



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**THASSYA FERNANDA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**MECANISMO DE COMPENSAÇÃO VESTIBULAR NAS ALTERAÇÕES DO  
EQUILÍBRIO EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO INDUZIDO  
POR RESERPINA**

**SÃO CRISTÓVÃO-SE**

**2022**

**THASSYA FERNANDA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**MECANISMO DE COMPENSAÇÃO VESTIBULAR NAS ALTERAÇÕES DO  
EQUILÍBRIO EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO  
INDUZIDO POR RESERPINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

**SÃO CRISTÓVÃO**

**2022**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237m Santos, Thassya Fernanda Oliveira dos  
Mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio em um modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina / Thassya Fernanda Oliveira dos Santos ; orientador José Ronaldo dos Santos.— São Cristóvão, SE, 2022.  
84 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas)—Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Parkinson, Doença de. 2. Reabilitação. 3. Reserpina. I. Santos, José Ronaldo dos, orient. II. Título.

CDU 616.858-085

**THASSYA FERNANDA OLIVEIRA DOS SANTOS**

**MECANISMO DE COMPENSAÇÃO VESTIBULAR NAS ALTERAÇÕES DO  
EQUILÍBRIO EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO  
INDUZIDO POR RESERPINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas.

**Orientador:** Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

---

Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos (UFS)  
Orientador – Presidente da banca

---

Profa. Dra. Patrícia Rodrigues Marques de Souza (UFS)  
1º Examinador

---

Prof. Dr. Carlos Kazuo Taguchi (UFS)  
2º Examinador

---

Prof. Dr. Luís Felipe Souza da Silva (UFS)  
3º Examinador

---

Profa. Dra. Aline Cabral de Oliveira Barreto (UFS)  
4º Examinador

## AGRADECIMENTOS

Encerra-se mais um ciclo em minha vida. É a subida de mais um degrau em busca de um objetivo e de um sonho maior que se faz presente, latente e potente em minha alma. O caminhar até aqui foi árduo, desejar seguir os trilhos da carreira acadêmica não é das tarefas mais simples. Foi preciso abdicar de muito, me esforçar constantemente e acima de tudo, persistir convictamente no propósito. Ao longo do processo muitas pessoas caminharam ao meu lado, tornando a jornada mais leve e possível mais essa conquista. A vocês, deixo registrado meus sinceros agradecimentos.

A Deus, por me encher de fé, força e esperança em cada batalha. Por me acompanhar de perto, guiando sutilmente os meus caminhos, mas com tamanha generosidade, que me dá em todos os momentos o direito de escolher por onde seguir.

A meu pai Antônio e minha mãe Joseane, por desde muito cedo me mostrarem a importância dos estudos e o quanto a dedicação a eles poderia fazer diferença em minha vida. Por serem minha base, meu apoio e minha torcida. Ao meu irmão Thúllyo, pelo afeto, apoio, cuidado e parceria em meio às nossas diferenças. Vocês são meu verdadeiro tripé.

A minha vó Joelina, professora e diretora aposentada de uma escola pública do Estado. Tenho lembranças muito vivas de quando ainda pequena ela me levava para ficar com ela na escola. Não deve ser por acaso que decidi trilhar pelos caminhos da docência. A senhora que sempre se preocupou em garantir a mim uma educação de qualidade, minha profunda e imensurável gratidão.

A todos da família que sempre vibram comigo em cada conquista. Pela torcida fiel, muito obrigada.

Aos amigos de anos que acompanham de perto essa caminhada e seguem leais, incentivando, apoiando e trazendo momentos de leveza e descontração tão necessários.

Ao meu orientador José Ronaldo, que é o maior exemplo de liderança que tive a oportunidade de conhecer. A relação com seus alunos vai muito além de um elo profissional. Ronaldo é mestre, orientador, amigo, conselheiro, parceiro. Seu

compromisso com a pesquisa e com a docência é uma verdadeira fonte de inspiração para mim. Levarei seus exemplos comigo na caminhada e serei eternamente grata pelo seu acolhimento, ensinamentos, incentivos, oportunidades e principalmente, pela amizade.

A toda família LaNCE e LNFS, é difícil expressar em palavras o quão significativo é fazer parte desse grupo que sabe colocar em prática com maestria o significado do trabalho em equipe. Agradeço a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para que o desenvolver desse trabalho fosse possível. Vocês são mais que colegas de laboratório, são verdadeiros amigos. Em especial, agradeço a Marcos e a Auderlan, por todos os ensinamentos transmitidos a alguém que até então só havia trabalhado com humanos. Com eles aprendi a realizar testes, técnicas, procedimentos e análises essenciais aplicadas no laboratório. A Heitor e a Léo, pela ajuda imprescindível nas últimas rodadas de experimentos. Destaco a amizade construída com João, parceiro de viagens para Itabaiana nessa reta final. Ao longo da estrada, quantas conversas, desabafos, apoio mútuo, escuta e atenção recíproca. Obrigada pela parceria e por tornar tudo tão mais leve e divertido.

Ao Prof. Murilo Marchioro, pelos ensinamentos e questionamentos que nos faziam refletir além do óbvio.

Aos professores da banca PROASA, por toda discussão e contribuição ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do PROCFIS, por todo conhecimento transmitido.

Ao ex-secretário e atual secretária do PROCFIS, Renivan e Thais, por toda disponibilidade e atenção na resolução de nossas demandas.

Aos membros da banca de qualificação e defesa. Profa. Patrícia, pelos ensinamentos, questionamentos e contribuições desde os temidos PROASAS de mestrado que no final eram super tranquilos e proveitosos. Prof. Luís Felipe, pela atenção, disponibilidade e por trazer reflexões pertinentes que desde a banca de defesa de mestrado contribuíram para a construção desse trabalho. Prof. Carlos, o primeiro orientador e desde lá quantos reencontros regados de admiração, respeito e afeto. Obrigada pelos ensinamentos de anos, pelas

contribuições imprescindíveis na banca de qualificação e pela torcida sincera e fiel. E Profa. Aline, que prontamente aceitou somar-se aos professores da banca de qualificação e fazer parte da banca de defesa. Por ser uma grande referência desde a primeira prática em Audiologia, não tinha como querer seguir outra área. Aline exala conhecimento de uma forma que me desperta profundo encantamento.

A Universidade Federal de Sergipe, onde por muitas vezes estive por mais tempo do que em minha própria casa. Por me fazer sentir o sabor do conhecimento, os ventos de liberdade e o poder da resistência.

A CAPES, FAPITEC e CNPq pelo apoio financeiro.

**MECANISMO DE COMPENSAÇÃO VESTIBULAR NAS ALTERAÇÕES DO EQUILÍBRIO EM UM MODELO PROGRESSIVO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA, Thassya Fernanda Oliveira dos Santos, São Cristóvão, 2022.**

As alterações do equilíbrio na doença de Parkinson (DP) respondem de forma insatisfatória aos medicamentos dopaminérgicos utilizados no tratamento dos sintomas motores, suscitando o envolvimento de neurotransmissores adicionais no desequilíbrio, como é o caso do sistema colinérgico do núcleo pedunculopontino (NPP). Dada a complexidade da terapêutica medicamentosa do desequilíbrio na DP, o presente estudo objetivou investigar a atuação do mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio em um modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina (RES). No delineamento experimental 1, 28 animais foram divididos de forma aleatória em 2 grupos: controle (animais tratados com solução veículo – CTR) e RES (animais tratados com RES 0,1 mg/kg),  $n = 14$  por grupo. As avaliações comportamentais consistiram em: catalepsia (a cada 48h); teste de campo aberto (48h após a 2<sup>o</sup>, 4<sup>a</sup> e 10<sup>o</sup> injeções) e teste de equilíbrio na trave (realizado no dia 0 e 48h após a 4<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> injeções). No delineamento experimental 2, 42 animais foram divididos de forma aleatória em 3 grupos: CTR, RES e controle total (animais tratados com solução veículo e que não foram submetidos aos testes de equilíbrio – CTRt),  $n = 14$  por grupo. As avaliações comportamentais consistiram em: catalepsia e testes de equilíbrio na trave (equilíbrio estático e equilíbrio dinâmico), todos realizados nos dias 0 e 48h após a 4<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> injeções. 48h após a 4<sup>a</sup> injeção, um observador externo selecionou aleatoriamente metade dos animais de cada grupo ( $n = 7$ ) de ambos os delineamentos experimentais para serem perfundidos. Os animais restantes ( $n = 7$  por grupo) foram perfundidos 48h após a 10<sup>a</sup> injeção. Para os animais do delineamento experimental 1 foi realizada análise imunohistoquímica para colina acetiltransferase (ChAT) no núcleo NPP. No delineamento experimental 1 os animais do grupo RES apresentaram maior tempo de permanência na barra no teste de catalepsia, a partir do dia 12 ( $p = 0,03$ ) até o final do tratamento, dia 20 ( $p < 0,01$ ), quando comparados com o grupo CTR. Na atividade geral do campo aberto, avaliada no dia 20, o grupo RES apresentou uma diminuição da distância total percorrida ( $p = 0,04$ ), velocidade média ( $p = 0,04$ ) e do número de eventos de rearing ( $p < 0,01$ ), quando comparados ao grupo CTR. No teste de equilíbrio na trave os animais do grupo RES apresentaram um tempo de travessia maior no dia 8 ( $p < 0,01$ ) e no dia 20 ( $p < 0,01$ ) quando comparados com o grupo CTR. No NPP houve uma diminuição de células ChAT+ para os animais do grupo RES que receberam 4 ( $p < 0,01$ ) e 10 injeções ( $p < 0,01$ ). No delineamento experimental 2 os animais do grupo RES apresentaram maior tempo de permanência na barra, no teste de catalepsia no dia 20 ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo CTR. Na trave de equilíbrio estático os animais do grupo RES apresentaram um tempo de permanência sobre a trave menor no dia 20 ( $p < 0,1$ ) e uma pontuação menor (score) no dia 8 ( $p = 0,01$ ) e no dia 20 ( $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo CTR. O grupo RES

mostrou um tempo de travessia maior no dia 8 ( $p < 0,01$ ) e no dia 20 ( $p < 0,01$ ), quando comparado ao CTR. No presente estudo a administração repetida de baixas doses (0,1 mg/kg) de reserpina foi capaz de causar alterações comportamentais do equilíbrio desde os estágios iniciais. Essas alterações foram acompanhadas pela redução do número de células imunorreativas para ChAT no NPP, o que permitiu verificar que o uso de exercícios repetidos potencializou a atuação do mecanismo central de compensação vestibular.

**Descritores:** Doença de Parkinson, Colina acetiltransferase, Reabilitação

**VESTIBULAR COMPENSATION MECHANISM IN BALANCE CHANGES IN A RESERPINE-INDUCED PROGRESSIVE MODEL OF PARKINSONISM, Thassyia Fernanda Oliveira dos Santos, São Cristóvão, 2022.**

Balance alterations in Parkinson's disease (PD) have an unsatisfactory response to dopaminergic drugs used in the treatment of motor symptoms, leading to the involvement of additional neurotransmitters in the imbalance, such as the cholinergic system of the pedunculopontine nucleus (PPN). Due to the complexity of drug therapy for imbalance in PD, the present study investigated the role of the vestibular compensation mechanism in balance alterations in a reserpine-induced progressive model of parkinsonism. In experiment 1, 28 animals were randomly divided into 2 groups: control (animals treated with the vehicle – CTR) and reserpine (RES) (animals treated with 0.1 mg/kg RES),  $n = 14$  per group. Behavioral assessments consisted of a catalepsy test (every 48h); an open field test (48h after the 2nd, 4th and 10th injections), and a balance beam test (performed on day 0 and 48h after the 4th and 10th injections). In experiment 2, 42 animals were randomly divided into 3 groups: CTR, RES, and total control (CTRt – animals treated with vehicle and not submitted to equilibrium tests),  $n = 14$  per group. Behavioral assessments consisted of a catalepsy test, and a balance beam test (static balance and dynamic balance), all performed on day 0 and 48h after the 4th and 10th injections. An external observer randomly selected half of the animals in each group ( $n = 7$ ) of both experiments to be perfused 48h after the 4th injection. The remaining animals ( $n = 7$  per group) were perfused 48h after the 10th injection. In experiment 1, animals were submitted to immunohistochemical analysis for choline acetyltransferase (ChAT) in the pedunculopontine nucleus (PPN). In experiment 1, the RES group spent more time on the bar in the catalepsy test, from day 12 ( $p = 0.03$ ) until the end of treatment – day 20 ( $p < 0.01$ ) when compared with the CTR group. In the general activity of the open field test, assessed on day 20, the RES group showed a decrease in the total distance traveled ( $p = 0.04$ ), mean speed ( $p = 0.04$ ), and the number of rearing events ( $p < 0.01$ ) when compared to the CTR group. In the balance beam test, the RES group had a longer crossing time on day 8 ( $p < 0.01$ ) and on day 20 ( $p < 0.01$ ) when compared to the CTR group. In PPN, there was a decrease in ChAT+ cells in the RES group that received 4 ( $p < 0.01$ ) and 10 injections of reserpine ( $p < 0.01$ ). In experiment 2, the RES group spent more time on the bar in the catalepsy test on day 20 ( $p < 0.1$ ) when compared to the CTR group. In the static balance beam, the RES group had a shorter time on the beam on day 20 ( $p < 0.1$ ), and a lower score on day 8 ( $p = 0.01$ ) and on day 20 ( $p < 0.1$ ) when compared to the CTR group. The RES group showed a longer crossing time on day 8 ( $p < 0.01$ ) and day 20 ( $p < 0.01$ ) when compared to CTR. In the present study, repeated administration of low doses (0.1 mg/kg) of reserpine was able to cause behavioral changes in balance from the initial stages. These changes were accompanied by a decreased number of immunoreactive cells for ChAT in the PPN. It was also possible to verify that the repeated

exercises potentiated the performance of the central vestibular compensation mechanism.

**Keywords:** Parkinson's Disease; Choline acetyltransferase; Rehabilitation.

## RESUMO PARA A SOCIEDADE

O envelhecimento da população acontece de forma crescente no mundo inteiro e constitui um fator de risco para muitas doenças. Nesse contexto está a doença de Parkinson (DP), considerada a segunda doença neurodegenerativa, relacionada ao envelhecimento, mais comum. A DP tem como características a degeneração de neurônios dopaminérgicos em uma área do encéfalo chamada substância negra parte compacta e a consequente redução do neurotransmissor dopamina, o qual está envolvido com a atividade motora, em outra área denominada estriado. Essas características são responsáveis pelos sintomas motores observados na DP, como tremor, rigidez e alterações do equilíbrio. As alterações do equilíbrio apresentam uma natureza complexa e pouco compreendida pelos estudiosos. Um exemplo disso, é o fato dessas alterações não responderem de forma satisfatória aos medicamentos dopaminérgicos utilizados no tratamento dos outros sintomas motores, o que fez os pesquisadores suspeitarem da participação de outros tipos de neurotransmissores, como o sistema de neurotransmissão colinérgico em uma área chamada núcleo pedunculopontino (NPP), nos distúrbios do equilíbrio em pacientes com a DP. Devido a essa complexidade na abordagem terapêutica das alterações do equilíbrio o presente estudo teve como objetivo investigar a participação do mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio em ratos que foram induzidos por meio de um fármaco chamado reserpina (RES) a reproduzirem a DP. Esse mecanismo ocorre de maneira natural após uma lesão no sistema vestibular periférico ou central, fazendo com que os sintomas dessas alterações, como tontura, quedas e desequilíbrio diminuam gradativamente, porém de maneira lenta e por vezes incompleta. Trata-se de um componente importante no processo terapêutico de reabilitação vestibular, que por sua vez busca a recuperação clínica de pacientes com distúrbios do equilíbrio promovendo e acelerando o mecanismo de compensação, utilizando exercícios repetidos de olhos, cabeça e corpo. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa foi observada uma diminuição do número de células colinérgicas no NPP para os animais que haviam recebido 4 injeções de RES, porém houve um aumento dessas células nos animais que receberam 10 injeções, o que nos fez refletir sobre a participação do mecanismo de compensação potencializado pela reabilitação vestibular, uma vez que os animais eram repetidamente submetidos a tarefas de avaliação do equilíbrio. É importante mencionar que o uso humanitário de animais em pesquisa é autorizado por lei e o presente estudo obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe. Assim, para responder ao nosso objetivo nesse estudo, os animais foram submetidos a uma série de testes que avaliaram a inibição motora e rigidez (teste de catalepsia), o comportamento locomotor e exploratório (teste de campo aberto) e o equilíbrio estático e dinâmico (traves de equilíbrio), enquanto recebiam as injeções de RES a cada 48h. Entretanto, nós diminuimos exposição dos animais aos testes de

equilíbrio para apenas uma avaliação inicial e uma avaliação final. Ao final do experimento os animais que receberam 4 ou 10 injeções foram eutanasiados e foi investigado se houve aumento ou diminuição do número de células colinérgicas no NPP. Verificou-se, portanto, que as alterações do equilíbrio se manifestaram desde os estágios iniciais, antes das alterações avaliadas pelos outros testes motores (catalepsia e campo aberto) e que essas alterações do equilíbrio foram acompanhadas pela redução do número de células colinérgicas no NPP tanto para os animais que receberam 4 quanto para os animais que receberam 10 injeções. Assim, foi possível confirmar ainda, que o uso de exercícios repetidos potencializou a atuação do mecanismo central de compensação vestibular em nosso estudo anterior.

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Ilustração simplificada do circuito funcional dos núcleos da base.....	10
<b>Figura 2:</b> Ilustração esquemática do delineamento experimental 1.....	25
<b>Figura 3:</b> Ilustração esquemática do delineamento experimental 2.....	26
<b>Figura 4:</b> Ilustração do teste de catalepsia.....	27
<b>Figura 5:</b> Ilustração do teste de campo aberto.....	28
<b>Figura 6:</b> Ilustração do teste de equilíbrio na trave (equilíbrio estático).....	29
<b>Figura 7:</b> Ilustração do teste de equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico).....	30
<b>Figura 8:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no comportamento catalepsia em ratos.....	34
<b>Figura 9:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) sobre a atividade motora.....	35
<b>Figura 10:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) sobre a atividade motora.....	36
<b>Figura 11:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) sobre a atividade motora.....	36
<b>Figura 12:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos.....	37
<b>Figura 13:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos.....	38
<b>Figura 14:</b> Administração crônica e repetida de RES (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) sobre o número de células ChAT+ no NPP em animais que receberam 4 injeções (A) e 10 injeções (B).....	39

<b>Figura 15:</b> Imagens representativas do número de neurônios ChAT+ no NPP dos animais tratados com 4 ou 10 injeções de reserpina (RES) e seus respectivos CTR barra de escala. 200 $\mu$ m.....	40
<b>Figura 16:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no comportamento catalepsia em ratos.....	41
<b>Figura 17:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no comportamento catalepsia em ratos.....	42
<b>Figura 18:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no tempo de permanência na trave de equilíbrio (equilíbrio estático) em ratos.....	43
<b>Figura 19:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no tempo de permanência na trave de equilíbrio (equilíbrio estático) em ratos.....	43
<b>Figura 20:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) por meio do score em ratos.....	44
<b>Figura 21:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) por meio do score em ratos.....	45
<b>Figura 22:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos.....	46
<b>Figura 23:</b> Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos.....	46

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ACh – Acetilcolina  
CEPA - Comitê de ética em pesquisas com animais  
ChAT – Colina Acetiltransferase  
CTR - Grupo controle  
DA - Dopamina  
DP - Doença de Parkinson  
E.P.M. - Erro padrão da média  
Gpe – Globo pálido externo  
Gpi – Globo pálido interno  
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina  
NE – Norepinefrina  
MSNs - Neurônios espinhosos médios  
NPP – Núcleo pedunculopontino  
NST – Núcleo subtalâmico  
NVM – Núcleo vestibular medial  
6-OHDA - 6- hidroxidopamina  
RV – Reabilitação vestibular  
PB – Tampão fosfato  
PBS – Tampão fosfato salina  
PFA - Paraformaldeido  
RES – Reserpina  
SN – Substância Negra  
SNC – Sistema nervoso central  
SNP – Sistema nervoso periférico  
SNpc - Substância negra parte compacta  
SNpr – Substância negra parte reticulada  
TH - Tirosina hidroxilase  
UFS – Universidade Federal de Sergipe  
VMAT – Transportador vesicular de monoaminas  
VTA – Área tegmental ventral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1. DOENÇA DE PARKINSON.....	4
2.1.1. Histórico.....	4
2.1.2. Epidemiologia.....	5
2.1.3. Etiologia.....	6
2.1.4. Fisiopatologia.....	8
2.1.5. Sintomas da DP.....	11
2.2. EQUILÍBRIO.....	12
2.2.1. Fisiologia do Equilíbrio.....	12
2.2.2. Aspectos fisiológicos do equilíbrio na DP.....	15
2.2.3. Compensação vestibular nas alterações do equilíbrio e a estratégia terapêutica de RV.....	17
2.2.4. Impactos das alterações do equilíbrio.....	19
2.3. MODELOS ANIMAIS.....	20
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO.....</b>	<b>23</b>
4.1. ANIMAIS.....	23
4.2. DROGAS.....	23
4.3. DELINAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
4.3.1. Delineamento Experimental 1: Atuação do mecanismo de compensação vestibular na DP.....	24
4.3.2. Delineamento Experimental 2: Ativação dos núcleos vestibulares, cerebelo, NPP, e núcleos da base após testes de equilíbrio.....	25

4.4. TESTES COMPORTAMENTAIS.....	26
<b>4.4.1. Teste de catalepsia.....</b>	<b>26</b>
<b>4.4.2. Teste de campo aberto.....</b>	<b>27</b>
<b>4.4.3. Teste de equilíbrio na trave (equilíbrio estático).....</b>	<b>28</b>
<b>4.4.4. Teste de equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico).....</b>	<b>29</b>
4.5. PERFUSÃO DOS ANIMAIS.....	30
4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	31
4.7. AQUISIÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS.....	32
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1: Atuação do mecanismo de compensação vestibular na DP.....	34
<b>5.1.1. Teste de catalepsia.....</b>	<b>34</b>
<b>5.1.2. Teste de campo aberto.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1.3. Teste de equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico).....</b>	<b>36</b>
<b>5.1.4. Imunorreatividade para ChAT+.....</b>	<b>38</b>
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2: Ativação dos núcleos vestibulares, cerebelo, NPP e núcleos vestibulares.....	40
<b>5.2.1. Teste de catalepsia.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.2. Teste de equilíbrio na trave (equilíbrio estático – tempo).....</b>	<b>42</b>
<b>5.2.3. Teste de equilíbrio na trave (equilíbrio estático – score).....</b>	<b>44</b>
<b>5.2.4. Teste de equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico).....</b>	<b>45</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional acontece mundialmente e traz consigo demandas que tornam esse fenômeno um objeto de estudo da comunidade científica. Caracterizado por um processo gradual de deterioração da capacidade funcional do corpo (PÉREZ; SIERRA, 2009; SILVA, 2014), o envelhecimento é um processo complexo e multifatorial que provoca alterações a nível estrutural, funcional e molecular do organismo (MAGUIRE; SLATER, 2013). Por conta desses aspectos, o envelhecimento constitui um fator de risco para muitas doenças (SONG; CHEN, 2015; SILVA, 2014), dentre as quais encontram-se as doenças neurodegenerativas (SONG; CHEN, 2015).

