



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

JOÃO EDUARDO CONCEIÇÃO MELO

**INTERFERÊNCIA DA IDADE NA PROGRESSÃO DE PARKINSONISMO NO
MODELO DA RESERPINA EM RATOS**

**SÃO CRISTOVÃO – SE
2020**

JOÃO EDUARDO CONCEIÇÃO MELO

**INTERFERÊNCIA DA IDADE NA PROGRESSÃO DE PARKINSONISMO NO
MODELO DA RESERPINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Livia Cristina Rodrigues Ferreira Lins

SÃO CRISTOVÃO – SE

2020

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

M528i Melo, João Eduardo Conceição
Interferência da idade na progressão de parkinsonismo no modelo da reserpina em ratos / João Eduardo Conceição Melo ; orientador José Ronaldo dos Santos. – São Cristóvão, SE, 2020.
76 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2020.

1. Parkinson, Doença de. 2. Dopamina. 3. Envelhecimento. 4. Reserpina. 5. Modelos animais em pesquisa. I. Santos, José Ronaldo dos, orient. II. Título.

CDU 612.8:616.858

JOÃO EDUARDO CONCEIÇÃO MELO

**INTERFERÊNCIA DA IDADE NA PROGRESSÃO DE PARKINSONISMO NO
MODELO DA RESERPINA EM RATOS**

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

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Lívia Cristina Rodrigues Ferreira Lins

Prof. Dr. José Ronaldo Dos Santos
Presidente da banca

Profa. Dra. Sandra Lauton Santos
1º Examinador (Avaliador interno)

Prof. Dr. Luiz Felipe Souza da Silva
2º Examinador (Avaliador externo)

AGRADECIMENTOS

Neste momento, após meses de trabalho, venho agradecer a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada junto comigo.

Em primeiro lugar quero agradecer a Deus pelo dom da vida, pela minha saúde e pela minha alegria de viver, que me permitiu buscar meus objetivos sempre com um sorriso no rosto.

Quero agradecer também aos meus pais Germano e Evani por toda a dedicação em me ensinar o caminho certo a seguir, sempre me incentivando a estudar. Obrigado por todo o esforço em me criar para ser uma pessoa honesta e justa. Agradeço ainda aos meus irmãos Hugo e Lore e minha cunhada Ana pelo incentivo a avançar na carreira e pela torcida por minha vitória, além dos momentos de apoio ao longo de minha trajetória.

Agradeço também a minha amiga, parceira e esposa Renata. Agradeço por toda compreensão pelos momentos de ausência e estresse, e ainda pelo companheirismo. Obrigado pelo incentivo através das palavras: “vai dar tudo certo” e “você consegue” obrigado galega por todo apoio e amor.

Não posso esquecer também de agradecer a todos os meus tios e tias das famílias Melo e Conceição que sempre me incentivaram a estudar e alcançar novos patamares em busca de um futuro melhor.

Ao meu amigo, padrinho de casamento e orientador Dr. José Ronaldo dos Santos o “Big Boss”, agradeço pelos ensinamentos e “resenhas” ao longo desses 2 anos de mestrado. Obrigado por ser esse líder competente que motiva todos seus alunos apesar das dificuldades que enfrentamos. Por fim, obrigado por confiar em mim “chefe”.

A amiga e Coorientadora Dr^a.Lívia Cristina Rodrigues Ferreira Lins agradeço a parceria, a preocupação e incentivo durante todo o processo. Não posso esquecer também do professor Murilo e da professora Vanessa pela paciência, bom humor e ensinamentos nas disciplinas e reuniões do laboratório.

Sem dúvida alguma esse trabalho não poderia ter sido executado sem a ajuda de toda a equipe do LaNCE e LNFS, em especial Keiri (Katty) que tanto me ajudou no início dessa caminhada e que hoje além de amiga é também madrinha do meu casamento. Não posso deixar de agradecer também a Krysthinna (Thassya), Pikachu (Rodolfo) que me acompanhou desde a graduação e na iniciação científica, Heitor um grande amigo que posso contar sempre que preciso, dona Mila que no início, mesmo sem muita prática, se pôs a me ajudar e Wesley pela ajuda nas etapas do projeto que ocorriam em Itabaiana. Muito obrigado pela ajuda de vocês. Gostaria de abrir um parêntese e agradecer a Krysthinna por todas as conversas que tivemos nesse período do mestrado que nos tornou mais amigos que antes.

Não menos importante agradeço ao demais membros do grupo Auderlan, Marina, Rezende, Saruê (Thiago), Mylaine e Roberta, que sempre me auxiliaram em momentos de precisão, e em especial ao Marcos que sempre me ajudou prontamente, desde minha iniciação científica e ao Auderlan que muito me ajudou com conselhos certos e auxílio técnico. Agradeço a todos pela amizade e pela ajuda, sem a qual eu não conseguiria ter realizado a tarefa hoje cumprida.

