y., PRZEDBORSKI, S. Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Mechanism of Pathogenic and Therapeutic Significance. *Mitochondria and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147: 93–104, 2008.

WANG, J. et al. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 47, n. 1, p.113-9, 2012.

WANG, Y.L et al., Protective Effect of Curcumin Against Oxidative Stress-Induced Injury in Rats with Parkinson's Disease Through the Wnt/  $\beta$ -Catenin Signaling Pathway, *Cell Physiol*, **Cell Physiol Biochem**, v.43.n.6, p.2226-2241, 2017.

WHO, Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. 2017  
[http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/publications/atlas.cvd/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publications/atlas.cvd/en/). Acesso em: 31.abr.2017.

**Rosmarinic acid prevents hyperlocomotion and induces biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease mouse model using the neurotoxin MPTP**

Sarah Martins Presti-Silva <sup>a, b</sup>, Cristina Martins-Silva <sup>a, b</sup>, Rita Gomes Wanderley Pires <sup>a, b, \*</sup>.

<sup>a</sup> Department of Physiological Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468 – Maruípe, Vitória-ES 29.043-910, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Molecular and Behavioral Neurobiology, Health Sciences Center, Federal University of Espírito Santo, Av. Marechal Campos 1468 – Maruípe, Vitória-ES 29.043-910, Brazil

\*Corresponding author at: Laboratory of Molecular and Behavioral Neurobiology, Department of Physiological Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES 29043910, Brazil.

E-mail address: ritagwpires@gmail.com (Rita Gomes Wanderley Pires).

## Highlights

- Rosmarinic acid prevented the hyperlocomotion induced by MPTP
- Rosmarinic acid increases in the neurotransmitters DA, 5-HT and their metabolites in healthy animals
- mRNA levels of the dopamine degradation enzyme Catechol-O-methyltransferase (COM-T) were upregulated by AR after the neurotoxicity induced by MPTP

## Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease worldwide. Currently, the main therapeutic approach relieves only motor symptoms, however it does not prevent or stop the neurodegeneration. Rosmarinic Acid (RA) an ester of caffeic and 3,4-dihydroxyphenylacetic acids obtained from numerous plant species such as *Salvia officinalis* L. (sage) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). This compound has a wide spectrum of known biological activities, such as antioxidant and anti-inflammatory and could be an additive therapy for neurodegenerative disorders. Since inflammation is one of the principal mechanisms underlying Parkinson's disease we aimed to evaluate the potential neuroprotective effects of RA treatment in an animal model of PD the neurotoxin MPTP in mice. Mice were separated into 4 distinct groups: (CN) Control/saline; (AR) Rosmarinic acid/vehicle; (MPTP) MPTP/saline; (MPTP+AR) MPTP/AR. RA (or vehicle) was administered orally by intra-gastric gavage for 14 days, one hour before MPTP or saline injection. MPTP groups received intraperitoneal injection (30 mg/kg) once daily for 5 days (4-8 day of experiment). In the motor parameters, a hyperlocomotion behavior was observed in MPTP treated animals, and this effect was significantly prevented by RA treatment. In the biochemical context, we show that RA treatment increased dopaminergic and serotonergic neurotransmission in healthy animals but there was no normalization of the neurotransmitter dysfunctions observed in the parkinsonian mice. Analysis of mRNA alterations in dopaminergic system components in striatum showed that catechol-O-methyl-transferase (COM-T) expression was increased in (MPTP+AR) group, while a normal expression of this enzyme was observed in the other groups. Overall, this report brings new evidence of the potential neuroprotective properties of RA in preventing behavioral features observed in PD in addition to improve neurotransmission in healthy brain.

Abbreviations: 5-HT, serotonin; 5-HIAA, 5-hydroxyindole-3-acetic acid; COM-T; catechol-O-methyl-transferase; DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; Dbh  $\beta$ -, dopamine  $\beta$ -hydroxylase knockout; HPLC, high performance liquid chromatography; HVA, homovallinic acid; L-DOPA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid;

MAO A, monoamine oxidase A; MAO B, monoamine oxidase B, MPP+, 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihidropyridium; MPTP, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, NE, norepinephrine; RA, Rosmarinic acid; SNpc, substantia nigra pars compacta.

Keywords: Parkinson's disease, MPTP, Rosmarinic acid, neuroprotection

## 1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a progressive neurodegenerative disorder that results in the impairments of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) [1]. As a result of the degeneration of nigrostriatal dopaminergic pathways, PD patients suffer from motor symptoms such as tremors, muscle rigidity and bradykinesia which cause disabilities and affect their quality of life [2].

Clinical diagnosis of PD is based on the presence of motor dysfunctions, nonetheless, at the time of diagnosis the patient has already lost 60 % or more of dopaminergic neurons in the midbrain [3].

Currently, no pharmacological therapeutic is able to prevent, slow down or stop the underlying neurodegenerative process [4]. The treatment options available to the diagnosed patients are based mainly on the replacement of the levels of dopamine (DA). The dopaminergic precursor 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), in association with carbidopa, a peripheral dopa decarboxylase inhibitor, for decades remains the gold standard symptomatic treatment of PD. However, this therapeutic approach in long-term use is associated with the development of motor fluctuations and dyskinesias [5]. Additional pharmacological strategies such as dopaminergic agonist, monoamine oxidase B (MAO B) inhibitors, catechol-O-methyl-transferase (COM-T) inhibitors, reduce fluctuations in DA concentrations and are also options in treatment with L-DOPA. Nevertheless, these drugs also have many side effects and do not decrease the progression of the disease [6].

The specific molecular events that lead to dopaminergic neurons degeneration is not yet fully understood [7]. Some hypothesis point out that at cellular level, the pathogenesis of PD is related to an increased production of reactive oxygen species (ROS), neuroinflammation and mitochondrial dysfunction [8]. The dopaminergic neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) is extensively studied in pre-clinical studies of PD [9]. The toxic effect of MPTP is mainly due its active form, the ion 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridium (MPP<sup>+</sup>). In turn, MPP<sup>+</sup> is an inhibitor of mitochondrial complex I [10, 11]. This impairment of mitochondrial function leads to elevated Ca<sup>++</sup> levels, formation of free radicals, and impairment of ATP production causing inability to mitochondria to supply the cell with energy [12] culminating in dopaminergic neuronal death in the nigrostriatal pathway [13].

Recently, the interest in the use of alternative therapies with natural products has increased, especially those compounds derived from plants[14]. Plants are important resources of antioxidants components, mostly related to phenolic compounds [15, 16], such as rosmarinic acid (RA).

RA is a phenolic natural compound and a common ester derived from caffeic acid and (R)-(+)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)lactic acid. RA is abundant in several medicinal plants of the Lamiaceae family, such as rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), spearmint (*Mentha* spp), lemon balm (*Melissa officinalis*), and also in plants used in traditional Chinese medicine, such as *Perilla frutescens* (L) Britton, *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Rabdosia rubescens* (Hemsl)H.Hara [17]. The variety of pharmacological and biological activities of RA and RA-containing plant extracts have received considerable attention, it has been reported that RA has therapeutic properties, such as antiviral, antibacterial, anti-inflammatory and an exceptional antioxidant activity.[18].

The use of RA as a neuroprotective agent in PD has recently been shown. RA administered orally at the dose 20 mg/kg was able to reverse nigrostriatal degeneration induced by 6-OHDA[19]. This study demonstrated that RA treatment increased the number of TH positive neurons in SNpc and consequently the increase of dopamine levels in striatum. Additionally, RA promoted the upregulation of mRNA from Bcl-2, an antiapoptotic protein [19].

Herein, due to the need to further study the features of the PD and improve the spare therapies available, the present study aims to investigate whether oral administration of RA at 20mg/kg is effective preventing the biochemical and motor changes induced by MPTP, and contribute to the understanding of the neuroprotective effects attributed to RA. For this purpose, we analyzed behavioral parameters, locomotor activity, grip strength, motor coordination and bradykinesia. Additionally, we measured DA and serotonin (5-HT) tone in striatum of mice treated with MPTP and the expression of genes related to dopaminergic neurotransmission.



## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

A total of 40 Male C57BL/6 mice (9-12 weeks old), weighing 25-30 g, were used to conduct the experiments. Ethical principles of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA, [www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)) were respected, which are in accordance with international standards for research involving animals. The experimental procedures were approved by The Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Espírito Santo (UFES: protocol number 60/2016).

The animals were housed in our own vivarium of at Laboratory of Molecular and Behavioral Neurobiology (LNMC) of UFES, they were kept in polypropylene boxes (38 cm X 20cm X 13 cm) with floor covered with sawdust under a 12/12 h light-dark cycle, in a temperature-controlled environment ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) with water and food ad libitum.