No campo das doenças neurodegenerativas destaca-se a DP, considerada o distúrbio do movimento mais comum (TYSNES; STORSTEIN, 2017) e a segunda doença neurodegenerativa geriátrica mais prevalente, ficando atrás da doença de Alzheimer (CHEN; TSAI, 2010). Trata-se de um distúrbio crônico e progressivo (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020; ZESIEWICZ, 2019), caracterizado pela degeneração predominante e progressiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc, pela presença de corpos de Lewy no citoplasma e depleção de dopamina (DA) no estriado (CARMICHAEL; LOCKHART, 2012; OPARA *et al.*, 2017; SHAHMORADIAN *et al.*, 2019).

As características fisiopatológicas da DP são responsáveis pelo surgimento dos sintomas motores (TYSNES; STORSTEIN, 2017; OPARA *et al.*, 2017), dentre os quais encontram-se a bradicinesia, tremor, rigidez e desequilíbrio (ZESIEWICZ, 2019; OPARA *et al.*, 2017). Este último, se caracteriza por apresentar uma natureza complexa e pouco compreendida pela literatura (RINALDUZZI *et al.*, 2015), o que desperta interesse pelo entendimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos nesse sintoma.

Os déficits de equilíbrio respondem de forma insatisfatória aos medicamentos dopaminérgicos, suscitando a possibilidade de atuação de neurotransmissores adicionais na função do equilíbrio (MORRIS *et al.*, 2019). Nesse sentido, a comunidade científica tem investigado a participação do NPP nas alterações do equilíbrio (PAHAPILL; LOZANO, 2000; KARACHI *et al.*, 2010; MORO *et al.*, 2010; MORRIS *et al.*, 2019), ressaltando o fato de que esse núcleo representa uma das fontes mais importantes de neurônios colinérgicos do encéfalo (BOHNE; ALBIN, 2011). Somado a isso, tem sido observado o envolvimento dessa área em déficits de equilíbrio em modelos animais da DP (JANICKOVA *et al.*, 2017; KARACH; FRANCOIS, 2018), além de ter sido verificada uma redução da acetilcolina (ACh) em pessoas com DP quando em comparação com controles saudáveis (BOHNEN *et al.*, 2012).

Dada a complexidade da terapêutica medicamentosa das alterações do equilíbrio na DP (KARACHI; FRANCOIS, 2018), há uma necessidade de explorar abordagens não dopaminérgicas para o tratamento de problemas de equilíbrio e marcha em indivíduos com DP (ETON; LEPORE, 2008). Logo, se faz relevante voltar o olhar para a participação do mecanismo fisiológico de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio em pacientes com a DP. Esse mecanismo está interligado à uma série de propriedades adicionais do sistema de controle postural que buscam garantir a capacidade de se adaptar às mudanças nas condições do ambiente e a plasticidade neural induzida por lesões periféricas ou centrais. Trata-se de um componente essencial no processo terapêutico de reabilitação vestibular (RV), a qual visa a recuperação clínica de pacientes com distúrbios do equilíbrio (BRONSTEIN; PAVLOU, 2013). Em vários estudos têm sido observado os benefícios dessa estratégia no tratamento das alterações do equilíbrio nas mais diferentes situações clínicas (HILLIER; MCDONNELL, 2016; SULWAY E WHITNEY, 2019) e inclusive, no caso de pacientes acometidos pela DP (ACARER *et al.*, 2015; ROSSI-IZQUIERDO *et al.*, 2009).

Assim, buscando investigar a atuação do mecanismo de compensação vestibular na DP, o presente estudo o fez por meio da utilização de um modelo experimental com animal que mimetiza a doença por meio da utilização de baixas doses repetidas de RES, a qual atua de modo a impedir o armazenamento de monoaminas nas vesículas sinápticas, causando a depleção dessas monoaminas em terminais nervosos, induzindo assim, sintomas motores comumente observados na DP (ALVES *et al.*, 2000).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. DOENÇA DE PARKINSON

#### 2.1.1. Histórico

Em 1817, em seu livro *“Um Ensaio sobre a Paralisia Agitante”*, James Parkinson descreveu, pela primeira vez de forma clínica (KHANDHAR; MARKS, 2007; REICH; SAVITT, 2019), os sinais e sintomas da DP a partir da observação de seis casos clínicos (OBESO *et al.*, 2017). Entretanto, em documentos mais antigos é possível encontrar a descrição de componentes relacionados a DP (DORSEY *et al.*, 2018), a qual era denominada de Kampavata. Dentre esses componentes estavam a dificuldade de movimento, sonolência e olhar fixo (RAUDINO, 2012). Mais tarde, sintomas como tremor de repouso e festinação foram descritos respectivamente por Sylvius de La Boë em 1680 e por Sauvages em 1768 (GOETZ, 2011).

Em 1872, Jean-Martin Charcot, considerado o principal neurologista do século XIX, foi mais completo em suas descrições (OBESO *et al.*, 2017). De acordo com Charcot, a bradicinesia e a rigidez representavam características chaves da doença (GOETZ, 2003; GOETZ, 2011; OBESO *et al.*, 2017) e o tremor poderia ser considerado típico, mas não uma característica essencial para o diagnóstico da DP (OBESO *et al.*, 2017), o que o fez argumentar contra o termo paralisia agitante, sugerindo a utilização do nome DP para designar o distúrbio, em homenagem a James Parkinson (FAHN, 2003; GOETZ, 2011).

Com o passar dos anos a acinesia foi sendo reconhecida como sintoma da DP pelos estudiosos. Em 1959, Schwab e Peterson descreveram, dentro da definição de acinesia, sintomas como fadiga, diminuição da amplitude de movimento, dificuldade para mudar para outros padrões de contração, apatia, incapacidade de completar ações, dificuldade de iniciar um ato e dificuldade em executar dois eventos motores simultaneamente (FAHN, 2003).

Embora as descobertas a respeito das condições clínicas da DP tenham ocorrido de maneira rápida, o mesmo não aconteceu em relação aos aspectos anatomopatológicos, que permaneceram enigmáticos por bastante tempo. Durante a década de 1920, Trétiakoff foi o primeiro a relatar alterações

neuropatológicas na substância negra (SN) em pacientes com DP, observando a despigmentação macroscópica dessa região, que mais tarde descobriu-se ser resultado da perda de neurônios dessa área, os quais contém grandes quantidades de neuromelanina, observando ainda a perda microscópica de neurônios associados à gliose e à presença de inclusões citoplasmáticas denominadas de corpos de Lewy (PRZEDBORSKI, 2017).

As pesquisas sobre as bases neuroquímicas da DP vieram logo em seguida e em 1959, após a realização de experimentos anteriores, Carlsson sugeriu que a DP estava relacionada à DA. No ano seguinte, Ehringer e Hornykiewicz, mediram a DA e a norepinefrina (NE) em tecido humano *post mortem* de indivíduos com distúrbios nos gânglios da base e verificaram uma redução da DA neostriatal no parkinsonismo. A partir desses achados deu-se início à era moderna de compreensão do parkinsonismo e do papel da DA no encéfalo (FAHN, 2003; PRZEDBORSKI, 2017).

### **2.1.2. Epidemiologia**

Dados epidemiológicos referentes à DP são de grande relevância e interesse para a comunidade científica, tendo em vista o seu potencial para identificar fatores de risco e consequentemente proporcionar uma melhor compreensão da história natural da doença. Somado a isso, esses dados são utilizados como embasamento na elaboração de um planejamento eficaz nos serviços de saúde, algo extremamente necessário diante do número crescente de idosos e da necessidade de cuidados a eles demandados (PRINGSHEIM *et al.*, 2014).

A DP afeta milhões de pessoas ao redor do mundo (ZESIEWICZ, 2019). Trata-se da segunda doença neurodegenerativa mais comum, sendo a primeira, a doença de Alzheimer (LEE; GILBERT, 2016). De acordo com a literatura, o aumento da idade constitui o principal fator de risco para a doença (Lee e Gilbert, 2016), de modo que o aumento da expectativa de vida pode provocar um crescimento de mais de 50% do número de pessoas com a DP até 2030 (DORSEY *et al.*, 2007). Nesse contexto, os dados de prevalência aumentam com

o avançar da idade (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020), passando de 0,3% na população geral, para cerca de 1% em sujeitos com mais de 60 anos nos países industrializados (LAU; BRETELER, 2006). As taxas de incidência na população geral têm uma estimativa de 13 casos por 100.000 enquanto que as populações com 65 anos ou mais apresentam uma média de 180 casos por 100.000 ao ano (DRIVER *et al.*, 2009).

Ao longo da vida os homens têm maiores chances de ter a DP do que as mulheres (CHARLES; NELSON, 2016; ZESIEWICZ, 2019). Além disso, o início da doença costuma acontecer mais cedo nos homens do que nas mulheres (TWELVES, PERKINS; COUNSELL, 2003) e uma vez que adquirem a DP, as mulheres podem ter um fenótipo mais benigno, com progressão mais lenta e isso pode ser explicado pela maior atividade estrogênica presente nas mulheres (HAAXMA *et al.*, 2007).

### **2.1.3. Etiologia**

A etiologia da DP até o momento não é bem compreendida e não se tem conhecimento sobre o que desencadeia tal patologia (CAPRIOTTI; TERZAKIS, 2016). Em busca desse entendimento, modelos experimentais de DP envolvendo investigações neuropatológicas, análises genéticas e estudos epidemiológicos têm tentado elucidar a condição detalhada da DP (ABRUZZO *et al.*, 2017).

Os fatores de risco para a DP podem ser classificados em genéticos ou ambientais (ABRUZZO *et al.*, 2017; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Uma pequena parcela dos casos é atribuída a mutações genéticas conhecidas (CAMPDELACREU, 2014), mas na maioria dos casos é observada uma etiologia multifatorial (CAMPDELACREU, 2014; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020), ou seja, uma interação entre diversos fatores genéticos e ambientais, que atuam na suscetibilidade da doença, sendo esses, fatores de risco em maior ou menor grau (CAMPDELACREU, 2014).

De acordo com a literatura diversos fatores ambientais contribuem para um aumento do risco de DP (CAMPDELACREU, 2014). As evidências apontam,

por exemplo, uma associação positiva bastante consistente entre exposição a pesticidas e DP (LAU; BRETELER, 2006; CAMPDELACREU, 2014). Em estudos experimentais de laboratório, pesticidas como paraquat, rotenona e vários ditiocarbamatos e organoclorados, causam parkinsonismo, apoiando a possibilidade de que essas associações reflitam efeitos causais (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020).

O estudo do tabagismo como fator de risco para a DP está entre os fatores mais investigados e apresenta resultados bastante consistentes. Os resultados de estudos epidemiológicos mostram um risco reduzido de DP em fumantes de cigarro. Vários mecanismos foram propostos para explicar o potencial efeito neuroprotetor do tabagismo (LAU; BRETELER, 2006) e as explicações mais prováveis envolvem a nicotina (LAU; BRETELER, 2006; SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020), que por sua vez está associada a uma estimulação dos neurônios dopaminérgicos, à inibição da formação de fibrilas de  $\alpha$ -sinucleína e a melhoras dos sintomas da DP (CAMPDELACREU, 2014).

Estudos que avaliaram o risco do consumo de café para o desenvolvimento da DP revelaram uma redução significativa do risco de DP para indivíduos que consomem café, sendo a cafeína considerada o componente ativo dessa associação (LAU; BRETELER, 2006). O efeito é maior em homens com níveis mais altos de consumo de café e pode ser modificado por fatores genéticos (SIMON; TANNER; BRUNDIN, 2020). Em estudos com modelos animais, a cafeína foi considerada neuroprotetora, uma vez que bloqueou a toxicidade do 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (CAMPDELACREU, 2014) e melhorou os déficits motores relacionados a DP em um modelo de camundongo (ROSS *et al.*, 2000).

A atividade física foi relacionada a um baixo risco de DP mais proeminente em homens (CHEN *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2015). De acordo com a literatura, o exercício físico melhora os resultados comportamentais e reduz a perda neuronal de dopamina (DA) induzida por tóxicos em modelos animais da DP (TILLERSON *et al.*, 2003; CAMPDELACREU, 2014).

A maior prevalência e incidência de DP em homens levaram à hipótese de que os hormônios sexuais femininos proporcionariam uma proteção contra a

morte celular neuronal (LAU; BRETELER, 2006). Estudos em animais forneceram evidências de um efeito benéfico potencial dos estrogênios na DP, possivelmente por meio de propriedades antioxidantes (SAUNDERS-PULLMAN, 2003).

Por fim, causas unicamente genéticas não parecem constituir um fator etiológico principal na maioria dos casos de DP, embora em vários estudos, uma história familiar tenha sido associada a um alto risco de DP (LAU; BRETELER, 2006). Até o momento, pelo menos 23 loci e 19 genes causadores de doenças para parkinsonismo foram identificados e designados como genes causadores de DP pelo Comitê de Nomenclatura Genética HUGO. Estes incluem 10 genes autossômicos dominantes e 9 genes autossômicos recessivos (DENG; WANG; JANKOVIC, 2018).

Os genes mais comumente estudados nesse contexto são aqueles envolvidos no metabolismo da dopamina, metabolismo mitocondrial, desintoxicação, outras doenças neurodegenerativas e DP familiar e genes associados a fatores de risco putativos para DP (LAU; BRETELER, 2006).

#### **2.1.4. Fisiopatologia**

As marcas neuropatológicas da DP incluem a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc, o acúmulo generalizado de agregados de proteínas intraneuronais denominados corpos de Lewy e a depleção de DA no estriado. Essas características são fundamentais para o diagnóstico definitivo da DP (POEWE *et al.*, 2017).

Os corpos de Lewy são em grande parte constituídos por uma forma agregada da proteína  $\alpha$ -sinucleína depositadas de forma anormal no citoplasma de certos neurônios, não somente da SNpc, mas de muitas outras regiões do sistema nervoso periférico (SNP) e central (POEWE *et al.*, 2017), causando neurodegeneração, disfunção sináptica, neurogênese e diferenciação neuronal (KAUR, MEHAN; SINGH, 2019).

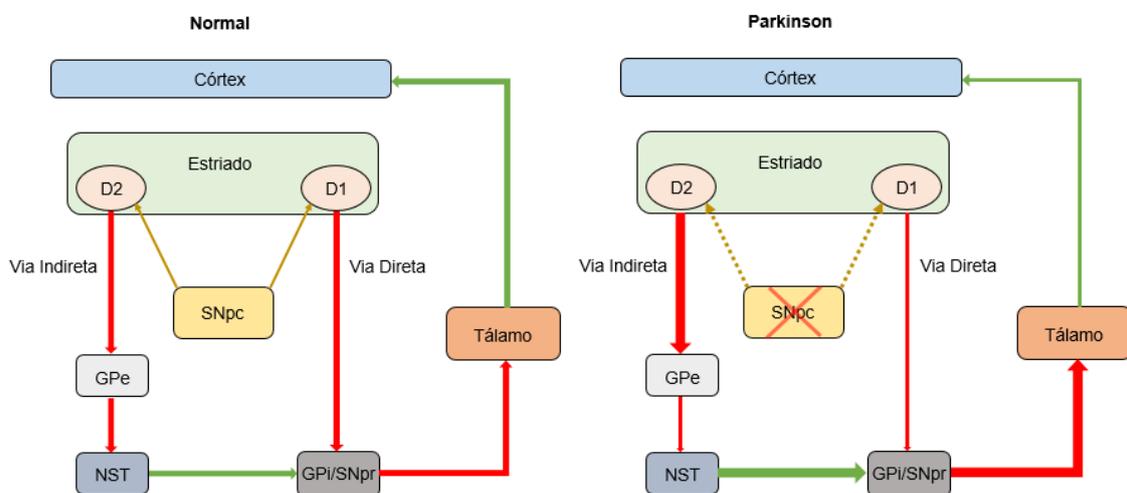
A DA é um neurotransmissor que desempenha um papel crítico nos circuitos do Sistema Nervoso Central (SNC) (GOWRISHANKAR; HAHN; BLAKELY, 2014) e exerce um controle modulatório significativo na locomoção, cognição, recompensa e motivação (ROBBINS, 2003). Dessa forma, as vias de sinalização dopaminérgica são essenciais para a realização de processos fisiológicos e uma atividade desequilibrada dessas vias pode levar a disfunções relacionadas a doenças neurodegenerativas (KLEIN *et al.*, 2019).

Os sintomas da DP estão relacionados principalmente à morte progressiva de neurônios dopaminérgicos da SNpc (GOPALAKRISHNA; ALEXANDER, 2015; (MAGRINELLI *et al.*, 2016) e a subsequente diminuição da DA no estriado (BERGMAN; DEUSCHL, 2002), uma vez que o estriado é ricamente inervado por neurônios dopaminérgicos (SHANTANAM, 2018) que ao projetarem-se da SNpc para o estriado dorsal dão origem a via dopaminérgica nigroestriatal, responsável pelo controle do movimento voluntário (LUO; HUANG, 2016). Além da via nigroestriatal, existem outras três principais vias dopaminérgicas: a via mesocortical, com neurônios dopaminérgicos projetando-se da área tegmental ventral (VTA) para o córtex pré-frontal, a via mesolímbica, com neurônios dopaminérgicos projetando-se de VTA para o núcleo accumbens, e a via tuberoinfundibular, como neurônios dopaminérgicos projetando-se do hipotálamo para a eminência mediana (SPEED, 2013; LUO; HUANG, 2016). As vias mesocortical e mesolímbica estão envolvidas com o processamento de recompensa e motivação (HORVITZ, 2000; KELLEY; BERRIDGE, 2002), enquanto que a via tuberoinfundibular está relacionada com a secreção de prolactina (GRATTAN, 2015).

A DA liberada pela via nigroestriatal tem um papel essencial na seleção e regulação do movimento do corpo por meio do controle diferencial das vias direta e indireta a partir de sua atuação nos receptores D1 e D2 (CENCI, 2007; TRITSCH; SABATINI, 2015; SHARPLES *et al.*, 2020), que são as duas principais famílias de receptores dopaminérgicos expressos em neurônios espinhosos médios (MSNs), principal grupo de neurônios estriatais (GRAYBIEL, 2017). Os receptores D1 são subdivididos em D1 e D5, enquanto que os receptores D2 são subdivididos em D2, D3 e D4. Esses receptores são intimamente ligados, mas funcionalmente distintos (YANG *et al.*, 2020). O receptor do tipo D1 predomina

na via direta, onde medeia respostas neuronais facilitadoras, enquanto o receptor do tipo D2 é predominante na via indireta, onde diminui a excitabilidade neuronal (CENCI, 2007). Dessa forma, a DA liberada no estriado ao atuar nos receptores D1, considerados excitatórios, promoverá a estimulação da via direta e ao atuar nos receptores D2, considerados inibitórios, provocará a inibição da via indireta (YANG *et al.*, 2015; GRAYBIEL, 2017);

Na via direta, os MSNs, que são GABAérgicos e inibitórios, se projetam para a substância negra parte reticulada (SNpr) e para o globo pálido interno (GPi), promovendo a inibição dessas áreas que também são GABAérgicas. Isso leva a uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo, os quais enviam projeções excitatórias para o córtex, havendo a liberação do movimento. Na via indireta, os MSNs inibem a atividade do globo pálido externo (GPe), o que leva a uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos do núcleo subtalâmico (NST) e a consequente excitação de GPi e SNpr resultando na inibição tálamo-cortical e portanto, na redução do movimento (OBESO *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009; CALABRESI *et al.*, 2014; BAMFORD *et al.*, 2018). Na DP, a depleção de DA no estriado provoca um desequilíbrio entre as vias direta e indireta, de modo que se observa uma redução da atividade da via direta e uma maior da atividade da via indireta que provoca um aumento da inibição dos neurônios do tálamo e por consequência um aumento da inibição de neurônios motores no córtex. Logo, o efeito resultante é uma diminuição geral da função motora (BERGMAN; DEUSCHL, 2002; RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009) (**Figura 1**).



