



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À
SAÚDE

RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA

Estudo da associação de óleo essencial e levodopa como uma
alternativa para o tratamento da doença de Parkinson utilizando
zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal

RECIFE
2022

RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA

Estudo da associação de óleo essencial e levodopa como uma alternativa para o tratamento da doença de Parkinson utilizando *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo animal

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena

RECIFE
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Renatta Priscilla Ferreira

Estudo da associação de óleo essencial e levodopa como uma alternativa para o tratamento da doença de Parkinson utilizando zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal / Renatta Priscilla Ferreira Silva– 2022.

50 f. : il., fig., tab.

Orientador: Pabyton Gonçalves Cadena

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde.

1. Doença de Parkinson. 2. *Danio rerio*. 3. Rotenona. 4. Levodopa. 5. *Piper nigrum*.

616.833

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -065

RENATTA PRISCILLA FERREIRA SILVA

Estudo da associação de óleo essencial e levodopa como uma alternativa para o tratamento da doença de Parkinson utilizando *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo animal

Data de apresentação: 24/02/2022

Renatta Priscilla Ferreira Silva

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pabyton Gonçalves Cadena (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza
Departamento de Biologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Profa. Dra. Marília Ribeiro Sales Cadena
Departamento de Biologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico

À Deus, minha mãe e ao meu pai (*in memoriam*)
por todo apoio, cuidado e amor por mim nessa
trajetória.

AGRADECIMENTOS

Diante de tudo que enfrentei nesse mestrado, e posso dizer com plena convicção que não foi fácil, principalmente quando uma das maiores dificuldades se trata da perda de um pai, quero agradecer imensamente a Deus, por ter estado comigo e não ter permitido jamais que eu desistisse dos meus objetivos se fazendo luz para guiar os meus caminhos, decisões e minha vida.

Serei eternamente grata aos meus pais Lienaldo e Maria, por todo amor que me proporcionaram através dos ensinamentos, reclamações, incentivos e sermões, sobretudo pelo carinho, que foram e são partes importantes da minha formação.

Ao Professor Pabyton, meu orientador, sempre presente, disposto a nos ajudar, orientar, sanar todas as nossas dúvidas e responder nossas perguntas. Aos meus colegas do LECA, em especial, André, Renata, Letícia e Jadson.

A instituição Universidade Federal Rural de Pernambuco e Universidade Federal de Pernambuco pelas experiências e gerando momentos importantes para minha vida profissional, acadêmica e pessoal.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e aos convidados para banca examinadora do meu trabalho.

E finalmente a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram e encorajaram a lutar e superar mais uma etapa da minha vida, meu muito obrigada!

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade
e a energia atômica: a vontade.”

Albert Einstein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ação da toxicidade induzida pela rotenona em neurônios dopaminérgicos.

Figura 2 – *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Figura 3 - Aquários de reprodução para *zebrafish* (Zebclean, Alesco).

Figura 4 – Porcentagem de eclosão com 72 e 96 hpf de *zebrafish* expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*.

Figura 5 – Porcentagem de animais afetados com 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) hpf expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*.

Figura 6 – Porcentagem da resposta comportamental dos *zebrafish* com 144 hpf expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*, que exibiram Tigmotaxia (A) e Sensibilidade ao toque (B).

Figura 7 – Porcentagem do total da Resposta Optomotora no Tempo Inicial (TI), Tempo Médio (TM) e Tempo Final (TF) das larvas de *zebrafish* com 144 hpf expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*.

Figura 8 – Porcentagem do total da Resposta Optomotora no Tempo Inicial (TI), Tempo Médio (TM) e Tempo Final (TF) das larvas de *zebrafish* com 144 hpf expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*.

Figura 9 – Regiões medidas na morfometria da cabeça dos embriões de *Danio rerio*: comprimento da cabeça (CC), distância entre os olhos (DO), comprimento do olho (CO) e largura da cabeça (LCab).

Figura 10 – Regiões medidas na morfometria lateral dos embriões de *Danio rerio*: comprimento do olho (CO), comprimento da traseira (CT), comprimento da traseira/ânus (CTA), comprimento total (CT) e largura da cauda (LC).

Figura 11 - Regiões da morfometria lateral dos embriões de *Danio rerio*: comprimento do olho (CO), comprimento da traseira (CT), comprimento da traseira/ânus (CTA), comprimento total (CT) e largura da cauda (LC).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações dos compostos individuais e suas misturas usadas para avaliação da proteção contra os efeitos tóxicos da exposição à rotenona usando o modelo de embriões de *zebrafish* Parkinson-like.

Tabelas 2 e 3 - Análises morfométricas das regiões da cabeça e lateral das larvas de *zebrafish* com 144 hpf expostas à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP - Doença de Parkinson
DA – Doença de Alzheimer
ROT - rotenona
L-DOPA - L-3,4-dihidroxi-fenilalanina
PN – *Piper nigrum*
OE – óleo essencial
OEs – óleos essenciais
6-OHDA - 6-hidroxi-dopamina
ANOVA -Análise de variância
DMSO - dimetil-sulfóxido
CEUA - Comissão de ética no uso de animais
Ad - Atraso no desenvolvimento
Rp - redução na pigmentação
As - ausência de somitos
Ep - edema de pericárdio
Esv - edema de saco vitelínico
Ac - área de coagulação
Dco - deformação de coluna
Dca - deformação de cauda
Mo - malformação dos olhos
Aib - ausência de inflação da bexiga natatória
CC - comprimento da cabeça
DO - distância entre os olhos
CO - comprimento do olho
LCab - largura da cabeça
CO - comprimento do olho
CTr - comprimento da traseira
CTA - comprimento da traseira/ânus
CTo - comprimento total
LC - largura da cauda
OMR – resposta optomora
TH – teste de tigmotaxia
TS – teste de sensibilidade ao toque
TI -Tempo Inicial

TM -Tempo Médio

TF - Tempo Final

MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum entre pessoas idosas, causa uma perda das funções motoras, fisiológicas e cognitivas. A rotenona (ROT), é uma molécula orgânica que em excesso degenera neurônios dopaminérgicos induzindo sua morte e deformando corpúsculos de *Lewy*. Esse pesticida é um protótipo de toxina exógena capaz de induzir atributos clínicos de *Parkinson-like* em modelo animal. Convencionalmente a levodopa (L-DOPA) é utilizada para o do Parkinson, mas, o uso a longo prazo causa efeitos adversos. Diante disso, buscam-se alternativas terapêuticas para o tratamento através da introdução de bioprodutos de origem vegetal. Logo, nosso estudo avaliou a associação de *Piper nigrum* (PN) e L-DOPA como uma alternativa para o tratamento do *Parkinson-like* em modelo experimental de embriões de *Danio rerio*. A manutenção dos animais, obtenção dos ovos e experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais. Utilizamos 16 grupos experimentais (5 repetições x 15 animais por pote): grupo controle de DMSO (0,1%); ROT (11,250 µg/L); L-DOPA + ROT (diferentes concentrações de L-DOPA: 0,125; 0,250; 0,500 e 0,750 mM); PN + ROT (diferentes concentrações de PN: 1,250; 2,500; 5,000 e 7,500 µg/mL); L-DOPA + PN + ROT (diferentes concentrações de L-DOPA + PN: 0,250 M + 2,500 µg/mL e 0,500 M + 5,000 µg/mL) e grupos L-DOPA e PN (1,000 mM e 10,000 µg/mL) de forma isolada durante 2 até 144 horas pós-fertilização (hpf). Avaliamos: taxa de eclosão, efeitos teratogênicos, mortalidade, sobrevivência, testes comportamentais e morfometria. Os resultados mostraram que ROT é tóxica, os animais expostos apresentaram atraso na eclosão, efeitos teratogênicos e comportamentais. L-DOPA não é tóxica, porém, apenas em maiores concentrações conseguiu proteger parcialmente os animais contra a ação da ROT. PN em baixas concentrações protegeu os animais contra ROT, entretanto, em maiores concentrações mostrou-se tóxica e provocou atraso na eclosão, efeitos teratogênicos e mortalidade dos animais. L-DOPA e PN isolados não foram tóxicos em nenhum dos parâmetros avaliados, mas, os animais expostos ao grupo contendo a mistura das três substâncias não apresentou eclosão indicando que a mistura entre L-DOPA e PN pode exercer toxicidade. Isso nos direciona a testar outros compostos que reduzam a toxicidade de ROT reduzindo os sintomas de *Parkinson-like* e nos dá a oportunidade de identificar novas estratégias terapêuticas ou de prevenção para DP.

Palavras- chave: Doença de Parkinson, *Danio rerio*, rotenona, levodopa, *Piper nigrum*

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease among older people, causing a loss of motor, physiological and cognitive functions. Rotenone (ROT), is an organic molecule that in excess, degenerates dopaminergic neurons inducing their death and deforming Lewy corpuscles. This pesticide is a prototype of an exogenous toxin capable of inducing Parkinson-like clinical attributes in an animal model. Conventionally levodopa (L-DOPA) was used for the treatment, but the use in the long-term caused adverse effects. Therefore, therapeutic alternatives for treatment are proposed by the introduction of bioproducts of plant origin. Therefore, our study evaluated the association of *Piper nigrum* (PN) and L-DOPA as an alternative for Parkinson-like treatment in an experimental model of embryos of *Danio rerio*. The maintenance of animals, obtaining the eggs, and experiments were carried out in the *Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal* of the *Universidade Federal Rural de Pernambuco* and approved by the Ethics Committee in the Use of Animals. We used 16 experimental groups (5 replicates x 15 animals per chamber): Control group of DMSO (0.1%); ROT (11.250 µg/L); L-DOPA + ROT (different concentrations of L-DOPA: 0.125; 0.250; 0.500 and 0.750 mM); PN + ROT (different concentrations of PN: 1.250; 2.500; 5.000 and 7.500 µg/mL); L-DOPA + PN + ROT (different concentrations of L-DOPA and PN: 0.250 M + 2.500 µg/mL and 0.500 M + 5.000 µg/mL) and groups containing L-DOPA and PN (1.000 mM and 10.000 µg/mL) in isolation for 2 to 144 hours post-fertilization (hpf). We evaluated: Hatching rate, teratogenic effects, mortality, survival, behavioral tests, and morphometry. The results showed that ROT is toxic, exposed animals showed hatching delay and teratogenic and behavioral defects. L-DOPA is not toxic, however, only at higher concentrations was it able to partially protect the animals against the action of ROT. PN at low concentrations protected the animals against ROT, however, at higher concentrations, showed toxicity and caused a delay in hatching, teratogenic effects, and mortality of animals. L-DOPA and PN isolates were not toxic in any of the parameters evaluated, but in animals exposed to the mixture of the three compounds, there was no hatching, indicating that the mixture between L-DOPA and PN may exert toxicity. This leads us to test other compounds that reduce ROT toxicity reducing Parkinson's-like symptoms and allows us to identify new therapeutic or prevention strategies for PD.

Keywords: Parkinson's disease, *Danio rerio*, rotenone, levodopa, *Piper nigrum*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3	OBJETIVOS	25
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
5	RESULTADOS	30
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO.....	42
8	REFERÊNCIAS.....	43
9	ANEXOS	50

1 INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é mundialmente considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum entre pessoas com idade acima dos 60 anos, afetando assim, cerca de 1-2% da população no mundo (ÜNAL; EMEKLI-ALTURFAN, 2019). Esse tipo de doença causa em seus pacientes a degeneração progressiva e irreversível de células do sistema nervoso central (SNC), provocando assim, uma perda gradativa das funções motoras e fisiológicas, bem como na capacidade cognitiva (PRZEDBORSKI et al., 2003).

A DP é considerada neurodegenerativa e irreversível justamente porque é caracterizada pela degeneração gradativa de neurônios dopaminérgicos em uma região compacta da substância negra, além disso, nota-se também um acúmulo de Corpos de *Lewy* causando demência (GAO; WU, 2016). Atualmente os medicamentos utilizados no tratamento da DP têm por objetivo estimular o aumento da neurotransmissão dopaminérgica, uma vez que isso ameniza a sintomatologia motora, porém nenhum fármaco é capaz de tratar totalmente a doença (KALIA; LANG, 2015).

Como exemplo de fármaco usado na terapêutica da DP, podemos citar a levodopa (L-DOPA), considerada um precursor direto da dopamina. Por outro lado, o seu uso em longo prazo causa em alguns pacientes efeitos colaterais como complicações motoras e discinésia induzida, por exemplo (LIU et al., 2019). Contudo, para neutralizar os efeitos adversos causados pela L-DOPA, existe a necessidade de novas alternativas terapêuticas que possam reduzir as doses da L-DOPA sem afetar os resultados de pacientes com DP, bem como minimizando assim seus efeitos motores e cognitivos (NASKAR et al., 2015).

Em face do exposto, com o aumento de casos de doenças do sistema nervoso existe a busca por alternativas terapêuticas através de pesquisas na área fitoterápica, eficientes na modificação do quadro evolutivo de doenças como a DP (RABIEI; SOLATI; AMINI-KHOEI, 2019; AMRO et al., 2018). Nascimento et al., (2020) apontaram o crescente e importante papel dos bioprodutos de origem natural, constituídos a base de metabólitos secundários de origem vegetal, isso justifica o fato da utilização de produtos naturais estarem ganhando destaque como alternativas farmacológicas, como por exemplo, os óleos essenciais (OEs). De acordo com a literatura (GUPTA et al., 2016; SABINA et al., 2011; SELVENDIRAN et al., 2003), um óleo essencial (OE) de odor muito forte com potencial terapêutico é o óleo de pimenta do reino (*Piper nigrum*). Esses estudos foram realizados em animais e evidenciaram que *P. nigrum* possui um princípio ativo conhecido como piperina. Esse alcaloide pode ser eficiente na terapêutica de respostas inflamatórias e tratamento de doenças neurodegenerativas, por exemplo, a DA (CHEN et al., 2022). Sendo assim, observamos a necessidade de testar novas

alternativas para o tratamento da DP, utilizando um modelo animal convencional, uma vez que as terapêuticas tradicionais causam muitos efeitos colaterais em seus pacientes.

Adicionalmente, um dos modelos animais que simulam a DP é o *Danio rerio* (zebrafish), pois se adequa a ensaios *in vivo* em larga escala, devido ao seu pequeno tamanho e rápida reprodução. Isso pode ser visto no trabalho de Khotimah et al., (2015), que propõe o zebrafish como modelo animal de DP induzido por rotenona. Assim, poderemos usar este modelo para avaliarmos parâmetros comportamentais, locomotores e fisiológicos através da sua exposição à rotenona e trata-los com L-DOPA e óleo essencial de *P. nigrum* em diferentes concentrações. Como outras vantagens, a indução da DP em zebrafish, bem como a administração dos fármacos são facilitadas através do meio aquoso por meio da imersão do animal em soluções contendo o fármaco. Com isso, a eficácia, biodisponibilidade e toxicidade podem ser prontamente determinadas. A transparência óptica é outra vantagem deste teleósteo, pois possibilita a observação direta de processos celulares e fisiológicos *in vivo* e em tempo real (VAZ et al., 2020).