### 2.2. Experimental Design

MPTP (Sigma-Aldrich, cat M0896) was dissolved in saline solution (0.9 % NaCl) at 30 mg/kg free base. Drug administration was performed i.p once a day for five consecutive days (Day 4-8) as previously described [20,21]. The animals from control (CN) group were injected with vehicle (5% Tween 20 in 0.9 saline). RA (Sigma-Aldrich, CAS 20283-92-5) was dissolved in vehicle and orally administered at a 20 mg/kg dose once a day for 14 days. Animals were randomly divided into four independent groups according with the drug administration: (CN) control group (vehicle), (AR) (RA/vehicle), MPTP (saline/MPTP), MPTP+ AR (MPTP/RA vehicle).(Fig 1)

### 2.3. Behavioral tests

#### 2.3.1. Locomotor Activity in Open Field

Locomotor activity assessment was performed 72 after the last MPTP administration. Animals were habituated to the experimental room for 30 minutes and then introduced into the box of 40X60X50 cm and permitted to freely explore the

environment for 5 min. The box was cleaned with 40% alcohol and water between trials. All the locomotor activity was monitored the results were expressed in total distance traveled in meters.

### 2.3.2. Grip test

Grip strength test was performed 72 h after the last MPTP injection and three hours after locomotor activity in Open Field. The apparatus consists in a force transducer attached to a small metallic support, as previously described [22]. Software Win DaQ (DATA Q Instruments, Akron, OH, USA) couple to a computer was used for data record. To perform the test, the experimenter keep the animal secure by the tail and allow the animal to grasp the support using their forelimbs, with its body always parallel to the surface. The maximum strength peak was automatically recorded and expressed in grams of force (gf). Each mice was subjected to five trials with a maximum period of 50s.

### 2.3.3. Pole test

Pole test is a value tool in the screening of anti-parkinsonian agents. The experiments were conducted as previously described [23]. The apparatus consisted to a 1-cm diameter and 45-cm high gauze-wrapped metallic pole. The animals were trained 3 days before starting experiment. After acclimatization, the animals were placed head-upward on the top of a rough-surfaced vertical pole and the time until it turn head down and climb down to the base of the pole were measured by using a chronometer. A maximum time of 60 s was attributed to the cases in which the mice was unable to descend to the base. The climbing latency was measured 96 h after the last administration of MPTP and five attempts of climbing were performed per mice.

### 2.3.4. Rotarod

Mouse motor coordination was evaluated 120 hs after MPTP by using a rotarod apparatus as previously described [24]. The rotarod was specifically

designed to make automatic measurements of neurological deficiencies in rodents, this measurement is a parameter to show balance and motor coordination and represents one of the most commonly used tests for motor characterization in mice [25]. A cylindrical rod approximately 3 cm in diameter was in constant movement to assess the animal's ability to remain balanced, as the speed of rotation was increased it becomes more difficult for the animal to remain on the rod. A sensor was coupled to the surface of the equipment. The animals were trained for 3 consecutive days before starting the experiment. The rotarod test was conducted at a uniformly accelerating speed from 4 rpm to 40 rpm in 300 s and the latency for the animal to fall from the rotating rod was measured. The experiment was repeated four times per animal.

#### 2.4. DA, Serotonin (5-HT) and metabolites measurement in the striatum by high-performance liquid chromatography (HPLC)

The tone of DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), Homovallinic acid (HVA), 5-HT and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) was determined using an HPLC system (Shimadu Corp, Kyoto, Japan) with an electrochemical detector (VT-03, Decode II, Antec, Fremont, CA, USA) as previously described [26]. After 6 days of the last administration of MPTP, the animals were euthanized and the striatum was dissected. The tissue sample was sonicated in 250  $\mu$ L of 0.1 M perchloric acid for 30 s. After the samples were placed on ice for 10 min and centrifuged (15.000Xg, 15 min, 4 C), the supernatant was filtered and injected into the HPLC system equipped with a reverse-phase column (Eclipse XBD-C18 Agilent, 4.6 X 250 mm, 50  $\mu$ L). The column temperature was kept at 27°C and the detector potential was set at +530 mV. The mobile phase consisted of 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mg/L octanesulfonic acid, pH 4.75 and the flow rate was 0.7 mL/min. Samples were injected in triplicate, monoamines dosage was normalized by total protein content, as determined by the Bradford method [27].

#### 2.5. Gene expression analysis

The striatum was dissected, immediately frozen in dry ice, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction as previously described [28]. Total RNA was extracted using TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-Aldrich, MO, USA). cDNA was synthesized using an iScript cDNA synthesis kit (Biorad, CA, USA). Subsequent qPCR was performed using a CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) and iQ SYBR Green Supermix (Biorad). Relative quantification of gene expression was performed via the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , using  $\beta$ -actin as the reference gene for normalization. Genes related to dopaminergic system, COMT, monoamine oxidase A (MAO A), dopaminergic receptor D1R and D2R were investigated. Primer sequences for each gene are described in Table 1.

## 2.6. Statistical analyses

Behavioral and molecular data were analyzed via One-way ANOVA with Bonferroni post hoc. The software Graph Pad Prism v.6. was used for statistical analyses. All data are presented as the mean  $\pm$  SEM and the differences were considered statistically significant when p values were less than 0.05 ( $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Behavioral parameters

In order to evaluate whether the treatment with RA could protect changes in locomotor activity induced by MPTP, mice were submitted to the open field test in order to evaluate the total distance traveled in a new environment. As shown in Fig 2, the MPTP-treated animals showed changes in locomotor activity, presenting an increase in exploratory behavior ( $F(3,25)=5,051$ ;  $p=0,0072$ ). Interestingly, treatment with RA prevented the MPTP-induced hyperlocomotion as evidenced by the statistical difference between the group (MPTP) and (MPTP + AR) ( $p=0,01$ ). On the other hand, animals from (AR) did not present any impairment of locomotion and had similar performances when compared with CN group.

Fig3. and Fig4. show respectively the behavior of mice subjected to the Grip test and Pole test. Overall, the evaluation of these parameters has shown that the

animals of the four groups did not exhibit changes in muscle strength and bradykinesia [ $F(3,37)=1.86$ ;  $p=0.15$ ] ; [ $F(3,23)=0.68$ ;  $p=0.56$ ]. Additionally, in order to assess whether MPTP exerts any influence in the motor coordination and the ability to RA reverse such changes, mice were submitted to the the rotarod (Fig 5). One way ANOVA following Bonferroni post-hoc did not indicate statistical differences between the four groups [ $F(3,26)=1,623$ ;  $p=0,21$ ], MPTP treatment did not impair performance on the rotarod.

### 3.2. Striatal DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA levels

The neuroprotective effect of RA was analyzed by quantification of DA, 5-HT and their metabolites by HPLC. The MPTP subacute treatment protocol at the dose of 30 mg/kg induced depletion of approximately 80 % of the DA levels compared with (CN), (AR) groups [ $F(3,16)=74,37$ ;  $p<0.0001$ ] (Fig. 6A). (MPTP+AR) did not show significant increase in the levels of striatal DA, however, the (AR) showed an increase in DA content as compared to (CN,  $p<0.0001$ ), (MPTP,  $p<0.0001$ ) and (MPTP+AR  $p<0.0001$ ).

Fig. 6B and Fig.6C shows the striatal levels of the DOPAC and HVA. MPTP significantly decreased the levels of metabolite DOPAC [ $F(3,15)=35.44$ ;  $p<0.0001$ ]. HVA levels in the group that received (MPTP) and (MPTP+AR) were below the limit of quantification. On the other hand, (AR) group showed an expressive increase in both metabolites compared to group (MPTP) and (MPTP+AR).

Fig 6D shows DA turnover in relation to DOPAC (DOPAC/DA), Bonferroni did not show statistical differences between the groups [ $F(3,15)=5,317$ ;  $p=0,0107$ ]. In addition, as shown in Fig. 7A, the levels of 5-HT in the PD mice striatum were significantly depleted in compared to (CN) ( $p<,0.0001$ ) and (AR) ( $p<0.0001$ ). Moreover, animals treated with RA alone demonstrated to statistically increase [ $F(3,15)=18,82$ ;  $p<0,0001$ ] in 5-HIAA content in relation to (MPTP) ( $p =0.0028$ ) and (CN) ( $p=0.045$ ).

### 3.3. Gene expression analysis

Gene expression of dopaminergic neurotransmission components were assessed by qPCR (Fig 8). Striatal expression of MAO-A [F (3,11)=3.22; p=0.06], D1R [F (3,9)=0.47; p=0.70], D2R [F (3,11)=2.39; p=0.12]. were not statistically altered (Fig.8 B,C,D). Furthermore, (Fig.8A) COMT expression was increased in (MPTP+AR) compared with (AR) (p=0.03) [ F(3,10)=4.46; p=0.03].