**Figura 1:** Ilustração simplificada do modelo fisiopatológico clássico dos núcleos da base em indivíduos saudáveis à esquerda e na DP à direita. As setas verdes representam as projeções glutamatérgicas excitatórias, enquanto que as setas vermelhas as projeções GABAérgicas inibitórias. As setas douradas se referem à via dopaminérgica. No esquema da DP as mudanças na atividade das vias de projeções são mostradas pelo espessamento (aumento da atividade) e pelo afinamento (diminuição da atividade) das setas. Abreviaturas: globo pálido interno – Gpi, globo pálido externo – Gpe, núcleo subtalâmico – NST, substância negra parte compacta – SNpc. Figura adaptada de Cenci, 2007.

### 2.1.5. Sintomas da DP

A DP é caracterizada como uma doença neurodegenerativa multissistêmica (ARCHIBALD; MILLER; ROCHESTER, 2013) com a presença de sintomas motores e não motores (ARCHIBALD; MILLER; ROCHESTER, 2013; ZESIEWICZ, 2019), entretanto, no curso da doença os sintomas mais evidentes estão relacionados ao movimento (OPARA *et al.*, 2017). Os sintomas motores cardinais incluem tremor, rigidez, bradicinesia e desequilíbrio (ZESIEWICZ, 2019; COAKELEY; MARTENS; ALMEIDA, 2014), cuja progressão se dá de maneira lenta, expandindo-se gradualmente ao longo dos anos (ABRUZZO *et al.*, 2017). O início das manifestações motoras está relacionado com a perda de DA no putâmen posterior, área correspondente à região motora do estriado e acontecem quando as concentrações de DA caem abaixo de 60 a 70% (RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009).

Além da disfunção motora, têm havido um reconhecimento crescente da importância dos sintomas não motores no diagnóstico e tratamento da DP (ZESIEWICZ, 2019), os quais são reconhecidos pelos importantes impactos negativos na qualidade de vida de pacientes com a doença (CHAUDHURI; SCHAPIRA, 2009). Dentre os sintomas não-motores estão incluídos os neuropsiquiátricos (depressão, ansiedade, psicose, transtorno de déficit de atenção), cognitivos (perda de memória, demência, disfunção executiva), autonômicos (constipação, náusea, incontinência urinária, disfunção gastrointestinal), distúrbios do sono e alterações sensoriais como dor, fadiga e deficiência olfativa (ZESIEWICZ, 2019). Esses sintomas estão presentes nos estágios iniciais da doença e podem preceder o início dos sintomas motores em até uma década (JANAKIRAMAN *et al.*, 2016; ZESIEWICZ, 2019).

É sabido que a DP está associada à uma patologia disseminada que se estende para além do sistema dopaminérgico nigroestriatal, (SETHI, 2008). Nesse sentido, lesões nas vias mesolímbica e mesocortical e o envolvimento de sistemas não dopaminérgicos, como colinérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos resultam no aparecimento de sintomas não motores (SETHI, 2008) que por sua vez, não respondem à medicação dopaminérgica (JANAKIRAMAN *et al.*, 2016).

Além dos sintomas não motores, àqueles que envolvem equilíbrio, postura e marcha são em grande parte secundários à degeneração de vias não dopaminérgicas. Esses sintomas tem pouca ou nenhuma resposta à terapia dopaminérgica utilizada no tratamento dos demais sintomas motores e merecem uma atenção especial, uma vez que são características comuns e potencialmente incapacitantes em pacientes com DP avançada (SETHI, 2008).

## 2.2. EQUILÍBRIO

### 2.2.1. Fisiologia do equilíbrio

O corpo humano está numa busca constante pelo equilíbrio e para que esse seja alcançado, há uma rede complexa de vias que permite que o comando central do equilíbrio seja constantemente modificado e regulado pelo *feedback* periférico (JANUÁRIO; AMARAL, 2010).

A função do equilíbrio atua no controle do centro de massa do corpo sobre sua base de suporte (HORAK; MANCINI, 2014; PARK; KANG; HORAK, 2015) e requer uma integração complexa de informações sensoriais sobre a posição do corpo em relação ao ambiente (STURNIEKS; GEORGE; LORD, 2008). Processos que medeiam o controle do equilíbrio dependem de fontes de estímulos sensoriais periféricos decorrentes dos sistemas visual, proprioceptivo e vestibular (BRONSTEIN; PAVLOU, 2013). As informações advindas desses sistemas são interpretadas no SNC, para que em seguida uma resposta apropriada seja formulada e as sinergias musculares posturais sejam ativadas, promovendo a realização de movimentos apropriados de cabeça, olhos, tronco e membros, visando a manutenção da postura (MANCINI; HORAK, 2010).

Os receptores vestibulares detectam acelerações e desvios na orientação da cabeça. Essa informação contribui para o equilíbrio por meio de movimentos corretivos eliciados pelas vias vestibulo-ocular e vestibulo-espinhal. Somado a isso, os três canais semicirculares transduzem informações sobre a aceleração angular da cabeça em qualquer direção. As acelerações lineares em relação à gravidade são detectadas pelo sáculo e utrículo. As pistas sensoriais visuais por sua vez, detectam a orientação da cabeça em relação ao mundo visual e a informação visual de todo o campo sobre a oscilação e o movimento do corpo é um feedback eficaz para moderar o controle do equilíbrio. Os proprioceptores detectam principalmente a flexão do pé em relação à superfície de apoio. As informações sensoriais dos receptores nos músculos, tendões e articulações fornecem um *feedback* sobre o sentido da posição da articulação, sobre o movimento e o tato. A entrada dos membros inferiores é indiscutivelmente o contribuinte mais importante para o equilíbrio em pé e durante a caminhada, os mecanorreceptores articulares e musculares fornecem informações para ajudar a coordenar cada etapa e alcançar o posicionamento ideal do pé (PETERKA, 2002; STURNIEKS; GEORGE; LORD, 2008).

O sinal neuronal gerado pelo labirinto vestibular é transportado através do componente vestibular do oitavo par de nervo craniano para alvos no tronco encefálico, os núcleos vestibulares, e cerebelo (VAISERMAN; LUSHCHAK, 2019; RANALLI, 2019). Os núcleos vestibulares são importantes centros de integração, recebendo informações dos núcleos vestibulares do lado oposto, bem como do cerebelo e dos sistemas sensoriais visual e somático (VAISERMAN; LUSHCHAK, 2019). Os neurônios do núcleo vestibular possuem projeções ascendentes para os núcleos motores oculares que organizam o reflexo vestibulo-ocular e projeções descendentes, essenciais para os ajustes posturais da cabeça, mediados pelo reflexo vestibulo-cervical, e do corpo, mediados pelo reflexo vestibulo-espinhal (VAISERMAN; LUSHCHAK, 2019; RANALLI, 2019). Além dessas projeções, os núcleos vestibulares superior e lateral enviam axônios para o complexo nuclear posterior ventral do tálamo, que por sua vez se projeta para duas áreas corticais relevantes para as sensações vestibulares, uma dessas áreas encontra-se imediatamente posterior ao córtex somatossensorial primário, a outra está na transição entre o córtex sensorial

somático e o córtex motor (área 3 de Brodmann), cujas células respondem a estímulos proprioceptivos, visuais e vestibulares. Muitos desses neurônios são ativados por estímulos visuais móveis e também pela rotação do corpo, mesmo com os olhos fechados, sugerindo que essas regiões corticais estão envolvidas na percepção da orientação corporal no espaço extrapessoal (VAISERMAN; LUSHCHAK, 2019). Por fim, uma outra estrutura que também recebe projeções diretas do núcleo vestibular e de outros núcleos do tronco encefálico é o flóculo cerebelar. O mesmo recebe ainda informações da visão e dos movimentos dos olhos, transmitindo sinais necessários para modificações e ajustes em relação as informações vestibulares (RANALLI, 2019).

Portanto, durante a postura ereta, pistas vestibulares, visuais e proprioceptivas são combinadas, uma vez que cada sistema sensorial detecta o balanço do corpo a partir de uma posição de referência para os vários segmentos corporais (PETERKA, 2002; STURNIEKS; GEORGE; LORD, 2008). O SNC agrupa os sinais sensoriais individuais e, em função desses sinais combinados, gera uma resposta motora corretiva apropriada (RINALDUZZI *et al.*, 2015).

Nesse sentido, o controle do equilíbrio é um mecanismo complexo que envolve a manutenção de posturas, facilitação do movimento, recuperação do equilíbrio (MANCINI; HORAK, 2010) e se faz necessário para a manutenção do corpo adequadamente orientado durante a execução de atividades voluntárias, durante perturbações externas ou quando ocorre uma mudança na superfície de suporte ou no ambiente (RINALDUZZI *et al.*, 2015).

### **2.2.2. Aspectos fisiológicos do equilíbrio na DP**

A disfunção do equilíbrio ocorre mais tardiamente no curso da DP, cerca de uma década após o diagnóstico inicial (ZESIEWICZ, 2019), disfunção essa que piora com a progressão da doença (PARK; KANG; HORAK, 2015).

Os núcleos da base são conhecidos por estarem envolvidos no controle do equilíbrio, uma vez que o sistema dopaminérgico dos núcleos da base tem sido implicado na integração de informações sensoriais, como vestibular e visual, que são relevantes para o equilíbrio (SHOUSHTARIAN; LITHGOW, 2007). No

caso da DP sugere-se que a integração das informações visuais e vestibulares pode estar anormal (SMITH, 2018). Os núcleos da base estão envolvidos na percepção do movimento e sua direção, logo é razoável que na DP os comprometimentos cinestésicos possam prejudicar a capacidade dos pacientes de realizar as respostas posturais adequadas às perturbações externas, contribuindo portanto, para a instabilidade postural (RINALDUZZI *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que a neuropatologia associada à DP, como os corpos de Lewy, está presente no sistema vestibular central (SEIDEL *et al.*, 2015; SMITH, 2018).

Em pacientes com DP, os prejuízos com o controle postural se apresentam em muitos aspectos, incluindo: rigidez que afeta a biomecânica; bradicinesia das respostas posturais e ajustes posturais antecipatórios; cinestesia prejudicada para integração sensorial; marcha bradicinética com congelamento e menos automaticidade de marcha e equilíbrio, e no que se refere à orientação sensorial, esses pacientes têm uso prejudicado da propriocepção e apresentam dificuldade em perceber pequenas mudanças na inclinação da superfície, ou seja, cinestesia prejudicada (PARK; KANG; HORAK, 2015).

Embora a bradicinesia e a rigidez sensíveis à DA afetem progressivamente o equilíbrio e a marcha no início da doença, os problemas de equilíbrio são insensíveis à DA (PARK; KANG; HORAK, 2015), não respondendo aos medicamentos dopaminérgicos usados no tratamento da DP (GRABLI *et al.*, 2013; ZESIEWICZ, 2019) indicando assim, uma atuação para neurotransmissores adicionais que não os dopaminérgicos (MORRIS *et al.*, 2019) e de outras áreas encefálicas nas alterações referentes ao equilíbrio (MAGRINELLI *et al.*, 2016).

Evidências científicas indicam que a desnervação colinérgica subcortical, provavelmente devido à degeneração dos neurônios do NPP, pode estar relacionada à presença de marcha não responsiva à DA e alterações do equilíbrio, incluindo quedas na DP. O NPP representa uma das áreas mais importantes de projeções colinérgicas no encéfalo, e foram observadas

evidências importantes sobre as mudanças na neurotransmissão colinérgica associada a uma disfunção dopaminérgica na DP (BOHNEN; ALBIN, 2011).

Como um componente importante dos sistemas ativadores ascendentes, os neurônios colinérgicos do NPP estão envolvidos dentre outros fatores, com a locomoção, postura e atenção. A área possui uma conexão íntima com os núcleos da base (MORI *et al.*, 2016) e mais recentemente tem sido descritas projeções do NPP para o cerebelo (VITALE *et al.*, 2016), cujo papel na regulação dos movimentos motores é bem descrito (SAMSON; CLAASSEN, 2017) e inclui marcha automática, controle postural, coordenação, planejamento motor e integração de movimentos complexos (SAMSON; CLAASSEN, 2017; KELLY; SHANLEY, 2016).

O NPP envia projeções para o cerebelo (MORRIS *et al.*, 2019), estrutura conhecida por seu papel crucial na coordenação motora e controle do equilíbrio (GRABLI *et al.*, 2013). Conexões entre NPP e cerebelo não são observadas em pacientes com DP e congelamento da marcha, estando presente em indivíduos saudáveis ou de forma reduzida em sujeitos que apresentam a DP, mas não apresentam congelamento da marcha (SCHWEDER *et al.*, 2010). Além disso, em pacientes com DP foi observada uma hiperativação no cerebelo, a qual foi interpretada como sendo uma estratégia do SNC para compensar a função prejudicada dos núcleos da base e tronco encefálico, ou como causadora desse prejuízo. Nesse sentido, desvendar o papel da disfunção cerebelar na marcha e nos déficits de equilíbrio na DP pode representar um grande desafio para o futuro (GRABLI *et al.*, 2013).

Importante destacar ainda, as extensas conexões aferentes e eferentes entre cerebelo e núcleos vestibulares. O núcleo vestibular medial (NVM) contém uma gama completa de tipos de células e é, em volume total e número de células, o maior dos núcleos vestibulares. Análises imunoquímicas mostraram que a maioria das projeções ascendentes para regiões do cerebelo como vérmis anterior, posterior e flóculo são colinérgicas provenientes do NVM. Além disso, os neurônios vestibulares secundários expressam vários transmissores sinápticos, entre os mais proeminentes estão a ACh, GABA, glicina, aspartato, glutamato e taurina, e embora GABA e glutamato sejam expressos por neurônios

vestibulares secundários em toda a extensão rostral-caudal do complexo vestibular, a acetilcolina é mais seletivamente distribuído em neurônios vestibulares secundários localizados no NVM e no núcleo vestibular dorsal (BARMACK, 2003).

### **2.2.3. Compensação vestibular nas alterações do equilíbrio e a estratégia terapêutica de reabilitação vestibular**

Um aspecto relevante a ser investigado, diz respeito a atuação do mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio em pacientes com a DP. A compensação vestibular é um fenômeno neurológico baseado na reorganização do SNC (DEVEZE *et al.*, 2014), dependente das propriedades de plasticidade neural básicas do sistema de controle postural (BRONSTEIN; PAVLOU, 2013). Trata-se de um mecanismo natural que ocorre de maneira lenta após um distúrbio vestibular agudo ou crônico e gradual (DEVEZE *et al.*, 2014).

Nesse processo, o SNC se adapta gradualmente à perda da transmissão normal da entrada sensorial vestibular do sistema vestibular periférico ou às lesões centrais (SMITH, 2020). Com o avançar da idade, comorbidades internas e neurológicas retardam o processo de compensação central, a qual depende da integridade funcional dos centros vestibulares e cerebelares centrais. Pacientes mais velhos ou com distúrbios do SNC adicionais podem ter um problema na compensação vestibular que pode vir a se apresentar de forma prolongada ou mesmo inadequada (ČADA *et al.*, 2019). Na ocorrência de uma perda do *input* vestibular periférico, esta pode se dar de maneira unilateral ou bilateral; completa ou parcial; repentina ou gradual ao longo do tempo e pode ainda, ser paroxística ou permanente (SMITH, 2020).

Embora os mecanismos subjacentes à compensação venham sendo investigados nos últimos anos, muitas questões permanecem em aberto (CULLEN *et al.*, 2009). Sabe-se que imediatamente após uma perda súbita bilateral ou unilateral da função vestibular, há uma desorganização forte e duradoura do sistema vestibular. Tal perturbação induz déficit vestibular estático

e dinâmico causando síndromes posturais, perceptivas e oculomotoras (LACOUR, 2006; HORAK, 2010). Esses sintomas declinam progressivamente por meio do mecanismo de compensação vestibular (HORAK, 2010; TIGHILET *et al.*, 2019), cada um com sua própria cinética, geralmente levando a um rápido e completo desaparecimento dos déficits estáticos e uma regressão muitas vezes mais lenta e incompleta dos déficits dinâmicos (TIGHILET *et al.*, 2019).

A extensão da compensação vestibular, tanto espontânea quanto em resposta à RV, varia amplamente entre os indivíduos (HORAK, 2010). A RV por sua vez, é um processo terapêutico que busca acelerar os mecanismos de compensação central por meio da plasticidade neuronal com a execução de exercícios repetitivos (ZEIGELBOIM *et al.*, 2009). Trata-se de um programa de exercícios composto por movimentos dos olhos, da cabeça e do corpo para estimular o sistema vestibular, promovendo, restaurando e acelerando a compensação central. Sua eficácia tem sido demonstrada tanto em pacientes vestibulares centrais quanto periféricos (BROWN *et al.*, 2006; HILLIER; MCDONNELL, 2016; ZEIGELBOIM *et al.*, 2009).

A RV atua de forma fisiológica no sistema vestibular, sendo uma estratégia terapêutica que envolve estímulos visuais, proprioceptivos e vestibulares com o intuito de manter o equilíbrio corporal de pacientes com sintomas vertiginosos. É um método importante na abordagem terapêutica de pacientes com instabilidade postural, que abriu novos horizontes na clínica otoneurológica nas últimas décadas (ZEIGELBOIM *et al.*, 2009). Seu objetivo, portanto, é melhorar a função do equilíbrio, reduzir o risco de queda e melhorar a qualidade de vida do paciente. Dito de uma perspectiva da ciência básica, o terapeuta tenta alcançar a melhor compensação vestibular funcional possível (VERGHESE, 2011).

Dos Santos, 2018 observou uma redução do número de neurônios ChAT+ no NPP para o grupo de animais que foram induzidos ao parkinsonismo por meio de 4 injeções de reserpina (RES). Entretanto, e diferentemente do que era esperado, essa redução não foi observada para o grupo de animais que receberam 10 injeções de RES, havendo inclusive uma recuperação nesse número de células. Esse resultado nos permitiu inferir e investigar sobre uma

possível atuação do mecanismo de compensação vestibular central no NPP, área envolvida com as alterações do equilíbrio na DP, uma vez que os animais eram diariamente submetidos a tarefas de avaliação do equilíbrio estático e dinâmico.

### **2.2.3. Impactos das alterações do equilíbrio**

Os distúrbios do equilíbrio caracterizam a progressão da DP e são fatores determinantes para a redução da qualidade de vida (MANCINI; HORAK, 2010), aumento dos custos com assistência médica e sobrecarga do cuidador (SCHRAG *et al.*, 2006). Trata-se de alterações que podem ter consequências graves para a função física, como as lesões relacionadas a quedas, bem como para a função social, exemplificadas pelo medo de cair que leva à restrição de atividades e isolamento social. Quedas e imobilidade para evitar quedas estão associadas a morbidade significativa, trauma, sedentarismo e depressão (MANCINI; HORAK, 2010). No contexto da DP as taxas de quedas são muito altas, de modo que de 35% a 90% dos pacientes sofreram um episódio de queda pelo menos uma vez, com uma taxa média de 60,5% (FASANO *et al.*, 2017).

Além das fraturas, as quedas podem ter como consequências a perda da independência, o aumento do número de pacientes institucionalizados (ZESIEWICZ, 2019), hospitalizações e até mesmo a morte (GERARDS *et al.*, 2017). Nesse ponto, uma melhor compreensão dos distúrbios do equilíbrio propicia uma contribuição significativa na melhoria do manejo desses distúrbios e evitaria a ocorrência de quedas, cujo risco aumenta gradualmente com a progressão da doença caso não haja uma intervenção adequada (PARK; KANG; HORAK, 2015).

Por essas razões, o impacto dos distúrbios do equilíbrio é bastante significativo, tanto para os indivíduos diretamente afetados, quanto para a sociedade em geral (MANCINI; HORAK, 2010), além de representar uma preocupação crescente para a saúde pública (STURNIEKS; GEORGE; LORD, 2008).