Assim, o presente estudo propõe a avaliação do potencial terapêutico do óleo essencial de *P. nigrum* associado a L-DOPA, bem como de forma isolada, para o tratamento de embriões de *Danio rerio* com sintomas de Parkinson-like induzidos por rotenona. Em nosso estudo foram avaliados parâmetros como sobrevivência, taxa de eclosão, efeitos teratogênicos, morfometria, testes comportamentais/ motores dos animais afetados e tratados, a fim de saber se o processo terapêutico realizado com o método convencionalmente utilizado, bem como com o óleo de *P. nigrum*, é capaz de tratar os animais e reduzir a quantidade de efeitos induzidos pela DP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Doença de Parkinson: histórico e epidemiologia

A doença de Parkinson (DP) foi reconhecida no século XIX, no ano de 1817 por James Parkinson, um farmacêutico e cirurgião inglês. Posteriormente, Jean Martin Charcot, neurofisiologista, apontou as principais características dessa doença nomeando-a de: "*maladie de Parkinson*" ou mal de Parkinson (OBESO et al., 2017).

A DP é considerada uma desordem neurológica causada pela degeneração progressiva e irreversível de células do sistema nervoso central (SNC). Seus sintomas são caracterizados por prejuízos nas funções motoras, fisiológicas, e cognitivas, mais precisamente bradicinesia, tremor, rigidez e instabilidade de postura. Os sintomas citados são provenientes da degradação de neurônios dopaminérgicos, o que implica na ativação de células da glia, conseqüentemente isso ocasiona a sintetização e segregação de intercessores inflamatórios e agentes reativos, levando assim, a morte de neurônios dopaminérgicos saudáveis (SILVA et al., 2021).

A primeira doença neurodegenerativa mais frequente é a Doença de Alzheimer, em segundo lugar temos a DP, um distúrbio silencioso distribuído de maneira semelhante em diversas etnias (ÜNAL; EMEKLI - ALTURFAN, 2019). Cerca de 1-3% da população com idade acima dos 65 anos é acometida pela DP e muitas vezes há uma predominância em indivíduos do sexo masculino (ROSSI et al., 2018). Existe uma certa carência com relação aos dados epidemiológicos sobre a DP no Brasil. Isso nos faz concluir que não há subsídios suficientes para elaborarmos de forma concisa e fidedigna parâmetros informativos adequados em nosso país sobre a prevalência desta doença. A pirâmide etária brasileira vem sofrendo modificações, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o que vem sendo observado é um aumento significativo na expectativa de vida da população, o que corrobora com o acréscimo no número de portadores da DP (TYSNES; STORSTEIN, 2017).

A DP é uma desordem neurológica que acomete preferencialmente pessoas com idades acima dos 50-60 anos, em ambos os sexos, é uma doença que está relacionada com o avanço da idade e existe uma maior proporção do sexo masculino, de 3:2. Em 2004 os dados epidemiológicos mostraram que 4 milhões de pessoas estavam acometidas com a DP, e diante disso estima-se que por volta da década de 2030, o dobro de pessoas faça parte do quadro de pacientes com essa desordem neural (PINHEIRO; BARBOSA, 2018).

A estimativa no Brasil é que 220 mil pessoas são portadoras da DP, a prevalência etária entre habitantes com 60 e 69 anos é de 7 para 1000. Entre a faixa etária de 70 e 79 anos, a taxa de acometimento é de 15 para cada 1000 indivíduos. Apesar disso, computa-se que podem vir a surgir todos os anos cerca de 36 mil novos casos, com maior prevalência ao sexo masculino (BOVOLenta; FELÍCIO, 2016; TYSNES; STORSTEIN, 2017).

2.2. Fisiopatologia e etiologia

Atualmente há conhecimento de 26 polimorfismos que podem ou não ser causadores do desenvolvimento da DP; é importante sabermos essa informação pois a mesma poderá futuramente auxiliar em estudos mais aprofundados sobre a DP e seu desenvolvimento. Vale salientar que a DP pode ser ocasionada por fatores externos, relação gene-ambiente, mutações genéticas, toxicidade proveniente de algum agente que entre em contato com o paciente acometido, enfim, várias são as hipóteses, mas nada é concreto ao ponto de ser utilizado como um motivo exato para o aparecimento e desenvolvimento progressivo da doença (IBANEZ et al., 2017).

De acordo com dados epidemiológicos, aproximadamente 10% dos casos de DP provêm de mutações herdadas (hereditariedade), ou seja, susceptibilidade genética e também por fatores ambientais e mutações em múltiplos genes. Existem alguns genes mais comuns envolvidos como: LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2) e SNCA (alfa-sinucleína) em situações

transmitidas com padrões de herança autossômica dominante, os genes Parkina, PINK1 (PTEN induced putative kinase 1) e DJ-1 (Protein deglycase DJ-1) em padrões de herança autossômicos recessivos (BALL et al., 2019). Os genes mencionados podem ser causadores de várias outras comorbidades, mas há alguns em específico que estão ligados apenas ao desenvolvimento da DP. O *GBA*, por exemplo, é o principal agente causador da doença de Gaucher quando em homozigose, em heterozigose, há cinco vezes mais chances de desenvolvimento da DP (KALIA et al., 2016).

Em contrapartida, aproximadamente 90% dos casos são ditos como idiopáticos e ligados a fatores externos, esses fatores acabam por sua vez interagindo com genes específicos de cada paciente e ocasionando o aparecimento da DP (BALL et al., 2019). Bioquimicamente falando, um paciente com DP, possui a formação de complexos proteicos denominados de corpos de *Lewy* (CL), formados principalmente por alfa-sinucleína (SILVA et al., 2021). Os corpos de *Lewy* são encontrados quando acontece a perda das funções ou morte neural em várias áreas cerebrais, bem como no sistema nervoso entérico (BALESTRINO et al., 2019). Neurônios dopaminérgicos são os principais responsáveis pela liberação de dopamina no nosso sistema nervoso central (SNC). Logo, a morte de neurônios dopaminérgicos acontece especialmente na substância *nigra*. Mou et al., (2020) relataram que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos pode ser causada por estresse oxidativo, fruto da própria dopamina e da sua metabolização. Outro fator ligado a degeneração neuronal são as atividades executadas pela dopamina que tendem a aumentar os níveis de cálcio intracelular ocasionando assim uma forma de estresse oxidativo.

Embora a etiologia da DP esteja direcionada a fatores ambientais, tóxicos e genéticos, esses fatores separadamente ou em conjunto ocasionam lesões por estresse oxidativo e conseqüentemente morte neuronal devido a neuroinflamação. É interessante saber que a neuroinflamação acontece por excesso de ferro e da alfa-sinucleína nos núcleos da base, influxo de cálcio e glutamato em neurônios dopaminérgicos, e atividade intensa das células da glia e agentes provenientes da morte neuronal (PANG et al., 2019). Essas lesões acontecem especificamente no complexo I mitocondrial, debilitando assim as atividades da cadeia respiratória e produzindo estresse oxidativo já mencionado anteriormente, gerando assim, prejuízos à molécula de DNA dessas células, ao seu componente lipídico e também a proteínas como alfa-sinucleína (RANI et al., 2020).

Toda proteína ao ter sua estrutura conformacional alterada perde sua funcionalidade. Com a alfa-sinucleína não seria diferente, a mesma passa a ser insolúvel e suas moléculas formam um complexo de CL (corpúsculos de *Lewy*) (THAKUR et al., 2019). Esses agregados proteicos e insolúveis são tóxicos e são umas das causas do processo de morte celular, além disso são

transmitidos de uma célula para outra através de uma espécie de propagação, semelhante a um príon (MA et al., 2019). Essa propagação entre as células é justamente o que vai dando origem a neurodegeneração, pois atinge regiões cerebrais específicas e assim promove o surgimento dos primeiros sintomas não motores da DP. Como descrito pela literatura há muitos anos, sabe-se que a DP é uma desordem neurológica de caráter progressivo, e segundo a hipótese de Braak et al., (2008), as irregularidades iniciais que acometem a alfa-sinucleína e alteram sua conformação original ocorre fora dos núcleos de base, iniciando-se ou pelo sistema nervoso entérico ou pelo bulbo olfatório (MA et al., 2019).

2.3. Diagnóstico e manifestações clínicas

A relação entre os fatores citados em um paciente com DP há anos tem sido estudada, pois sabe-se que pacientes acometidos com a doença passam a ter limitações e déficits que interferem diretamente na sua independência e funcionamento desses fatores comprometendo assim sua qualidade de vida (MONTEIRO et al., 2017). As limitações mais conhecidas que acometem pacientes com a DP são: problemas na regulação espaço-temporal, complicações na postura e sua funcionalidade, passadas de comprimento pequeno e em maior número e algumas vezes mais rápida, maior tempo do duplo apoio dos pés no chão e maior variabilidade dos parâmetros espaço-temporais em relação aos indivíduos saudáveis (MONTEIRO et al., 2017).

Estudos recentes realizaram uma revisão sistemática sobre as características da marcha e das quedas na DP. Através de metanálise foi possível verificar que sujeitos com DP possuem uma velocidade de caminhada menor, com ritmo reduzido e passos menores com movimentos mediolaterais da cabeça e da pelve. Pacientes com quadro motor nesse estágio são mais vulneráveis a significativo risco de quedas futuras (CREABY E COLE, 2018). Uma boa base para respostas motoras apropriadas aos desafios ambientais está relacionada com o bom funcionamento do controle postural. Este por sua vez depende do adequado processamento de informações sensoriais convergentes, entradas vestibulares, proprioceptivas, visuais e auditivas (BARONE et al., 2016). Como relata a literatura, a verticalidade é um fator crucial para manutenção de uma boa postura e estudos demonstram que a percepção subjetiva da verticalidade é afetada em casos de DP, sejam estes em escalas iniciais ou avançadas (SCHINDLBECK et al., 2018).

2.4. Tratamento da doença de Parkinson

O quadro progressivo da DP e suas características clínicas (motoras e não motoras), pertinentes a implicações colaterais precoces e demorados da influência terapêutica, tornam o processo de tratamento da doença muito complicado. Sabe-se que a DP é uma desordem progressiva causada pela degeneração de neurônios dopaminérgicos situados em uma região chamada substância negra. Por conseguinte, ao passar dos anos, os medicamentos utilizados

convencionalmente não apresentam uma condição de resposta favorável, uma vez que, ao progresso da doença vai acontecendo e esses fármacos vão se tornando ineficientes, conseqüentemente o quadro sintomatológico se agrava e a partir daí a necessidade pelo uso de medicamentos cresce. Assim, o tratamento da DP necessita focar na redução da progressão da doença (neuroproteção) bem como no controle dos sintomas (tratamento sintomático). Para isso, a levodopa (L-DOPA) vem sendo utilizada convencionalmente no processo terapêutico, embora seu efeito não seja permanente, e sim paliativo (SILVA et al., 2021).

O tratamento feito com os medicamentos convencionais da DP já não mostra tanta eficácia, pois funcionam como paliativos, uma vez que, reduzem a severidade sintomatológica, restituindo os níveis de dopamina, mas não cessam o processo de neurodegeneração. Atualmente a terapêutica é realizada com anticolinérgicos, agonistas de receptores dopaminérgicos, inibidores da monoamina oxidase (MAO), L- dihidroxifenilalanina (L-DOPA), procedimentos cirúrgicos e terapias. Porém esses procedimentos não inibem a degeneração neuronal ou impedem o progresso da enfermidade, agem apenas como anódinos para sintomas motores durante um intervalo curto de tempo (SILVA et al., 2021).

Conhecida desde meados do século XX, L-DOPA começou realmente a receber atenção máxima após a haver a descoberta em 1938 que uma determinada enzima, a dopa-decarboxilase (presente no cérebro de mamíferos), transformava a L-DOPA em dopamina, e esta dopamina é justamente o que encontramos no cérebro humano. Naquela época, ainda era desconhecida a informação de que a dopamina era um neurotransmissor e conseqüentemente, alguns estudiosos apostavam na ideia de que a mesma estaria envolvida no processo metabólico das catecolaminas, apenas. A L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) ou L-DOPA, como também podemos chamar é uma interessante e potente fonte terapêutica antiparkinsoniana. Quando descoberta, este fármaco provou que sua eficácia terapêutica foi decorrente de um conjunto importante de eventos. Acreditando-se assim, que talvez a mesma não inibisse os sinais progressivos da DP (FAHN et al., 2008).

Sendo assim, diante dessas e de outras tentativas, a neuroproteção na doença de Parkinson ainda é algo que não foi alcançada através da recomendação desses e de outros medicamentos na prática clínica. Diante dessa realidade, estudos vêm sendo realizados de forma intensa no objetivo de ampliar esse leque de possibilidades no tratamento da DP, através da introdução de modelos experimentais, assim como a busca por compostos inovadores com a capacidade terapêutica de promover neuroproteção na DP e inibir a desordem neural provocada pela mesma.

2.5 Modelo experimental da doença de Parkinson induzida por rotenona

A rotenona é um pesticida adquirido através das raízes e talos de plantas leguminosas provenientes de regiões tropicais (HISATA, 2002). Essa molécula orgânica de origem natural, é identificada como uma toxina com propriedades lipofílicas e facilidade de ser absorvida por membranas celulares. Além disso, atua também como inibidora do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Essa inibição implica na perda das funções mitocondriais resultando no desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além da redução de ATP e morte celular, a Figura 1 mostra a ação da toxicidade induzidos pela rotenona em neurônios dopaminérgicos. Esse pesticida também é eficiente na indução e ativação de agentes contribuintes para o processo de apoptose, resultando da formação de corpúsculos de *Lewy* (TERRON et al., 2018). Evidenciando a importância direta com DP em humanos, protocolos experimentais vêm sendo empregados com intuito de solucionar o quadro sintomatológico progressivo da doença. A rotenona, uma molécula orgânica de origem natural, é um modelo protótipo de uma toxina exógena que quando utilizada de forma desordenada apresenta características clínicas e patológicas da DP em modelos animais utilizados, segundo estudo realizado por Dal Santo et al., (2021).

Dentre as diversas ações exercidas pela rotenona, esta também tem capacidade de promover a ativação de mecanismos de apoptose, bem como a formação de corpúsculos de *Lewy*, agentes cruciais da DP. Assim, Zeng et al., (2018) retrataram que esse pesticida orgânico, quando administrado de maneira recorrente, promove a degeneração de neurônios dopaminérgicos, proveniente da inibição do desenvolvimento de microtúbulos de tubulina. Essa degeneração ocorre de maneira multissistêmica, ou seja, em determinado estágio, afeta todos os órgãos e/ou sistemas do corpo, gerando assim, prejuízo na quantidade de fibras dopaminérgicas estriatais, fibras serotoninérgicas estriatais, neurônios de projeção do estriado, neurônios dopaminérgicos, neurônios colinérgicos do núcleo tegmentar, neurônios noradrenérgicos no locus coeruleus e interneurônios colinérgicos estriatais.

Diante do exposto, muitos grupos de pesquisa executam seus estudos utilizando roedores como modelo animal experimental para avaliar essas perdas neuronais citadas e suas causas a partir do uso da rotenona, porém, outra espécie animal, o *zebrafish*, cujo nome científico é *Danio rerio*, vem sendo introduzido nesses estudos como modelo *in vivo* e apresentando sucesso experimental, uma vez que este apresenta similaridade genética com humanos em torno de mais de 70%, apresentando assim, interessante semelhança quanto a nossa organização basilar do sistema nervoso central (KHOTIMAH et al., 2015).