#### 4. Discussion

PD is characterized by the extensive neuronal loss in the brain, and degeneration of dopaminergic mesencephalic neurons accelerates the progression of its symptoms [29]. Oxidative stress and neuroinflammation are considered to play an important role in this degenerative process, leading to disruptions in the physiologic maintenance of the redox potential in neurons, recruitment of inflammatory cytokines which interfere with several biological processes, culminating in cell death [30]. In this context, the development of therapies for PD targeting inflammatory and oxidative processes is very promising. Indeed, there are convincing experimental and clinical studies revealing the multiple biological activities of natural compounds, such as RA [31], especially its antioxidant and anti-inflammatory capacity [32]. However, few reports on the effects of this polyphenol compound on PD have been made available so far.

Therefore, in the current study, we performed a combined of behavioral ,biochemical and molecular analysis in order to investigate the therapeutic potential of RA to prevent changes induced by the dopaminergic neurotoxin MPTP.

We found that the sub chronic MPTP protocol at 30 mg/kg dose did not generate typical motor deficiencies in rotarod, pole test and grip strength test. Opposed to motor disabilities, our results in the open field demonstrated that MPTP-treated mice presented an increased exploratory activity and this hyperactivity was observed by our group and others [33-39]. Interestingly, such behavior was completely prevented with RA treatment, leading to the usual exploratory behavior of mice with values similar to (CN) group. These data point to a protective activity of RA against MPTP-induced neurotoxicity in this paradigm of motor evaluation. The increase in the performance in MPTP-mice is not well understood and the precise mechanisms leading to this hyperlocomotion is still unclear. Several evidences suggest that dopaminergic denervation may result in compensatory mechanisms [40-41]. This phenomenon could be dopaminergic or non-dopaminergic and may also even be related to adaptive circuit's changes in the functioning of the basal nuclei and their connections [42].

Regarding the dopaminergic compensatory mechanisms, consistent studies propose that surviving DA neurons go through functional changes in an attempt to

preserve DA availability in the striatum [43-45]. That includes increments in synthesis [46], release and turnover of DA, DA receptor changes [46] and reduced DA transporter to enhance DA-pre-synaptic uptake [47]. Additionally, the physiological response to DA receptor stimulation is altered by DA-denervation [48]. Indeed, it has been shown that PD causes also reorganization of DA receptors, phenomena that has been called supersensitivity of DA receptors [48].

Notwithstanding, these compensatory responses should be operating in the early phase (pre-symptomatic) of PD to allow such marked depletion to take place without symptomatic manifestations,[49] it seems like this mechanisms could be involved in the maintenance of mice motor behavior and hyperlocomotion.

In agreement with this hypothesis, we showed a trend toward an increase in transcription of D2R receptor following the administration of MPTP, this response could represent a compensatory mechanism elicited by the drug, while a tendency to downregulation in (MPTP+AR) could represent a neuroprotective effect in order to prevent the dopaminergic nigrostriatal toxicity. In fact, it has been reported that in experimental animal models the dopaminergic depletion consistently cause enhance in D2-like receptor density [50]. Evidence showed that in hemiparkinsonian rat model induced by 6-OHDA, the GABAergic medium-sized spiny neurons showed increased in mRNA coding for D2R (that form the indirect pathway) and enkephalin, which was reversed by subsequent continuous treatment with D2 agonist quinpirole [51]. Baik et al.(1995) reported a physiological involvement of the receptor D2 in Parkinsonian-like locomotor impairment. They have shown that the targeted deletion of D2 receptor resulted in a phenotype having a marked hypoactivity trait, D2 knockout mouse displayed Parkinson like features [52]. Consistent with this observations, the greater transcription of the D2R receptor induced by MPTP could increase the modulatory action of DA and leads to an imbalance in the motor networks that stimulate and inhibit the initiation of movements, generating an increase of locomotion in MPTP-mice and unchanging the other engine parameters mentioned. On the other hand, RA treatment could reverse the compensatory responses mentioned above in an attempt to reduce neuronal damage in (MPTP+AR) mice.

Regarding non-dopaminergic compensatory mechanisms, Chia et al.(1999) proposed that hyperlocomotion might be due to increased serotonergic neurotransmission in the brains of animals treated with high doses of MPTP as a



mechanism to compensate the DA deficiency [53]. To clarify the relationship between RA and MPTP in the impact on serotonergic neurotransmitters and behaviors, we further analyzed both the 5-HT content and its metabolite in striatum. However, our results suggest that MPTP did not improve the serotonergic transmission, but induced a depletion of 5-HT and metabolite. Recently, similar findings have been reported by Zhang et al (2017), they described a similar response, using the same protocol employed in the present study. They have shown hyperactivity behavior in the animals treated with MPTP. In the same study, they assessed striatal DA, 5-HT and norepinefrin (NE) content and found a depletion in DA, 5-HT, while an increase in NE content in mice with hyperactive behavior was observed [54].

Yao et al(2015) reported NE loss after lesions in the locus coeruleus, the major noradrenergic nucleus in the brain, could potentiate MPTP toxicity. They examined motor deficits in dopamine  $\beta$ -hydroxylase knockout (Dbh  $-/-$ ) mice that lack NE, and found no abnormalities in MPTP-treated mice, despite 80 % loss striatal DA terminals. On the other hand Dbh $-/-$  were impaired in most tests and also display spontaneous dyskinesias. This behavior was reversed by NE restoring and DA agonist treatment[55]. Altogether, these findings point out that RA could prevent the hyperactivity by modulation the noradrenergic pathway to regulate the unbalanced of nigrostriatal system.

RA by itself demonstrated to increase the contents of monoamines DA and 5-HT. Interestingly, in normal brain, RA alone generated an expressive increase in the DA (100%), DOPAC(111,22%), HVA (94%), 5-HT(69.8%) and 5-HIAA (59.92 %), striatal content. Impressively, despite the increasing of monoamines content, RA itself did not alter the animals normal motor behavior. The detailed mechanisms involved in the improvement of RA in the serotonergic and dopaminergic system in healthy animals are not yet clear. The literature is scarce regarding the role of RA in monoaminergic systems in healthy brains. However, previous reports showed that RA and *Rosmarinus officinalis* extract raises both content of DA and 5-HT against different neurological disorder [56-58]. A recent pharmacological study revealed that administration of RA improved brain monoamines in a doxorubicin-induced neurotoxicity in rats, and, besides that, RA protected against oxidative stress, which was manifested by the decrease in malondialdehyde (MDA) accompanied with the increase of glutathione reduced (GSH) content. These data shows that RA could

protect the neurotoxicity induced by doxorubicin by antioxidant effects [59]. Indeed, the main action of RA is to capture free radicals and protect cellular molecules from oxidative damage through the stimulation of the endogenous antioxidant system and the ability to donate electrons to reactive radicals leading them to more stable form [60]. Rasoolijazi et al (2015) showed that rosemary extract that is added to the diet may improve the oxidative stress activity in the brain tissue of the aged rats [61]. Machado et al (2009) suggested that extract of *Rosmarinus officinalis* causes an antidepressant-like effect that seems to be mediated by an interaction with the monoaminergic system and dependent on a decrease in the 5-HT<sub>3</sub> receptor activation. The hypothesis that the suppression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor activity was reinforced by the synergistic antidepressant-like effect observed when mice were treated with MDL7222 (a selective 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor antagonist) in combination with a sub-effective dose of the extract of *Rosmarinus officinalis*. In the same study, the selective dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 and the dopamine D2 receptor antagonist, sulpiride, were able to reverse the antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* [62]. These results presented in the literature, show that RA presents interaction with the monoamine systems and in fact it demonstrates this activity in the previously mentioned works that are involved in neurological disorders.

Furthermore, the RA did not avert statistically the dopaminergic and serotonergic striatal depletion in the MPTP-treated animals. The dose of 20 mg/kg of RA used to study the treatment in the parkinsonian mice was based on previous report [63]. This work shows that 20 mg/kg RA given orally for 21 days could effectively rescue 6-OHDA dopaminergic neurons [63]. However, this result was not observed in our work, we treated the animals with RA 7 days less than the mentioned study, this could be an explanation for the absence of effects on monoamines in parkinsonian mice treated with this polyphenol. The MPTP-treated mouse has some clear advantages over the 6-OHDA lesion model. Being systemically active, MPTP has the advantage of producing a bilateral lesion more representative of human PD, which is associated to an extensive drastic neuronal loss [64]. In addition, our protocol consists of the application of the toxin once a day for 5 days, the MPTP-induced injury could be so drastic that the dose applied in this study was not sufficient to revert the depletion in monoaminergic system. There is a lack of

information regarding RA in animal models of PD, and we intend to evaluate in the future if there is a linear relationship between higher doses, longer days of treatment and the biochemical effects of RA in a preclinical PD model, since the 20 mg/kg dose was not the maximum effective dose capable of producing the effect in the biochemical parameters.