Ao meu grande amigo Renivan, agradeço pelos conselhos e por partilhar momentos de alegria e de angústia comigo, sou eternamente grato por conhecer uma pessoa de bom coração como você.

Aos professores da banca PROASA, Profa. Josi, Profa. Sandra e Profa. Renata pelas contribuições e debates, buscando melhores resultados.

Ao PROCFIS e todo o corpo docente pelo conhecimento construído

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Profa. Sandra, Profa. Edênia e Prof Luiz Felipe, pela discussão, considerações feitas e pelo reconhecimento do trabalho desenvolvido, além de aceitarem prontamente o convite para fazerem parte de um momento tão importante em minha vida.

A Universidade Federal de Sergipe, por todo suporte ao longo deste período.

A CAPES, FAPITEC e CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

INTERFERÊNCIA DA IDADE NA PROGRESSÃO DE PARKINSONISMO NO MODELO DA RESERPINA EM RATOS, João Eduardo Conceição Melo, São Cristóvão, 2020.

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, sendo mais comum na população idosa. Estudos em modelos animais têm contribuído para a compreensão da fisiopatologia da doença. Apesar da DP estar relacionada ao envelhecimento, os modelos animais utilizados para as pesquisas científicas para investigar a progressividade da doença são animais jovens. Nesse sentido, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito da idade no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (RES) em ratos. Ratos machos, com idade de 6-8 (adulto) ou 18-24 (idoso) meses, foram divididos em 6 grupos: controle-idoso (CI) (n=7), reserpina-idoso (RI) (n=6), reserpina-idoso abstinência (RI-ABS) (n=6) controle-adulto (CA) (n=7), reserpina-adulto (RA) (n=6) e reserpina-adulto abstinência (RA-ABS) (n=6). Os animais receberam 15 injeções de RES (0,1 mg/kg) ou veículo em dias alternados, ao longo do experimento, foram submetidos a testes comportamentais: (1) teste de catalepsia, a cada 48 horas e (2) atividade geral no campo aberto, 24 horas após a 2 injeção e avaliação do peso, a cada 4 dias. No 30º dia após início do experimento, metade dos animais dos grupos RI e RA foram aleatoriamente selecionados e mortos, enquanto os animais restantes foram sacrificados no dia 60 (animais abstinência) e passaram pelos mesmos procedimentos citados. Nesse período a administração de RES foi suspensa. Os cérebros de todos os animais foram processados, seguindo procedimento padrão para Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH) na substância negra parte compacta (SNpc), estriado dorsal (STR) e área tegumentar ventral (ATV). Os animais RES apresentaram maior tempo na barra, no teste de catalepsia do dia 18 ($p=0,0010$) ao dia 42 ($p=0,0048$) para os animais RA comparados ao CA e do dia 12 ($p=0,0051$) ao dia 46 ($p=0,0050$) para os animais RI. Animais RI também apresentaram maior tempo de catalepsia comparado aos animais RA entre os dias 12 ($p=0,0399$) e o dia 36 ($p=0,0154$). A RES induziu perda de peso quando comparados a seus controles, para o grupo RA a diferença surgiu no dia 12 ($p=0,0249$) e permaneceu até o dia 48 ($p=0,0316$), para o grupo RI a diferença surgiu no dia 16 ($p=0,0365$) e permaneceu até o final do experimento no dia 60 ($p=0,0416$). No campo aberto não foi observado efeito da RES sobre os parâmetros avaliados. Animais dos grupos RA e RI apresentaram diminuição da marcação para TH na SNpc ($p=0,0009$ e $p=0,0032$, respectivamente) e STR ($p=0,0026$ e $p=0,0043$, respectivamente) quando comparados a seus respectivos controles. Na ATV, apenas os animais RA apresentaram diminuição da marcação para TH quando comparados ao CA ($p=0,0166$). A diminuição de TH não foi reversível na SNpc ($p=0,0161$) e STR ($p=0,0086$) para os animais do grupo RI. Desta forma, o estudo verificou maior efeito da RES sobre animais idosos em comparação aos adultos, visto que observamos um maior aumento no tempo de catalepsia naqueles, não recuperação do peso com o cessar da intervenção e não recuperação das concentrações de TH em áreas motoras nos animais idosos.

Palavras-chave: Dopamina; Doença de Parkinson; Modelos animais; Envelhecimento.

ABSTRACT

AGE INTERFERENCE IN PARKINSONISM PROGRESSION IN THE RESERPINE MODEL IN RATS, João Eduardo Conceição Melo, São Cristóvão, 2020.