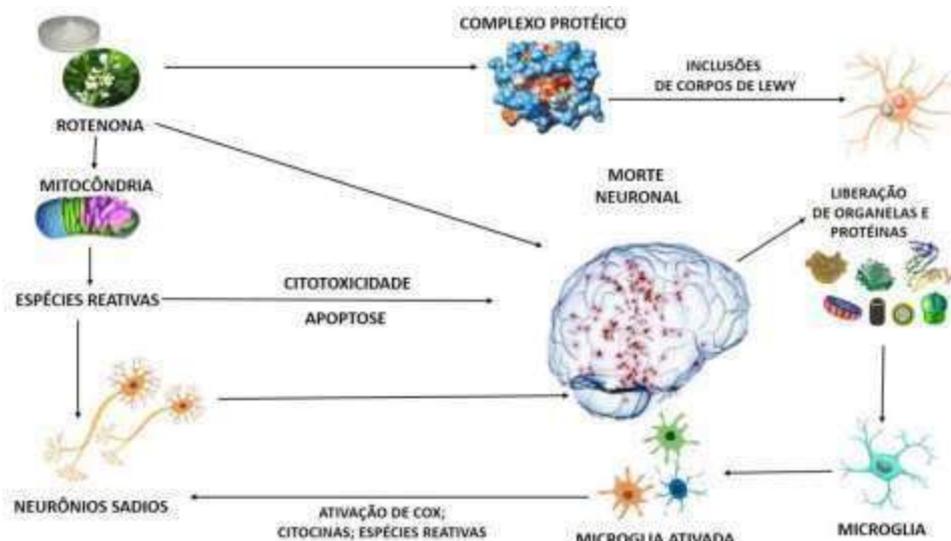


Figura 1. A ação da rotenona implica na formação de um complexo proteico proveniente da ação de neurotoxinas identificadas com MPTP (1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina) esse complexo fica presente nos corpúsculos de *Lewy*. A ação da rotenona, bem como de MPTP agem sobre os neurônios dopaminérgicos e induz à liberação de organelas e proteínas, assim, a microglia entra em ação. Na sequência ocorre a liberação de citocinas e espécies reativas, geradas em grande quantidade durante o estresse oxidativo. Essas espécies reativas agem sobre neurônios saudáveis protegendo contra o estresse oxidativo causado pela ação da rotenona. Um efeito clássico da exposição à rotenona é o desenvolvimento de disfunções mitocondriais, como diminuição da produção de ATP, na degeneração de neurônios dopaminérgicos do SNC e na expressão gênica dos genes da Ubiquitina, ATPase e ATPsintase e conferindo com isso o aparecimento de sintomas de Parkinson. **Fonte:** Própria.

2.6 Zebrafish (*Danio rerio*)

O *zebrafish* como é chamado no mundo ou paulistinha, como é conhecido no Brasil, nomes populares dados ao *Danio rerio*, é um peixe tropical de água doce, com medidas entre 3 e 4 cm. Pertencente à família Cyprinidae, classe Actinopterygii e ordem Teleosteo (Figura 2), esse pequeno teleosteo é proveniente dos rios do Sul da Ásia, originalmente encontrado em plantações de arroz adjacentes ao rio Ganges na Índia, Paquistão, Butão e Nepal (GRUNWALD e EISEN, 2002; ENGESZER et al., 2007; SPENCE et al., 2008).



Figura 2. Animal adulto da espécie *Danio rerio* (tipo selvagem, nove meses de idade). Adquirido em criadouros comerciais e mantidos no laboratório com aclimação para detectar e confirmar a ausência de patógenos ou doenças, sendo acondicionadas em aquários de 80 litros, aerados e alimentados duas vezes ao dia. **Fonte:** Própria.

Devido às suas condições simples de manipulação e seu formato cíclico de reprodução, o *D. rerio* consolidou-se como modelo experimental em diversos campos científicos como a

genética, farmacologia e nanotoxicologia (BRUNDO; SALVAGGIO, 2018), oncologia (STUELTEN et al., 2018), biologia do desenvolvimento (GORE et al., 2018), neurológica (PARDO; MEFFERT, 2018) e comportamental (SASZIK; SMITH, 2018). Várias são as vantagens de trabalhar com esse teleósteo, suas características fazem do mesmo um fantástico modelo de estudo em toxicologia e reprodução. Em torno de 9-10 semanas, as fêmeas podem desovar aproximadamente 100-200 ovos (KIMMEL et al., 1995; NOYES et al., 2018; BRUNDO; SALVAGGIO, 2018).

Desde 1996, Lele et al., relataram sobre as múltiplas vantagens em aplicar essa espécie em estudos científicos direcionados ao seu desenvolvimento, possibilitando assim progressos quanto ao conhecimento de sua embriogênese e ciclo de vida dos vertebrados. Isso se dá justamente pela presença de ovos transparentes, grande número de animais e desenvolvimento em aproximadamente dois meses, conferindo assim um animal de fácil manejo. Associado a isto, este modelo animal absorve os componentes diretamente da água pelas suas brânquias, posteriormente os acumula em diferentes tecidos, dentre os quais o sistema nervoso central (SNC). Não obstante a isso, são dotados de uma elevada capacidade de rendimento em larga escala na aplicação e desenvolvimento farmacológico (NUNES et al., 2017; SONG et al., 2018).

O *zebrafish* foi inserido na pesquisa biomédica em 1981 por George Streisinger, porém sua introdução vem ganhando espaço em todas as áreas de estudo como farmacologia, bioquímica, neurociência, comportamento toxicologia, genética, fisiologia e muitas outras áreas, em especial, vale ressaltar sobre o uso do *D. rerio* estudos relacionados a anormalidades psíquicas, uma vez que a similaridade com os sistemas de neurotransmissores, organização encefálica, parâmetros comportamentais e o trabalho de seu sistema regulador de estresse (HOWE et al., 2013; DAL SANTO et al., 2014; KALUEFF et al., 2014).

Em 2013, o genoma do *zebrafish* foi sequenciado completamente, e assim, foi possível saber que 71% dos genes que compilam proteínas do genoma humano são encontradas em genes encontrados no *zebrafish*, e, além disso, 84% dos genes já conhecidos, estudados e vinculados a doenças humanas têm um gene correspondente ao *zebrafish* (HOWE et al., 2013). Assim, foi possível identificarmos que diferentes sistemas neurotransmissores presentes em mamíferos também são encontrados em *zebrafish*, como sistema glutamatérgico, purinérgico, GABAérgico, dopaminérgico, serotoninérgico e histaminérgico (RICO et al., 2011). O sistema nervoso do *zebrafish*, possui áreas específicas que além de estar relacionada, também pode ser conservada quando comparadas com as regiões de nosso sistema cerebral. Diante de estudos e caracterização, um exemplo é o telencéfalo ventral desse teleósteo, área homóloga ao estriado nos mamíferos e o sistema dopaminérgico. Neurônios dopaminérgicos presentes em especial na região do bulbo olfatório, região pré-ótica, retina e diencéfalo ventral (SIEBEL et al., 2015).

2.7 O *zebrafish* (*Danio rerio*) como modelo experimental para a doença de Parkinson

De acordo com a literatura, tanto embriões quanto adultos de *zebrafish*, se comportam de forma diferente quando expostos a determinados tipos de medicamentos, agrotóxicos e substâncias químicas de um modo geral. Quando expostos a rotenona, por exemplo, uma molécula orgânica de origem natural (HISATA, 2002), larvas de *zebrafish* apresentam alterações dopaminérgicas e comportamentais, já os adultos, alterações comportamentais, incluindo diminuição da atividade locomotora, sugerindo assim, o *zebrafish* demonstra ser um importante modelo animal para averiguar mecanismos relacionados à neurotoxicidade e indução da DP (ROBEA et al., 2018).

Khotimah et al., (2015), propõe o *Zebrafish* como modelo animal de DP induzido por rotenona e avalia parâmetros comportamentais, locomotores, fisiológicos e bioquímicos. Como outras vantagens, a indução à DP e administração dos fármacos é facilitada através do meio aquoso. Também a eficácia, biodisponibilidade e toxicidade podem ser prontamente determinadas. A transparência óptica é outra vantagem deste teleósteo, pois possibilita a observação direta de processos celulares e fisiológicos in vivo e em tempo real (VAZ et al., 2018). Ainda em 2015, Melo et al., também realizaram estudos acerca da exposição de rotenona em *zebrafish* e posteriormente discutiram sobre as alterações causadas por esse pesticida em termos bioquímicos, comportamentais e histológicos. Na sequência de estudos utilizando *zebrafish* como modelo experimental, o estudo realizado por Robea et al., (2018) relataram sobre a importância da exposição dos animais à rotenona na geração de sintomas comportamentais para modelo de Parkinson-like. Vaz et al., (2020), descreveram sobre a identificação de drogas antiparkinsonianas por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) induzida em modelo de *zebrafish*. Já Wijayanti et al., (2021), relataram sobre a importância das larvas de *Danio rerio* como modelo animal para o estudo de atrofia óssea e retardo no seu desenvolvimento por rotenona induzida.

Diante do exposto, nota-se que o *zebrafish* vem sendo introduzido em diversas linhas de pesquisa e ocupando um espaço importante como um organismo modelo alternativo para a DP e outras pesquisas, ao longo dos anos. Isso se dá principalmente porque este é de fácil manipulação e manutenção comparando-se com outras espécies vertebradas, como os roedores, em especial. Pois, o *zebrafish* absorve substâncias químicas expostas aos mesmos diretamente na água pelas brânquias. Assim, essa exposição torna possível o acúmulo desses componentes em diversos tecidos e sistemas, em especial o sistema nervoso central, fazendo deste modelo, essencial para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou alternativas eficientes para o seu melhoramento (NUNES et al., 2017; SONG et al., 2018).

Quanto aos testes de embriotoxicidade em *Danio rerio*, devemos enfatizar sobre a importância de seguirmos os protocolos éticos. A embriotoxicidade em *zebrafish* é uma etapa que consiste no controle e/ou combate de riscos que determinadas substâncias químicas podem vir a causar tanto a seres humanos quanto ao ambiente, de um modo geral. Vale ressaltar que todo processo experimental respeita o bem-estar animal, acatando assim a prática da utilização de animais para testes em modelo *in vivo* e atendendo protocolos que levam a uma redução do número de animais, bem como o aprimoramento das técnicas utilizadas no intuito de reduzir custos e conservar a ética e inovação científica (GOMES et al., 2020).

Desde 2009 que Lammer et al., relataram sobre a importância do teste de embriotoxicidade. Pode-se dizer que é um divisor de águas, pois nessa etapa alguns efeitos são observados como parâmetros avaliativos e comparativos como: ovos coagulados, deformações corpóreas mais especificamente na cauda e no seu desprendimento, alterações na coluna e esqueleto axial, cabeça e otólitos, no coração e em seus batimentos e deformidades no olho, ausência de somitos, baixa pigmentação e circulação, movimentos involuntários ou até mesmo ausência dos mesmos retardo da eclosão e muitas vezes a presença de edemas no saco vitelínico.

Diante disso, o *zebrafish* é um importante modelo alternativo, assim como ele, outras espécies são cada vez mais introduzidas no campo científico como modelos alternativos para estudos em diversas áreas, biológica, biomédica, farmacêutica e médica de uma forma geral (BEEKHUIJZEN et al., 2015). Além do *zebrafish*, espécies vegetais vêm ganhando espaço na corrida por meios alternativos de origem natural e menos sintéticos para o tratamento de diversas doenças. A partir desse pressuposto, Pedroso et al., (2021) enfatizaram sobre a importância das plantas medicinais e sua ação terapêutica, uma prática exercida há muitos anos por inúmeras civilizações e que perdura até os dias atuais.

2.8 A importância das plantas medicinais e seus Óleos essenciais

A utilização de plantas para fins medicinais é uma prática milenar. Essa técnica é considerada uma alternativa terapêutica complementar ao tratamento de diversas doenças quando utilizadas de forma racional e adequada. Seu uso consciente é essencial, visto que as mesmas são constituídas por um arsenal de constituintes químicos, que muitas vezes podem ser benéficos, bem como apresentar riscos à saúde (PEDROSO et al., 2021). A inserção de plantas medicinais já vem sendo realizada em diferentes campos biológicos por cientistas do mundo inteiro. Há alguns anos essa prática vem ganhando cada vez mais destaque, em especial nas áreas da enfermagem e da medicina, devido às propriedades farmacológicas dos metabolitos secundários presentes em diversas espécies vegetais, bem como pela busca de tratamentos alternativos eficientes e de caráter natural (FERREIRA et al., 2019).

Um exemplo de produtos de origem natural, que vem cada vez mais ganhando espaço e sendo inserido em pesquisas para o tratamento de doenças e afins, são os óleos essenciais (OEs). Cada um obviamente possui suas particularidades, sua composição é extremamente complexa e muitas vezes apenas um óleo é constituído por inúmeros compostos químicos, e assim, através de sua caracterização é possível identificarmos os componentes em maior concentração, sendo estes justamente o responsável por determinada atividade terapêutica. Todavia, os demais constituintes não devem ser considerados como menos importantes, uma vez que mesmo estando em menor concentração, a sinergia entre todos os componentes que compõem um óleo essencial deve ser considerada para se avaliar a atividade terapêutica (NASCIMENTO et al., 2020).

OEs são substâncias voláteis produzidos através do metabolismo secundário das plantas. Com relação aos seus aspectos químicos, os OEs são classificados de acordo com sua atividade bioquímica e estrutura molecular em sesquiterpenos, álcoois, aldeídos, ésteres, monoterpenos, fenóis, éteres, furanos, óxidos e peróxidos. O cheiro, sabor e outras características fazem parte das particularidades dos OEs, seu princípio ativo é bastante conhecido pela indústria alimentícia, cosmética, perfumaria, inseticida, farmacêutica entre outras. Adicionalmente, através da cromatografia é possível sabermos a composição química dos OEs e sua pureza e suas particularidades (NASCIMENTO et al., 2020).

Um óleo essencial de odor muito forte com potencial terapêutico é o óleo de pimenta do reino (*Piper nigrum*). Alguns estudos já realizados em animais e em escala celular, evidenciam que *P. nigrum* possui um princípio nativo conhecido como piperina. Esse alcaloide pode ser eficiente na terapêutica de respostas inflamatórias. Essa função se dá em relação ao seu potencial inibidor de enzimas responsáveis pela biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas. Desse modo, as etapas inflamatórias podem conduzir para o desenvolvimento de uma multiplicidade de disfunções à saúde, dentre as mesmas podemos citar a doença de Alzheimer, artrite, DP e reincidência de câncer (BUTT et al., 2013).

2.9 Considerações sobre *P. nigrum* e suas atividades biológicas

A família Piperaceae é utilizada há muitos anos, culturas do passado bem como as do presente fazem uso da mesma não só para fins culinários, mas também para fins medicamentosos. Isso pode ser evidenciado através de sua constituição bioquímica, a supramencionada anteriormente, possui grãos ricos em vitamina A e K, β -caroteno, fibras dietéticas, além ser riquíssima em sais minerais como magnésio, fósforo, cálcio, potássio e manganês. Uma gama de ácidos fenólicos e antioxidantes também fazem parte de sua composição bioquímica. Dentre seus metabólitos secundários, os que compõem *P. nigrum* são

os ácidos fenólicos glicosídeos e flavonoides glicosídeos pertinentes ao grupo dos compostos fenólicos (QUIJIA et al., 2021).