Herein, these data are encouraging and suggest a potential for RA to prevent the onset of the disease. Besides PD being related to dopaminergic hypofunction, evidence also points to the role of 5-HT in this disease [65]. Indeed, epidemiological studies suggest that high dietary intake of polyphenols correlates with a decreased risk of a range of disease including neurodegenerative diseases like PD and Alzheimer disease [66]. Previous reports show that ageing itself decline dopamine synthesis, notably in the striatum and extra striatal regions [67]. Moreover, the age-related loss in dopamine is thought to be involved with many neurological symptoms that increase in frequency with age, for example, decreased arm swing and increased rigidity [68].

As we mentioned, oxidative stress play an important role in pathophysiology of PD. Previous reports suggest that the brain produces high levels of ROS every day. Contradictorily, the brain is least prepared to handle this excessive load of free radicals because it has low levels of both antioxidant system and dietary antioxidants. In this way, the risk of developing idiopathic PD becomes significant high only after the age of 65 or more. This is explained by the fact that neurons have a high degree of plasticity to maintain the normal brain functions. Therefore, supplementation with antioxidants like RA could reduce the rate of loss of neurons, especially in catecholaminergic neurons which are more susceptible to oxidative damage [69].

Regarding the analysis of gene expression of dopaminergic degradation enzyme, COM-T, we show that striatum mRNA COM-T levels increased in (MPTP+AR) group, and the difference was statistically significant compared with (AR). Diverse environment insults have been proposed to alter COM-T expression. Reenila et al (1997) have shown that COM-T expression is increased in rat brain following middle cerebral artery occlusion and reperfusion, a model of brain hypoxia [70]. On top of that, it was shown that there is a persistent increase of COM-T in a rat traumatic brain, and this biomolecular response appeared to be due to upregulation

of COM-T in microglia. These authors proposed that it could represent a compensatory mechanism to terminate the catecholamine signaling in injured brain regions [71].

Also some authors, based on the DA auto-oxidation hypothesis, suggested that increased COM-T activity occurs as a way to protect neurons from injury, and in an attempt to reduce oxidative stress. Similarly, expression of COM-T and COM-T activity increased in the SNpc following local infusion of LPS an immune activador [72]. However, although COM-T appears to be upregulated following neuropathological insults in a several animal models, it is unclear to extension of these changes as neuroprotective.

In summary, we provide the first description of the effects of RA *in vivo* focusing on the biochemical and behavioral alterations in response to MPTP. Overall, this report brings new evidence of the potencial therapeutic demonstrated by RA in parkinsonian mice by reversing hyperlocomotion induced by MPTP and presents potential for preventing the onset of the disease, mainly by the increase of dopaminergic and serotonergic tone in healthy animals.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Health Sciences Center facilities Laboratório de Análises Biomoleculares (LABIOM). This work was supported by Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- [1] .A.E. Lang, A.M Lozano, Parkinson's disease. First of two parts, *N Engk J Med.* 15(1998) 1044-1053. doi:10.1056/NEJM199810083391506
- [2] K.A. Jellinger, Pathology of Parkinson's disease, *Mol. Chem, Neuropathol* 14(1991)153-197. doi:1044-7393/91/1403-0153
- [3] .A.E. Lang, A.M Lozano, Parkinson's disease. First of two parts, *N Engk J Med.* 15(1998) 1044-1053. doi:10.1056/NEJM199810083391506
- [4] .L.V. Kalia, A.E. Lang. Parkinson's disease, *Lancet.* 996 (2015) 896-912. doi:10.1016/s0140-6736(14)61393-3.
- [5] .R.A. Hauser. Parkinson disease treatment & management. *Medscape: Neurology.* 2018. <http://emedicine.medscape.com/article/1831191-treatment>.
- [6] .S.H. Fox, R. Katzenschlager, S-Y. Lim, et al. The Movement Disorder Society evidence-based medicine review update: Treatments for the motor symptoms of Parkinson's disease, *Mov Disord* 26 (2011) S2-41. doi:10.1002/mds.23829.
- [7] W. Dauer, S. Przedborski. Parkinson's disease: mechanisms and models, *Cell Press, Neuron* 39 889-909. doi:10.1016/S0896-6273(03)00568-3.
- [8] J. Blesa, I. Trigo-Damas, A. Quiro-Varela et al. Oxidative stress in Parkinson's disease, *Frontiers in neuroanatomy* 9 (2015). doi: 10.3389/fnana.2015.00091.
- [9] N. Schmidt, B. Ferger. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease, *J. Neural Trans,* 108 (2001) 1263-1282 doi:10.1007/s007020100004.
- [10] J.Langston, J. Ballard, J. Tetrad et al. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis, *Science.*219 (1983) 979-980. doi:10.1126/science.6823561.
- [11] G.C. Davis, A.C. Willians, S.P. Markey, M.H. Ebert, E.D. Calne, C.M. Reichert, C.M. Kopin, Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues 1(1979) 249-254 doi:10.1016/0165-1781(79)90006-4.
- [12] D. Blum, S. Torch, N. Lambeng, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA dopamine and MPTP contribution to the apoptotic

- theory in Parkinson's disease, *Prog Neurobiol* 65 (2001) 135-172. doi:10.1016/S0301-0082(01)00003-X.
- [13] N. Schmidt, B. Ferge, Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *Journal of Neural Transmission*. 108 (2001) 1263-1282. doi:10.1007/s007020100004.
- [14] S. Rates, Plants as source of drugs, *Toxicon*. 39(2001) 603-613 doi:10.1016/S0041-0101(00)00154-9.
- [15] V.D. Aher, A. Wahi, A.M. Pawdey, Antioxidants as immunomodulator: an expanding research avenue, *Int J Curr Pharm Res*. 3(2011) 8-10 ISSN-0975-7066.
- [16] W. Zheng, S.Y. Wang, Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*. 49 (2001) 5165-5170. doi:10.1021/jf010697n.
- [17] S.K.S Amoah, L.P.Sandjo, J.M.Kratz, M.W.Biavatti, Rosmarinic acid- Pharmaceutical and clinical aspects. *Planta Med*. 82 (2016) 388-406. doi:10.1055/s-0035-1568274.
- [18] M. Petersen, M.S. Simmonds, Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 62 (2003) 121-125. doi:10.1016/S0031-9422(02)00513-7.
- [19] J.Wang, H. Xu, X. Du, P. Sun, J. Xie, Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons. doi:10.1007/s12031-011-9693-1
- [20] L.S.Moraes, B.Z.Rohor, L.B.Areal et al, Medicinal plant *Combretum leprosum* mart ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP, *Journal of Ethnopharmacology*. 185 (2016) 68-76. doi:10.1016/j.jep.2016.03.041.
- [21] W.F.Hilario, A.L.Herlinger, L.B.Areal, Cholinergic and dopaminergic alterations in nigrostriatal neurons are involved in environmental enrichment motor protection in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of molecular neuroscience*. 60(2016) 453-464. doi: 10.1007/s12031-016-0831-7.
- [22] H.A.Tilson, P.A.Cabe, Assessment of chemically-induced changes in the

- neuromuscular function of rats using a new recording grip meter. *Life Sci* 23(1978) 1365-1370. doi: 10.1016/0024-3205(78)90395-8.
- [23] N. Ogawa, Y.Hirose, S.Ohara et al., A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*. 50(1985). doi:10.1016/S0165-0270(96)02211-X.
- [24] N.W.Duham, T.S.Miya, A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc*. 46(1957) 208-209. doi:10.1002/jps.3030460322.
- [25] G. Rozas, J.L.G.Labandeira, Drug-free evaluation of rat models of parkinsonism and nigral grafts using a new automated rotarod teste. *Brain Res*. 749(1997). doi:10.1016/S0006-8993(96)01162-6.
- [26] J.D.Chi, J.Odontiadis, M.Franklin, Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 731(1999). doi:10.1016/S0378-4347(99)00255-8.
- [27] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(1976). doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [28] A.L.Herlinger, A.R.Almeida, S.M.Presti-Silva et al., Behavioral, biochemical and molecular characterization of a Parkinson's disease mouse model using the neurotoxin 2'CH<sub>3</sub>-MPTP: A novel approach. *NeuroMolecular Medicine*. 20(2018) 73-82. doi: 10.1007/s12017-018-8476-z.
- [29] S.S.Agrawal, S.Gullaiya, V. Dubey, V. Singh, A. Kumar, A. Nagar, P.Tiwari, Neurodegenerative shielding by Curcumin and its derivatives on brain lesions induced by 6-OHDA model of Parkinson's disease in albino wister rats. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2012(2012) .doi: 10.1155/2012/942981.
- [30] V.Dias, E.Junn, M.M.Mouradian, The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*. 3(2013) 461-491. doi:10.3233/JPD-130230.
- [31] S.K.S.Amoah, L.P.Sandjo, J.M.Kratz et al., Rosmarinic acid-Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta Med*. 82(2016) 388-406. doi:10.1055/s-0035-1568274.