### 2.3. MODELOS ANIMAIS

O uso de modelos experimentais com animais constitui um elemento essencial para a pesquisa e investigação científica por refletirem características patológicas, bioquímicas e clínicas de diferentes doenças. No caso da DP, os modelos animais têm contribuído significativamente para elucidar a patogênese, mecanismos de morte celular envolvidos e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas (TIEU, 2011). Tais modelos podem ser gerados por meio de abordagens baseadas em neurotoxina ou genética (CHIA; TAN; CHAO, 2020). Em modelos induzidos por neurotoxinas, produtos químicos como 6-hidroxidopamina – 6-OHDA, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina – MPTP, rotenona, haloperidol e RES são usados com o objetivo de mimetizar a doença (DUTY; JENNER, 2011; CHIA; TAN; CHAO, 2020).

O modelo animal escolhido no presente estudo foi o da RES. A RES atua no SNC causando um bloqueio farmacológico irreversível na proteína transportadora das monoaminas vesiculares (VMAT), provocando a depleção dessas monoaminas (dopamina, serotonina e norepinefrina) nos terminais nervosos. Ao provocar o bloqueio de VMAT, a RES acaba por aumentar os níveis intracelulares das monoaminas e de seu metabolismo por meio da monoamina oxidase (MAO), o que pode resultar numa superprodução de metabólitos neurotóxicos e estresse oxidativo (DE FREITAS *et al.*, 2016) reproduzindo assim aspectos da fisiopatologia da DP (PIFL *et al.*, 2014; MILLER; CALLAGHAN, 2014) e induzindo o aparecimento de sintomas motores (DAWSON *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013) e não motores (SANTOS *et al.*, 2013; LEAL *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2020) similares aos observados em indivíduos com a DP.

Assim, no presente estudo e em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, o modelo animal utilizado se baseia na administração repetida de baixas doses de RES, o que nos permite mimetizar a natureza progressiva da DP (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013). Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa, mostraram, por meio dos testes de campo aberto, catalepsia, movimentos orais (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; CAMPÊLO *et al.*, 2017; BISPO *et al.*, 2019) e de traves de equilíbrio estático e

dinâmico (DOS SANTOS *et al.*, 2021), o desenvolvimento progressivo de sintomas motores em animais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar a participação do mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio em um modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar os efeitos da administração repetida de uma concentração baixa de reserpina nos aspectos relacionados ao equilíbrio de ratos;
- Verificar a participação do NPP nas alterações do equilíbrio em um modelo animal de parkinsonismo induzido por reserpina;
- Avaliar a Colina Acetiltransferase Imunorreativa (ChAT-IR) no NPP;
- Investigar o efeito de exercícios repetidos de equilíbrio no mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio em um modelo animal de parkinsonismo induzido por reserpina;

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1. ANIMAIS

Foram utilizados 70 ratos da linhagem Wistar machos, pesando entre 300 a 500 gramas, com idade aproximada de 6 meses, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Os animais foram mantidos no Laboratório de Neurofisiologia da UFS, alojados em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm) com no máximo quatro animais por gaiola e estiveram sob ventilação e temperatura controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e livre acesso à água e comida.

Todos os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela lei brasileira nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 para o uso de animais em pesquisas (Lei Arouca). Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS) sob o protocolo de número 74/2018 (Anexo I). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o sofrimento dos mesmos.

### 4.2. DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas: ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, BR), 99,7%; Reserpina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO); Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União) e Cloridrato de xilazina (Calmium®, Agener União).

As diluições das drogas foram realizadas da seguinte maneira: a RES foi dissolvida em ácido acético glacial e, posteriormente, diluída em água destilada. A solução controle consistiu no mesmo volume de ácido acético e água destilada como na solução de RES, sendo aproximadamente 50µL de ácido acético em 50 mL da solução.

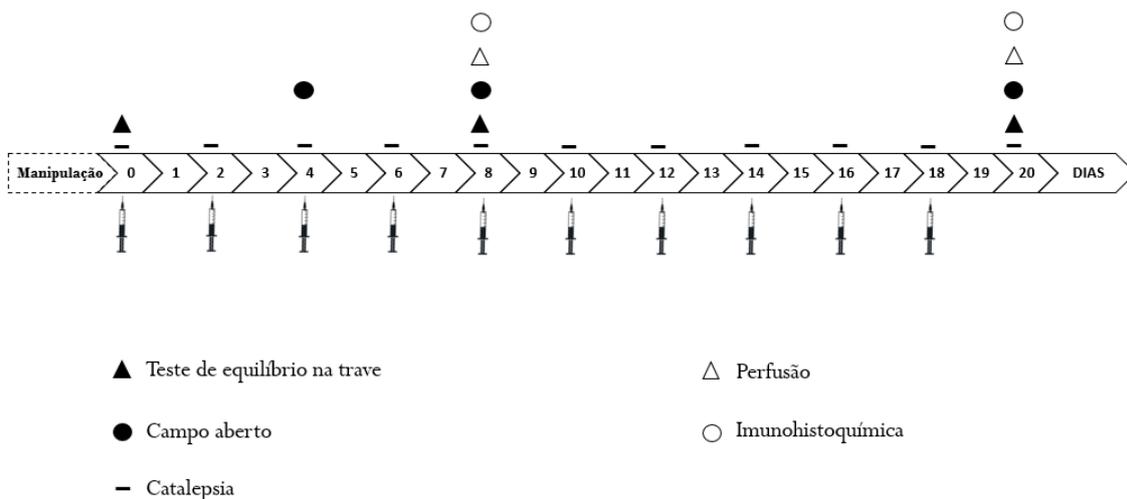
#### 4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Com a finalidade de executar os objetivos propostos, o presente estudo foi dividido em **Delineamento Experimental 1** e **Delineamento Experimental 2**.

##### 4.3.1. Delineamento Experimental 1 – Atuação do mecanismo de compensação vestibular na DP

Os animais foram submetidos a um período de 5 minutos de manipulação, diariamente, durante cinco dias anteriores aos experimentos. Após a manipulação, os animais foram inicialmente divididos de forma aleatória em 2 grupos (Controle = CTR e reserpina = RES), com 14 animais por grupo. Os animais do grupo CTR foram tratados com uma solução veículo, enquanto que os animais do grupo RES foram tratados com uma solução de RES 0,1 mg/kg. Os animais de ambos os grupos receberam 4 ou 10 injeções por via subcutânea (s.c.) de veículo ou RES (0,1 mg/kg), uma vez que 48h após a 4ª injeção, metade dos animais de cada grupo (n = 7) foram aleatoriamente selecionados e perfundidos, enquanto que o restante dos animais (n = 7 por grupo) foram perfundidos 48h após a 10ª injeção. As injeções de veículo ou RES (0,1 mg/kg) foram administradas, uma a cada 48 horas.

Ao longo do experimento os animais foram submetidos a avaliações comportamentais: 1) catalepsia; 2) teste de campo aberto; 3) teste de equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico). O teste de catalepsia foi realizado a cada 48h durante todo o experimento, o teste de campo aberto ocorreu 48h após a 2º (treino), 4ª (teste) e 10ª (teste) injeções e o teste de equilíbrio foi realizado no dia 0 e 48h após a 4ª e 10ª injeção (**Figura 2**). Após a realização do último teste comportamental, os animais foram anestesiados e mortos por perfusão transcardíaca para fixação e coleta dos encéfalos e posterior processamento dos tecidos para realização da técnica de imunohistoquímica.



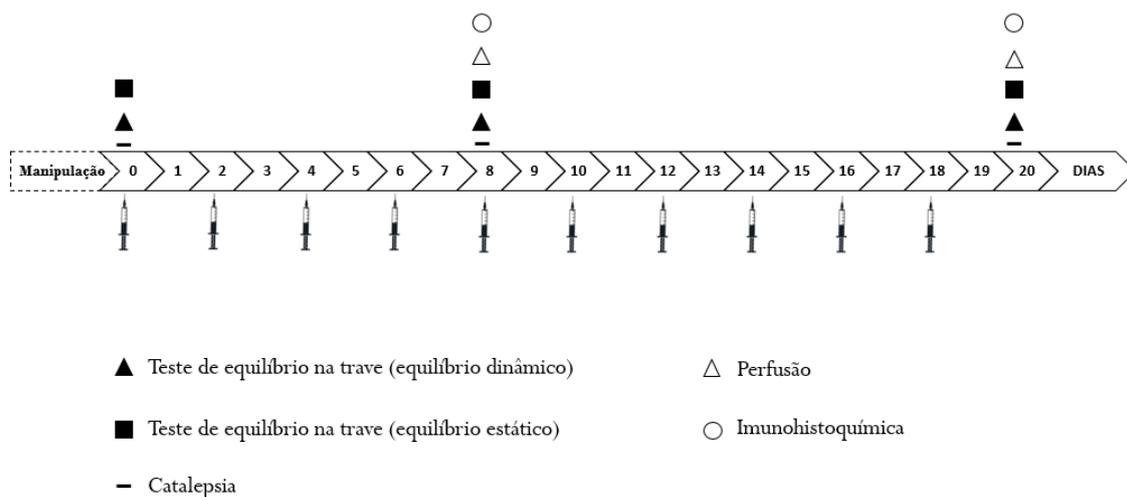
**Figura 2:** Ilustração do delineamento experimental 1.

#### 4.3.2. Delineamento Experimental 2 – Ativação dos núcleos vestibulares, cerebelo, núcleo pedunculopontino e núcleos da base após testes de equilíbrio.

Os animais foram submetidos a um período de 5 minutos de manipulação, diariamente, durante cinco dias anteriores aos experimentos. Após a manipulação, os animais foram inicialmente divididos de forma aleatória em 3 grupos (Controle = CTR, Controle total = CTRt e reserpina = RES), com 14 animais por grupo. Os animais dos grupos CTR e CTRt foram tratados com solução veículo, entretanto os animais do grupo CTRt não foram submetidos aos testes de equilíbrio, enquanto que os animais do grupo RES foram tratados com solução de RES 0,1 mg/kg. Os animais de todos os grupos receberam 4 ou 10 injeções por via subcutânea (s.c.) de veículo ou RES (0,1 mg/kg), uma vez que 48h após a 4ª injeção, metade dos animais de cada grupo ( $n = 7$ ) foram aleatoriamente selecionados e perfundidos, enquanto que o restante dos animais ( $n = 7$  por grupo) foram perfundidos 48h após a 10ª injeção. As injeções de veículo ou RES (0,1 mg/kg) foram administradas, uma a cada 48 horas.

Ao longo do experimento os animais foram submetidos a avaliações comportamentais: 1) catalepsia; 2) teste de equilíbrio na trave (equilíbrio estático); 3) teste de equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico). Todos os testes foram realizados nos dias 0 e 48h após a 4ª e 10ª injeção (**Figura 3**). Sessenta

minutos após a realização do último teste de equilíbrio na trave, os animais foram anestesiados e mortos por perfusão transcardíaca para fixação e coleta dos encéfalos.

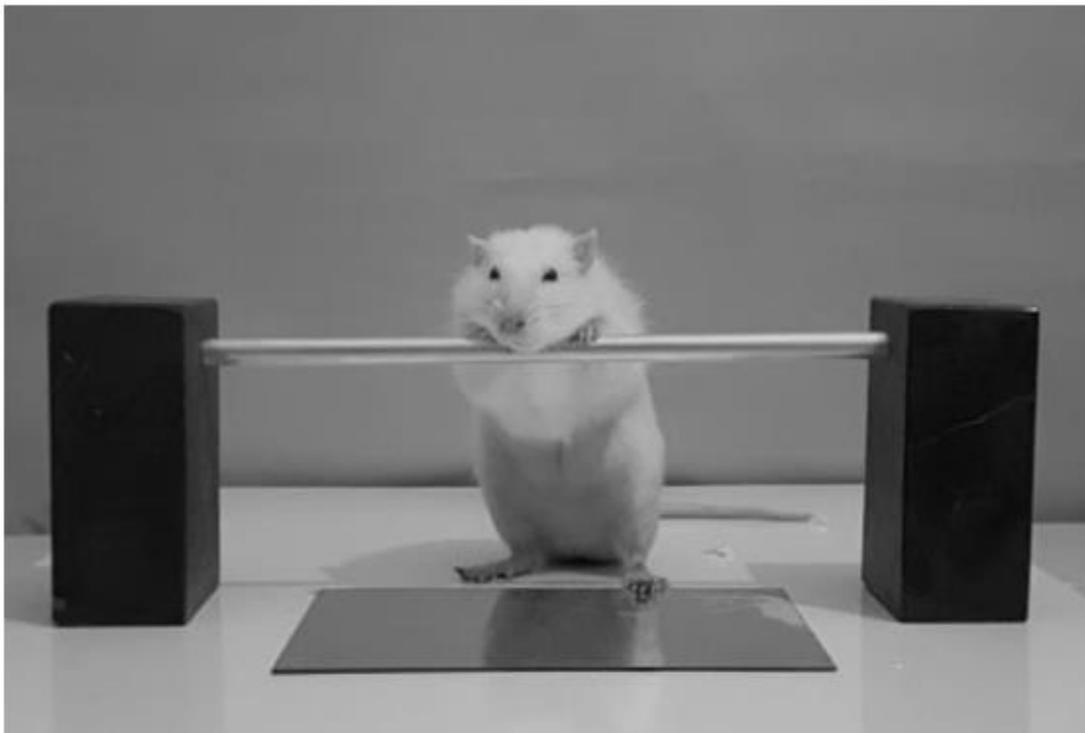


**Figura 3:** Ilustração do delineamento experimental 2.

## 4.5. TESTES COMPORTAMENTAIS

### 4.5.1. Teste de Catalepsia

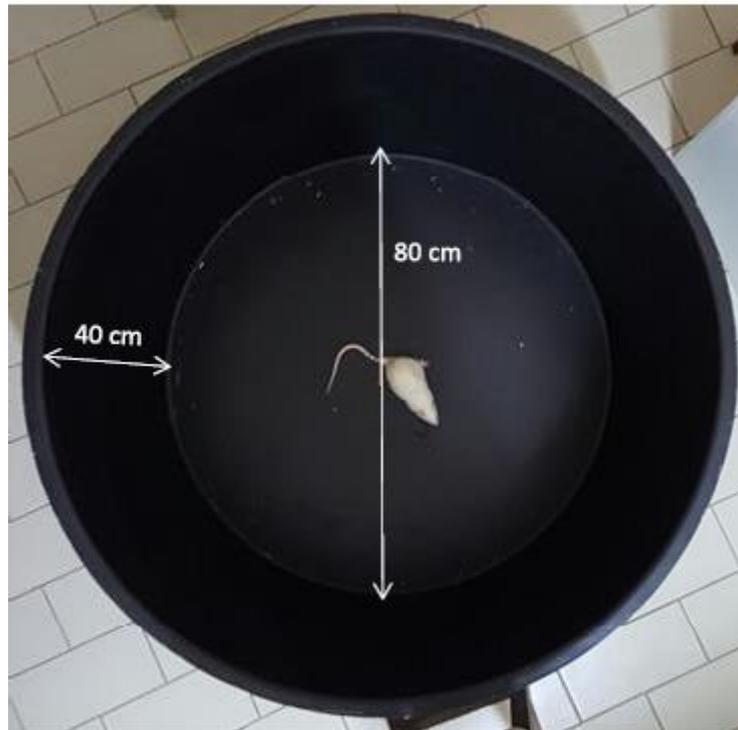
A catalepsia é definida como um estado comportamental caracterizado por inibição motora e rigidez muscular que pode ser induzido experimentalmente por uma depleção de dopamina, o que ocorre após o tratamento com RES (GERLACH; RIEDERER, 1996). Para avaliação do comportamento de catalepsia, o animal foi colocado com ambas as patas dianteiras sobre uma barra horizontal de vidro elevada a 9,0 cm da superfície de apoio das patas traseiras (**Figura 4**). O tempo que o animal permaneceu nessa posição foi considerado como medida da catalepsia e foi mensurada a latência para o animal realizar um movimento, ou seja, sair da posição inicial. Os animais foram submetidos três vezes consecutivas ao aparato até um limite de 180 segundos e para cada dia foi realizada a média do tempo durante as três tentativas (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS, 2013).



**Figura 4:** Ilustração do teste de catalepsia (Fonte: produção própria).

#### **4.5.2. Teste de Campo Aberto**

O campo aberto é utilizado com a finalidade de avaliar o comportamento locomotor e exploratório dos animais e consiste em um aparato circular de acrílico, cujo interior é pintado de preto (para aumentar o contraste e favorecer o reconhecimento do animal pelo programa). Possui 80 cm de diâmetro e 40 cm de altura (**Figura 5**). Nesse teste, os animais foram colocados no centro do aparato por 5 minutos para livre exploração. Uma câmera, conectada a um computador, foi colocada sobre o campo aberto a uma altura de 230 cm, e os parâmetros comportamentais foram registrados por um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA). Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1- distância total percorrida; 2- velocidade média e 3-número de eventos de rearing. Cada animal foi avaliado individualmente e o aparato limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes (SANTOS *et al.*, 2013; BISPO *et al.*, 2019).



**Figura 5:** Ilustração do teste de campo aberto (Fonte: produção própria).

#### **4.5.3. Teste de Equilíbrio na Trave (equilíbrio estático)**

O teste de equilíbrio na trave consiste em uma placa de madeira (31.5 cm x 1 cm), elevada a 80 cm do chão por suportes também de madeira (**Figura 6**). Cada animal foi colocado perpendicular e individualmente sobre a trave de equilíbrio por um tempo máximo de 60 segundos (tempo de permanência sobre a trave). Durante esse tempo o desempenho dos animais também foi avaliado de forma qualitativa por meio de um score com as seguintes classificações: 0 – cai, não tenta equilibrar-se ou pendurar-se na trave; 1 – se pendura na trave e cai; 2 – se pendura na trave sem cair, gira mais de três vezes ao redor da trave; 3 – movimentos instáveis, 2 a 3 deslizos; 4 – postura firme na trave). Os animais foram colocados sobre a trave por três vezes consecutivas e para cada dia de avaliação foi realizada a média das três tentativas. Com a finalidade de amortecer uma possível queda do animal, uma superfície macia foi colocada abaixo do equipamento (FUJIMOTO *et al.*, 2004).



**Figura 6:** Ilustração do teste de equilíbrio na trave (equilíbrio estático) (Fonte: produção própria).

#### **4.5.4. Teste de Equilíbrio na Trave (equilíbrio dinâmico)**

O aparato do teste consiste em uma haste de madeira de 105 cm de comprimento, 4 cm de largura e 3 cm de altura (**Figura 7**). A haste é suspensa 80 cm do chão por suportes de madeira em cada extremidade. Para diminuir o impacto de uma possível queda foi colocada uma superfície acolchoada abaixo do aparato. Os animais foram treinados por três dias seguidos para atravessar a trave. Na extremidade final da trave foi colocada uma caixa com os animais que pertenciam a essa caixa para que quando colocados individualmente na extremidade oposta, atravessassem a trave retornando para a caixa onde ficaram os outros animais, funcionando dessa forma como um estímulo. No dia do teste, foi feito o registro do tempo que o animal levou para a travessia, calculando a média de três tentativas. O tempo máximo estabelecido para travessia na trave foi de 120s e para cada queda do animal do aparato, foi registrado o tempo máximo. Com o objetivo de amortecer uma possível queda

do animal, uma superfície macia foi colocada abaixo do equipamento (ALLBUTT; HENDERSON, 2007).



**Figura 7:** Ilustração do teste de equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico) (Fonte: produção própria).

#### 4.6. PERFUSÃO

Ao final dos testes comportamentais realizados nos 8<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) intraperitonealmente. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado foi realizado um acesso a cavidade torácica seccionando-se a pele e partes moles. Após expor a cavidade abdominal foi feita uma incisão no diafragma para exposição do coração. Os animais foram perfundidos intracardiacamente com tampão fosfato salina (PBS; pH 7,2-7,4) para a lavagem dos vasos, por 10 minutos, e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PB; pH 7,4; 100mM), por 20 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos

e mergulhados em PFA a 4% e sacarose a 30%, a 4°C, por 24 horas. Em seguida, os encéfalos foram crioprotégidos em sacarose à 30% a 4°C.

Após a perfusão dos animais, as carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS, para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializada. Os resíduos perfuro-cortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital.

Os encéfalos foram levados a um criostato à -20 °C para obtenção de secções frontais de 50 µm, as quais foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos correspondeu a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte era de aproximadamente 300 µm. Estes cortes foram armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e PB e posteriormente conservados a 4°C até as reações de imunohistoquímica.

#### 4.7. IMUNOHISTOQUÍMICA

Durante a realização dos procedimentos da imunohistoquímica, processada em temperatura controlada (22° C), as secções encefálicas foram lavadas cinco vezes por cinco minutos sob agitação automática em solução de PB após cada etapa de exposição aos reagentes. As secções de cada animal foram pré-tratadas com peróxido de hidrogênio a 0,3% em PB por 20 minutos para inativação da peroxidase endógena. Os cortes foram colocados em contato com anticorpos específicos para cada marcação. Para ChAT foi utilizado o anticorpo primário monoclonal anti-ChAT produzido em cabra, (1:1000; AB144P Chemicon, USA). Cada anticorpo foi diluído em PB contendo Triton-X 100 a 0,4% (ICN Biomedicals) e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2% durante 24 horas (22°C). Em seguida, as secções do marcador foram colocadas em contato com seu anticorpo secundário biotilado para ChAT (anti-cabra produzido em coelho, Sigma Chemical Company, concentração de 1:1000);

diluídos em Triton-X 100 a 0,4%, por 120 minutos. Após esta etapa, os cortes foram incubados numa solução contendo complexo avidina biotina (ABC Elite kit, Vector Labs, USA) por 120 minutos. Para visualizar a reação, os cortes foram colocados em contato com o cromógeno, diaminobenzidina-DAB (Sigma, St Louis, MO, USA) a 2,5% diluída em PB (0,1M / pH 7,4) e 0,01% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas, e em seguida foram desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de álcool, clareadas com xilol e as lamínulas fixadas com Entellan (Merck). As secções foram examinadas por iluminação de campo claro (Nikon Eclipse Ci-S,) e as imagens foram capturadas utilizando-se uma câmera digital (Nikon, Ds-fi1c) acoplada ao microscópio e as localizações das áreas foram determinadas usando o atlas Paxinos e Watson (2018).