Diante de sua constituição bioquímica, nota-se que *P. nigrum* engloba a presença de diversos componentes que em conjunto exercem um papel farmacológico interessante e eficiente, em especial no tratamento de doenças neurodegenerativas (CHEN et al., 2022). Esses metabólitos são justamente os agentes que conferem a ervas e especiarias sabor e aromas peculiares. Além dessas propriedades organolépticas, também são excelentes fontes antioxidantes naturais, com isso, espera-se que estes antioxidantes também atuem quimicamente no organismo vivo em prol de processos terapêuticos contra inflamações diversas, combate ao câncer e prevenção do envelhecimento (NASCIMENTO et al., 2020; CHEN et al., 2022). Em estudo realizado por Chen et al., (2022), foi utilizado OEs de especiarias, entre elas, *P. nigrum*, onde foi avaliada a atividade antioxidante e sua atuação em relação aos danos causados pela doença de Alzheimer através de estudo *in vitro*. Isso nos permite entender que o óleo essencial de *P. nigrum* é eficiente no tratamento de distúrbios neurológicos e perda de memória induzidas por estresse oxidativo. Pois sua composição fitoquímica causa efeitos benéficos no sistema nervoso central, devido a sua atividade antioxidante (RASHEDINIA et al., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do óleo essencial de *Piper nigrum* livre e associado a L-DOPA no tratamento de embriões de *Danio rerio* com sintomas de Parkinson-like induzidos por rotenona.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronização da técnica de indução do Parkinson-like em embriões de *zebrafish*.
- Realizar a terapêutica dos animais afetados com sintomas de Parkinson-like, com óleo essencial de *P. nigrum* e L-DOPA, de forma isolada e também com a associação de ambos em diferentes concentrações, avaliando a sinergia e sua eficiência no tratamento dos animais.
- Durante a terapêutica, avaliar parâmetros como Taxa de eclosão, Efeitos teratogênicos, Morfometria, Testes comportamentais/ motores e Taxa de mortalidade dos animais afetados e tratados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manutenção dos animais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal (LECA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), com métodos

previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Licença n. 3581030221) da mesma instituição.

Animais adultos da espécie *Danio rerio* (tipo selvagem, nove meses de idade) foram adquiridos em criadouros comerciais e mantidos no laboratório com aclimatação para detectar e confirmar a ausência de patógenos ou doenças, sendo acondicionadas em aquários de 80 litros, aerados, alimentados duas vezes ao dia (KHOTIMAH et al., 2015), com fotoperíodo 14/10 h (claro/escuro) e temperatura controlada (26 ± 1 °C) e manutenção do pH em $7,0 \pm 0,5$ (AVDESH, 2012).

Para a obtenção dos ovos, foi utilizado o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE 236, 2013) onde os animais adultos foram separados de acordo com o sexo em aquários de reprodução para *zebrafish* (Figura 3) (Zebclean, Alesco), utilizando machos e fêmeas na proporção de 8:4. Após a desova, foram recolhidos os ovos e por meio do microscópio óptico de luz (com lâmpada LED) a 1 hora pós-fertilização (hpf) (BITTENCOURT et al., 2018) foram utilizados apenas ovos cuja desova apresentou mais de 90% de viabilidade (OCDE 236, 2013).



Figura 3. Aquários de reprodução para *zebrafish* (Zebclean, Alesco). **Fonte:** Própria.

Para formação dos grupos experimentais foram utilizados ovos fertilizados (desenvolvimento normal da blástula), enquanto os não fertilizados (com injúrias, clivagens irregulares, ou malformações) foram descartados. Os ovos foram aleatoriamente acondicionados em potes estéreis de poliestireno com capacidade de 80 mL (16 grupos experimentais contendo 15 ovos por pote), mantidos em incubadora (patente BR10201801504) com temperatura controlada de 26 ± 1 °C, pH $7,5 \pm 0,5$ e fotoperíodo 14/10h (claro/escuro).

4.2 Reagentes e preparação das soluções concentradas

Foi preparada uma solução concentrada de rotenona (ROT R8875, SIGMA, St. Louis MO, USA) 0,02 mg/mL em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO, 0,1% v/v). Essa solução concentrada foi usada para diluição em 80 mL de água dechlorada em potes estéreis de poliestireno, sendo este volume o mesmo onde os animais foram alocados obtendo uma concentração final de 11,25 µg/L de rotenona (DE ANDRADE et al., 2022). Para obtenção da solução de levodopa (L-DOPA) e cloridrato de benserazida (CB), foram macerados comprimidos comerciais contendo 100 mg de L-DOPA e 25 mg de CB para obtenção de solução concentrada de L-DOPA e CB tendo 0,2 mg/L ($\approx 1,014$ M) e 0,05 mg/L (0,170 M), respectivamente. Para obtenção da solução de óleo essencial (OE) de *Piper nigrum*, 0,05 g do óleo foi dissolvido em DMSO (0,1% v/v) obtendo uma concentração nominal de 5,00 mg/L. Em seguida, esta solução foi diluída para 50 mL de água dechlorada obtendo concentração nominal final de 1,00 mg/L. A partir destas soluções de trabalho de OE de *P. nigrum* foi feita a diluição com 80 mL de água dechlorada nos potes para a obtenção das soluções teste usada nos experimentos. As concentrações nominais finais para cada composto químico estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações dos compostos individuais e suas misturas usadas para avaliação da proteção contra os efeitos tóxicos da exposição à rotenona usando o modelo de embriões de *zebrafish Parkinson-like*.

Composto químico	Concentração	Rotenona
Controle (DMSO 0,1%)	-	0
Rotenona (ROT)	-	11,250 µg/L
Levodopa (L-DOPA)	1,000 M	0
Levodopa (L-DOPA)	0,125, 0,250, 0,500, 0,750 e 1,000 mM	11,250 µg/L
<i>Piper nigrum</i> (PN)	10,000 µg/mL	0
<i>Piper nigrum</i> (PN)	1,250, 2,500, 5,000, 7,500 e 10,000 µg/mL	11,250 µg/L
L-DOPA + PN	0,250 M + 2,500 µg/mL, 0,500 M + 5,000 µg/mL	11,250 µg/L

4.3 Análises do desenvolvimento embrionário

Os testes de toxicidade foram realizados de acordo com a OCDE 236 (2013). Após acondicionamento e exposição dos ovos as diferentes concentrações citadas anteriormente, foram testados 16 grupos experimentais com 5 repetições para cada grupo experimental com 15 animais por pote de poliestireno (≈ 1200 animais) durante 2 até 144 hpf, sendo removidos apenas para a coleta dos dados experimentais. A solução estoque de óleo essencial de *P. nigrum* foi renovada diariamente com controle das condições abióticas conforme descrito acima. A solução estoque de L-DOPA foi renovada a cada dois dias, considerando que sua degradação no organismo é de 60 a 120 minutos (CARDOSO, 1995; PAPPERT et al., 1996).

O desenvolvimento embrionário e larval (24 -144 hpf) de *D. rerio* foi usado como variável resposta e exposto a diferentes concentrações descritas na Tabela 1. Com o auxílio de um microscópio óptico (400x, 1000x), os embriões e larvas de *D. rerio* foram observados e por meio da câmera acoplada (Hayear Mod. HY-2307 e software S-EYE 1.42.474), Figura 4 foram fotografados para identificação de possíveis efeitos tóxicos. A eclosão dos embriões foi observada diariamente para obtenção do percentual da taxa de eclosão, sendo este um parâmetro indicador dos efeitos teratogênicos dos animais expostos aos grupos experimentais já mencionados. A avaliação da toxicidade foi realizada a partir da observação dos seguintes efeitos teratogênicos: atraso no desenvolvimento (Ad), redução na pigmentação (Rp), ausência de somitos (As), edema de pericárdio (Ep), edema de saco vitelínico (Esv), área de coagulação (Ac), deformação de coluna (Dco), deformação de cauda (Dca), malformação dos olhos (Mo), ausência de inflação da bexiga natatória (Aib), (OCDE 236 2013; Silva et al., 2019; Cadena et al., 2020). A mortalidade foi observada diariamente, sendo apresentada em porcentagem (%) de acordo com a OCDE 236 (2013). A mortalidade e os efeitos teratogênicos foram observados de forma qualitativa por resposta dicotômica (presente ou ausente).

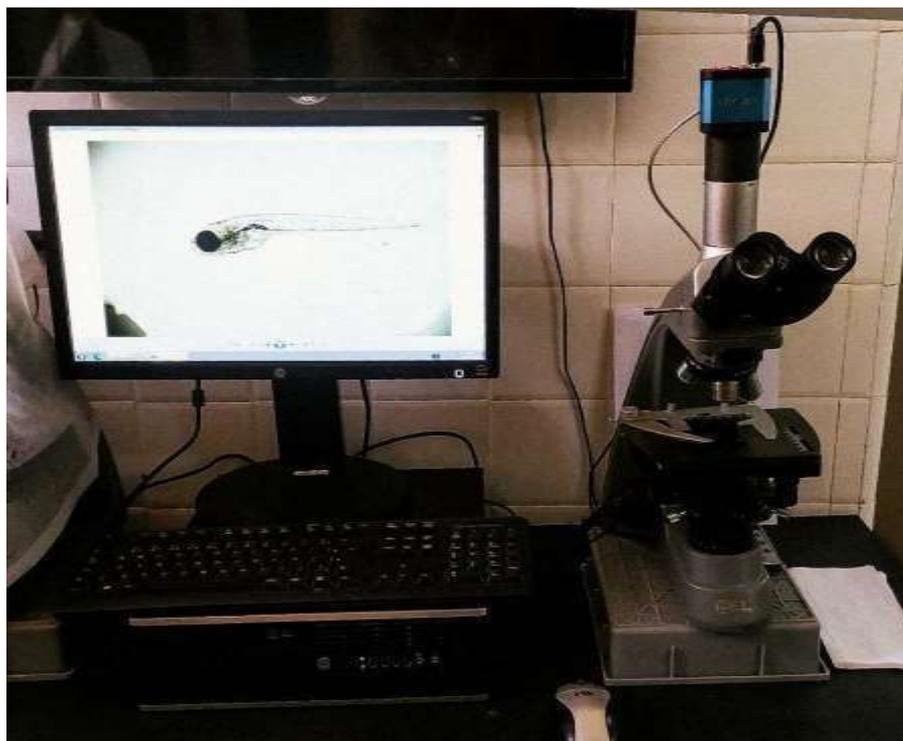


Figura 4. Microscópio óptico (400x, 1000x), os embriões e larvas de *D. rerio* foram observados e por meio da câmera acoplada (Hayear Mod. HY-2307 e software S-EYE 1.42.474).

4.4 Avaliações dos parâmetros comportamentais

As larvas sem alterações morfológicas visíveis, com 144 hpf, foram utilizadas para análise dos testes comportamentais. As mesmas foram retiradas dos potes de poliestireno de 80 mL e acondicionadas em placas de 48 poços, cada poço comportou uma larva. Os testes comportamentais foram feitos de acordo com metodologias modificadas de Cadena et al.,

(2020). O teste de tigmotaxia (TH) é eficiente para avaliar o comportamento análogo à ansiedade (BASNET et al. 2019). O teste TH foi realizado, após 10 minutos de aclimação das larvas contidas nas placas de 48 poços e a resposta foi registrada para avaliação da tendência de as larvas estarem próximas ou afastadas à parede das placas (CADENA et al., 2020). Para esse teste foi utilizado o método *Scan sampling* com obtenção de resposta dicotômica (SILVA et al., 2019) (sim para a larva próxima a parede e não para a larva afastada da parede). Em seguida foi realizado o teste de sensibilidade ao toque (TS), este, foi utilizado para avaliarmos a resposta larval aos estímulos mecânicos (CADENA et al., 2020) por meio do método *Scan sampling* com obtenção de resposta dicotômica (SILVA et al., 2019). Esses estímulos foram feitos na região da cauda ou da cabeça das larvas e a resposta foi registrada se a larva respondeu a esse estímulo através de um comportamento de fuga. O comportamento de fuga foi identificado quando as larvas apresentaram um comportamento de natação ou explosão. A Resposta Optomotora (OMR) foi utilizada para avaliar a acuidade visual dos animais (BRATROM et al. 2019; CADENA et al., 2020). As placas com as larvas foram postas sobre um monitor na posição horizontal e submetidas a um vídeo com duração total de 75 s, com linhas pretas e brancas se movendo para a direita e para a esquerda. O vídeo simula uma corrente d'água e foi eficiente para contabilizar o número de larvas que seguiam o sentido do estímulo. O vídeo, capturado por câmera de celular, consistiu em 5 s de branco para tempo inicial (TI), 30 s de linhas alternadas no sentido direito para tempo médio (TM), 5s de branco e 30 s de linhas alternadas no sentido esquerdo para tempo final (TF). A OMR foi pontuada em duas áreas diferentes representando baixo alinhamento (70% do poço) e alto alinhamento (30% do poço) (CADENA et al., 2020).

A análise da morfometria foi realizada ao término dos testes comportamentais, após as larvas serem eutanasiadas. Com o auxílio de um microscópio óptico (400x, 1000x), as larvas com 144 hpf foram observadas e através da câmera acoplada ao mesmo (Hayear Mod. HY-2307 e software S-EYE 1.42.474) os animais foram fotografados para as medições morfométricas da cabeça e lateral descritos nas Figuras 9 e 10 respectivamente. Na região da cabeça foram avaliados: comprimento da cabeça (CC), distância entre os olhos (DO), comprimento do olho (CO) e largura da cabeça (LCab). Já na vista lateral foram avaliados: comprimento do olho (CO), comprimento da traseira (CT), comprimento da traseira/ânus (CTA), comprimento total (CT) e largura da cauda (LC) (CADENA et al., 2021).

4.5 Análises estatísticas

Os dados paramétricos, taxa de eclosão, efeitos teratogênicos, testes de tigmotaxia e sensibilidade ao toque, foram analisados por *one-way* ANOVA. Quando a diferença foi significativa, as médias foram comparadas através do teste de Tukey sendo $p < 0,05$. Para os

dados não paramétricos, resposta optomotora, foi usado o teste MCNemar. Para as análises estatísticas, foi utilizado o software Origin Pro Academic 2015 (Origem Lab. Northampton, MA, EUA).

5 RESULTADOS

Durante todo experimento, não foi observado taxa de mortalidade maior que 10% no grupo DMSO, o que está de acordo com o recomendado pela OCDE 236 (2013) validando os nossos dados. De acordo com a Figura 5, foram observadas as maiores taxas de sobrevivência nos grupos experimentais de L-DOPA (1,000 mM) de forma isolada e L-DOPA (0,75 mM) + ROT. Os animais expostos a L-DOPA tiveram maior taxa de sobrevivência quando comparada aos animais expostos a ROT. Em relação à mistura L-DOPA (0,75 mM) + ROT, obtivemos resultado satisfatório (> 80%) na taxa de sobrevivência dos animais. Já o óleo essencial de *Piper nigrum* foi menos tóxico que a ROT. Porém quando associados PN (0,125 ug/mL) + ROT observamos uma redução na sobrevivência dos animais (\approx 50%).