- [32] C. Sanbongi, H. Takano, N. Osakabe, et al., Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med.* 34(2003) 1060-1069. doi:10.1016/S0891-5849(03)00040-6.
- [33] W.F.Hilario, A.L.Herlinger, L.B.Areal, L.S.Moraes et al., Cholinergic and dopaminergic alterations in nigrostriatal neurons are involved in environmental enrichment motor protection in a mouse model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 60(2016) 453-464. doi:10.1007/s12031-016-0831-7.
- [34] E. Rousellet, C.Joubert, J.Callebert et al., Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. *Neurobiology of disease.* 14(2003) 218/28. doi:10.1016/S0969-9961(03)00108-6.
- [35] D.W.Luchtman, D.Shao, C.Song. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Physiol Behavior.* 98(2009) 130-8.doi:10.1016/j.physbeh.2009.04.021.
- [36] L.S.Moraes, B.Z.Rohor, L.B.Areal et al, Medicinal plant *Combretum leprosum* may ameliorates motor, biochemical and molecular alterations in a Parkinson's disease model induced by MPTP, *Journal of Ethnopharmacology.* 185 (2016) 68-76.doi:10.1016/j.jep.2016.03.041.
- [37] E.Bezard, C.E.Gross, Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. *Prog Neurobiol.* 55(1998) 93-116. doi:10.1016/S0301-0082(98)00006-9.
- [38] W.F. Hilario, A.L. Herlinger, L.B. Areal, L.S. de Moraes, T.A.A. Ferreira, T.E.S. Andrade, C. Martins-Silva, R.G.W. Pires, Cholinergic and Dopaminergic Alterations in Nigrostriatal Neurons Are Involved in Environmental Enrichment Motor Protection in a Mouse Model of Parkinson's Disease, *J. Mol. Neurosci.* 60 (2016) 453–464. doi:10.1007/s12031-016-0831-7.
- [39] Q-S. hang, Y. Heng, Z. Mou et al., Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. *Acta Pharmacologia Sinica.* 38(2017) 1317-1328. doi:10.1038/aps.2017.49.
- [40] E.Bezard, C.E.Gross, Compensatory mechanisms in experimental and human



- parkinsonism: Towards a dynamic. *Progress in Neurobiology*. 55(1998) 93-116. doi:10.1016/S0301-0082(98)00006-9.
- [41] J.Blesa, I.Trigo-Damas, M.Dileone et al., Compensatory mechanisms in Parkinson's disease: Circuits adaptations and role in disease modification. *298(2017) 148-161*. doi:10.1016/j.expneurol.2017.10.002.
- [42] A.H.V.Schapira, K.R.Chaudhuri, P.Jenner, Non-motor features of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*. 18 (2017) 435-450. doi:10.1038/nrn.2017.62.
- [43] D.B.Calne, M.J.Zigmond, Compensatory mechanisms in degenerative neurologic diseases. Insights from parkinsonism. *Arch Neurol*. 48(1991) 361-363. doi:10.1001/archneur.1991.00530160025009.
- [44] M.J.Zigmond, Do compensatory processes underlie the preclinical phase of neurodegenerative disease? Insights from an animal model of parkinsonism. *Neurobiol*. 4(1997) 247-253. doi:10.1006/nbdi.1997.0157.
- [45] M.J. Zigmond, E.D.Abercrombie, T.W.Berger et al., Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends Neurosci*. 13(1990) 290-296. doi:10.1016/0166-2236(90)90112-N.
- [46] E.Bezard, S.Dovero, C. Prunier, et al., Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 21(2001) 6853-6861. doi: 21/17/6853.
- [47] C.S.Lee, A.Sossi, T.J.Ruth et al., In vivo positron emission tomographic evidence for compensatory changes in presynaptic dopaminergic nerve terminals in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 47(2000) 493-503. doi:10.1002/1531-8249(200004)47:4<493::AID-ANA13>3.0.CO;2-4.
- [48] T.Lee, P.Seeman, A.Rajput et al., Receptor basis for dopaminergic supersensitivity in Parkinson's disease. *Nature*. 273(1978) 59-61. doi: 10.1038/273059a0.
- [49] E.Bezard, C.E.Gross, J.M. Brotchie, Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends Neurosci*. 26(2003)

- 215-221.doi:10.1016/S0166-2236(03)00038-9.
- [50] P.Falardeau, P.J.Bédard, T. T.Di Paolo, Relation between brain dopamine loss and D2 dopamine receptor density in MPTP monkeys. *Neurosci Lett.* 86(1988) 225-229. doi:10.1016/0304-3940(88)90575-7.
- [51] C.R.Gerfen, T.M. Engber, L.C.Mahan et al., D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science.* 250(1990) 1429-1432. doi:10.1126/science.2147780..
- [52] J.H.Baik, R. Picetti, A.Saiardi et al., Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature.* 377(1995) 424-8.doi:10.1038/377424a0
- [53] L.G.Chia, D.R.Cheng, L.J.Kuo, Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 5,7-dihydroxytryptamine on the locomotor activity and striatal amine in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett.* 218(1996) 67-71. doi:10.1016/0304-3940(96)13091-3.
- [54] .Q.S.Zhang, Y.Heng, Z.Mou et al., Reassessment of subacute MPTP-treated mice as animal model of Parkinson's disease. *Acta Pharmacologica Sinica.* v (2017) 1-12. doi:16714083/17.
- [55] N.Yao, Y.Mu, Y.Zhou, L.Ju, Y.Ju et al., Lesion of the locus coeruleus aggravates dopaminergic neuron degeneration by modulation microglial function in mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1625(2015) 255-74. doi:10.1016/j.brainres.2015.08.032.
- [56] .J.Wang, H.Xu, H. Jiang et al., Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci.* 47(2011) 113-9. doi:10.1007/s12031-011-9693-1.
- [57] H.A.Rizk, M.A.Masoud, O.W.Maher. Prophylactic effects of ellagic acid and rosmarinic acid on doxorubicin-induced neurotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 12 (2017).doi:10.1002/jbt.21977.
- [58] D.G.Machado, L.E.Bettio, M.P.Cunha et al. Antidepressant-like effect of the

- extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 4(2009) 642-50.doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.03.004.
- [59] H.A.Rizk, M.A.Masoud, O.W.Maher. Prophylactic effects of ellagic acid and rosmarinic acid on doxorubicin-induced neurotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol*. 12 (2017).doi:10.1002/jbt.21977.
- [60] S. Moreno, T. Scheyer, C.S.Romano et al. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res*. 40(2006) 223-31. doi: 10.1080/10715760500473834.
- [61] .H.Raspplijazi, M.Mehdizadeh, M.Soleimani et al. The effect of rosemary extract on spatial memory, learning and antioxidant enzymes activities in the hippocampus of middle-aged rats. *Med J Islam Repub Iran*. 29(2015) 187.
- [62] D.G.Machado, L.E.Bettio, M.P.Cunha et al. Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: involvement of the monoaminergic system. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 4(2009) 642-50.doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.03.004.
- [63] J.Wang, H.Xu, H. Jiang et al., Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci*. 47(2011) 113-9. doi:10.1007/s12031-011-9693-1.
- [64] P.R.Holf, C.V.Mobbs., *Handbook of the neuroscience of aging*. Academic Press. 2010, 554.
- [65] S.J.Kish, J. Tong, O.Hornykiewicz, et al. Preferential loss of serotonin markers in caudate versus putamen in Parkinson's disease. *Brain* 131(2008) 120-13. doi:10.1093/brain/awm239.
- [66] .D.Vauzour, A.Rodriguez-Mateos,G.Corona,M.J.Oruna-Concha et al., Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* . 2(2010) 1106-1131. doi: 10.3390/nu2111106.
- [67] M.Ota,F.Yasuno, H.Ito et al., " Age-related decline of dopamine synthesis in

- the living human brain measured by positron emission tomography with L-[ $\beta$ -<sup>11</sup>C]DOPA". *Life Sciences*. 79(2006) 730-736. doi:10.1016/j.lfs.2006.02.017.
- [68] E.Wang, S.D.Snyder, *Handbook of the aging brain*. San Diego, California: Academic Press. ISBN 0-12-734610-4. OCLC 636693117.
- [69] N.P.Kedar, Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease?. *Journal of postgraduate medicine*. 49(2003) 236-245.
- [70] I.Reenila, P.Tuomainen, S.Soinila, P.T.Mannisto, Increase of catechol-O-methyltransferase activity in rat brain microglia after intrastriatal infusion of fluorocitrate, a glial toxin. *Neurosci Lett*. 230(1997) 155-8. doi:10.1016/S0304-3940(97)00502-8.
- [71] J.B.Redell, P.K.Dash. Traumatic brain injury stimulates hippocampal catechol-O-methyltransferase expression in microglia. *Neurosci Lett*. 413(2007) 36-41. doi:10.1016/j.neulet.2006.11.060.
- [72] T.Helkamaa, I.Reenila, R.K.Tuominen et al., Increased catechol-O-methyltransferase activity and protein expression in OX-42-positive cells in the substantia nigra after lipopolysaccharide microinfusion. *Neurochem Int*. 51(2007) 412-23. doi:10.1016/j.neuint.2007.04.020.