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease in the world, being more common in the elderly population. Studies in animal models have contributed to the understanding the pathophysiology of this disease. Although PD is related to aging, but animal models used for scientific research to investigate the progression of the disease are young animals. In this sense, the aim of the study was to evaluate the effect of age on the model of parkinsonism induced by reserpine (RES) in rats. Male rats, aged 6-8 (adult) or 18-24 (elderly) months, were divided into 6 groups: control-elderly (CI) (n=7), reserpine-elderly (RI) (n=6), reserpine-elderly abstinence (RI-ABS) (n=6) control-adult (CA) (n=7), reserpine-adult (RA) (n=6) and reserpine-adult abstinence (RA-ABS) (n=6). The animals received 15 injections of RES (0.1 mg / kg) or vehicle on alternate days, throughout the experiment, were subjected to behavioral tests: (1) catalepsy test, every 48 hours and (2) general activity in the open field, 24 hours after the 2 injection and weight assessment, every 4 days. On the 30th day after the beginning of the experiment, half of the animals in the RI and RA groups were randomly selected and killed, while the remaining animals were sacrificed on the 60th (abstinence animals) and underwent the same procedures. During this period, the administration of RES was suspended. The brains of all animals were processed, following standard procedure for immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) in the substance nigra (SN), dorsal striatum (STR) and ventral tegumentar area (ATV). RES animals showed longer time in the bar, in the catalepsy test from day 18 ($p=0.0010$) to day 42 ($p=0.0048$) for RA animals compared to CA and day 12 ($p=0.0051$) on day 46 ($p=0.0050$) for the RI animals. RI animals also had a longer catalepsy time compared to RA animals between days 12 ($p=0.0399$) and day 36 ($p=0.0154$). RES induced weight loss when compared to its controls, for the RA group the difference appeared on day 12 ($p=0.0249$) and remained until day 48 ($p=0.0316$), for the RI group the difference appeared on day 16 ($p=0.0365$) and remained until the end of the experiment on day 60 ($p=0.0416$). In the open field, there was no effect of RES on the evaluated parameters. Animals in the RA and RI groups showed decreased markings for TH in SNpc ($p=0.0009$ and $p=0.0032$, respectively) and STR ($p=0.0026$ and $p=0.0043$, respectively) when compared to their respective controls. In the ATV, only the RA animals showed a decrease in TH marking when compared to the CA ($p=0.0166$). The decrease in TH was not reversible in SN ($p=0.0161$) and STR ($p=0.0086$) for animals in the RI group. Thus, the study found a greater effect of RES on elderly animals compared to adults, since we observed a greater increase in the time of catalepsy in those, non-recovery of weight with the cessation of the intervention and non-recovery of concentrations of TH in motor areas in elderly animals.

Keywords: Dopamine; Parkinson's disease; Animal models; Senescence .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeito da inibição da MAO	22
Figura 2: Via de biossíntese de dopamina	25
Figura 3: Via de biossíntese da dopamina em epinefrina	26
Figura 4: Tipos de receptores dopaminérgicos.....	28
Figura 5: Distribuição dopaminérgica no encéfalo.....	28
Figura 6: Via dopaminérgica nigroestriatal	30
Figura 7: Vias direta e indireta em pacientes saudáveis e acometido com DP	32
Figura 8: Mecanismo de ação da reserpina sobre os neurônios monoaminérgicos	34
Figura 9: Ilustração esquemática do delineamento experimental.....	39
Figura 10: Ilustração do teste de catalepsia.	40
Figura 11: Ilustração do Campo Aberto.....	41
Figura 12: Efeito da administração de reserpina sobre alterações motoras no comportamento de catalepsia em ratos adultos e idosos.....	47
Figura 13: Efeito da administração de reserpina sobre a atividade motora de animais adultos e idosos no CA.	48
Figura 14: Efeito da administração de reserpina sobre a alteração do peso em ratos adultos e idosos	49
Figura 15. Efeito da administração de reserpina sobre o número de células TH+ na SNpc (A) e VTA (B) de ratos adultos e idosos.	50
Figura 16. Efeito da administração de reserpina sobre a densidade óptica relativa no estriado dorsal em ratos adultos e idosos.....	51
Figura 17. Imagens representativas do número de neurônios TH+ na Substância Nigra parte compacta de animais adultos e idosos	52
Figura 18. Imagens representativas do número de neurônios TH+ na Área tegumentar ventral de animais adultos e idosos	53
Figura 19. Imagens representativas do número de neurônios TH+ do Estriado dorsal de animais adultos e idosos	54