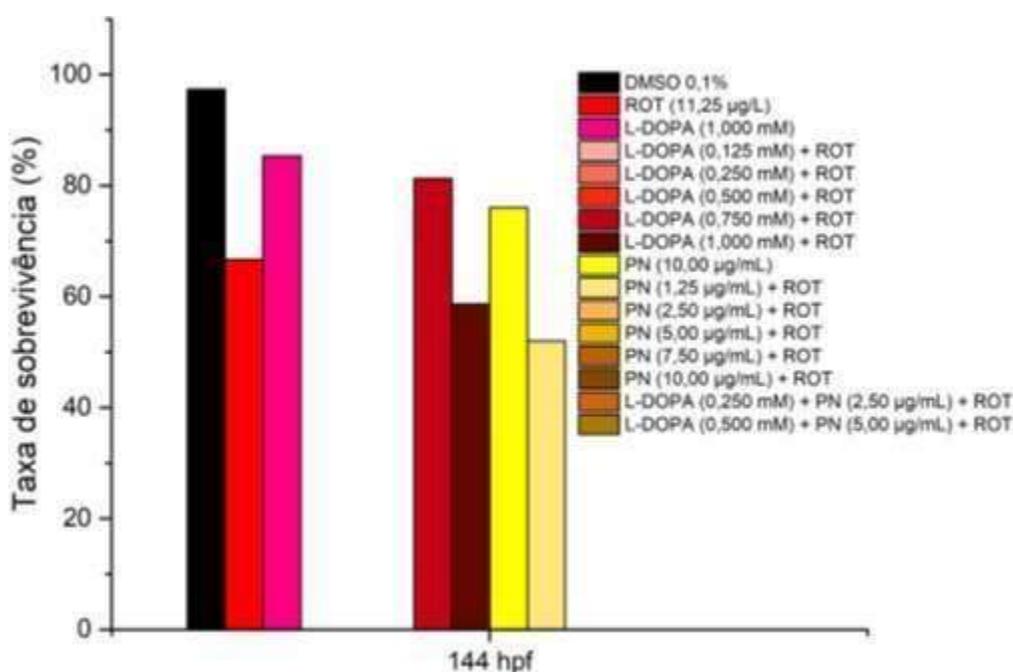


Figura 5. Porcentagem da taxa de sobrevivência de *zebrafish* com 144 hpf expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*. Legenda: DMSO 0,1% - Dimetilsulfóxido; ROT – Rotenona; L-DOPA – Levodopa; PN – Óleo essencial de *Piper nigrum*. Cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO 0,1% e ROT (11,25 µg/L) por One-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os resultados de taxa de eclosão dos ovos do *zebrafish* são apresentados na Figura 6 onde foi observado que a eclosão dos ovos se iniciou entre o período de 72 e 96 horas (3-4 dpf). Na Figura 3, às 72 hpf foi observado que a rotenona (ROT) afetou a taxa de eclosão dos animais. Da mesma forma, observamos que no grupo da levodopa (L-DOPA) (0,125 mM) + ROT, a L-DOPA em sua menor concentração, não apresentou efeito protetor contra ROT. Nos demais

grupos de L-DOPA + ROT, não houve diferença contra o grupo DMSO, indicando com isso que houve um efeito de proteção da L-DOPA sobre os efeitos tóxicos de ROT. A L-DOPA (1,000 mM) isolada, não causou toxicidade na taxa de eclosão dos animais. Com relação ao efeito protetor de *Piper nigrum* (PN) contra ROT foi observado uma ausência da eclosão até 72 hpf, o que nos permitiu identificar que o óleo essencial não exerceu um papel protetivo nesse parâmetro. Já o grupo PN (10,000 µg/mL), apresentou redução na taxa de eclosão indicando com isso um efeito tóxico aos animais expostos.

Na Figura 6, ainda podemos observar que às 96 hpf o grupo ROT apresentou uma maior taxa de eclosão e não diferiu do grupo DMSO. Adicionalmente, os grupos contendo L-DOPA contra ROT também não diferiram do grupo DMSO. L-DOPA (1,000 mM) novamente não apresentou toxicidade em relação a este parâmetro. Com relação aos grupos PN contra ROT foi observado uma baixa eclosão indicando que a mistura pode estar exercendo toxicidade quando avaliamos este parâmetro. Já no grupo PN (10,00 ug/mL) não houve diferença na taxa de eclosão. Para os grupos contendo L-DOPA (0,250 mM) + PN (2,50 ug/mL) + ROT e L-DOPA (0,500 mM) + PN (5,00 ug/mL) + ROT, considerados os grupos contendo a mistura das três substâncias para exposição dos animais, não houve eclosão durante todo tempo de exposição indicando que a mistura entre L-DOPA e PN pode exercer alguma toxicidade.

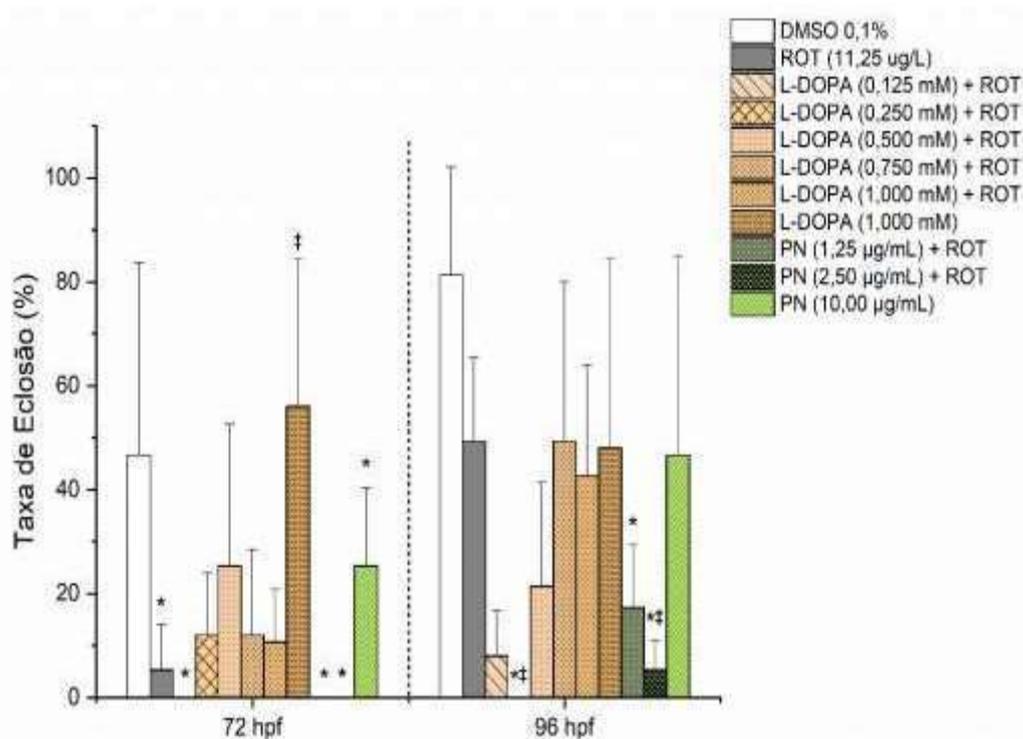


Figura 5. Porcentagem de eclosão com 72 e 96 hpf de *zebrafish* expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*. Legenda: DMSO 0,1% - Dimetilsulfóxido; ROT – Rotenona; L-DOPA – Levodopa; PN – Óleo essencial de *Piper nigrum*. Cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO 0,1% e ROT (11,25 µg/L) por One-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre grupo

DMSO 0,1% em relação aos demais grupos; ‡Diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo ROT (11,25 $\mu\text{g/L}$) em relação aos demais grupos.

Os resultados relacionados aos efeitos teratogênicos observados nos animais são apresentados na Figura 7. Das 24 às 96 hpf em todas as observações, ROT apresentou taxa de animais afetados diferente do DMSO. Entre 24 e 48 hpf, todos os grupos contendo L-DOPA e PN contra ROT apresentaram maiores taxas de animais afetados quando comparados ao grupo DMSO como mostrado na Figura 7a e 7b. Os grupos L-DOPA (0,750; 1,000 mM) + ROT foram os únicos grupos que não apresentaram taxa de animais afetados em comparação ao grupo DMSO em 72 hpf, como mostrado na Figura 6c. Isso indicou um efeito protetivo da L-DOPA em maiores concentrações sobre a ação tóxica de ROT. Às 96 hpf, mais uma vez, os grupos contendo as maiores concentrações de L-DOPA exerceram um papel de proteção com relação aos efeitos tóxicos gerados por ROT, como mostrado na Figura 6d. Entretanto, o grupo L-DOPA (1,000 mM) + ROT ao completar às 96 hpf apresentou efeito tóxico, o que nos indicou que menores concentrações de L-DOPA não tiveram efeito protetor e a maior concentração pode ter exercido efeito tóxico. Não foram observados efeitos tóxicos nos grupos contendo L-DOPA (1,000 mM) e PN (10,00 $\mu\text{g/mL}$) indicando que esses compostos de forma isolada não afetaram os animais nos parâmetros avaliados durante todo o experimento.

O teste de Tigmotaxia (TH) e o teste de sensibilidade ao toque (TS) nos mostraram que não houve alteração com os animais expostos aos compostos químicos, como podemos observar nas Figuras 8a e 8b, o que indica que ROT, L-DOPA e PN não exerceram toxicidade em relação a este parâmetro estudado.

Os resultados relacionados à análise da OMR estão apresentados na Figura 9. Os animais expostos à ROT responderam ao estímulo apenas no TM. Os grupos L-DOPA (0,750; 1,000 mM) + ROT e L-DOPA (1,000 mM), não responderam aos estímulos, indicando assim que a L-DOPA pode prejudicar a resposta optomotora dos animais. Em relação à PN, em todas as concentrações foi observada resposta apenas no TF, enquanto no grupo contendo apenas PN sem associação com ROT não foi observada resposta ao estímulo visual em nenhum dos tempos.

As regiões medidas na morfometria da cabeça e lateral estão descritas nas Figuras 10 e 11, respectivamente. As análises morfométricas estão representadas nas Tabelas 2. As medições foram feitas com larvas a 144 hpf. Na morfometria da cabeça, de acordo com a Tabela 2A, no grupo ROT foi observada a redução no comprimento da cabeça (CC) e no comprimento do olho (CO), os mesmos resultados foram observados em L-DOPA (0,750; 1,000 mM) + ROT e L-DOPA isolada. Sugerindo assim, que os grupos contendo as maiores concentrações de L-DOPA não foram eficientes na ação protetiva das larvas contra os efeitos tóxicos de ROT, causando

consequentemente um retardo no crescimento das regiões citadas. Enquanto os grupos PN (1,25 ug/mL) + ROT e PN (10,00 ug/mL), não foram observadas redução em nenhuma das regiões medidas. Indicando que o óleo de *P. nigrum* se comportou de forma neutra, não houve aumento nem diminuição das regiões analisadas. Adicionalmente, a morfometria lateral representada na Tabela 2B mostra que o grupo ROT só diferiu no comprimento do olho (CO) e no comprimento total (CT) com relação ao grupo DMSO. Enquanto o grupo PN (1,25 ug/mL) + ROT foi observado reduções significativas com relação ao DMSO nos parâmetros: comprimento do olho (CO), comprimento traseiro/ânus (CTA) e no comprimento total (CT). Porém, o grupo contendo apenas PN (10,00 ug/mL) apresentou diferença apenas no comprimento do olho (CO) com relação ao DMSO.

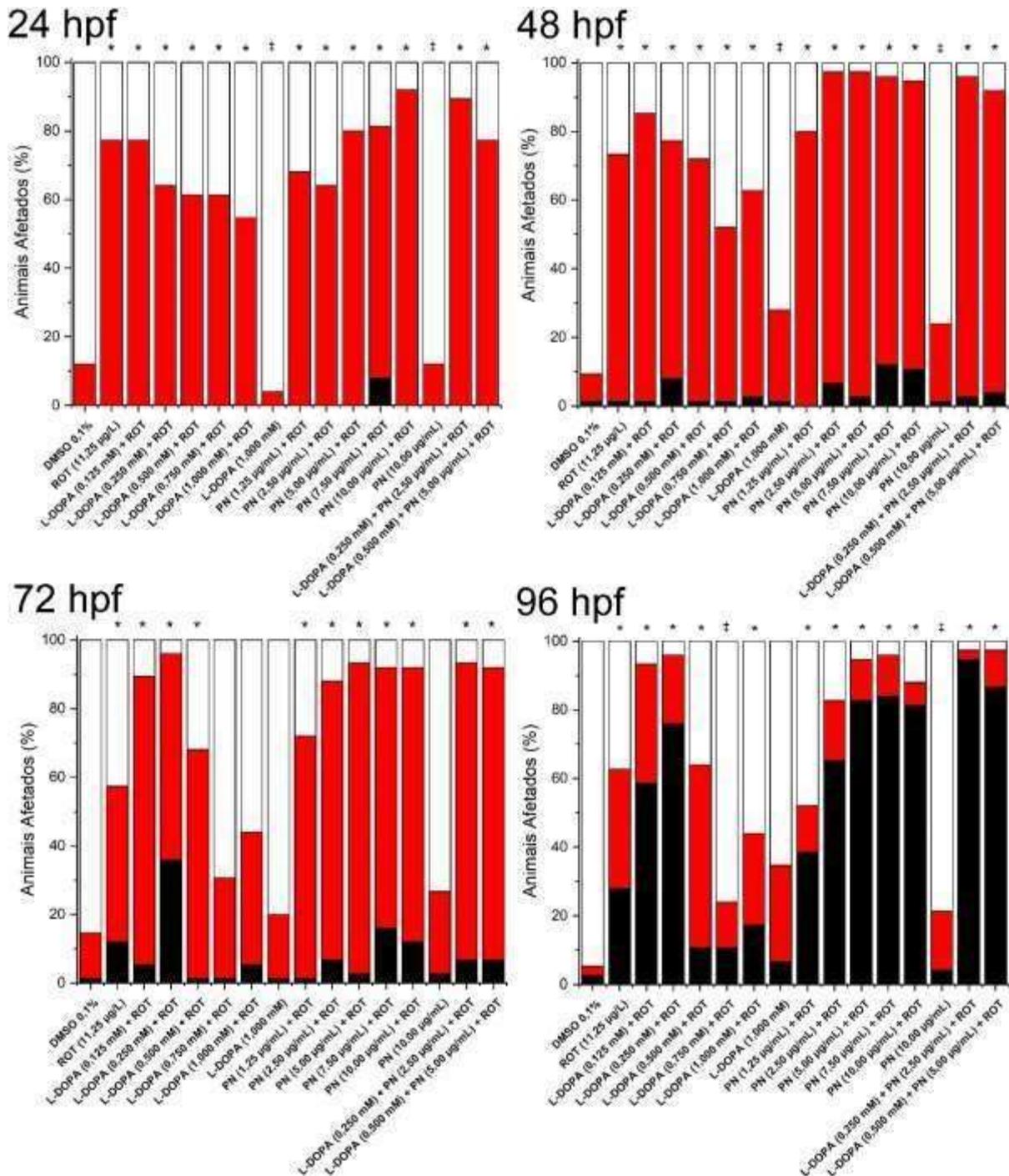


Figura 7. Porcentagem de animais afetados com 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 96 (D) hpf expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*. Legenda: DMSO 0,1% - Dimetilsulfóxido; ROT – Rotenona; L-DOPA – Levodopa; PN – Óleo essencial de *Piper nigrum*. Cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO 0,1% e ROT (11,25 µg/L) por *One-way ANOVA* seguido pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre grupo DMSO 0,1% em relação aos demais grupos; ‡Diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo ROT (11,25 µg/L) em relação aos demais grupos.