## Figure captions

Fig. 1. Experimental design: 74 C57/BL6 mice were weaned at the age of 21 days and divided into four groups : (CN) Control; (AR) Rosmarinic acid/vehicle; (MPTP) MPTP/saline; (MPTP+AR) MPTP/AR+vehicle. When animals were 90-day-old they were trained for behavioral tests. RA (or vehicle) was administered orally by intragastric gavage for 14 days in 20 mg/kg dose. Mice received intraperitoneal MPTP (30 mg/kg) treatment once daily for 5 days (Days 4-8). Animals were allowed to rest for 72h prior to motor function assessment. Animals were tested for motor behavioral tests as described in Materials and Methods section. The striatum was dissected for gene expression analysis and biochemical assay. At the end, statistical analysis of the data was performed.

Fig. 2. Effect of RA treatment on locomotor activity assessed in Open Field paradigm. (CN n=7); (AR n=7); (MPTP n=8); (MPTP+AR n=7). All results were subjected to one-way analyses of variance with Bonferroni post hoc analyses . Data is expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $p$ <0.05).

Fig. 3. Effect of RA treatment on grip strength assessed in Grip Test paradigm. (CN n=11); (AR n=10); (MPTP n=11); (MPTP+AR n=9). All results were subjected to one-way analyses of variance with Bonferroni post hoc analyses . Data is expressed as mean  $\pm$  SEM.

Fig. 4. Effect of RA treatment on bradykinesia assessed in Pole test. (CN n=8); (AR n=7); (MPTP n=7); (MPTP+AR n=5). All results were subjected to one-way analyses of variance with Bonferroni post hoc analyses . Data is expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $p$ <0.05).

Fig. 5. Effect of RA treatment on motor coordination assessed in Rotarod. (CN n=7); (AR n=10); (MPTP n=8); (MPTP+AR n=5). All results were subjected to one-way analyses of variance with Bonferroni post hoc analyses. Data is expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $p$ <0.05).

Fig. 6. Striatal DA content in mice treated with MPTP and RA (A) and its metabolite DOPAC (B) and HVA (C) and DA metabolism (D-E). All results were subjected to one-way analyses of variance with Bonferroni post hoc analyses . Data is expressed as mean  $\pm$  SEM (\* $p$ <0.05, \*\*  $p$  <0.01, \*\*\*  $p$ <0,001, \*\*\*\* $p$ ,0.0001).

Fig. 7. Striatal 5-HT content in mice treated with MPTP and RA (A) and its metabolite 5-HIAA (B). All results were subjected to one-way analyses of variance with Bonferroni post hoc analyses . Data is expressed as mean  $\pm$  SEM ( \*\*  $p$  <0.01, \*\*\*  $p$ <0,001, \*\*\*\* $p$ ,0.0001).

Fig. 8. Effect of treatment with MPTP and RA on the expression of genes involved in DA neurotransmission. COM-T (A) MAO-A (A), D1R (C), D2R (D). mRNA were normalized with  $\beta$ -actin. All results were subjected to one-way analyses of variance with Bonferroni post hoc analyses . Data is expressed as mean  $\pm$  SEM ( \*\*  $p$  <0.01, \*\*\*  $p$ <0,001, \*\*\*\* $p$ ,0.0001).

Table 1: Primers used in qPCR.

Gene	Primer sequence	Amplicon length (bp)	Target sequence
$\beta$ Actin	F: GGAATCCTGTGGCATCCATGA R: ATGCCTGGGTACATGGTGGTA	122	NM_007393.5
MAO-A	F: CTGTATGGAAGGGTGATTCGG R:AGGTGTGGGTAATTTCAAGAGC	217	NM_173740.3
COM-T	F:CGAGGGGATGAGAGAGTCCTA R: AGACAGCAGCCAACAGCATT	126	NM_010277.3
D1R	F:CTCAAGGAAGACTGTGCTATGG G:CCAAGAACGTGAGGGGCTAAG	120	NM_001291801.1
D2R	F:TGAGGATGCGAAAGGAGAAG G:GAGCCAACCTGAAGACACC	158	NM_010077.2