LISTA DA QUADROS

Quadro 1: Categorização da progressão dos prejuízos motores da DP	15
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA - 6- hidroxidopamina
AADC - Aminoácido aromático descarboxilase
ANOVA - Análise de variância
ATV – Área tegmental ventral
CA – Controle adulto
CEPA - Comitê de ética em pesquisas com animais
CI – Controle idoso
CM - Córtex motor
COMT – Catecol-o-metiltransferase
DA - Dopamina
DAB - Diaminobenzidina
DOR - Densidade óptica relativa
DP - Doença de Parkinson
E.P.M. - Erro padrão da média
EPI - Epinefrina
ERO – Espécie reativa de oxigênio
STR – Estriado dorsal
FAH - Fenilalanina 4-hidroxilase
FD1 - Família de receptor dopaminérgico 1
FD2 - Família de receptor dopaminérgico 2
Gpe – Globo pálido externo
Gpi – Globo pálido interno
i.p. - Intraperitoneal
MAO – Monoamina oxidase
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
NE - Norepinefrina
NST – Núcleo subtalâmico
PFA - Paraformaldeido

RA– Reserpina adulto

RES – Reserpina

RES-ABS – Reserpina abstinência

RI– Reserpina idoso

SN – Substância negra

SNC – Sistema nervoso central

SNpc - Substância negra parte compacta

TAL – Tálamo

TDA - Transportador de dopamina

TF – Tampão fosfato

TFS – Tampão fosfato salina

TH - Tirosina hidroxilase

TVMA – Transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1	Doença de Parkinson	13
2.2	Fatores envolvidos com o desenvolvimento da DP.....	16
2.3	Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	19
2.4	A dopamina e a Doença de Parkinson.....	23
2.5	Modelos animais da doença de Parkinson	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MATERIAL E MÉTODO	36
4.1	Animais	36
4.2	Drogas.....	36
4.3	Procedimentos gerais.....	37
4.4	Delineamento experimental.....	37
4.5	Testes comportamentais.....	39
4.5.1	<i>Teste de catalepsia</i>	<i>39</i>
4.5.2	<i>Atividade geral em Campo Aberto.....</i>	<i>40</i>
4.6	Avaliação do peso.....	41
4.7	Perfusão dos animais.....	42
4.8	Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH)	43
4.9	Aquisição de imagens e contagem de células	43
4.10	Avaliação da Densitometria Óptica Relativa – DOR	44
4.11	Análise estatística	45
5	RESULTADOS	46
5.1	Comportamento de catalepsia	46
5.2	Atividade geral em campo aberto.....	47

5.3	Alterações de Peso	48
5.4	Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH)	49
6	DISCUSSÃO	55
7	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXO - Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais	76

1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da ciência e do conhecimento médico, as pessoas cada vez mais aumentaram sua taxa de sobrevivência. Contudo, esse acréscimo de tempo de vida, cria um novo perfil epidemiológico caracterizado pelo aumento da incidência de doenças relacionadas à idade. Nesse perfil, a população está mais suscetível a doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (DP).

A DP é uma das doenças neurodegenerativas mais comum no mundo, afetando, em média, 1% da população idosa. Ela apresenta perda neuronal de caráter crônico e progressivo e é caracterizada principalmente por alterações motoras. Entretanto, sintomas não motores também estão relacionados à DP e estudos recentes sugerem que esses prejuízos podem surgir antes mesmo das manifestações motoras.

Apesar de não se conhecer bem a etiologia da DP, na literatura são relatados alguns fatores que podem estar envolvidos no seu desenvolvimento. Os fatores mais apontados estão relacionados à idade, ao sexo, estresse oxidativo e neuroinflamação. Estes fatores, em geral, podem ocorrer de maneira combinada e ocasionar progressão mais acelerada da doença.

Nesse sentido, modelos animais de roedores têm sido amplamente utilizados, buscando gerar conhecimento acerca da fisiologia desta doença. Mas, apesar da DP estar relacionada ao envelhecimento, os animais usados nesses estudos são jovens, o que compromete a mimetização, por parte dos modelos, do que ocorre na doença em humanos. Um outro fator que merece destaque é o fato da maioria dos modelos disponíveis na literatura serem baseados em induções agudas das alterações motoras e neuronais, o que não mimetiza a natureza progressiva da DP.

Buscando estudar a progressividade da DP, nosso grupo de pesquisa há mais de 10 anos, tem investido esforços no desenvolvimento de um modelo de parkinsonismo induzido por administrações repetidas de baixas doses de reserpina. Esse modelo foi capaz de criar uma janela temporal que permite investigar os diferentes estágios da doença em animais, de maneira semelhante ao observado em humanos

Acreditamos que questões a respeito das alterações fisiológicas ainda não respondidas em modelos animais, como por exemplo aumento ou não na suscetibilidade a drogas de indução, podem estar relacionadas ao fato da utilização de animais mais jovens. Desta maneira, no presente estudo propomos associar a utilização de animais idosos em um modelo progressivo e já validado, para melhor compreender aspectos comportamentais e neuroquímicos associados a idade avançada e à progressividade da DP em ratos, no modelo da reserpina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doença de Parkinson