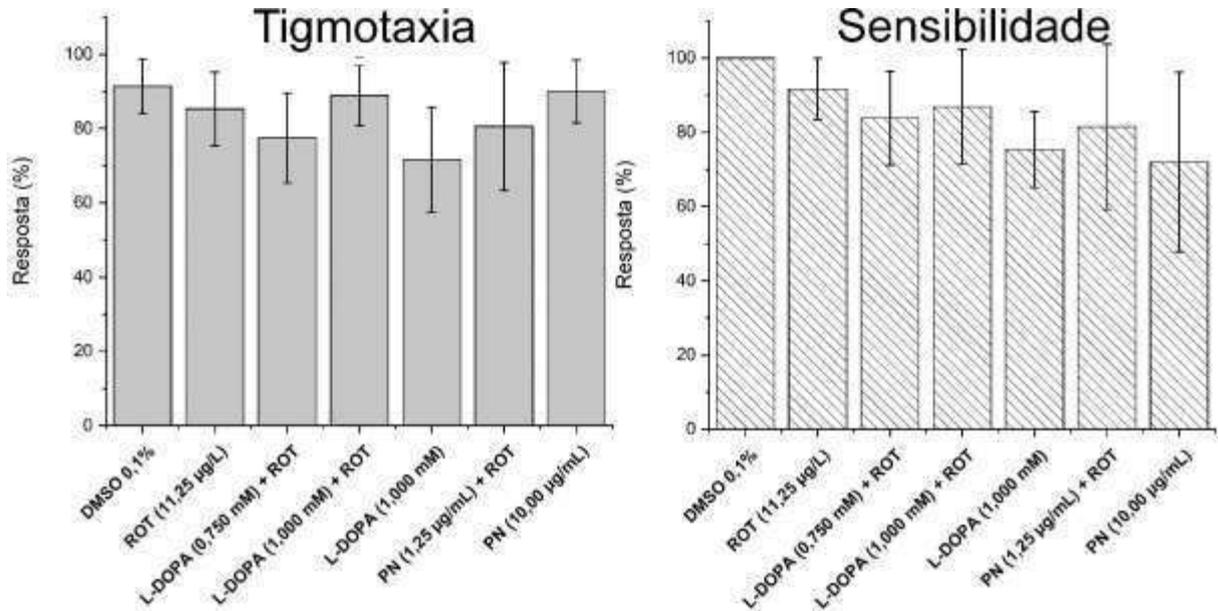


Figura 8. Porcentagem da resposta comportamental do *zebrafish* com 144 hpf que exibiram Tigmtotaxia (A) e Sensibilidade ao Toque (B) expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*. Legenda: DMSO 0,1% - Dimetilsulfóxido; ROT – Rotenona; L-DOPA – Levodopa; PN – Óleo essencial de *Piper nigrum*. Cada grupo experimental foi comparado com o grupo DMSO 0,1% e ROT (11,25 µg/L) por *one-way* ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre grupo DMSO 0,1% em relação aos demais grupos; ‡Diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo ROT (11,25 µg/L) em relação aos demais grupos.

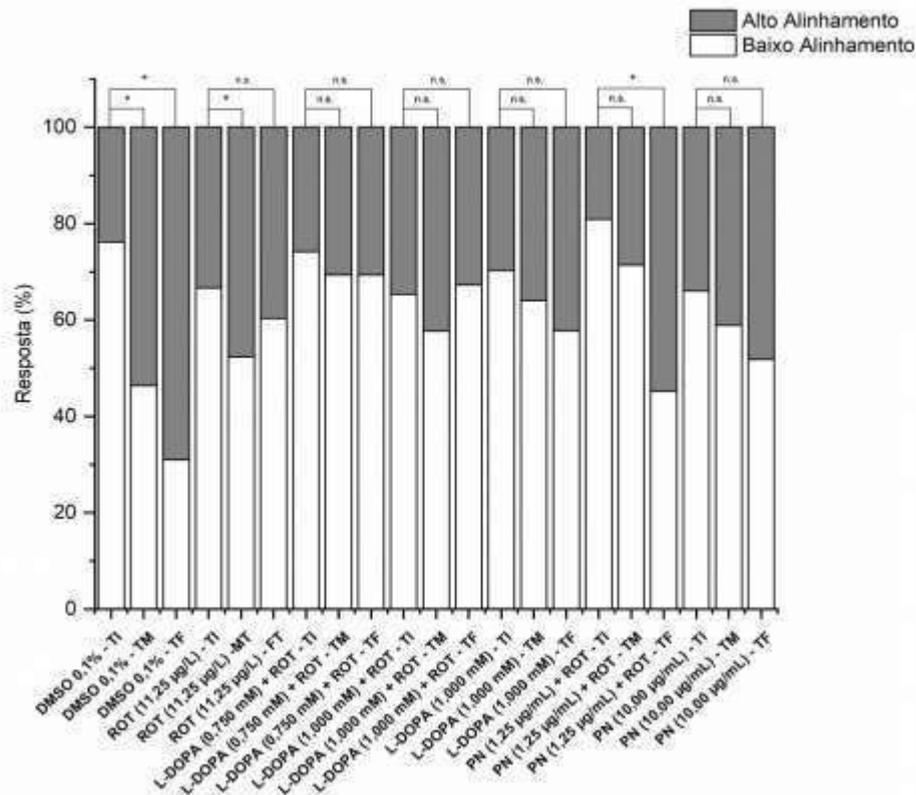


Figura 9. Porcentagem do total das Resposta Optomotora no Tempo Inicial (TI), Tempo Médio (TM) e Tempo Final (TF) das larvas de *zebrafish* com 144 hpf expostos à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*. Legenda: DMSO 0,1% - Dimetilsulfóxido; ROT – Rotenona; L-DOPA – Levodopa; PN – Óleo essencial de *Piper nigrum*. Resultados comparados pelo teste de simetria de McNemar no mesmo grupo entre Tempo Inicial (TI), Tempo Médio (TM) e Tempo Final (TF). *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes Tempos; n.s.: Sem diferença significativa ($p < 0,05$).

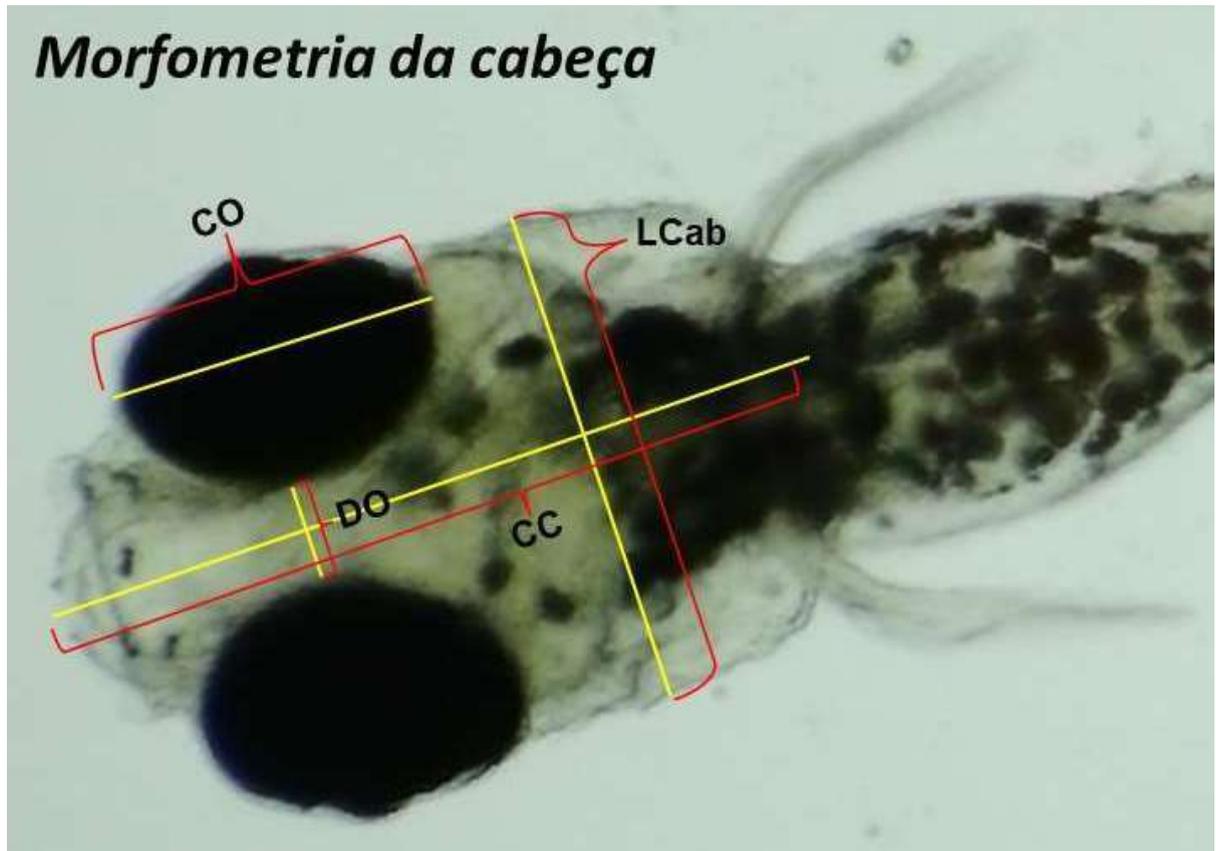


Figura 10. Regiões da morfometria da cabeça dos embriões de *Danio rerio*: comprimento da cabeça (CC), distância entre os olhos (DO), comprimento do olho (CO) e largura da cabeça (LCab).

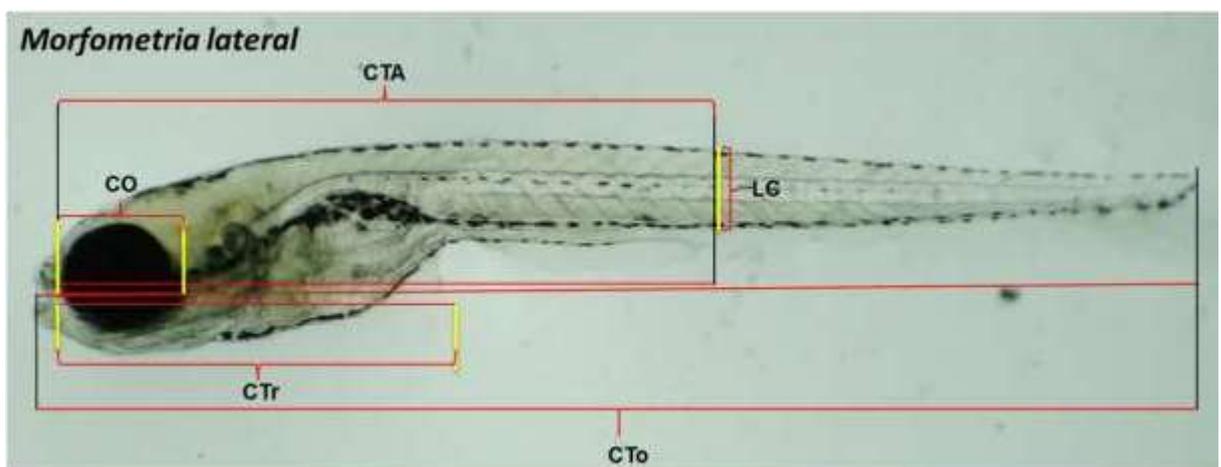


Figura 11. Regiões da morfometria lateral dos embriões de *Danio rerio*: comprimento do olho (CO), comprimento da traseira (CT), comprimento da traseira/ânus (CTA), comprimento total (CT) e largura da cauda (LC).

Tabela 2. Análises morfométricas das larvas de *zebrafish* até 144 hpf expostas à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*. Legenda: DMSO 0,1% - Dimetilsulfóxido; RT – Rotenona; LD – Levodopa; PN – *Piper nigrum*. Grupos experimentais: DMSO = DMSO 0,1%; RT = RT a 11,25 µg/L; LD4+RT = LD (0,750 mM) +RT; LD5+RT = LD (1,000 mM) +RT; LD5= LD (1,000 mM); PN1+RT = PN (1,25 µg/mL) + RT; PN5 = 10,00 µg/mL. Regiões das análises morfométricas das larvas de *zebrafish* com 144 hpf expostas à rotenona, levodopa e óleo essencial de *Piper nigrum*. *Medidas da cabeça:* Legenda: Head Width (HW); Eye Diameter (ED); Head Length (HL); Ocular Distance (OD). *Medidas da região lateral:* Legenda: Eye Length (EL); Rump Length (RL); Rump Anus Length (RAL); Larvae Standard Length (SL); Tail Width (TW). Os dados estão expressos em Média ± Desvio Padrão e os resultados foram comparados por *one-way* ANOVA seguido pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre grupo DMSO 0,1% em relação aos demais grupos; #Diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo RT (11,25 µg/L) em relação aos demais grupos.

(A) Morfometria da cabeça					
<i>Grupos</i>	<i>CC (mm)</i>	<i>DO (mm)</i>	<i>CO (mm)</i>	<i>LCab (mm)</i>	
DMSO	0,738 ± 0,085	0,172 ± 0,165	0,346 ± 0,045	0,536 ± 0,060	
RT	0,681 ± 0,080*	0,152 ± 0,110	0,316 ± 0,054*	0,511 ± 0,062	
LD4+RT	0,579 ± 0,056**	0,140 ± 0,084	0,289 ± 0,037**	0,453 ± 0,049**	
LD5+RT	0,573 ± 0,039**	0,138 ± 0,031	0,277 ± 0,025**	0,457 ± 0,0441**	
LD5	0,597 ± 0,44**	0,124 ± 0,034	0,298 ± 0,019*	0,469 ± 0,032**	
PN1+RT	0,652 ± 0,053**	0,139 ± 0,032	0,305 ± 0,037*	0,496 ± 0,045*	
PN5	0,658 ± 0,058**	0,110 ± 0,032	0,312 ± 0,023*	0,489 ± 0,039*	

(B) Morfometria lateral					
<i>Grupos</i>	<i>LO (mm)</i>	<i>CTr (mm)</i>	<i>CTA (mm)</i>	<i>CTo (mm)</i>	<i>LC (mm)</i>
DMSO	0,368 ± 0,040	1,213 ± 0,111	2,032 ± 0,124	3,526 ± 0,289	0,259 ± 0,024
RT	0,342 ± 0,046 *	1,204 ± 0,097	1,975 ± 0,182	3,377 ± 0,280 *	0,251 ± 0,030
LD4+RT	0,302 ± 0,039 **	1,119 ± 0,077 *	1,833 ± 0,112**	3,151 ± 0,225**	0,232 ± 0,025**
LD5+RT	0,284 ± 0,040**	1,066 ± 0,093**	1,817 ± 0,091**	3,099 ± 0,174**	0,231 ± 0,025**
LD5	0,308 ± 0,044**	1,117 ± 0,073**	1,842 ± 0,079 **	3,208 ± 0,130**	0,242 ± 0,021*
PN1+RT	0,329 ± 0,051*	1,172 ± 0,084	1,913 ± 0,149*	3,311 ± 0,185*	0,259 ± 0,030
PN5	0,338 ± 0,034*	1,164 ± 0,072	1,956 ± 0,109	3,508 ± 0,175	0,266 ± 0,020

6 DISCUSSÃO

O *Danio rerio* (*zebrafish*) vem sendo utilizado como modelo para detectar deficiências neurológicas durante seu desenvolvimento, ganhando assim, um importante papel no estudo de doenças neurodegenerativas. Este teleósteo possui regiões cerebrais específicas homólogas a nós humanos. Assim, o sistema dopaminérgico cerebral do *zebrafish* interage com outros sistemas como histaminérgicos e serotoninérgicos, tornando esse modelo ideal para o estudo da Doença de Parkinson (MANASA et al., 2020). O modelo animal utilizado foi o *zebrafish*. Como já mencionado, este teleósteo vem sendo utilizado como modelo experimental de Parkinson-like, tanto em seu estágio larval como na fase adulta. Nosso estudo avaliou os efeitos tóxicos

de ROT em embriões de *Danio rerio* como modelo animal com sintomas de *Parkinson-like*, bem como estudou a associação de óleo essencial de *P. nigrum* e levodopa (L-DOPA) como uma alternativa para o tratamento desses embriões com sintomas de *Parkinson-like*.