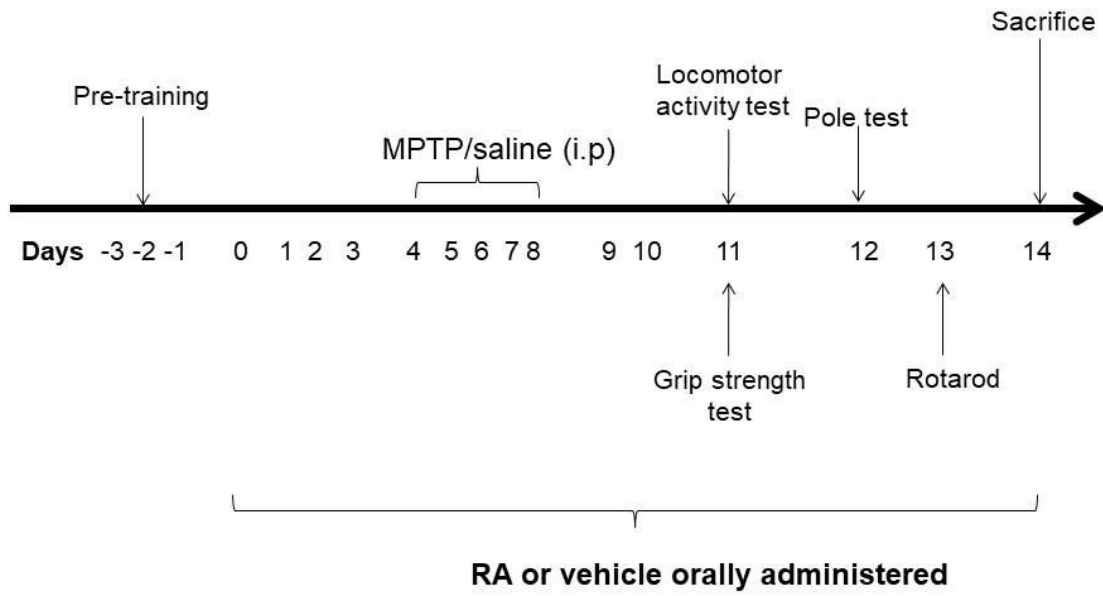


Figure 1



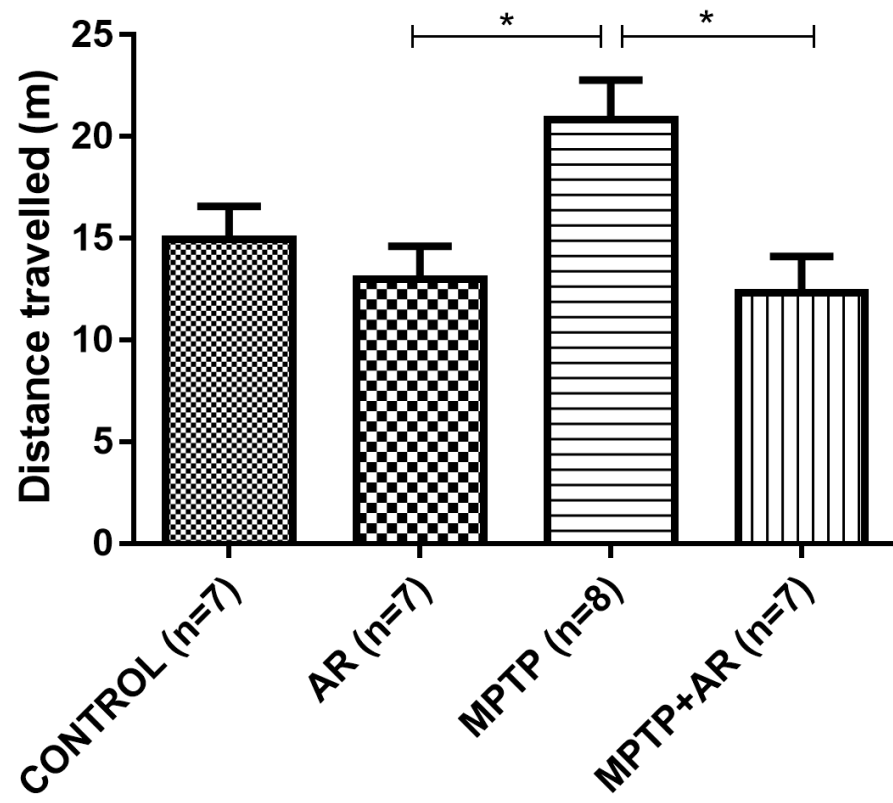


Figure 2

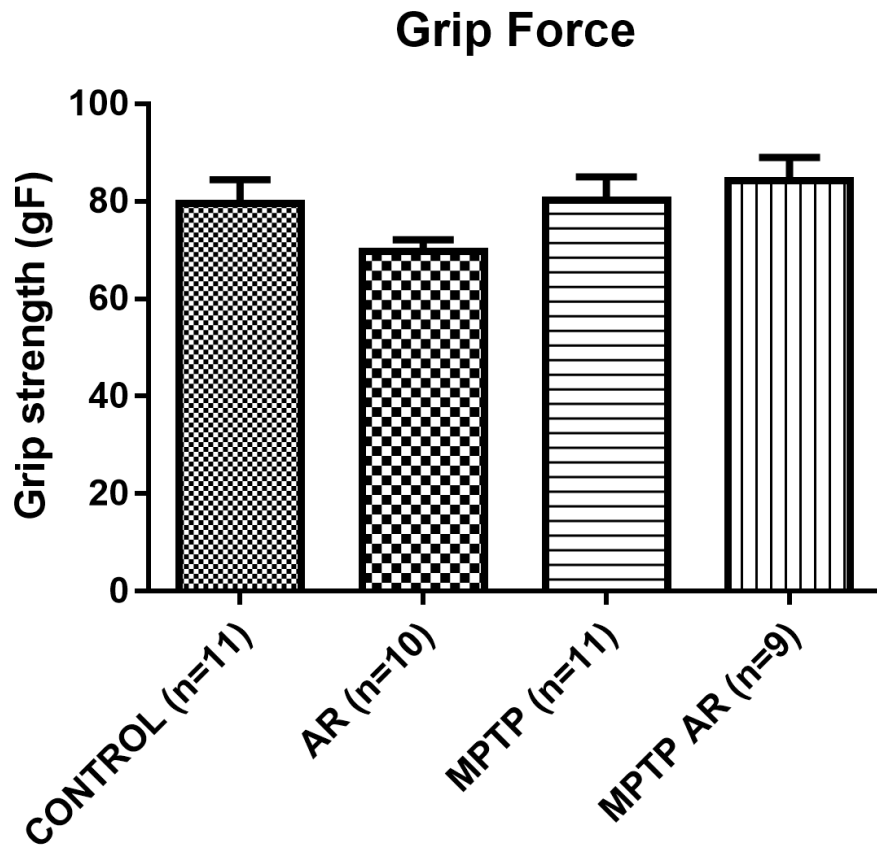


Figure 3

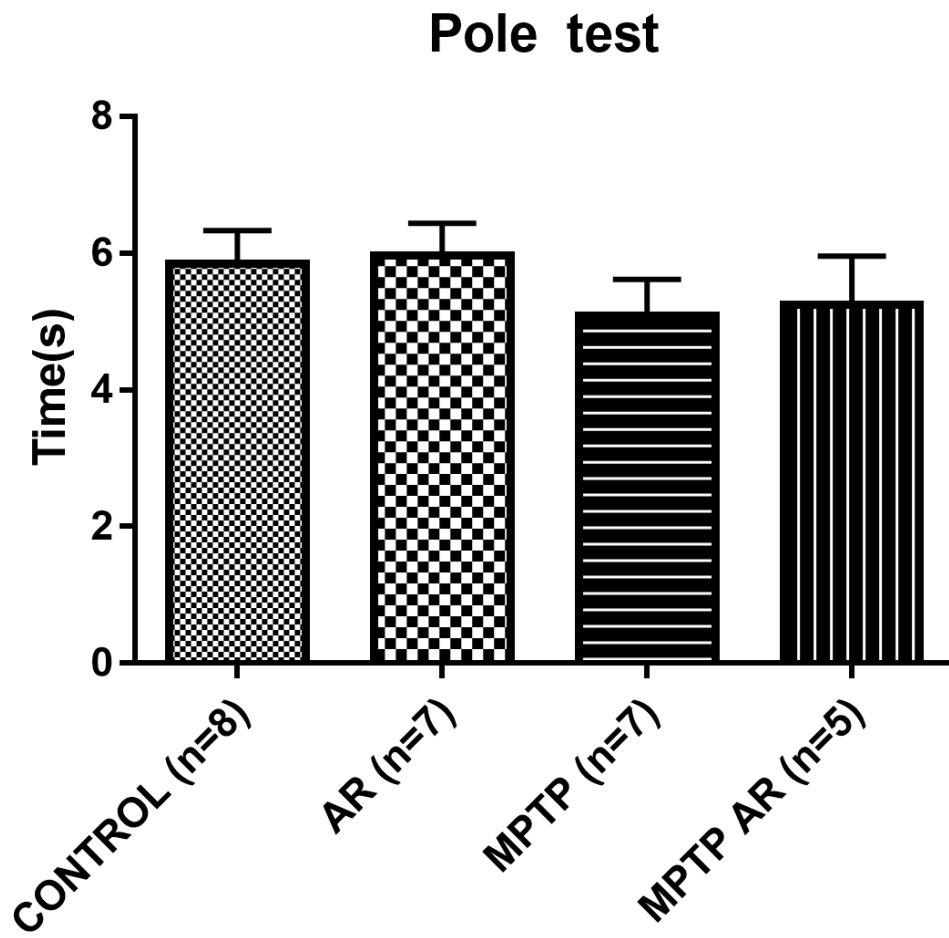


Figure 4