Com o aumento da expectativa de vida no mundo, cada vez mais pessoas são acometidas com enfermidades neurológicas e neuropsiquiátricas, que afetam não só o encéfalo, mas também a qualidade de vida dos mesmos (HANAMSAGAR; BILBO, 2016; LIU; FANG, 2019). De maneira específica, o tratamento de doenças que afetam o sistema nervoso central (SNC) tem sido um dos maiores desafios encontrados pela medicina na atualidade (DUARTE et al., 2016). Dentre as desordens neuronais mais importantes, relacionadas a idade avançada, pode-se destacar a Doença de Parkinson (DP).

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente no mundo (DIAZ-DIESTRA et al., 2017; DINIZ et al., 2019), atingindo cerca de 1% da população humana com idade acima de 60 anos (BOHUSH; NIEWIADOMSKA; FILIPEK, 2018) e em média 4% dos indivíduos acima de 80 anos de idade (LILL, 2020). A patologia apresenta degeneração progressiva (SANYAL et al., 2019) e apesar de ser foco de estudos no mundo inteiro, nenhuma cura efetiva foi encontrada (LIU; FANG, 2019).

Vale ressaltar que apesar da DP ser majoritariamente esporádica, 5% a 10% apresentam mutações nos genes *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, *PINK1*, *DJ-1* e *Parkin* associadas ao desenvolvimento da DP (LILL, 2020). Além disso, foi observado um padrão, no qual indivíduos do sexo masculino apresentam aproximadamente 2 vezes mais chances de desenvolver a patologia que os de sexo feminino (HOLMES et al., 2016). Além disso, Betancourt et al., (2016) relatou que homens tendem a desenvolver a doença mais cedo que mulheres e que neles os sintomas apresentam maior severidade.

No levantamento bibliográfico realizado por Abbas; Xu; Tan, (2018), os autores relataram que além dos motivos citados existem fatores étnicos relacionados a DP. Segundo eles, afro-americanos apresentam menor prevalência da DP em comparação a caucasianos sendo isso um possível indicador de maior susceptibilidade genética dos caucasianos. Além disso, os

autores relatam ainda que afro-americanos apresentam menor prevalência se comparados aos africanos na Nigéria, indicando que fatores ambientais também podem estar associados ao desenvolvimento da DP.

No Brasil a taxa de prevalência é de 3300 a cada 100000 indivíduos acima de 64 anos, sendo considerada uma das mais altas (RODRIGUES-DE-PAULA et al., 2018). O Brasil se encontra passando por uma transição demográfica rápida com aumento significativo da população idosa. Na década de 40 a população idosa representava 4,1% da população brasileira e em 2060 estima-se que esse valor será de 33,7%. Este aumento pode ser em resposta ao desenvolvimento social e econômico dos indivíduos (BOVOLENTA; FELICIO, 2017).

A DP foi descrita em 1817 por James Parkinson (RUA RAFAEL et al., 2016), contudo os primeiros relatos da doença foram realizados por Leonardo Da Vinci (1452-1519) (VELÁZQUEZ-PANIAGUA et al., 2016). Apesar de já ser conhecida, a DP passou a ser estudada e caracterizada na década de 80 pelo fisiologista francês Jean-Martin Charco.

A DP é bem conhecida pelos seus sintomas motores cardinais. Entretanto, a literatura já tem mostrado que também há ocorrência de sintomas não motores e que estes geralmente ocorrem antes da manifestação dos sinais motores (BETANCOURT et al., 2016).

Os principais sintomas motores da enfermidade que comumente são utilizados para diagnóstico são tremores, rigidez, lentidão dos movimentos voluntários (bradicinesia) (RECKZIEGEL et al., 2016; SMITH, 2018). Dentre estes, o tremor em repouso é o primeiro a se manifestar evoluindo para prejuízo de marcha (PERUMAL; SANKAR, 2016).

Os prejuízos motores da doença são progressivos, acompanhando o avanço da neurodegeneração. Velázquez-Paniagua et al. (2016) mostraram de forma resumida como se dá a progressão dos prejuízos motores em 5 categorias, apresentadas no quadro 1.