A rotenona (ROT) é uma molécula orgânica natural de origem vegetal (Hisata, 2002) que quando em excesso em animais, degenera neurônios dopaminérgicos induzindo sua morte e deformando corpúsculos de *Lewy*. Esse pesticida é um protótipo de toxina exógena que pode ser usada sob o ponto de vista clínico para a indução de *Parkinson-like* em modelo animal (SANDERS et al., 2014). Adicionalmente, Manasa et al. (2020) em seu estudo menciona outras substâncias que também podem ser inseridas no estudo de indução de sintomas de *Parkinson-like* em *zebrafish*, onde as neurotoxinas citadas foram MPTP, hidroxidopamina (6-OHDA) e pesticidas. Manasa et al. (2020) relataram que a exposição dos animais a essas substâncias levam a à deficiência de dopamina e neurodegeneração dopaminérgica. O que confere confiabilidade ao nosso modelo de estudo utilizando ROT para exposição ao *zebrafish*. Assim como Manasa et al. (2020) relataram em seu estudo sobre a ação de 6-OHDA, Vaz et al. (2020), em seu estudo utilizaram 6-OHDA para indução de sintomas de *Parkinson-like* em modelo animal e observaram que esse composto orgânico neurotóxico foi eficiente para provocar em embriões de *zebrafish* comportamento semelhante ao bradicinético e deficiências motoras.

Com relação a toxicidade de ROT, em nosso estudo, foi visto que este pesticida causou um atraso na taxa de eclosão dos animais expostos à 11,25 µg/L de ROT (DE ANDRADE et al., 2022), ocorrendo entre 72 e 96 hpf, causou efeitos teratogênicos e alterou o comportamento dos animais sendo estes considerados os efeitos de *Parkinson-like* a serem revertidos no nosso modelo. Nossos resultados corroboram com estudos realizados por Melo et al. (2015) onde seus dados mostraram que os animais expostos a 5 µg/L de ROT começaram a eclodir a 48 hpf e que houve um atraso na eclosão dos animais em concentrações superiores entre 20-40 µg/L. Robea et al. (2018) descreveram danos causados por ROT em baixas concentrações relacionadas a taxa de desenvolvimento, danos cognitivos, motores e morfométricos em *zebrafish*, sendo também estes achados em acordo com o nosso estudo. Entretanto, estes autores não avaliaram a possibilidade do uso do *zebrafish* em seus estágios iniciais de desenvolvimento ser aplicado como um modelo de estudo para *Parkinson-like*. De Andrade et al., (2022) em seu modelo de estudo expôs os embriões de *zebrafish* as seguintes concentrações de ROT: 5; 10; 15 e 20 µg/L. Os mesmos autores determinaram a EC50 (concentração de efeito médio) e identificaram que a concentração ideal para expor os embriões de *zebrafish* foi de 11,25 µg/L. Esta concentração foi eficiente para causar nos animais efeitos que consideramos de *Parkinson-like* sem causar grande mortalidade. Definindo assim, esta concentração, como padrão para indução de sintomas de *Parkinson-like* em embriões de *zebrafish* como modelo experimental.

Com relação à taxa de animais afetados, em todos os dias de exposição, 24 - 96 hpf, notou-se que os grupos expostos a ROT na concentração de 11,25 µg/L, apresentaram uma alta frequência de efeitos teratogênicos. Melo et al. (2015) avaliaram os efeitos teratogênicos e identificaram a presença de edemas de pericárdio, falta de pigmentação no olho e no corpo, atraso geral e formação de somitos quando expostos a concentrações iguais ou superiores a 2,5 µg/L, deixando claro que esse pesticida é um eficiente precursor de efeitos teratogênicos mesmo em baixas concentrações e que esses efeitos podem ser provenientes da ação mutagênica e citotóxica provocada pela ação de ROT. Em nosso estudo os efeitos observados foram: edemas de pericárdio, ausência de pigmentação e somitos, e ainda uma redução no tamanho dos animais. Não foi observado problemas relacionados com os batimentos cardíacos. Adicionalmente, o estudo de Melo et al. (2015) também relata sobre deformações na coluna vertebral dos embriões e conseqüentemente a perda de equilíbrio dos animais colocados para nadar em microplaca contendo água. Além da observação dos efeitos teratogênicos identificados, Melo et al. (2015) também conseguiram identificar a ação da rotenona com relação ao comportamento dos animais diante de estímulos mecânicos e ambientais, parâmetros também avaliados em nosso estudo.

Na OMR, os embriões expostos a DMSO responderam a estímulos aumentando seu alinhamento. De acordo com nossos resultados, estes se assemelham a estudos prévios (ANICHTCHIK et al., 2004; CRONIN e GREALY, 2017; FENG et al., 2014). Entretanto, nós não visualizamos efeito semelhante no nosso modelo de ROT. Assim como em nosso estudo, alterações comportamentais e motoras também são abordadas nos estudos de Melo et al., (2015). Essas alterações incluíram perda de equilíbrio, em seis diferentes espécies de peixes, incluindo o *zebrafish*, expostas a altas concentrações de ROT. Sugerindo assim, uma maior sensibilidade dos embriões e /ou uma variabilidade interespecies na sensibilidade a esse pesticida. Essas questões também foram avaliadas por Vaz et al., (2020) que abordaram sobre momentos de imobilidade dos embriões de *zebrafish* diante do prejuízo de neurônios dopaminérgicos, o que poderia configurar um parâmetro comportamental também visto em nossas análises. O estudo de Robea et al., (2018) relataram sobre a neurotoxicidade causada aos animais e a indução da DP quando expostos à ROT e enfatizam que a exposição de *D. rerio* à ROT provocou diminuição da performance natatória, déficits no consumo de oxigênio, estresse oxidativo e outros efeitos que, em alguns casos, ocasionam na morte celular (MELO et al., 2015). Robea et al., (2018) relataram ainda que, em modelos animais, a ROT contribuiu para ocorrência de sintomas característicos de Parkinson como: diminuição da atividade mitocondrial e na produção de ATP, estresse oxidativo, o que implica diretamente no comportamento do animal (GOLDMAN, 2014). No entanto, os animais expostos a ROT e

tratados com L-DOPA, assim como os grupos expostos apenas a L-DOPA e *P.nigrum* foram afetados pela diminuição de seu alinhamento. Isso pode ser justificado por uma provável sinergia entre os compostos químicos induzindo toxicidade. Adicionalmente não existe na literatura estudos relacionados a exposição do *zebrafish* e tratados com L-DOPA ou óleo de *Piper nigrum* de forma isolada ou associados.

Nosso estudo evidenciou que as concentrações de ROT utilizadas não causaram alterações comportamentais significativas na concentração utilizada (10 µg/L). Em estudo anterior (DE ANDRADE et al., 2022) foram observadas alterações comportamentais de TH e TS em animais expostos a 20 µg/L de ROT. Entretanto, os outros compostos provavelmente induziram toxicidade já que afetaram a resposta optomotora. Melo et al. (2015) em seu estudo relataram que embriões de *zebrafish* com 96 hpf, expostos a concentração de 12,2 µg/L, ou seja, concentração superior à que utilizamos em nossos testes, foi eficiente não só no desenvolvimento de efeitos teratogênicos, como esses efeitos também causaram dificuldade nos animais em reagir a estímulos ambientais como a luz, bem como a estímulos mecânicos. Pois, a postura anormal dos embriões fez com que os mesmos perdessem o equilíbrio e nadassem apenas no fundo do poço da microplaca onde os mesmos foram colocados para análise dos testes comportamentais. O que não foi visto nos animais do grupo ROT realizado no nosso estudo.

Nossos dados morfométricos mostraram que ROT reduziu o comprimento da cabeça e dos olhos dos animais. Essa diminuição no comprimento corporal está de acordo com estudo realizado por Khotimah et al., (2018). Khotimah et al., relataram que ROT devido a sua toxicidade é capaz de diminuir a ossificação das larvas de *zebrafish* e que o aumento do estresse oxidativo causa esse distúrbio e interfere no crescimento ósseo. Wijayanti et al., (2021) em seu estudo relatou que ROT provocou a inibição do complexo mitocondrial I, isso acarretou a diminuição da capacidade de fosforilação oxidativa, e na síntese de Adenosina Trifosfato (ATP). O que pode ter implicado diretamente na ação das mitocôndrias. Logo, um retardo na atividade dessa organela pode diminuir os níveis de produção de ATP e conseqüentemente causa estresse oxidativo e um dos danos são riscos na taxa de crescimento e desenvolvimento do osso, bem como riscos ao desenvolvimento cerebral.

Em nosso modelo de estudo, notamos que em altas concentrações, L-DOPA não foi tóxica, sendo eficiente contra a ação tóxica de ROT e às 96 hpf, observou-se uma taxa de eclosão significativa. Isso apontou que em nosso estudo a ação terapêutica de L-DOPA conseguiu proteger os embriões de *zebrafish* contra a ação toxica de ROT e não interferiu na eclosão dos animais, que ocorreu mesmo de forma tardia. Isso confere ao nosso modelo uma particularidade que até o momento não foi relatada na literatura, pois nosso tratamento é

realizado durante todo o desenvolvimento dos animais, desde a sua fase ovípara até a sua eclosão e desenvolvimento até 144 hpf. Em contrapartida, em estudo realizado por Vaz et al. (2020) a terapêutica só foi realizada após a eclosão dos animais. Fármacos antiparkinsonianos foram utilizados no modelo de 6-OHDA com larvas de *zebrafish* com 96 e 120 hpf como modelo animal, e alguns dos fármacos utilizados foi a rasagilina, amantadina, L-DOPA e isradipina. Nesse modelo de estudo, diferente do nosso, a indução de sintomas de *Parkinson-like* aconteceu primeiro e em seguida a terapêutica foi realizada com os fármacos mencionados, e concluiu-se que cada um desses fármacos fora eficiente no tratamento dos embriões em parâmetros específicos. Em relação a morfometria, L-DOPA em maiores concentrações e de forma isolada exerceu toxicidade e não protegeu contra os efeitos de ROT. As elevadas concentrações de L-DOPA não foram eficientes na ação protetiva das larvas contra os efeitos tóxicos de ROT e provocaram um retardo no crescimento das regiões citadas.

Em relação ao óleo essencial de *Piper nigrum*, altas concentrações apresentaram efeito tóxico sobre os animais expostos, causaram mortalidade e não protegeram contra os efeitos tóxicos de ROT. Este óleo essencial apresenta como componentes majoritários monoterpenos e sesquiterpenos (DE ANDRADE et al., 2021) onde esperávamos que a atividade antioxidante destes componentes apresentasse efeito protetor contra os efeitos tóxicos induzidos por ROT. Entretanto, isto não foi observado no nosso estudo. Não há estudos que utilizaram este óleo como agente terapêutico em modelo de *zebrafish* com sintomas de *Parkinson-like*. Porém, Patel et al. (2020) avaliaram a toxicidade seletiva de extratos aquosos de diferentes partes de *Piper nigrum* utilizando embriões de *zebrafish* como modelo animal. Neste estudo foi observado efeitos tóxicos como mortalidade, taxa de eclosão, efeitos teratogênicos e anormalidades nos batimentos cardíacos. Com isso podemos concluir que *Piper nigrum* exerceu toxicidade com seu óleo essencial e com seus extratos aquosos. Em relação a morfometria, PN em sua menor concentração e de forma isolada não causou redução em nenhuma das regiões medidas na cabeça. Entretanto, nas medições laterais, PN em sua menor concentração provocou nos animais redução em praticamente todos os parâmetros avaliados. Com isso, podemos concluir que PN exerceu efeito tóxico em relação a morfometria e teve algum efeito contra protetor contra os efeitos tóxicos induzidos por ROT.

Já os grupos expostos a L-DOPA e PN, entre 24-48 hpf apresentaram baixas taxas de efeitos teratogênicos e mortalidade. Já os grupos expostos a ROT e tratados com L-DOPA e PN apresentaram efeitos teratogênicos como ausência de pigmentação, tamanho reduzido e presença de edemas na região do saco vitelínico. Entre 72-96 hpf, os animais expostos à L-DOPA e *Piper nigrum* não apresentaram efeitos teratogênicos, provando que as substâncias não afetaram desenvolvimento dos animais, assim como não causaram mortalidade. Em nossos

resultados foi possível identificar que a L-DOPA em suas menores concentrações não foi capaz de tratar os animais afetados com sintomas de *Parkinson-like* provenientes da exposição à ROT. Diferente das maiores concentrações de L-DOPA, que foram eficientes no efeito protetivo, pois reduziram os efeitos teratogênicos causados pela ação tóxica de ROT. Embora não exista na literatura estudos que sobre a utilização da L-DOPA para tratar sintomas de *Parkinson-like* causados pela ação tóxica de ROT em embriões, bem como em adultos de *zebrafish*. Adicionalmente não existe estudos prévios que relatem sobre a utilização de L-DOPA e/ou *Piper nigrum* no tratamento de embriões de *zebrafish* afetados com sintomas de *Parkinson-like*.

7 CONCLUSÃO

- O presente estudo avaliou o estudo da associação de óleo essencial de *P. nigrum* e levodopa como uma alternativa para o tratamento dos efeitos tóxicos de *Danio rerio* em estágio embrio-larval como modelo animal com sintomas de *Parkinson-like*.
- Concluímos que a rotenona foi tóxica em nosso modelo de *Parkinson-like*. A exposição à mesma produziu atraso na eclosão, efeitos teratogênicos e comportamentais.
- A levodopa em maiores concentrações (0,750; 1,000 mM) protegeu parcialmente os animais contra a ação da rotenona.
- *Piper nigrum* em pequenas concentrações protegeu os animais contra rotenona, entretanto, em maiores concentrações foi tóxica e provocou atraso na eclosão, efeitos teratogênicos e mortalidade nos animais.
- Os animais expostos ao grupo contendo a mistura das três substâncias, não houve eclosão durante todo tempo de exposição indicando que a sinergia entre levodopa e *Piper nigrum* pode exercer alguma toxicidade.
- Diante dos efeitos observados nos animais, isso nos oferece uma oportunidade para testar outros compostos que reduzam a toxicidade de rotenona reduzindo os sintomas de *Parkinson-like* e nos direcione a identificar novas estratégias terapêuticas ou de prevenção para Doença de Parkinson.

8 REFERÊNCIAS

- ANICHTCHIK, Oleg V. et al. Neurochemical and behavioural changes in zebrafish *Danio rerio* after systemic administration of 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine. **Journal of neurochemistry**, v. 88, n. 2, p. 443-453, 2004.
- AMRO, MS et al. O papel potencial dos produtos à base de plantas no tratamento da doença de Parkinson. **La Clinica terapeutica**, v. 169, n. 1, pág. e23-e33, 2018.
- AVDESH, Avdesh et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 69, p. e4196, 2012.
- BALESTRINO R, Schapira AH V. Parkinson Disease: **A Review For The General Neurologist**. Eur J Neurol. 2019.
- BALL, Nicole et al. Parkinson's disease and the environment. **Frontiers in neurology**, v. 10, p. 218, 2019.
- BARONE, Paolo et al. Pisa syndrome in Parkinson's disease and parkinsonism: clinical features, pathophysiology, and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 10, p. 1063-1074, 2016.
- BASNET, Ram Manohar et al. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 23, 2019.
- BEEKHUIJZEN, Manon et al. From cutting edge to guideline: A first step in harmonization of the zebrafish embryotoxicity test (ZET) by describing the most optimal test conditions and morphology scoring system. **Reproductive Toxicology**, v. 56, p. 64-76, 2015.
- BITTENCOURT, T. Q. M. et al. Efeitos tóxicos de compostos de vanádio sobre os parâmetros biológicos de embriões e adultos de zebrafish (*Danio rerio*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 1877-1886, 2018.
- BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A. C. Pacientes com Parkinson no contexto da Política Pública de Saúde Brasileira. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 3, p. 7-9, 2016.
- BRAAK, Heiko; DEL TREDICI, Kelly. Invited Article: Nervous system pathology in sporadic Parkinson disease. **Neurology**, v. 70, n. 20, p. 1916-1925, 2008.
- BRUNDO, Maria Violetta; SALVAGGIO, Antonio. Zebrafish or *Danio rerio*: a new model in nanotoxicology study. **Recent advances in zebrafish researches**, v. 10, p. 121-33, 2018.
- BUTT, Masood Sadiq et al. Black pepper and health claims: a comprehensive treatise. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 9, p. 875-886, 2013.
- CADENA, Marília R. Sales et al. As larvas do peixe-zebra (*Danio rerio*) apresentam defeitos comportamentais e de desenvolvimento embrionário quando expostas a opióides na fase embrionária. **Neurotoxicologia e teratologia**, v. 85, p. 106964, 2021.
- CADENA, Pabyton Gonçalves et al. Folic acid reduces the ethanol-induced morphological and behavioral defects in embryonic and larval zebrafish (*Danio rerio*) as a model for fetal alcohol spectrum disorder (FASD). **Reproductive Toxicology**, v. 96, p. 249-257, 2020.