#### 4.8. AQUISIÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS

As lâminas foram fotografadas em um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporation inc., Japan), com câmera fotográfica digital acoplada (Ds-fi1c, Nikon Corporation inc., Japan) e programa de computador específico para essa finalidade (Ds-U3, Labconco Corporation inc., USA). Para cada animal analisado, foram feitas imagens dos cortes, em aumento de 40x, nas quais foi possível ver em detalhes a presença ou ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem de célula foi realizada em 4 secções de cada animal e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas. A área analisada foi o NPP. Todas as células imunorreativas ChAT da área de interesse foram contadas usando o software Image J (versão 1.46i, NIH) e a delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2007). Todas as contagens foram realizadas de forma “cega”, em que o experimentador não soube a que grupo pertencia cada imagem a ser contada. Os valores para cada animal foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

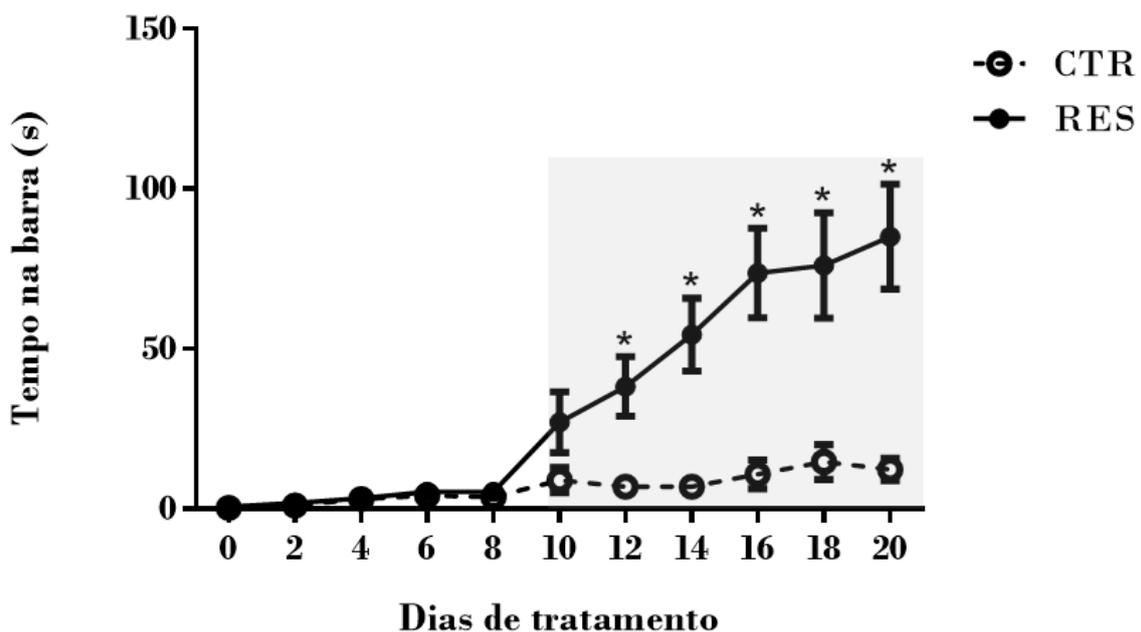
Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal, assim, foram aplicados testes paramétricos apropriados. Para análise das diferenças nos testes comportamentais de catalepsia, equilíbrio na trave (tempo), score da avaliação qualitativa do equilíbrio e o teste da trave estreita foi utilizada a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguida do pós-teste de Fisher's. Para os dados do teste no campo aberto e contagem de célula ChAT+ foi utilizado teste t simples para a comparação das médias. Os dados apresentados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média ( $\pm$  E.P.M.), com nível de significância de  $p < 0,05$  para diferenças estatisticamente significativas. As análises foram realizadas com a utilização do software *Graphpad Prism 6.0*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 1: ATUAÇÃO DO MECANISMO DE COMPENSAÇÃO VESTIBULAR NA DP

#### 5.1.1. Teste de Catalepsia

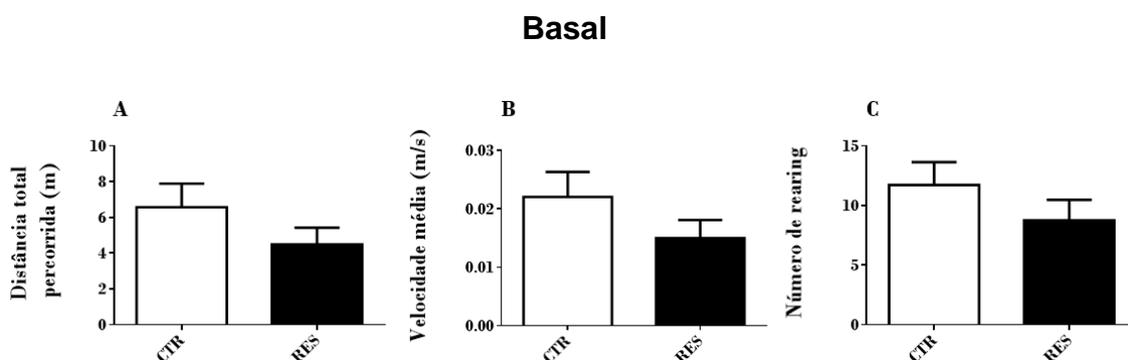
A ANOVA de duas vias com medidas repetidas, realizada até a 4ª injeção, mostrou efeito do tempo [F (4, 112) = 19,27,  $p < 0,0001$ ], mas não houve efeito de tratamento [F (1, 28) = 1,134,  $p = 0,2961$ ], nem interação tempo x tratamento [F (4, 112) = 0,6904,  $p = 0,6001$ ]. Para a análise realizada da 5ª a 10ª injeção, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito do tempo [F (5, 65) = 7,477,  $p < 0,0001$ ], do tratamento [F (1, 13) = 17,01,  $p = 0,0012$ ] e interação tempo x tratamento [F (5, 65) = 5,050,  $p = 0,0006$ ]. O pós-teste de Fisher's revelou um aumento significativo, a partir do dia 12 até o final do tratamento (dia 20), no tempo de permanência na barra do grupo RES, quando comparado ao grupo CTR [ $p^{12} = 0,0352$ ;  $p^{14} = 0,0017$ ;  $p^{16} < 0,0001$ ;  $p^{18} < 0,0001$ ;  $p^{20} < 0,0001$ ] (Figura 8).



**Figura 8:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no comportamento de catalepsia em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir um aumento progressivo do tempo de catalepsia dos animais tratados com RES, 48h após a 6ª injeção. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).

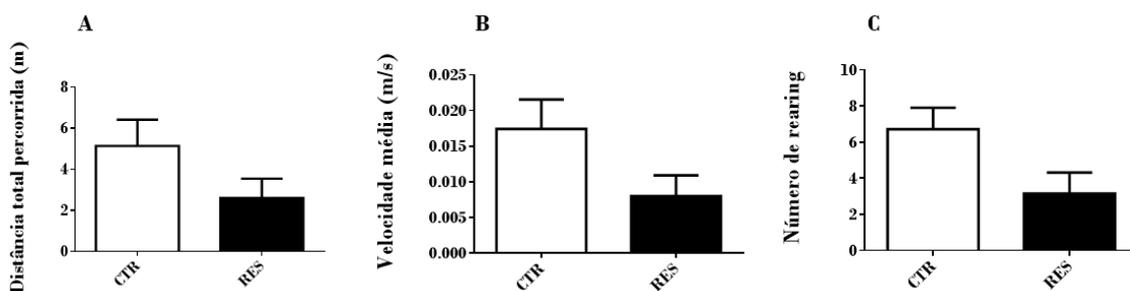
### 5.1.2. Teste de Campo Aberto

Para a atividade geral no campo aberto, realizada 48h após a 2<sup>a</sup> injeção (basal), o teste t mostrou que não houve efeito do tratamento na distância total percorrida [ $t(28) = 1,317$ ,  $p = 0,1986$ ], velocidade média [ $t(28) = 1,363$ ,  $p = 0,1839$ ] e número de eventos de rearing [ $t(28) = 1,152$ ,  $p = 0,2590$ ] para o grupo RES quando comparado com seu CTR (**Figura 9**). Para a atividade geral no campo aberto, realizada 48h após a 4<sup>a</sup> injeção, o teste t mostrou que não houve efeito do tratamento na distância total percorrida [ $t(13) = 1,622$ ,  $p = 0,1289$ ], velocidade média [ $t(13) = 1,908$ ,  $p = 0,0788$ ] e número de eventos de rearing [ $t(13) = 2,131$ ,  $p = 0,0527$ ] para o grupo RES quando comparado com seu CTR (**Figura 10**). Para a atividade geral no campo aberto, realizada 48h após a 10<sup>a</sup> injeção, o teste t revelou uma diminuição da distância total percorrida [ $t(13) = 2,209$ ,  $p = 0,0457$ ], velocidade média [ $t(13) = 2,269$ ,  $p = 0,0409$ ] e número de eventos de rearing [ $t(13) = 3,775$ ,  $p = 0,0023$ ] para o grupo RES, quando comparado com seu CTR (**Figura 11**).



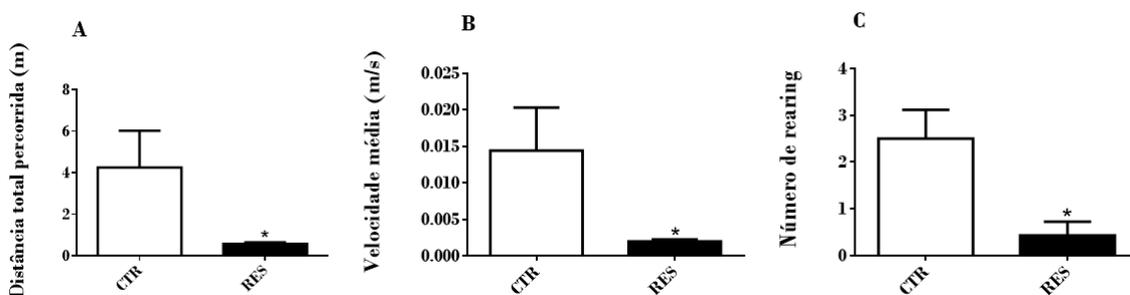
**Figura 9:** Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) sobre a atividade motora (A – Distância total percorrida; B – Velocidade média; C – Número de eventos de rearing). Não houve efeito da administração repetida de RES (0,1 mg/kg) sobre a distância total percorrida, a velocidade média e o número de eventos de rearing. Os valores são expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  quando comparado aos seus respectivos controles (teste-t simples para amostras não pareadas).

### 4 Injeções



**Figura 10:** Efeito da administração repetida de reserpina (RES) (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) sobre a atividade motora (A – Distância total percorrida; B – Velocidade média; C – Número de eventos de rearing). Não houve efeito da administração repetida de RES (0,1 mg/kg) sobre a distância total percorrida, a velocidade média e o número de eventos de rearing quando comparado aos seus respectivos controles. Os valores são expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (teste-t simples para amostras não pareadas).

### 10 Injeções

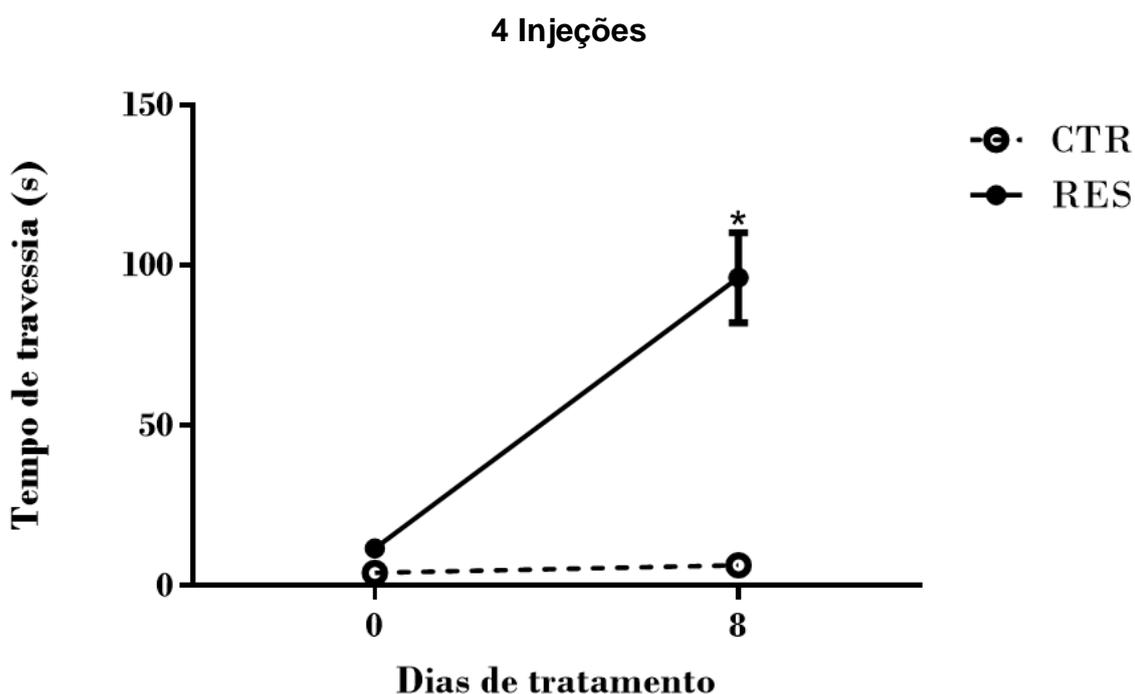


**Figura 11:** Efeito da administração repetida de RES (0,1 mg/kg) ou veículo sobre a atividade motora (A – Distância total percorrida; B – Velocidade média; C – Número de eventos de rearing). A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir uma diminuição da distância total percorrida, da velocidade média e do número de eventos de rearing, nos animais tratados com RES 48h após a 10ª injeção quando comparado aos seus respectivos controles. Os valores são expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (teste-t simples para amostras não pareadas).

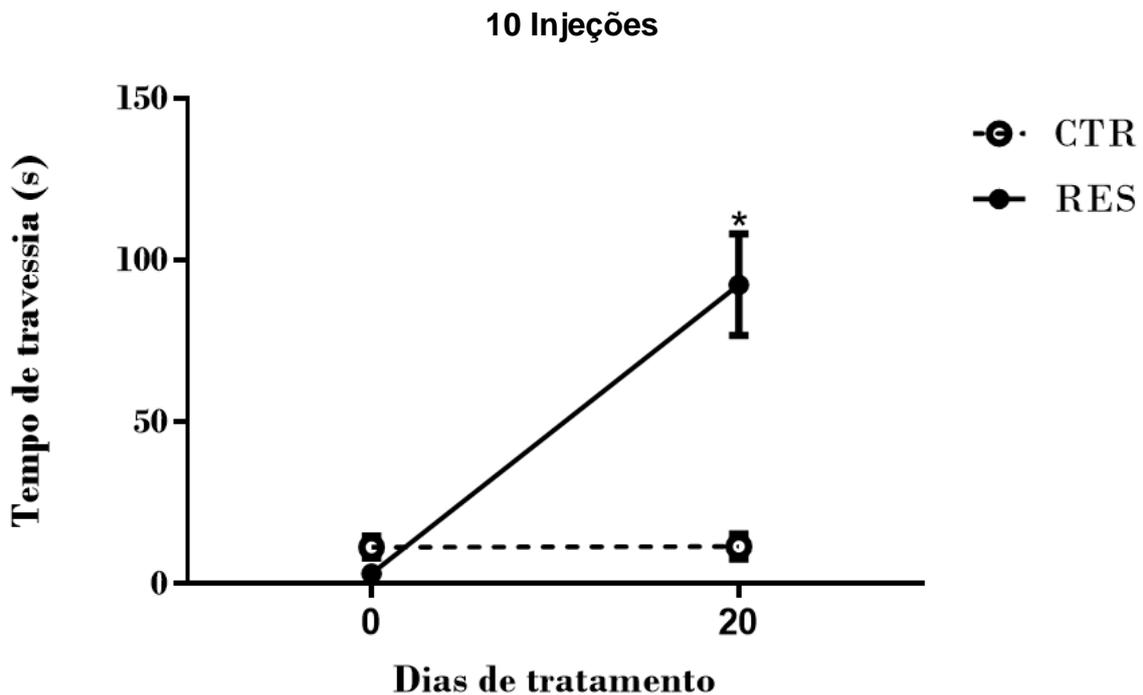
#### 5.1.3. Teste de Equilíbrio na trave (equilíbrio dinâmico)

Para o tempo de travessia na trave de equilíbrio, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, realizada com os animais que receberam 4 injeções, revelou efeito do tempo [ $F(1, 13) = 32,64, p < 0,0001$ ], do tratamento [ $F(1, 13) = 40,19, p < 0,0001$ ] e interação tempo x tratamento [ $F(1, 13) = 19,01, p < 0,0001$ ] (**Figura 12**). O pós-teste de Fisher's mostrou um tempo de travessia significativamente maior no dia 8 do grupo RES, quando comparado ao CTR [ $p^8$ ].

< 0,0001]. Para a análise realizada com os animais que receberam 10<sup>a</sup> injeções, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [F (1, 13) = 28,32, p = 0,0001], do tratamento [F (1, 13) = 15,78, p = 0,0016] e interação tempo x tratamento [F (1, 13) = 28,07, p = 0001]. O pós-teste de Fisher's mostrou um tempo de travessia significativamente maior no dia 20 do grupo RES, quando comparado ao CTR [ $p^{20} < 0,0001$ ] (**Figura 13**)



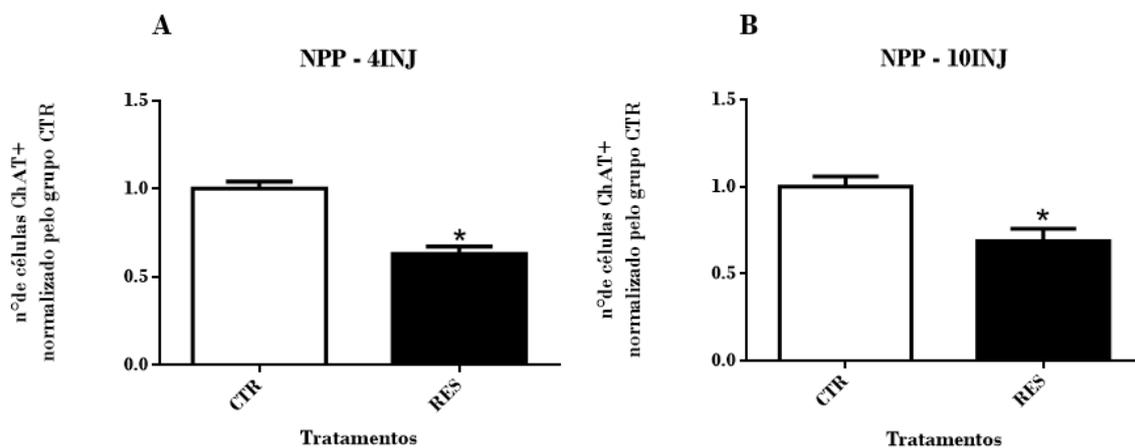
**Figura 12:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir um aumento do tempo necessário para atravessar a trave nos animais tratados com RES no dia 8. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \*p < 0,05 (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).