Quadro 1: Categorização da progressão dos prejuízos motores da DP [Adaptado de Velázquez-Paniagua et al. (2016)]

Categoria	Sintomas
1	Paciente com leve tremor unilateral, podendo apresentar má postura
2	Sintomas passam a ser bilaterais com rigidez no pescoço e costas levando a movimentos desajeitados
3	Paciente incapaz de andar em linha reta, movimentos se tornam lentos apresentando deficiência leve
4	Doença completamente desenvolvida, paciente pode andar sem ajuda mas não pode realizar atividades diárias sozinho
5	Paciente se encontra acamado ou em cadeira de rodas, neste ponto o paciente depende de outros para atividades diárias

Um outro sintoma motor bastante comum na DP, decorrente também da gradual neurodegeneração é a instabilidade postural (BENTEA; VERBRUGGEN; MASSIE, 2016; SANYAL et al., 2019) que resulta em dificuldade no caminhar, aumentando o risco de quedas e causando impacto negativo direto na qualidade de vida do paciente (YANG et al., 2016), sendo um dos sintomas mais debilitantes na DP (BEKKERS et al., 2018).

Abe et al. (2004) e Smith, (2018) relataram que essa perda de equilíbrio está relacionada a uma comunicação inadequada entre os sistemas vestibulares, visuais e proprioceptivos ocasionando desvio do centro de gravidade e incapacidade de realizar movimentos compensatórios para reestabelecer o equilíbrio, levando a queda. Isso reflete também no aumento do tempo do caminhar do paciente e na diminuição da amplitude do movimento (YOUNG et al., 2016).

Os pacientes com prejuízos no equilíbrio apresentam também incapacidade de produzir um “passo” eficaz que conseqüentemente leva a queda (GEERSE et al., 2018). Bekkers et al. (2018) relata que essa inabilidade de dar um passo efetivo é chamada “*Freezing of gait*”. Este é relatado como uma ausência de respostas dos pés no movimento de andar, apesar da intenção de se realizar esse movimento. Nesta situação o paciente inicia o movimento e seus

pés continuam imóveis, enquanto que seu tronco continua a deslocar seu centro de gravidade para frente, causando desequilíbrio e levando a queda.

No trabalho de Tighilet et al. (2019) é relatado que a integração, a nível central, dos sinais advindos dos sistemas visuais, vestibulares e proprioceptivos são fundamentais na manutenção da postura e do equilíbrio. Nos pacientes com DP a comunicação entre esses sistemas encontra-se precária causando o prejuízo motor (MORRIS et al., 2019)

Na doença, além dos sintomas motores mais característicos, os principais responsáveis por debilitar o paciente (MUSTAFA et al., 2016), há também a presença de sintomas não motores que são progressivos e diminuem a qualidade de vida dos indivíduos acometidos (FUJIOKA et al., 2016).

Os sintomas não motores apesar de serem relatados em fases mais tardias da doença, em geral se desenvolvem antes da manifestação dos sinais motores cardinais (BETANCOURT et al., 2016; COVA et al., 2016). Alguns desses sintomas são distúrbios do sono e olfatórios (DINIZ et al., 2019; SHIN et al., 2019).

Além desses sintomas, podem ocorrer ainda o desenvolvimento de complicações cognitivas e emocionais (ARBABI et al., 2016; BOHUSH; NIEWIADOMSKA; FILIPEK, 2018). Entre elas pode-se citar, déficit de aprendizagem (BEIGI et al., 2016), déficit de memória (BETANCOURT et al., 2016) e depressão (SMITH, 2018).

2.2 Fatores envolvidos no desenvolvimento da DP

Apesar de a DP se desenvolver predominantemente de maneira idiopática (HOLMES et al., 2016), sendo apenas 10% envolvida com fatores genéticos (RECKZIEGEL et al., 2016), existem alguns fatores que podem levar ao desenvolvimento da patologia. Eles podem ocorrer de forma isolada ou combinados ocasionando os distúrbios característicos da doença (BHATTACHARJEE et al., 2016; MARTIN-JIMÉNEZ et al., 2016; ELGUETA et al., 2017).

Um dos principais fatores de risco envolvido com o desenvolvimento da DP é a idade avançada (SHEPHARD et al., 2016). Cerca de 1% da população mundial acima dos 60 anos desenvolve a doença (IWAKI et al., 2019; WEI et al., 2016). Por esse motivo a patologia é majoritariamente dita como uma condição relacionada ao envelhecimento (BENTEA; VERBRUGGEN; MASSIE, 2016; LIU; FANG, 2019; MITRA et al., 2016).

O envelhecimento é acompanhado de perda de parte da capacidade do organismo de reparar e regenerar os tecidos (KHAN, SINGER e VAUGHAN, 2017). Pode ocorrer ainda diminuição da capacidade de manter o equilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio e quantidade de enzimas antioxidantes (HOLMES et al., 2016; XU et al., 2017).

Um outro fator envolvido com o desenvolvimento da DP é o sexo do paciente, apresentando dessa forma dimorfismo sexual, causado possivelmente pelas concentrações diferentes de hormônios sexuais. Os indivíduos do sexo masculino tem maior incidência e prevalência da doença se comparados aos do sexo feminino (DAHODWALA; PEI; SCHMIDT, 2016).