CARDOSO, Francisco. Tratamento da doença de Parkinson. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 53, n. 1, p. 1-10, 1995.

CHEN, Shu-Xia et al. Essential Oils from Spices Inhibit Cholinesterase Activity and Improve Behavioral Disorder in AlCl₃ Induced Dementia. **Chemistry & biodiversity**, v. 19, n. 1, p. e202100443, 2022.

CREABY, Mark W.; COLE, Michael H. Gait characteristics and falls in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Parkinsonism & related disorders**, v. 57, p. 1-8, 2018.

CRONIN, Aileen; GREALLY, Maura. Neuroprotective and neuro-restorative effects of minocycline and rasagiline in a zebrafish 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 367, p. 34-46, 2017.

DAL SANTO, G.; CONTERATO, G. M. M.; BARCELLOS, L. J. G.; ROSEMBERG, D.B.; PIATO, A. L. Acute restraint stress induces an imbalance in the oxidative status of the zebrafish brain. **Neuroscience Letters**, v. 558, p. 103–108, 2014.

DAL SANTO, Glaucia et al. Hexane extract from *SpoSndias mombin* L. (Anacardiaceae) prevents behavioral and oxidative status changes on model of Parkinson's disease in zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 241, p. 108953, 2021.

DE ANDRADE, André Lucas Corrêa et al. Efeitos motores da rotenona em zebrafish como modelo animal da doença de Parkinson-like. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 15, n. 6, p. e10196-e10196, 2022.

ENGESZER, R. E.; PATTERSON, L. B.; RAO, A. A. et al. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. **Zebrafish**, Larchmont, v. 4, n. 1, p. 21-40, Spring 2007.

FAHN, Stanley. The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 23, n. S3, p. S497-S508, 2008.

FENG, Chien-Wei et al. Effects of 6-hydroxydopamine exposure on motor activity and biochemical expression in zebrafish (*Danio rerio*) larvae. **Zebrafish**, v. 11, n. 3, p. 227-239, 2014.

FERREIRA, Eberto Tibúrcio et al. A utilização de plantas medicinais e fitoterápicos: uma revisão integrativa sobre a atuação do enfermeiro. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 3, p. 1511-1523, 2019.

GAO, P. et al. Universality analysis of the existence of substantia nigra “swallow tail” appearance of non-Parkinson patients in 3T SWI. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 65-37, 2016.

GOLDMAN, Samuel M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 54, p. 141-164, 2014.

GOMES, S. S. et al. Efeitos tóxicos dos sedimentos do estuário do rio Capibaribe em embriões de zebrafish (*Danio rerio*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 623-632, 2020.

GUPTA, S. K. et al. Comparative anti-nociceptive, anti-inflammatory and toxicity profile of nimesulide vs nimesulide and piperine combination. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 6, p. 657-662, 2000.

GRUNWALD, David Jonas; EISEN, Judith S. Cabeceiras do peixe-zebra – surgimento de um novo modelo de vertebrado. **Nature revisa genetics**, v. 3, n. 9, pág. 717-724, 2002.

HISATA, John S. et al. Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks. **Final supplemental environmental impact statement. Washington Department of Fish and Wildlife**, Olympia, 2002.

HOWE, Kerstin et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, 2013.

IBANEZ, Laura et al. Parkinson disease polygenic risk score is associated with Parkinson disease status and age at onset but not with alpha-synuclein cerebrospinal fluid levels. **BMC neurology**, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2017.

KALIA, Lorraine V.; LANG, Anthony E. Evolving basic, pathological and clinical concepts in PD. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, n. 2, p. 65-66, 2016.

KALUEFF, Allan V.; STEWART, Adam Michael; GERLAI, Robert. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KHOTIMAH, Husnul; SUMITRO, Sutiman B.; WIDODO, M. Aris. Zebrafish Parkinson's model: rotenone decrease motility, dopamine, and increase α -synuclein aggregation and apoptosis of zebrafish brain. **International Journal of ChemTech Research**, v. 4, p. 614-21, 2015.

KHOTIMAH, Husnul et al. Centella asiatica increased the body length through the modulation of antioxidant in rotenone-induced zebrafish larvae. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 11, n. 2, p. 827-833, 2018.

KIMMEL, Charles B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics**, v. 203, n. 3, p. 253-310, 1995.

LAMMER, E. et al. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 196-209, 2009.

LELE, Z.; KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology advances**, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

LIU, Qianqian et al. Resveratrol synergizes with low doses of L-DOPA to improve MPTP-induced Parkinson disease in mice. **Behavioural brain research**, v. 367, p. 10-18, 2019.

MA, Jiangnan et al. Prion-like mechanisms in Parkinson's disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 552, 2019.

MANASA, K. et al. Teleost Model as an Alternative in Parkinson's Disease. **Neurology India**, v. 68, n. 5, p. 979, 2020.

MELO, Karina Motta et al. Short-term exposure to low doses of rotenone induces developmental, biochemical, behavioral, and histological changes in fish. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 18, p. 13926-13938, 2015.

MONTEIRO, Elren Passos et al. Aspectos biomecânicos da locomoção de pessoas com doença de Parkinson: revisão narrativa. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 39, p. 450-457, 2017.

MOU, Lei; DING, Wei; FERNANDEZ-FUNEZ, Pedro. Open questions on the nature of Parkinson's disease: from triggers to spreading pathology. **Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 2, p. 73-81, 2020.

NASCIMENTO, Alexandra; PRADE, Ana Carla Koetz. Aromaterapia: o poder das plantas e dos óleos essenciais. **Recife: Fiocruz-PE**, 2020.

NASKAR, Amit; MOHANAKUMAR, K. P. **Synergistic actions of melatonin in combination with anti-parkinsonian drugs in experimental model of Parkinson's disease**. 2015. Tese de Doutorado. University of Calcutta.

NOYES, P., GARCIA, G., TANGUAY, R. L. Advances in the Use of Zebrafish in Developmental Toxicology: Linking Genetics, Behavior, and High-Throughput Testing Strategies. Chapter: December, 2018.

NUNES, Mauro E. et al. Chronic treatment with paraquat induces brain injury, changes in antioxidant defenses system, and modulates behavioral functions in zebrafish. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 6, p. 3925-3934, 2017.

OBESO, JA et al. Passado, presente e futuro da doença de Parkinson: um ensaio especial sobre o 200º aniversário da paralisia trêmula. **Distúrbios do Movimento**, v. 32, n. 9, pág. 1264-1310, 2017.

OECD, Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, Section 2, OECD Publishing, (July), pp.1–22, 2013.

PANG, Shirley Yin-Yu et al. A interação do envelhecimento, genética e fatores ambientais na patogênese da doença de Parkinson. **Neurodegeneração translacional**, v. 8, n. 1, pág. 1-11, 2019.

PAPPERT, Eric J. et al. Levodopa stability in solution: time course, environmental effects, and practical recommendations for clinical use. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 11, n. 1, p. 24-26, 1996.

PARDO, Carlos A.; MEFFERT, Mollie K. Animal models in autism research: The legacy of Paul H. Patterson. **Experimental neurology**, v. 299, n. Pt A, p. 197, 2018.

PATEL, Paritosh et al. Selective in vivo molecular and cellular biocompatibility of black peppercorns by piperine-protein intrinsic atomic interaction with elicited oxidative stress and apoptosis in zebrafish eleuthero embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 192, p. 110321, 2020.

PEDROSO, Reginaldo dos Santos; ANDRADE, Gécica; PIRES, Regina Helena. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, 2021.

PINHEIRO, J. E. S.; BARBOSA, M. T. Doença de Parkinson e Outros Distúrbios do Movimento em Idosos. In: FREITAS, E. V. D.; PY, L. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

PRZEDBORSKI, Serge et al. Introdução da Série: Neurodegeneração: O que é e onde estamos? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 1, pág. 3-10, 2003.

QUIJIA, Christian Rafael; ARAUJO, Victor Hugo; CHORILLI, Marlus. Piperine: Chemical, biological and nanotechnological applications. **Acta Pharmaceutica**, v. 71, n. 2, p. 185-213, 2021.

RABIEI, Zahra; SOLATI, Kamal; AMINI-KHOEI, Hossein. Fitoterapia no tratamento da doença de Parkinson: uma revisão. **Biologia farmacêutica**, v. 57, n. 1, pág. 355-362, 2019.

RANI, Linchi; MONDAL, Amal Chandra. Emerging concepts of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease progression: Pathogenic and therapeutic implications. **Mitochondrion**, v. 50, p. 25-34, 2020.

RASHEDINIA, Marzieh et al. The Effect of a Traditional Preparation Containing Piper nigrum L. and Bunium persicum (Boiss.) B. Fedtsch. on Immobility Stress-Induced Memory Loss in Mice. **BioMed research international**, v. 2021, 2021.

RICO, E. P.; ROSEMBERG, D. B.; LANGONI, A. DA S.; et al. Chronic ethanol treatment alters purine nucleotide hydrolysis and nucleotidase gene expression pattern in zebrafish brain. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 6, p. 871-878, 2011.

ROBEA, Mădălina-Andreea et al. The importance of rotenone in generating neurological and psychiatric features in zebrafish-relevance for a Parkinson's disease model. **AOSR**, v. 7, n. 1, p. 59-67, 2018.

ROSSI, Alexander et al. Projection of the prevalence of Parkinson's disease in the coming decades: Revisited. **Movement Disorders**, v. 33, n. 1, p. 156-159, 2018.

SABINA, Evan Prince; NAGAR, Shruthi; RASOOL, Mahaboobkhan. A role of piperine on monosodium urate crystal-induced inflammation—an experimental model of gouty arthritis. **Inflammation**, v. 34, n. 3, p. 184-192, 2011.

SANDERS, Laurie H. et al. Mitochondrial DNA damage: molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease. **Neurobiology of disease**, v. 70, p. 214-223, 2014.

SASZIK, Shannon M.; SMITH, Conor M. O impacto do estresse no comportamento social em peixe-zebra adulto (*Danio rerio*). **Farmacologia comportamental**, v. 29, n. 1, pág. 53-59, 2018.

SIEBEL, A. M.; BONAN, C. D.; SILVA, RS da. Zebrafish como modelo para estudos comportamentais. **Resende RR, organizador. Biotecnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações. São Paulo: Blucher, p. 15-56, 2015.**

SELVENDIRAN, K. et al. Cytoprotective effect of piperine against benzo [a] pyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1-2, p. 109-115, 2003.

SILVA, Ana Beatriz Gomes et al. Doença de Parkinson: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 5, p. 47677-47698, 2021.

SCHINDLBECK, Katharina A.; EIDELBERG, David. Network imaging biomarkers: insights and clinical applications in Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 7, p. 629-640, 2018.

SONG, Cai et al. Modeling consequences of prolonged strong unpredictable stress in zebrafish: Complex effects on behavior and physiology. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 81, p. 384-394, 2018.

SPENCE, R.; FATEMA, M. K.; ELLIS, S. et al. Diet, growth and recruitment of wild zebrafish in Bangladesh. **Journal of Fish Biology**, London, v. 71, n. 1, p. 304-309, July 2007

STUELTEN, Christina H.; PARENT, Carole A.; MONTELL, Denise J. Cell motility in cancer invasion and metastasis: insights from simple model organisms. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 5, p. 296-312, 2018.

TERRON, Andrea et al. Uma via de resultado adverso para déficits motores parkinsonianos associados à inibição do complexo I mitocondrial. **Arquivos de Toxicologia**, v. 92, n. 1, pág. 41-82, 2018.

THAKUR, Poonam et al. α -Synuclein 2.0—Moving towards cell type specific pathophysiology. **Neuroscience**, v. 412, p. 248-256, 2019.

TYSNES, Ole-Bjørn; STORSTEIN, Anette. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of neural transmission**, v. 124, n. 8, p. 901-905, 2017.

ÜNAL, I.; EMEKLI-ALTURFAN, E., Fishing for Parkinson's disease: A review of the literature, **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 62, 1-6, 2019

VAZ, R. L.; OUTEIRO, T. F.; FERREIRA, J. J. Zebrafish as an Animal Model for Drug Discovery in Parkinson's Disease and Other Movement Disorders: A Systematic Review. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. June, p. 347, 2018.

VAZ, Rita L. et al. Identificação de drogas antiparkinsonianas no modelo de 6-hidroxiopamina zebrafish. **Farmacologia Bioquímica e Comportamento**, v. 189, p. 172828, 2020.

WIJAYANTI, Aida Ratna; RIDLAYANTI, Annisa; ALI, Husnul Khotimah Muljohadi. Protection of Pegagan (*Centella asiatica*) Extract Through Hsp60 and Bax Expression on Stunting Model Zebrafish Larvae (*Danio rerio*) By Rotenone Inducted. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2021. p. 01 2019.

ZENG, Xian-Si; GENG, Wen-Shuo; JIA, Jin-Jing. Neurotoxin-induced animal models of Parkinson disease: pathogenic mechanism and assessment. **ASN neuro**, v. 10, p. 1759091418777438, 2018.

9 ANEXOS



UNIVERSIDADE
FEDERAL RURAL
DE PERNAMBUCO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da associação da Levodopa com óleo essencial de *Piper nigrum* de forma livre e em nanoemulsão como um novo produto para o tratamento da Doença de Parkinson utilizando zebrafish (*Danio rerio*) como modelo animal", protocolada sob o CEUA nº 3581030221 (00 000575), sob a responsabilidade de **Pabyton Gonçalves Cadena** e equipe; **André Lucas Corrêa de Andrade**; **Renatta Priscilla Ferreira Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) na reunião de 10/02/2021.

We certify that the proposal "Study of the association of Levodopa with *Piper nigrum* essential oil in free form and in nanoemulsion as a new product for the treatment of Parkinson's Disease using zebrafish (*Danio rerio*) as an animal model", utilizing 1825 Fishes (males and females), protocol number CEUA 3581030221 (00 000575), under the responsibility of **Pabyton Gonçalves Cadena** and team; **André Lucas Corrêa de Andrade**; **Renatta Priscilla Ferreira Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Rural Federal University of Pernambuco (CEUA/UFRPE) in the meeting of 02/10/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 03/2021 a 03/2024

Área: Ciências Biológicas

Origem:	Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA						
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	3 a 12 meses	N:	300
Linhagem:	WT (selvagem)			Peso:	1 a 2 g		
Origem:	Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA						
Espécie:	Peixes	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	1 a 7 dias	N:	1525
Linhagem:	WT (selvagem)			Peso:	1 a 1 g		

Local do experimento: No Laboratório de Ecofisiologia e Comportamento Animal - LECA

Recife, 10 de fevereiro de 2021