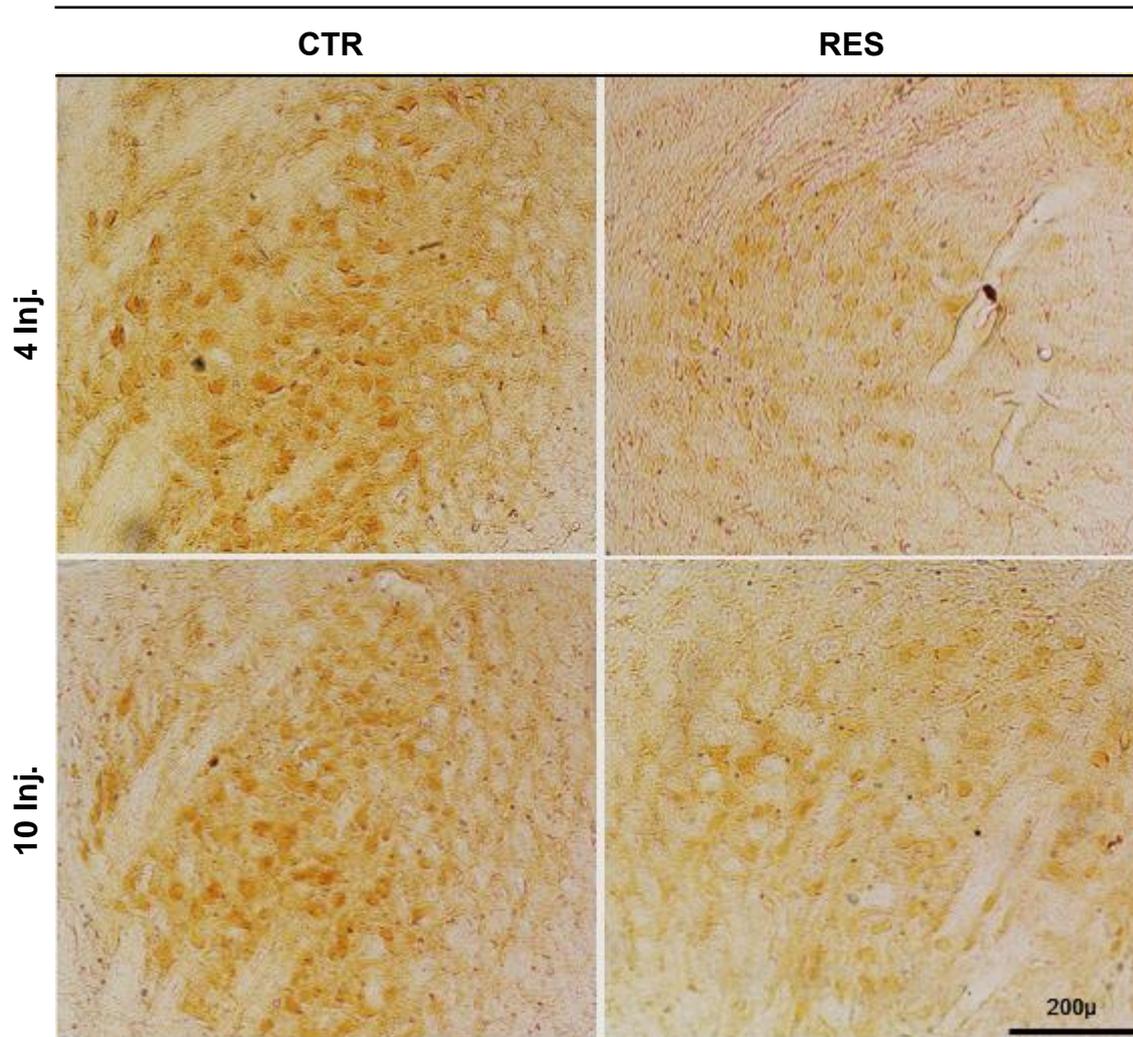
**Figura 13:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir um aumento do tempo necessário para atravessar a trave nos animais tratados com RES, no dia 20. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).

#### 5.1.4. Imunorreatividade para ChAT<sup>+</sup>

Para o número de neurônios ChAT<sup>+</sup> no NPP, o teste-t simples revelou uma diminuição do número de células tanto nos animais do grupo RES que receberam 4 injeções quando comparados com os animais do grupo CTR [ $t(8) = 6,367$ ,  $p = 0,0002$ ], quanto nos animais do grupo RES que receberam 10 injeções, quando comparados com o grupo CTR [ $t(8) = 3,406$ ,  $p = 0,0093$ ] (**Figura 14**).



**Figura 14:** Administração crônica e repetida de reserpina (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) sobre o número de células ChAT+ no NPP em animais que receberam 4 injeções (A) e 10 injeções (B). Houve uma diminuição do número de células ChAT+ tanto no grupo RES que recebeu 4 injeções quanto no grupo RES que recebeu 10 injeções, quando comparados com seus respectivos grupos CTR. Os valores são expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (teste-t simples para amostras não pareadas).



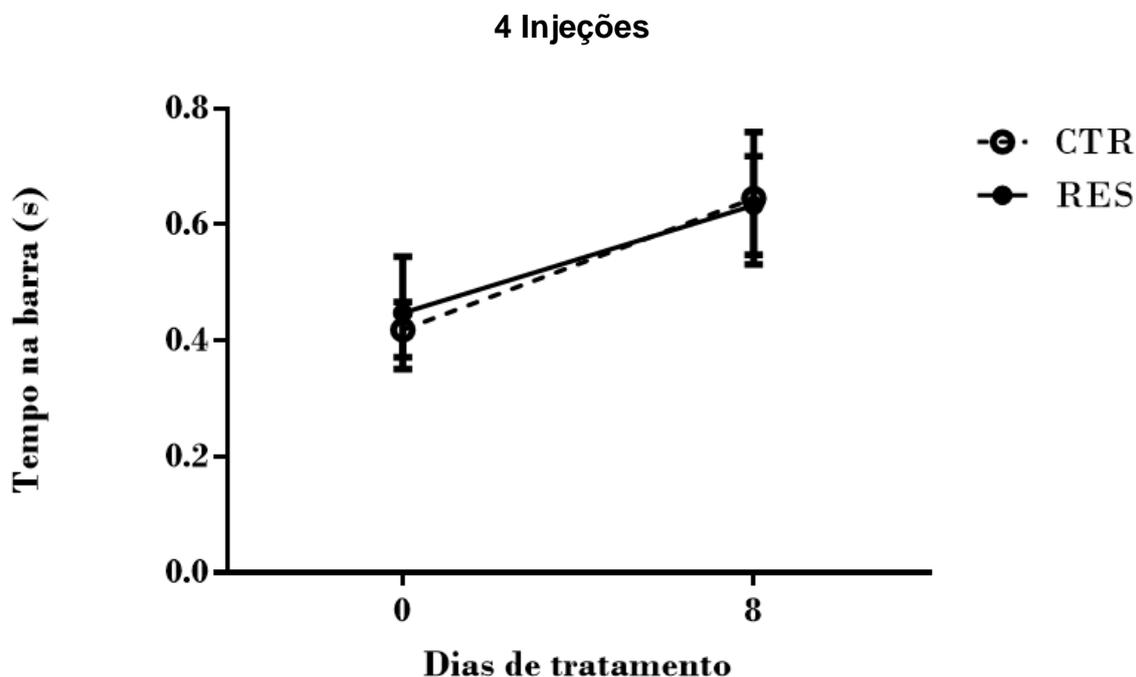
**Figura 15:** Imagens representativas do número de neurônios ChAT+ no NPP dos animais tratados com 4 e 10 injeções de RES e seus respectivos CTR. Barra de escala: 200 µm.

## 5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 2: ATIVAÇÃO DOS NÚCLEOS VESTIBULARES, CEREBELO, NÚCLEO PEDÚNCULOPONTINO E NÚCLEOS DA BASE APÓS TESTES DE EQUILÍBRIO NA TRAVE

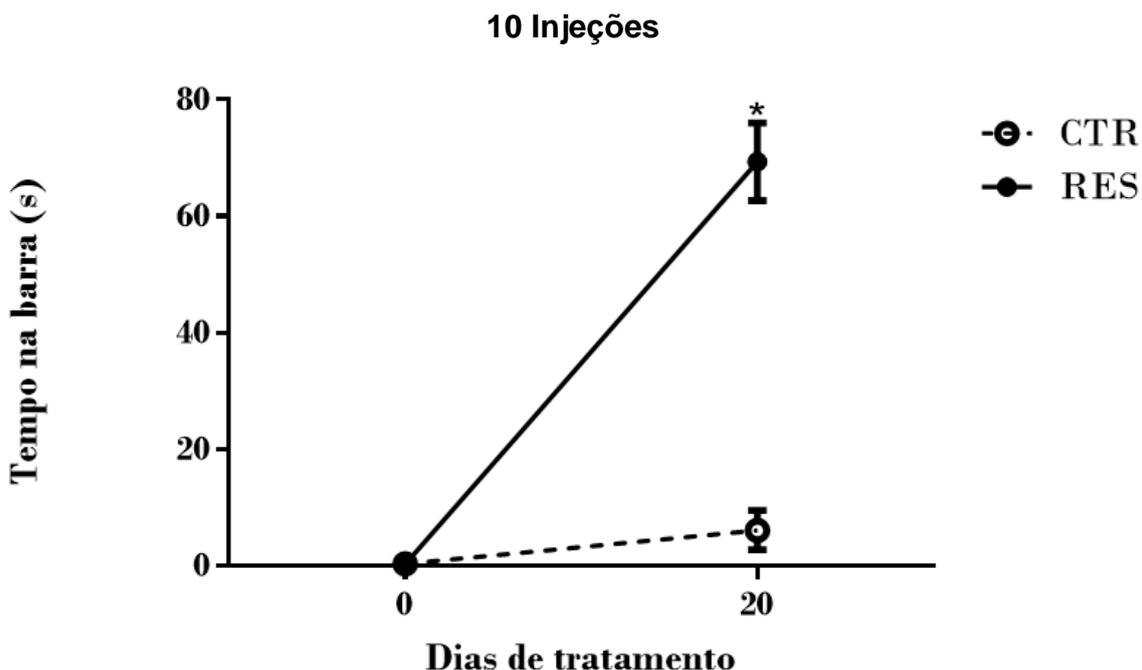
### 5.2.1. Teste de Catalepsia

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas realizada com os animais que receberam 4 injeções, mostrou efeito do tempo [ $F(1, 30) = 6,143$ ,  $p = 0,0190$ ], mas não houve efeito de tratamento [ $F(1, 30) = 0,007616$ ,  $p = 0,9310$ ], nem interação tempo x tratamento [ $F(1, 30) = 0,06198$ ,  $p = 0,8051$ ] (**Figura 16**). Para a análise realizada com os animais que receberam 10 injeções, a ANOVA

de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito do tempo [ $F(1, 13) = 92,57$ ,  $p < 0,0001$ ], do tratamento [ $F(1, 13) = 64,65$ ,  $p < 0,0001$ ] e interação tempo x tratamento [ $F(1, 13) = 66,17$ ,  $p < 0,0001$ ]. O pós-teste de Fisher's revelou um aumento significativo no dia 20 no tempo de permanência na barra do grupo RES, quando comparado ao grupo CTR [ $p^{20} < 0,0001$ ] (**Figura 17**).



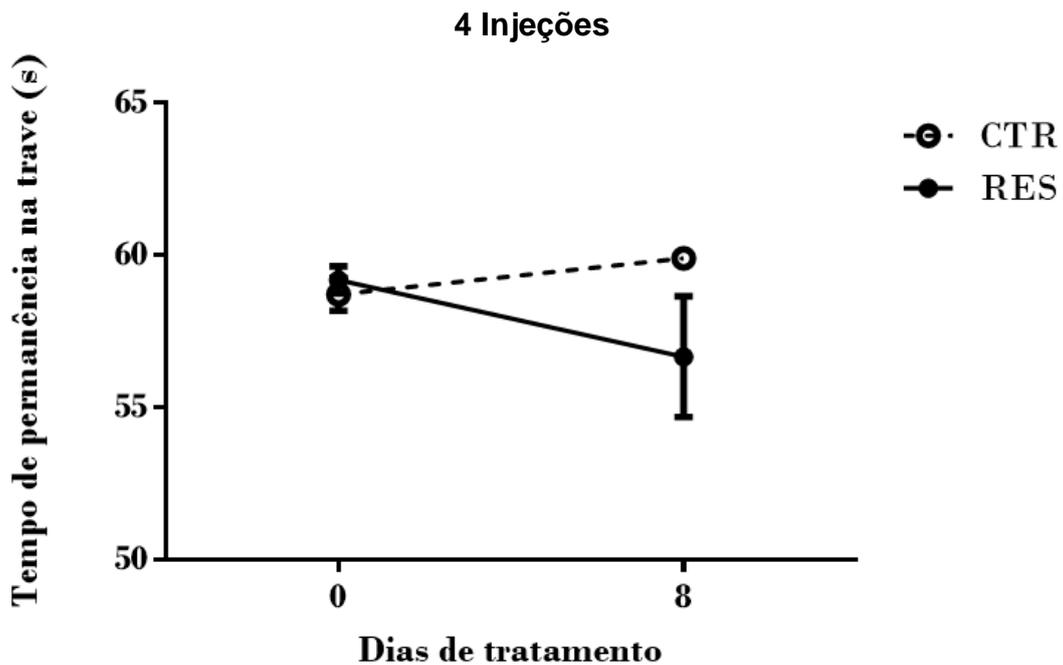
**Figura 16:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no comportamento de catalepsia em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) não induziu aumento do tempo de catalepsia dos animais tratados com RES no dia 8. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).



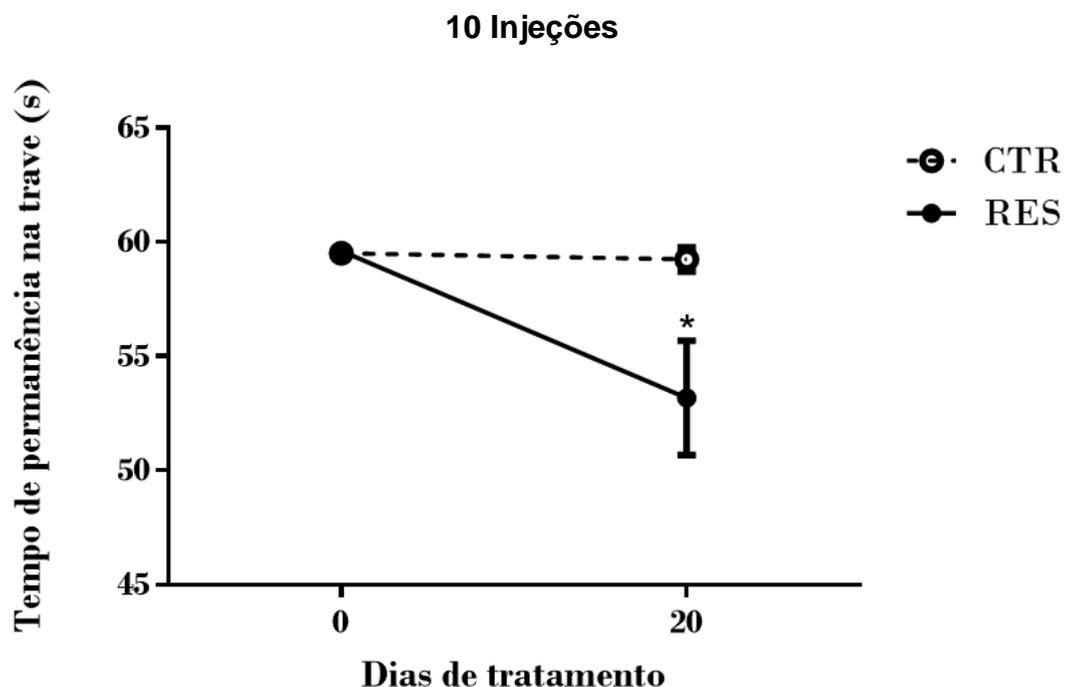
**Figura 17:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no comportamento de catalepsia em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir aumento progressivo do tempo de catalepsia dos animais tratados com RES no dia 20. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).

### 5.2.2. Teste de Equilíbrio na Trave (Equilíbrio estático - tempo)

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas, realizada com os animais que receberam 4 injeções, não revelou efeito de tempo [F (1, 29) = 0,4405,  $p = 0,5121$ ], de tratamento [F (1, 29) = 1,418,  $p = 0,2434$ ], nem de interação tempo x tratamento [F (1, 29) = 3,423,  $p = 0,0745$ ] (**Figura 18**). Para a análise dos animais que receberam 10 injeções, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito de tempo [F (1, 13) = 7,41,  $p = 0,0199$ ], de interação tempo x tratamento [F (1, 13) = 5,947,  $p = 0,0298$ ], mas não mostrou efeito de tratamento [F (1, 13) = 4,020,  $p = 0,0662$ ]. O pós-teste de Fisher's mostrou um tempo de permanência na trave menor no dia 20 do grupo RES, quando comparado ao grupo CTR [ $p^{20} = 0,0045$ ] (**Figura 19**).



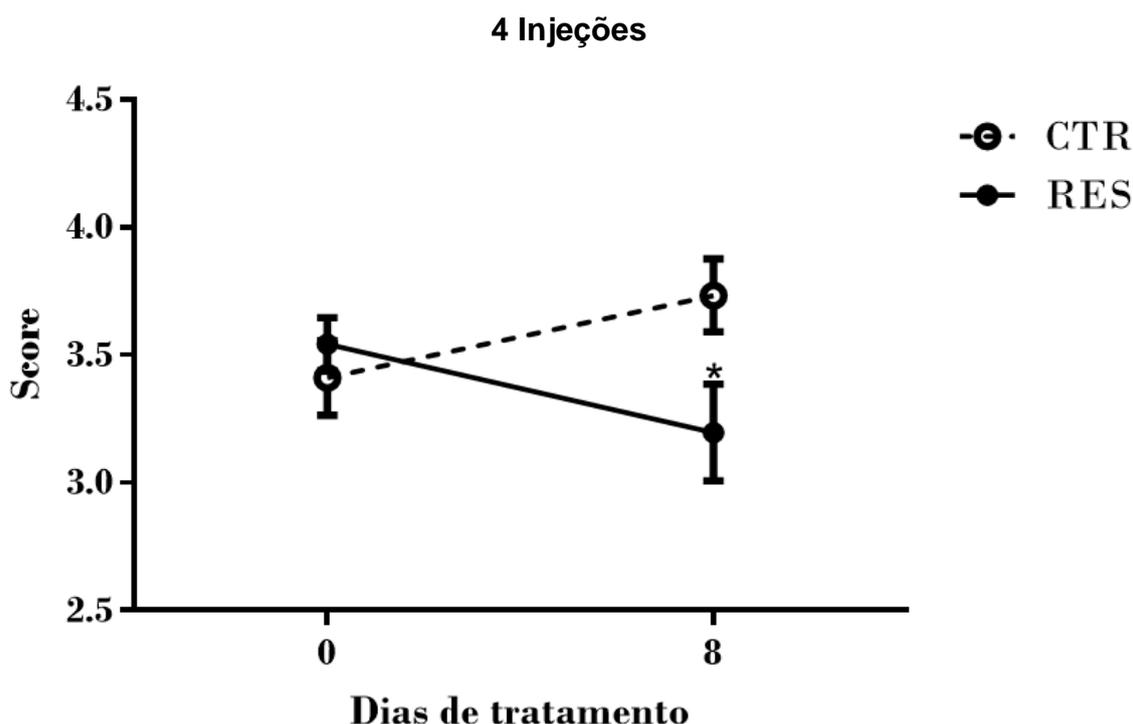
**Figura 18:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no tempo de permanência na trave de equilíbrio (equilíbrio estático) em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) não foi capaz de induzir uma diminuição do tempo de permanência na trave nos animais tratados com RES, no dia 8. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).



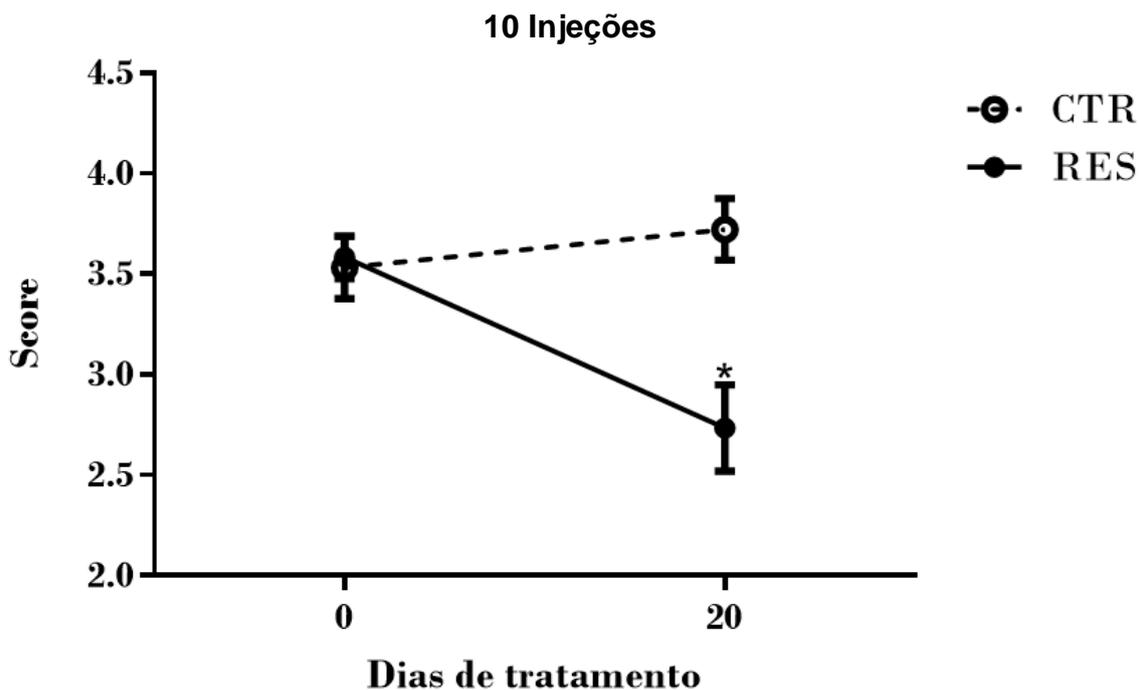
**Figura 19:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no tempo de permanência na trave de equilíbrio (equilíbrio estático) em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir uma diminuição do tempo de permanência na trave nos animais tratados com RES, no dia 20. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).