Gillies; McArthur, (2010) relataram que além da menor incidência de DP as mulheres, estas tendem a desenvolver a doença em idades mais tardias, além de apresentarem progressão sintomática mais lenta. De maneira interessante, Bispo et al. (2019) mostraram que essa diferença também ocorre em animais submetidos a modelos de Parkinsonismo, fato esse observado também por Melcangi et al. (2016).

Pode-se relatar ainda a associação entre a questão hormonal com a idade, visto que ao longo da vida adulta há constante diminuição hormonal com maior diminuição na velhice (DUARTE et al., 2016).

Contudo, os fatores em específico que ocasionam o dimorfismo sexual na DP ainda são poucos entendidos. Acredita-se que o estilo de vida e principalmente os hormônios sexuais, são determinantes para a suscetibilidade do indivíduo à doença (LOKE; HARLEY; LEE, 2015; NITKOWSKA et al., 2015).

O estresse oxidativo é uma anormalidade fisiológica definida como a perda do equilíbrio entre agentes antioxidantes e espécies reativas de oxigênio

(ERO), trazendo consequências fisiopatológicas (EGEA et al., 2017). Em altas concentrações, essas espécies oxidantes interagem com proteínas, lipídios e DNA causando danos e levando a morte celular (LIU; LIANG; SOONG, 2019), já em baixas concentrações agem como sinalizadores moleculares (EGEA et al., 2017).

Esse desequilíbrio pode ocorrer tanto pelo aumento da produção de EROs quanto por ineficiência dos sistemas antioxidantes (SCUTIERO et al., 2017). As espécies reativas são moléculas produzidas em condições aeróbicas como produto de processos metabólicos. Alguns exemplos de EROs são superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH), todos derivados do oxigênio molecular (O_2) (GAMBINO; CAPPITELLI, 2016).

Porém, é válido lembrar que apesar desse desequilíbrio ter potencial patológico, EROs são produzidas naturalmente no organismo através do metabolismo do oxigênio, além de serem mediadores inflamatórios podendo modular a proliferação celular. Como proteção contra o estresse oxidativo, existe um conjunto de enzimas antioxidantes, entre estas temos: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase, elas funcionam limitando a ação das EROs, inativando-as (SCUTIERO et al., 2017)

Outro fator que pode levar ao aumento do risco de desenvolvimento da DP é a inflamação, que é comumente observada em pacientes com DP e Alzheimer, tanto em modelos animais quanto em pacientes (LIU; LIANG; SOONG, 2019). No sistema nervoso central a inflamação está intimamente ligada a produção de EROs, visto que o aumento do estresse oxidativo está associado ao aumento da ativação do fator nuclear kB (NF-kB) e cicloxigenase 2 (COX2), sendo ambas vias clássicas de sinalização neuroinflamatória. Vale ressaltar que o aumento de COX2 já foi observado em encéfalos de pacientes com PD (HOLMES et al., 2016). Dessa forma, a inibição do estresse oxidativo e/ou da inflamação pode diminuir a velocidade de progressão da DP (XU et al., 2017).

Ainda sobre neuroinflamação, no encéfalo existem as células da glia, responsáveis por manter a homeostase no tecido nervoso. Dentre estas podemos destacar os astrócitos. Em caso de algum dano no encéfalo, os

astrócitos são ativados e passam a liberar citocinas pro-inflamatórias que contribuem para sobrevivência e reparação neuronal. Entretanto em casos onde há superativação dessa célula, como na neurodegeneração crônica, seus efeitos passam a ser maléficos, pois inibem o crescimento axonal e restauração da conexão sináptica (ACAZ-FONSECA et al., 2016).

Há relatos também que essa ativação exacerbada pode levar a alta expressão de alfa-sinucleína nos astrócitos, aumentando a morte neuronal e suscetibilidade a estresse oxidativo, podendo contribuir para a progressão da DP (DINIZ et al., 2019). Além disso, o próprio microambiente criado com alta concentração de citocinas e moléculas inflamatórias, passam a ser tóxicos para as células (MITRA et al., 2016). Como exemplo disso o óxido nítrico (molécula pro-inflamatória) em baixas concentrações suportam a função neuronal normal, mas em altas concentrações pode iniciar neurodegeneração (LIU; LIANG; SOONG, 2019).

Contudo, apesar do conhecimento acerca das alterações celulares e moleculares envolvidas com a neurodegeneração na DP, não há cura ou métodos que parem o avanço da enfermidade (LIU; FANG, 2019; VENDEROVA; PARK, 2012).

2.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

A DP é caracterizada pela morte de um grupo específico de neurônios chamados dopaminérgicos localizados principalmente nos núcleos da base, sendo denominados: Substancia Negra parte compacta (SNpc), estriado e globo pálido (YOUNG et al., 2016). Os neurônios são assim chamados pois produzem a dopamina, um neurotransmissor de fundamental importância no controle do movimento (DIAZ-DIESTRA et al., 2017).