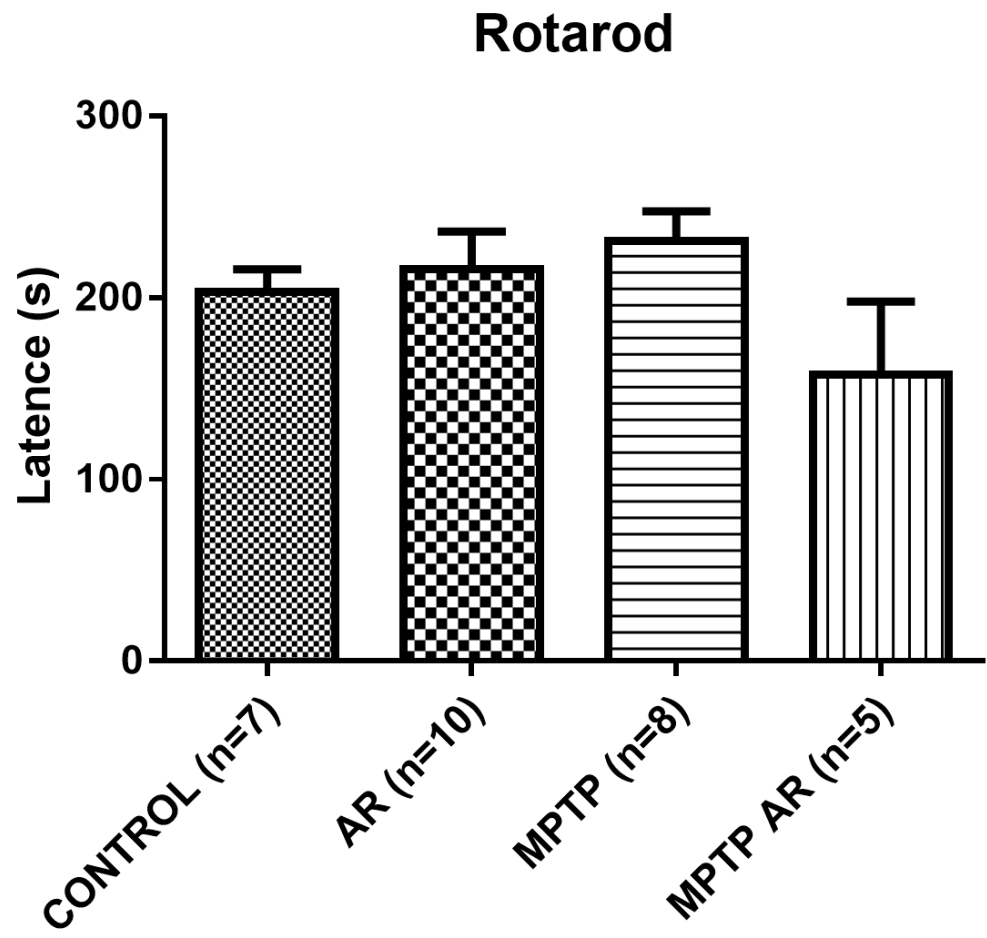


Figure 5

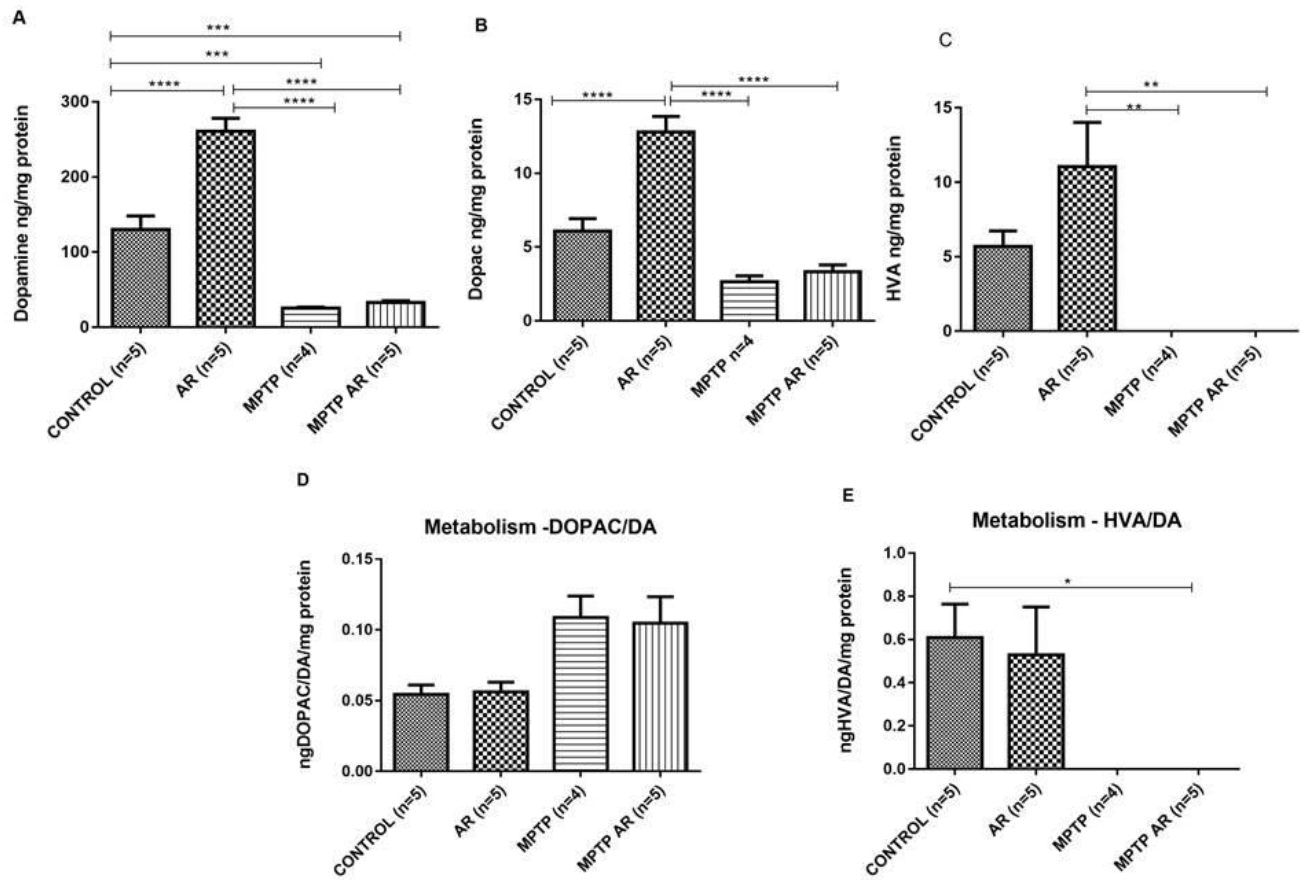


Figure 6

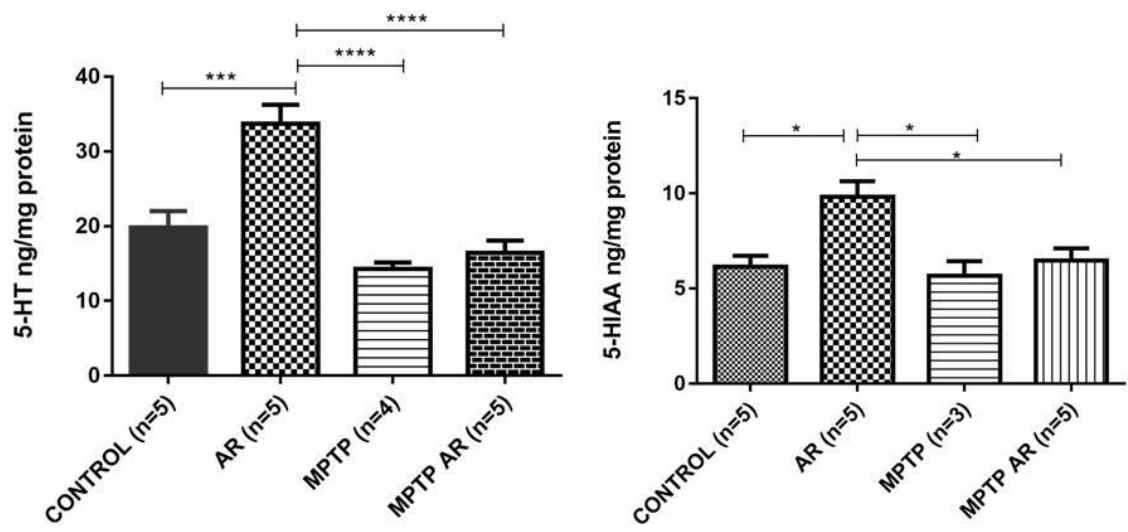


Figure 7

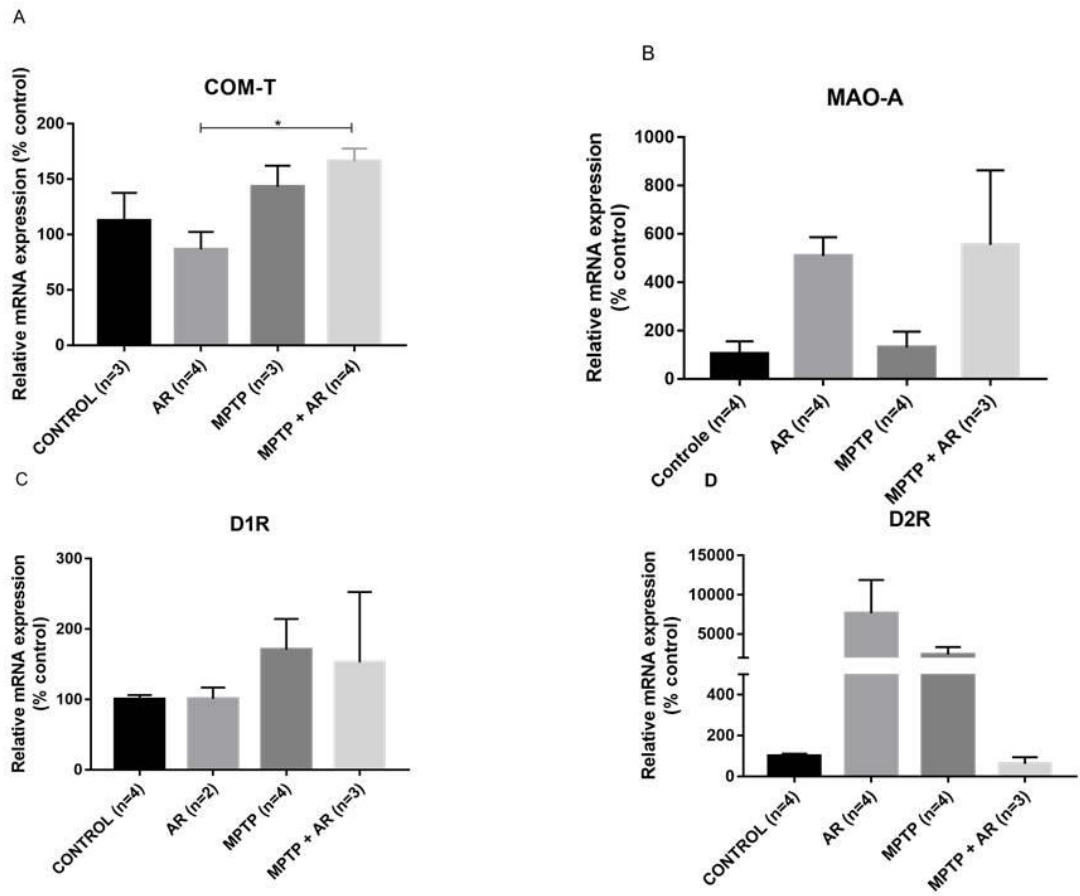


Figure 8