### 5.2.3. Teste de Equilíbrio na Trave (Equilíbrio estático - score)

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas, realizada com os animais que receberam 4 injeções mostrou efeito de interação tempo x tratamento [F (1, 29) = 6,135,  $p = 0,0193$ ], mas não mostrou efeito de tempo [F (1, 29) = 0,006746,  $p = 0,9351$ ], nem de tratamento [F (1, 29) = 1,559,  $p = 0,2217$ ]. O pós-teste de Fisher's mostrou uma pontuação significativamente menor (score), no dia 8 do grupo RES quando comparado ao grupo CTR [ $p^8 = 0,0137$ ] (**Figura 20**). Na análise realizada com o grupo de animais que receberam 10 injeções, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito do tempo [F (1, 13) = 38,21,  $p < 0,0001$ ], do tratamento [F (1, 13) = 10,73,  $p = 0,0060$ ] e de interação tempo x tratamento [F (1, 13) = 22,80,  $p = 0,0004$ ]. O pós-teste de Fisher's mostrou uma pontuação significativamente menor (score) no dia 20 do grupo RES, quando comparado ao grupo CTR [ $p^{20} < 0,0001$ ] (**Figura 21**).



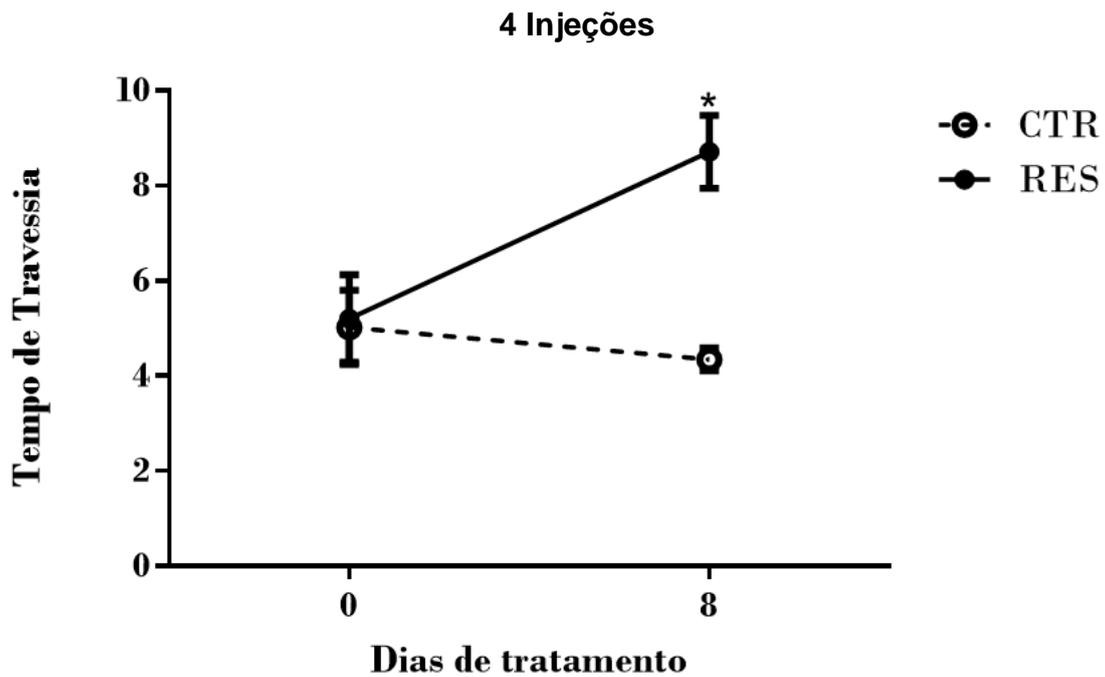
**Figura 20:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) na avaliação por meio de score em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir uma diminuição do score nos animais tratados com RES, no dia 8. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).



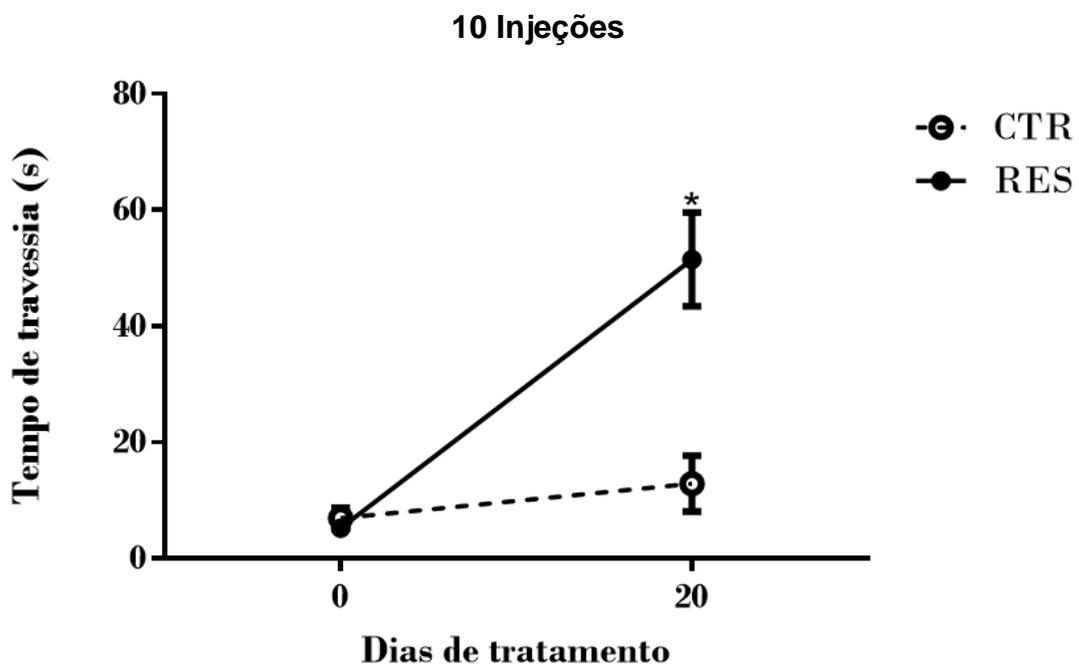
**Figura 21:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) na avaliação por meio de score em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir uma diminuição do score nos animais tratados com RES, entre no dia 20. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).

#### 5.2.4. Teste de Equilíbrio na Trave (Equilíbrio dinâmico)

Para o tempo de travessia, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas, realizada para os animais que receberam 4 injeções, revelou efeito de tratamento [ $F(1, 13) = 8,882, p = 0,0106$ ], de interação tempo x tratamento [ $F(1, 13) = 8,188, p = 0,0134$ ], mas não mostrou efeito de tempo [ $F(1, 13) = 3,759, p = 0,0745$ ]. O pós-teste de Fisher's mostrou um tempo de travessia significativamente maior no dia 8 do grupo RES, quando comparado ao CTR [ $p^8 = 0,0003$ ] (**Figura 22**). Para a análise realizada com os animais que receberam 10 injeções, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas revelou efeito de tempo [ $F(1, 13) = 38,21, p < 0,0001$ ], de tratamento [ $F(1, 13) = 10,73, p = 0,0060$ ] e de interação tempo x tratamento [ $F(1, 13) = 22,80, p = 0,0004$ ]. O pós-teste de Fisher's mostrou um tempo de travessia significativamente maior no dia 20 do grupo RES, quando comparado ao CTR [ $p^{20} < 0,0001$ ] (**Figura 23**).



**Figura 22:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir um aumento do tempo necessário para atravessar a trave nos animais tratados com RES, no dia 8. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).



**Figura 33:** Efeito da administração repetida de 0,1 mg/kg de reserpina (RES) ou veículo (CTR) no tempo de travessia na trave de equilíbrio (equilíbrio dinâmico) em ratos. A administração repetida de RES (0,1 mg/kg) foi capaz de induzir um aumento do tempo necessário para atravessar a trave nos animais tratados com RES, no dia 20. Os dados foram expressos como média e E.P.M. \* $p < 0,05$  (ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Fisher's).

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou, por meio de um modelo de administração de baixas doses (0,1 mg/kg) de RES em ratos, investigar a participação do mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio observadas na DP. A partir da análise dos dados verificamos que em ambos os delineamentos experimentais, as alterações relacionadas ao equilíbrio estático e dinâmico precederam as alterações motoras relacionadas a catalepsia e campo aberto. Neuroquimicamente, no delineamento experimental 1 houve uma redução do número de células ChAT imunorreativas no NPP tanto para os animais que receberam 4 injeções, quanto para os animais que receberam 10 injeções ao reduzirmos a exposição dos animais aos testes de equilíbrio na trave, realizando apenas uma avaliação basal e uma 48h após a 4ª e 10ª injeções, visto que o objetivo foi investigar a participação do mecanismo de compensação vestibular com base em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa.

Tendo em vista que a DP traz consigo a manifestação de sintomas motores como rigidez, tremor e bradicinesia (ZESIEWICZ, 2019; RUIZ; CATALÁN; CARRIL, 2011; OPARA *et al.*, 2017), faz-se relevante uma análise das alterações motoras em um trabalho que se utiliza de um modelo animal para mimetizar os aspectos comportamentais da DP como é o da RES. Diante disso, o presente estudo fez uso dos testes de catalepsia e campo aberto. Na análise dos dados referentes à catalepsia, foi possível observar no delineamento experimental 1, um aumento progressivo do comportamento de catalepsia 48h após a 6ª injeção de RES que permaneceu até o final do tratamento. No delineamento experimental 2, esse aumento foi observado apenas na avaliação pontual realizada 48h após a 10ª injeção. Ambos os resultados são semelhantes aos encontrados em outros estudos que também fizeram uso do mesmo parâmetro de avaliação motora e do mesmo modelo animal (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; BISPO *et al.*, 2019; CINTRA *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2021), os quais verificaram por meio do teste de catalepsia um aumento da latência para iniciar um movimento nos animais tratados com RES. Os resultados do campo aberto mostraram uma diminuição da distância total percorrida, da velocidade média e do número de rearing apenas para os animais

do grupo RES que receberam 10 injeções, ou seja, em estágios mais avançados do tratamento, assim como observado em estudos anteriores (FERNANDES *et al.*, 2012; CAMPÊLO *et al.*, 2017; BISPO *et al.*, 2019; DOS SANTOS *et al.*, 2021).

O objetivo principal do estudo consistiu na investigação do mecanismo de compensação envolvido nas alterações do equilíbrio. Nesse sentido, foi necessária a utilização de testes comportamentais que avaliassem o equilíbrio em ratos. Para uma avaliação mais ampla, optamos por modelos de testes de equilíbrio em traves de madeira que analisaram o equilíbrio estático (FUJIMOTO *et al.*, 2004; KHARATISHVILI *et al.*, 2009; DOA SANTOS *et al.*, 2021) e o equilíbrio dinâmico (BUDEBERG *et al.*, 2004; ALLBUTT; HENDERSON, 2007) (DOS SANTOS, *et al.*, 2021). No delineamento experimental 1, utilizamos apenas a trave de equilíbrio dinâmico, tendo em vista o objetivo a ser respondido, bem como por ser uma tarefa mais complexa (MELO *et al.*, 2017); (CAMPOLETTANO; GELLNER; ROWSON, 2018). Em ambos os delineamentos experimentais, as alterações do equilíbrio foram observadas 48h após a 4ª injeção, enquanto que as alterações motoras de catalepsia e campo aberto somente foram observadas após esse período, conforme descrito no parágrafo anterior. Esse dado se torna um ponto de observação importante, uma vez que em humanos os distúrbios do equilíbrio começam a se manifestar em estágios mais avançados da doença (RINALDUZZI *et al.*, 2015; SMITH, 2018; ZESIEWICZ, 2019) e nos leva a uma reflexão pertinente sobre o fato de em nosso estudo as alterações do equilíbrio terem acontecido em estágios iniciais e anteriores às alterações motoras observadas por meio do teste de catalepsia e campo aberto.

Nesse sentido, é importante citar que o controle do equilíbrio é uma habilidade complexa, baseada na interação de processos sensório-motores dinâmicos, abrangendo, portanto, múltiplos sistemas (HORAK, 2006; GERA *et al.*, 2016), como restrições biomecânicas, integração sensorial, respostas posturais, ajustes posturais antecipatórios, processamento cognitivo e estratégias de movimento (HORAK; WRISLEY; FRANK, 2009). Diante dessas informações, é possível inferir que o fato das alterações do equilíbrio terem se manifestado nos estágios iniciais do tratamento com baixas doses RES, seja devido ao acometimento de um ou mais dos sistemas envolvidos no controle do

equilíbrio, que não estão relacionados essencialmente à atividade motora, visto que em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa foi observado o aparecimento de sintomas não motores como alterações cognitivas, nociceptivas e comprometimento do tipo ansiedade também em estágios iniciais do tratamento com baixas doses de RES, precedendo as alterações motoras (LEAL *et al.*, 2019; CINTRA *et al.*, 2021).

Análises mais detalhadas em relação ao momento em que as alterações motoras acontecem, são possíveis graças a utilização de um modelo crônico de indução da DP, o que permite o aparecimento gradual dos sintomas motores (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013) e uma melhor compreensão da fisiopatologia da doença, tendo em vista que em humanos os sintomas motores começam a se manifestar somente após uma degeneração substancial de cerca de 70% dos neurônios dopaminérgicos (RODRIGUEZ-OROZ *et al.*, 2009; GOPALAKRISHNA; ALEXANDER, 2015; MAGRINELLI *et al.*, 2016) e as alterações do equilíbrio mais tardiamente no curso da doença (RINALDUZZI *et al.*, 2015; SMITH, 2018; ZESIEWICZ, 2019). Logo, o conhecimento dessas informações é de grande relevância no que diz respeito a elaboração de uma estratégia terapêutica que busque o cuidado de pacientes acometidos pela DP e minimize as consequências decorrentes da patologia na qualidade de vida desses sujeitos (MORO *et al.*, 2010; GOPALAKRISHNA; ALEXANDER, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). No caso do desequilíbrio, pesquisadores apontam para a necessidade de sua compreensão, ressaltando que se trata de uma demanda que apesar de grande ainda não foi atendida (MORO *et al.*, 2010; PERERA *et al.*, 2018).

Assim, na busca por um melhor entendimento dos aspectos relacionados ao equilíbrio na DP, a investigação da participação do NPP e do sistema de neurotransmissão colinérgico nos distúrbios do equilíbrio é condizente com o que vem sendo abordado pela literatura (KARACHI, GRABLI, BERNARD, *et al.*, 2010; PERERA *et al.*, 2018; MORRIS *et al.*, 2019; CHAMBERS; LANZA; BISHOP, 2020), tendo em vista os objetivos do presente estudo. O NPP compreende neurônios não colinérgicos (GABAérgicos e glutamatérgicos) e colinérgicos, entretanto esses últimos representam 80% a 90% de sua composição. É uma área que possui projeções aferentes e eferentes com

diferentes regiões como córtex cerebral, tálamo, núcleos da base, cerebelo e medula espinhal (FRENCH; MUTHUSAMY, 2018). Em macacos, uma lesão específica em neurônios colinérgicos do NPP induz déficits posturais e de marcha (KARACHI; GRABLI; BERNARD *et al.*, 2010). Em pacientes com DP, os neurônios colinérgicos do NPP degeneraram ao longo do tempo com uma correlação significativa entre quedas e velocidade de marcha (PAHAPILL; LOZANO, 2000; BOHNEN *et al.*, 2013; WELTER *et al.*, 2015). Diante do exposto e devido ao papel crítico da entrada cortical para a marcha e o equilíbrio, a acetilcolina (ACh), um sistema neurotransmissor essencial para a atenção, tornou-se um elemento de interesse comum quando se fala em mobilidade (MORRIS *et al.*, 2019).

A enzima ChAT é responsável por sintetizar a acetilcolina a partir da colina e da acetil coenzima A (acetil-CoA) (WITZEMANN, 2007; OKUDA; HAGA, 2003). O conteúdo de ACh nas células é proporcional à expressão de ChAT dentro das células (WITZEMANN, 2007; HALDER; LAL, 2021), sendo a ChAT utilizada como indicador direto para o monitoramento funcional de neurônios colinérgicos no SNC e no SNP (KAN; CHAO; FORNO, 1980; SPANG; FORSGREN, 2015). A investigação da participação do mecanismo de compensação vestibular nas alterações do equilíbrio a partir do modelo animal da RES, envolveu a análise do número de células ChAT imunorreativas do NPP e foi realizada por meio do experimento 1. A partir de um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (DOS SANTOS, 2018), foi observada uma diminuição do número de neurônios ChAT+ para o grupo de animais que receberam 4 injeções de RES. No entanto, o grupo de animais que recebeu 10 injeções não apresentou redução do número de neurônios ChAT+ estatisticamente significativa quando comparado com o grupo CTR. Esse resultado suscitou a possibilidade de estar ocorrendo a participação do mecanismo de compensação vestibular central ao longo do tratamento, uma vez que os animais eram submetidos a tarefas de equilíbrio todos os dias e sabe-se que o engajamento comportamental ativo é necessário para iniciar o processo de compensação vestibular (LACOUR; BERNARD-DEMANZE, 2015). Além disso, no caso de humanos com prejuízos no equilíbrio, o processo de aceleração da compensação vestibular por meio da reabilitação vestibular, tem como um dos seus mecanismos a mobilidade precoce desses pacientes, sendo

capaz de melhorar o desequilíbrio, quedas, medo de cair, oscilopsia, tontura, vertigem, sensibilidade ao movimento e sintomas secundários. Logo, uma limitação dos movimentos por parte dos pacientes não é algo recomendado (DEVEZE *et al.*, 2014; HILLIER; MCDONNELL, 2016; SULWAY; WHITNEY, 2019).

Nesse sentido, a estratégia utilizada para investigar se de fato estava havendo um mecanismo de compensação vestibular foi repetir o experimento realizado anteriormente, mas retirando a exposição dos animais às traves de equilíbrio diariamente, limitando a mobilidade desses animais a dois únicos momentos pontuais: uma avaliação inicial (antes da primeira injeção para todos os grupos) e uma avaliação final (48h após a 4ª injeção para os animais que receberam 4 injeções e 48h após a 10ª injeção para os animais que receberam 10 injeções). Os resultados encontrados mostraram uma redução do número de neurônios ChAT+ tanto para o grupo de animais que recebeu 4 quanto para o grupo de animais que recebeu 10 injeções, confirmando a hipótese de participação do mecanismo de compensação vestibular levantada por meio do estudo anterior.

Os resultados supracitados reforçam a importância e os benefícios da RV como estratégia terapêutica para indivíduos com DP e distúrbios do equilíbrio já observados em estudos anteriores (ROSSI-IZQUIERDO *et al.*, 2009; ZEIGELBOIM *et al.*, 2009; ACARER *et al.*, 2015). A RV é realizada para auxiliar na recuperação da função do equilíbrio e para correção de estratégias inadequadas de equilíbrio, baseando-se na melhora e aceleração da compensação vestibular (DEVEZE *et al.*, 2014; SULWAY; WHITNEY, 2019), que por sua vez, ao ocorrer sem a aplicação da estratégia terapêutica de RV, promove uma recuperação espontânea que não é a ideal (LACOUR; BERNARD-DEMANZE, 2015).

Desde o final da década de 1990, houve um aumento significativo das evidências sobre as técnicas de exercícios vestibulares utilizados no tratamento de pacientes com patologias vestibulares, permitindo que as intervenções se tornassem mais refinadas e eficazes (SULWAY; WHITNEY, 2019), sendo essa estratégia reconhecida como uma das técnicas mais valiosas no tratamento de pacientes com distúrbios do equilíbrio (HOFFE; BALABAN, 2011).

Destaca-se aqui, que os efeitos dos protocolos de reabilitação no estudo da compensação vestibular em roedores nunca foram estudados (MAROUANE *et al.*, 2021). Em contrapartida, numerosos estudos destacaram os efeitos benéficos do exercício físico na neurogênese e plasticidade cerebral em vários modelos de patologias neurológicas (VAN PRAAG *et al.*, 1999; STRANAHAN; MARTIN; MAUDSLEY, 2012; NOKIA *et al.*, 2016), inclusive na DP (LAU *et al.*, 2011; COTMAN; BERCHTOLD; CHRISTIE, 2007; PATKI; LAU, 2011).

É importante mencionar ainda, a relevância de uma intervenção precoce e de programas de prevenção das alterações do equilíbrio (KELLER; BASTIAN, 2014; KHANUJA *et al.*, 2018). Na prática clínica, esses programas apresentam resultados significativos na melhora do equilíbrio e na prevenção das consequências relacionadas às alterações do equilíbrio, como por exemplo as quedas (GSCHWIND *et al.*, 2013; KRUSCHKE; BUTCHER, 2017; JEON *et al.*, 2014).

## **7. CONCLUSÃO**

No presente estudo a administração repetida de baixas doses (0,1 mg/kg) de reserpina foi capaz de causar alterações comportamentais do equilíbrio desde os estágios iniciais. Essas alterações foram acompanhadas pela redução do número de células imunorreativas para ChAT no NPP, o que permitiu verificar que o uso de exercícios repetidos potencializou a atuação do mecanismo central de compensação vestibular.

## REFERÊNCIAS

- ABRUZZO, A. *et al.* Reoperation for persistent or recurrent secondary hyperparathyroidism. Surgical treatment of renal hyperparathyroidism. **Acta Bio Medica : Atenei Parmensis**, v. 88, n. 3, p. 325, 2017.
- ACARER, A.; KARAPOLAT, H.; CELEBISOY, N.; OZGEN, G.; COLAKOGLU, Z. Is customized vestibular rehabilitation effective in patients with Parkinson's? **NeuroRehabilitation**, v. 37, n. 2, p. 255–262, 2015.
- ALLBUTT, H. N.; HENDERSON, J. M. Use of the narrow beam test in the rat, 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, n. 2, p. 195–202, 2007.
- ARCHIBALD, N.; MILLER, N.; ROCHESTER, L. **Neurorehabilitation in Parkinson disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 110
- BARMACK, N. H. Central vestibular system: Vestibular nuclei and posterior cerebellum. **Brain Research Bulletin**, v. 60, n. 5–6, p. 511–541, 2003.
- BERGMAN, H.; DEUSCHL, G. Pathophysiology of parkinson's disease: From clinical neurology to basic neuroscience and back. **Movement Disorders**, v. 17, n. SUPPL. 3, p. 28–40, 2002.
- BISPO, J. M. M. *et al.* Sex differences in the progressive model of parkinsonism induced by reserpine in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 363, p. 23–29, 2019.
- BOHNEN, N. I.; ALBIN, R. L. The cholinergic system in Parkinson's disease. **Behav Brain Res.**, v. 221, n. 2, p. 564–573, 2011.
- BOHNEN, N. I. *et al.* Gait speed in Parkinson disease correlates with cholinergic degeneration. **Neurology**, v. 81, n. 18, p. 1611–1616, 2013.
- BOHNEN, N. I. *et al.* Heterogeneity of cholinergic denervation in Parkinson's disease without dementia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 32, n. 8, p. 1609–1617, 2012.

BRONSTEIN, A. M.; PAVLOU, M. Balance. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 110, n. 0, p. 189–208, 2013.

BROWN, K. E. *et al.* Physical therapy for central vestibular dysfunction. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 87, n. 1, p. 76–81, 2006.

BUDDEBERG, B. S. *et al.* Behavioral testing strategies in a localized animal model of multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 153, n. 1–2, p. 158–170, 2004.

CALABRESI, P. *et al.* DI. Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1022–1030, 2014.

CAMPDELACREU, J. Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: Factores de riesgo ambientales. **Neurologia**, v. 29, n. 9, p. 541–549, 2014.

CAMPÊLO, C. L. C. *et al.* Exposure to an enriched environment facilitates motor recovery and prevents short-term memory impairment and reduction of striatal BDNF in a progressive pharmacological model of parkinsonism in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 328, n. April, p. 138–148, 2017.

CAMPOLETTANO, E. T.; GELLNER, R. A.; ROWSON, S. Assessing Static and Dynamic Postural Control in a Healthy Population. **Biomedical sciences instrumentation**, v. 54, n. 1, p. 24–31, 2018.

CAPRIOTTI, T.; TERZAKIS, K. Parkinson Disease. **Home healthcare now**, v. 34, n. 6, p. 300–307, 2016.

CARMICHAEL, O.; LOCKHART, S. Neurotrophins and. **Brain Imaging in Behavioral Neuroscience**, n. November 2011, p. 289–320, 2012.

CENCI, M. A. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 236–243, 2007.

CHAMBERS, N. E.; LANZA, K.; BISHOP, C. Pedunculopontine nucleus degeneration contributes to both motor and non-motor symptoms of Parkinson's disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. January, p. 1–9, 2020.

CHARLES NELSON, E. Notes from wisbech and fenland museum: Mrs Doyle's Dublin shells. **Archives of Natural History**, v. 43, n. 1, p. 171–173, 2016.

CHAUDHURI, K. R.; SCHAPIRA, A. H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 5, p. 464–474, 2009.

CHEN, H. *et al.* Physical activity and the risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 64, n. 4, p. 664–669, 2005.

CHEN, S. Y.; TSAI, S. T. The epidemiology of Parkinson's disease. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 22, n. 2, p. 73–81, 2010.

CHIA, S. J.; TAN, E. K.; CHAO, Y. X. Historical perspective: Models of Parkinson's disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 1–14, 2020.

CINTRA, R. R. *et al.* Nociception alterations precede motor symptoms in a progressive model of parkinsonism induced by reserpine in middle-aged rats. **Brain Research Bulletin**, v. 171, n. February, p. 1–9, 2021.

COAKELEY, S.; MARTENS, K. E.; ALMEIDA, Q. J. Management of anxiety and motor symptoms in Parkinson's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 14, n. 8, p. 937–946, 2014.

DAWSON, L. *et al.* The group II metabotropic glutamate receptor agonist, DCG-IV, alleviates akinesia following intranigral or intraventricular administration in the reserpine-treated rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 3, p. 541–546, 2000.

DENG, H.; WANG, P.; JANKOVIC, J. The genetics of Parkinson disease. **Ageing Research Reviews**, v. 42, p. 72–85, 2018.

DEVEZE, A. *et al.* Vestibular compensation and vestibular rehabilitation. Current concepts and new trends. **Neurophysiologie Clinique**, v. 44, n. 1, p. 49–57, 2014.

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

DORSEY, E. R. *et al.* The emerging evidence of the Parkinson pandemic. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 8, n. s1, p. S3–S8, 2018.

DOS SANTOS, T. F. O. **Alterações do equilíbrio em um modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina**. 2018. 77. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2018.

DOS SANTOS, T. F. O. *et al.* Balance alterations and reduction of pedunculopontine cholinergic neurons in early stages of parkinsonism in middle-aged rats. **Experimental Gerontology**, v. 145, n. July 2020, 2021.

FAHN, S. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 991, p. 1–14, 2003.

FASANO, A. *et al.* Falls in Parkinson's disease: A complex and evolving picture. **Movement Disorders**, v. 32, n. 11, p. 1524–1536, 2017.

FERNANDES, V. S. *et al.* Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 231, n. 1, p. 154–163, 2012.

FREITAS, C. M. *et al.* Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 3, p. 457–467, 2016.

FRENCH, I. T.; MUTHUSAMY, K. A. A review of the pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, n. APR, p. 1–16, 2018.

FUJIMOTO, S. T. *et al.* Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 4, p. 365–378, 2004.

GERARDS, M. H. G. *et al.* Perturbation-based balance training for falls reduction among older adults: Current evidence and implications for clinical practice. **Geriatrics and Gerontology International**, v. 17, n. 12, p. 2294–2303, 2017.

GOETZ, C. G. The history of Parkinson's disease: Early clinical descriptions and neurological therapies. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, 2011.

GOPALAKRISHNA, A.; ALEXANDER, S. A. Understanding Parkinson disease: A complex and multifaceted illness. **Journal of Neuroscience Nursing**, v. 47, n. 6, p. 320–326, 2015.

GOWRISHANKAR, R.; HAHN, M. K.; BLAKELY, R. D. Good riddance to dopamine: Roles for the dopamine transporter in synaptic function and dopamine-associated brain disorders. **Neurochemistry International**, v. 73, n. 1, p. 42–48, 2014.

GRABLI, D. *et al.* Normal and pathological gait. v. 83, n. 10, 2013.

GRATTAN, D. R. The hypothalamo-prolactin axis. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T101–T122, 2015.

GRAYBIEL, A. M. Chapter 10 - The Basal Ganglia. **Conn's Translational Neuroscience**, p. 219–225, 2017.

HAAXMA, C. A. *et al.* Gender differences in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 78, n. 8, p. 819–824, 2007.

HALDER, N.; LAL, G. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. April, 2021.

HILLIER, S.; MCDONNELL, M. Is vestibular rehabilitation effective in improving dizziness and function after unilateral peripheral vestibular hypofunction? An abridged version of a Cochrane Review. **European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 52, n. 4, p. 541–556, 2016.

HOFFE, M. E.; BALABAN, C. D. Vestibular rehabilitation: Ready for the Mainstream. **NeuroRehabilitation**, v. 29, n. 2, p. 125, 2011.

HORAK, F. B. **Postural compensation for vestibular loss and implications for rehabilitation** *Restorative Neurology and Neuroscience*, 2010.

HORVITZ, J. C. Mesolimbocortical and nigrostriatal dopamine responses to salient non-reward events. **Neuroscience**, v. 96, n. 4, p. 651–656, 2000.

JANAKIRAMAN, U. *et al.* Influences of chronic mild stress exposure on motor, non-motor impairments and neurochemical variables in specific brain areas of MPTP/probenecid induced neurotoxicity in mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–25, 2016.

JANUÁRIO, F.; AMARAL, I. C. Fisiologia do equilíbrio. v. 19, n. 1, 2010.

KAN, K. S.; CHAO, L.-PEN.; FORNO, L. S. (Accepted December 27th, 1979). v. 193, p. 165–171, 1980.

KARACHI, C. *et al.* Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 8, p. 2745–2754, 2010.

KARACHI, C.; FRANCOIS, C. Role of the pedunculo-pontine nucleus in controlling gait and sleep in normal and parkinsonian monkeys. **Journal of Neural Transmission**, v. 125, n. 3, p. 471–483, 2018.

KARACHI, C. *et al.* Cholinergic mesencephalic neurons are involved in gait and postural disorders in Parkinson disease. *St*. 2010.

KAUR, R.; MEHAN, S.; SINGH, S. Understanding multifactorial architecture of Parkinson's disease: pathophysiology to management. **Neurological Sciences**, v. 40, n. 1, p. 13–23, 2019.

KELLEY, A. E.; BERRIDGE, K. C. The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 9, p. 3306–3311, 2002.

KELLY, G.; SHANLEY, J. Rehabilitation of ataxic gait following cerebellar lesions: Applying theory to practice. **Physiotherapy Theory and Practice**, v. 32, n. 6, p. 430–437, 2016.

KHANDHAR, S. M.; MARKS, W. J. Epidemiology of Parkinson's Disease. **Disease-a-Month**, v. 53, n. 4, p. 200–205, 2007.

KHARATISHVILI, I. *et al.* Quantitative T2 mapping as a potential marker for the initial assessment of the severity of damage after traumatic brain injury in rat. **Experimental Neurology**, v. 217, n. 1, p. 154–164, 2009.

KLEIN, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 39, n. 1, p. 31–59, 2019.

KREBS, D. E. *et al.* M. Vestibular rehabilitation: Useful but not universally so. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 128, n. 2, p. 240–250, 2003.

L. STURNIEKS, D.; ST GEORGE, R.; R. LORD, S. Balance disorders in the elderly. **Neurophysiologie Clinique**, v. 38, n. 6, p. 467–478, 2008.

LACOUR, M. **Restoration of vestibular function: Basic aspects and practical advances for rehabilitation** **Current Medical Research and Opinion**, set. 2006.

LACOUR, M.; BERNARD-DEMANZE, L. Interaction between vestibular compensation mechanisms and vestibular rehabilitation therapy: 10 recommendations for optimal functional recovery. **Frontiers in Neurology**, v. 5, n. January, p. 1–14, 2015.

LEAL, P. C. *et al.* Cognitive and anxiety-like impairments accompanied by serotonergic ultrastructural and immunohistochemical alterations in early stages of parkinsonism. **Brain Research Bulletin**, v. 146, n. January, p. 213–223, 2019.

LEE, A.; GILBERT, R. M. Epidemiology of Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 955–965, 2016.

LUO, S. X.; HUANG, E. J. Dopaminergic neurons and brain reward pathways: From neurogenesis to circuit assembly. **American Journal of Pathology**, v. 186, n. 3, p. 478–488, 2016.

MAGRINELLI, F. *et al.* Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. **Parkinson's Disease**, v. 2016, 2016.

MAGUIRE, S. L.; SLATER, B. M. J. Physiology of ageing. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 7, p. 310–312, 2013.

MANCINI, M.; HORAK, F. B. The relevance of clinical balance assessment tools to differentiate balance deficits. **European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 46, n. 2, p. 239–248, 2010.

MELO, R. DE S. *et al.* Static and dynamic balance of children and adolescents with sensorineural hearing loss. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 15, n. 3, p. 262–268, 2017.

MILLER, D. B.; CALLAGHAN, J. P. O. Biomarkers of PD - Present and Future. **Metabolism**, v. 64, n. 3, p. S40–S46, 2014.

MORI, F. *et al.* The pedunculo-pontine tegmental nucleus as a motor and cognitive interface between the cerebellum and basal ganglia. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 10, n. NOV, p. 1–8, 2016.

MORO, E. *et al.* Unilateral pedunculo-pontine stimulation improves falls in Parkinson's disease. **Brain**, v. 133, n. 1, p. 215–224, 2010.

MORRIS, R. *et al.* Parkinsonism and Related Disorders Overview of the cholinergic contribution to gait, balance and falls in Parkinson ' s disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, n. January, p. 1–11, 2019.

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

OBESO, J. A. *et al.* Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23, n. SUPPL. 3, p. 548–559, 2008.

OKUDA, T.; HAGA, T. High-affinity choline transporter. **Neurochemical Research**, v. 28, n. 3–4, p. 483–488, 2003.

OPARA, J. A. *et al.* Motor assessment in parkinson's disease. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 3, p. 411–415, 2017.

PAHAPILL, P. A; LOZANO, A M. The pedunculo pontine nucleus and Parkinson's disease. **Brain : a journal of neurology**, v. 123 ( Pt 9, p. 1767–1783, 2000.

PARK, J.-H.; KANG, Y.-J.; HORAK, F. B. What Is Wrong with Balance in Parkinson's Disease? **Journal of Movement Disorders**, v. 8, n. 3, p. 109–114, 2015.

PEREIRA, A. G. *et al.* Temporal development of neurochemical and cognitive impairments following reserpine administration in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 383, n. August 2019, p. 112517, 2020.

PERERA, T. *et al.* Balance control systems in Parkinson's disease and the impact of pedunculo pontine area stimulation. **Brain**, v. 141, n. 10, p. 3009–3022, 2018.

PÉREZ, V.; SIERRA, F. Biología del envejecimiento. p. 296–302, 2009.

PETERKA, R. J. Sensorimotor integration in human postural control. **Journal of Neurophysiology**, v. 88, n. 3, p. 1097–1118, 2002.

PIFL, C. *et al.* Is Parkinson's disease a vesicular dopamine storage disorder? Evidence from a study in isolated synaptic vesicles of human and nonhuman primate striatum. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 24, p. 8210–8218, 2014.

POEWE, W. *et al.* Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

PRINGSHEIM, T. *et al.* The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 2014.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 251–259, 2017.

RANALLI, P. An overview of central vertigo disorders. **Advances in Oto-Rhino-Laryngology**, v. 82, p. 127–133, 2019.

RAUDINO, F. The Parkinson disease before James Parkinson. **Neurological Sciences**, v. 33, n. 4, p. 945–948, 2012.

REICH, S. G.; SAVITT, J. M. Parkinson's Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 2, p. 337–350, 2019.

RINALDUZZI, S. *et al.* A. Balance dysfunction in Parkinson's disease. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

ROBBINS, T. W. Dopamine and cognition. **Current Opinion in Neurology**, v. 16, n. SUPPL. 2, p. 4–5, 2003.

RODRIGUEZ-OROZ, M. C. *et al.* Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 12, p. 1128–1139, 2009.

ROSS, G. W. *et al.* Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. **Journal of the American Medical Association**, v. 283, n. 20, p. 2674–2679, 2000.

ROSSI-IZQUIERDO, M. *et al.* Vestibular rehabilitation with computerised dynamic posturography in patients with Parkinson's disease: Improving balance impairment. **Disability and Rehabilitation**, v. 31, n. 23, p. 1907–1916, 2009.

RUIZ, P. J. G.; CATALÁN, M. J.; CARRIL, J. M. F. Initial motor symptoms of Parkinson disease. **Neurologist**, v. 17, n. 6 SUPPL., p. 18–20, 2011.

SAMSON, M.; CLAASSEN, D. O. Neurodegeneration and the Cerebellum. **Neurodegenerative Diseases**, v. 17, n. 4–5, p. 155–165, 2017.

SANTOS, J. R. *et al.* Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 68–77, 2013.

SAUNDERS-PULLMAN, R. Estrogens and Parkinson disease: Neuroprotective, symptomatic, neither, or both? **Endocrine**, v. 21, n. 1, p. 81–87, 2003.

SCHRAG, A. *et al.* Caregiver-burden in parkinson's disease is closely associated with psychiatric symptoms, falls, and disability. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 12, n. 1, p. 35–41, 2006.

SCHWEDER, P. M. *et al.* Connectivity of the pedunculopontine nucleus in parkinsonian freezing of gait. **NeuroReport**, v. 21, n. 14, p. 914–916, 2010.

SEIDEL, K. *et al.* The brainstem pathologies of Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Brain Pathology**, v. 25, n. 2, p. 121–135, 2015.

SETHI, K. Levodopa unresponsive symptoms in Parkinson disease. **Movement Disorders**, v. 23, n. SUPPL. 3, p. 521–533, 2008.

SHAHMORADIAN, S. H. *et al.* Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 7, p. 1099–1109, 2019.

SHARPLES, S. A. *et al.* A dynamic role for dopamine receptors in the control of mammalian spinal networks. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–23, 2020.

SHOUSHTARIAN, M.; LITHGOW, B. The relationship between electrovestibulography and Parkinson's disease severity. **Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology - Proceedings**, p. 2377–2380, 2007.

SILVA, P. A. DA. Determinantes individuais e sociais do estado de saúde subjetivo e de bem-estar da população sênior de Portugal. **Cadernos de Saude Publica**, v. 30, n. 11, p. 2387–2400, 2014.

SIMON, D. K.; TANNER, C. M.; BRUNDIN, P. Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 1, p. 1–12, 2020.

SMITH, P. F. Vestibular Functions and Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 9, n. December, p. 1–13, 2018.

SONG, P.; CHEN, Y. Public policy response, aging in place, and big data platforms: Creating an effective collaborative system to cope with aging of the population. **BioScience Trends**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2015.

SPANG, C.; FORSGREN, S. Choline acetyltransferase and the nicotinic acetylcholine receptor AChR in experimental myositis. **International Immunopharmacology**, v. 29, n. 1, p. 189–194, 2015.

SPEED, N. K. The role of insulin signaling on dopamine transporter trafficking. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

SULWAY, S.; WHITNEY, S. L. Advances in vestibular rehabilitation. **Advances in Oto-Rhino-Laryngology**, v. 82, p. 164–169, 2019.

TIGHILET, B. *et al.* Peripheral vestibular plasticity vs central compensation: evidence and questions. **Journal of Neurology**, v. 266, n. 0123456789, p. 27–32, 2019.

TILLERSON, J. L. *et al.* Exercise induces behavioral recovery and attenuates neurochemical deficits in rodent models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 119, n. 3, p. 899–911, 2003.

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

TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017.

UC, E. Y. *et al.* Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **European Neurological Review**, v. 7, n. 1, p. 35–40, 2012.

VAISERMAN, A.; LUSHCHAK, O. **Geroscience**. [s.l: s.n.].

VITALE, F. *et al.* Cholinergic excitation from the pedunclopontine tegmental nucleus to the dentate nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 317, n. January, p. 12–22, 2016.

WELTER, M. L. *et al.* PPNa-DBS for gait and balance disorders in Parkinson's disease: a double-blind, randomised study. **Journal of Neurology**, v. 262, n. 6, p. 1515–1525, 2015.

WITZEMANN, V. Choline acetyltransferase. **xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference**, n. November, p. 1–5, 2007.

YANG, F. *et al.* Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. **Brain**, v. 138, n. 2, p. 269–275, 2015.

ZEIGELBOIM, B. S. *et al.* Vestibular rehabilitation: Clinical benefits to patients with Parkinson's disease. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 67, n. 2 A, p. 219–223, 2009.

ZESIEWICZ, T. A. Parkinson Disease. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 25, n. 4, p. 896–918, 2019.

ZHANG, L. *et al.* The Neural Basis of Postural Instability Gait Disorder Subtype of Parkinson's Disease: A PET and fMRI Study. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 360–367, 2016.

## ANEXO – Declaração do Comitê de Ética em pesquisa com animais

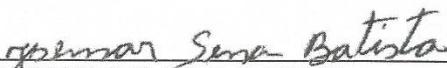


**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Mecanismos fisiológicos das alterações do equilíbrio em um modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina**”, registrada com o nº **74/2018**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de **30/04/2019**.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início:03/06/2019, Término 07/06/2021
Espécie/linhagem/raca	Rato Heterogênico
Nº de animais	126
Peso/Idade	350 a 500g / 6 a 9 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.

  
 Prof. Dr. JOSEMAR SENA BATISTA  
 Coordenador do CEPA/UFS

Cidade Universitária "Prof. Aloísio de Campos"  
 Jardim Rosa Elze – São Cristóvão – SE  
 49100-000  
 Fones: 3212 6661/6606