Na patologia em questão, a neurodegeneração ocorre de maneira progressiva e principalmente na SNpc (MUSTAFA et al., 2016). Desta região, projeções dos corpos celulares se direcionam ao estriado (composto por núcleo caudado e putâmen), formando a via nigroestriatal, sendo esta uma das

principais responsáveis pelo controle do movimento (BENTEA; VERBRUGGEN; MASSIE, 2016).

A comunicação ineficiente entre essas duas áreas, em associação com a morte dos neurônios dopaminérgicos é o que ocasiona o surgimento dos sintomas motores mencionados (BOHUSH; NIEWIADOMSKA; FILIPEK, 2018).

Entretanto, vale ressaltar que estes sintomas surgem apenas em estágios avançados da doença, quando 60% a 70% da população de neurônios dopaminérgicos já foram perdidos e/ou quando há perda de 70% da dopamina no estriado, resultando em diminuição da síntese e da liberação de dopamina nos terminais axônicos localizados no estriado (DI GIOVANNI et al., 2016; PERUMAL; SANKAR, 2016; RECKZIEGEL et al., 2016).

Outra característica histopatológica da DP é a presença intracelular de aglomerados proteicos insolúveis, no citoplasma do neurônio, compostos principalmente por α -sinucleína, chamados de corpos de Lewy (BEART, 2016; SANYAL et al., 2019).

Estes agregados foram descobertos em 1998 e são encontrados em neurônios de múltiplas regiões do encéfalo, incluindo SNpc e Locus Coeruleus, regiões bastante afetadas na DP (DI GIOVANNI et al., 2016; VISANJI et al., 2016). Em complemento, estudos sugerem que a evolução sintomática da doença ocorre devido a distribuição desses corpos nos neurônios dopaminérgicos (CONNOR-ROBSON et al., 2016).

Por conta do envolvimento dos corpos de Lewy na DP, esta é agrupada junto a outras doenças relacionadas a presença dos agregados, chamadas sinucleopatias (SHIN et al., 2019). Essa característica, juntamente com a perda dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais são os principais marcadores da fisiopatologia da DP (BOHUSH; NIEWIADOMSKA; FILIPEK, 2018).

Possivelmente, ocorre esse acúmulo por conta do mal funcionamento do sistema ubiquitina-proteassoma, complexo de proteínas responsável por degradar proteínas intracelulares em células eucarióticas. Foi observado que em pacientes com DP, a ação desse complexo é diminuída na Substância Negra (BENTEA; VERBRUGGEN; MASSIE, 2016).

Como dito, as alterações nos neurônios dopaminérgicos são os fatores que causam os sintomas cardinais da DP. Contudo modificações relacionadas a perda do equilíbrio estão associadas também a deficiência em sistemas não catecolaminérgicos. Isso explica o porquê de alterações no equilíbrio não responderem de maneira satisfatória ao tratamento padrão da doença (CHRISTOFOLETTI et al., 2010).

Apesar de todo o conhecimento a respeito da fisiopatologia e seu desenvolvimento, até o momento não há tratamento que interrompa a progressão da perda neuronal (VENDEROVA; PARK, 2012). Além disso há dificuldade em se diagnosticar a DP em seus estágios iniciais. Dessa maneira, o reconhecimento é feito a partir dos sinais motores clássicos que surgem apenas quando a perda dopaminérgica é grande (PERUMAL; SANKAR, 2016).

O tratamento atual é basicamente sintomático e consiste basicamente em 3 abordagens: uso de inibidores da monoamina oxidase (MAO), uso de agonistas dopaminérgicos e administração do precursor da dopamina (WEI et al., 2016).

A MAO é a principal enzima metabolizadora de monoaminas, sendo responsável por oxidar a DA. A enzima é subdividida em 2 tipos (isoformas) MAOA e MAOB (TONG et al., 2017). A isoforma 'A' é predominantemente encontrada na placenta, intestino, neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. Já a isoforma 'B' é mais encontrada em plaquetas, células gliais e neurônios serotoninérgicos (RAMSAY; TIPTON, 2017).

O uso de drogas inibidoras da MAOB tem seu efeito terapêutico pois previne a oxidação da dopamina, ocasionando liberação de espécies reativas de oxigênio, que como conhecido, em altas concentrações apresentam efeito citotóxico. Dessa forma, pacientes com a DP se beneficiam do efeito do medicamento pois este permite que a DA tenha maior tempo de ação, possibilitando também o aumento do estoque do neurotransmissor (HERRAIZ; GUILLÉN, 2018) (**Figura 1**).

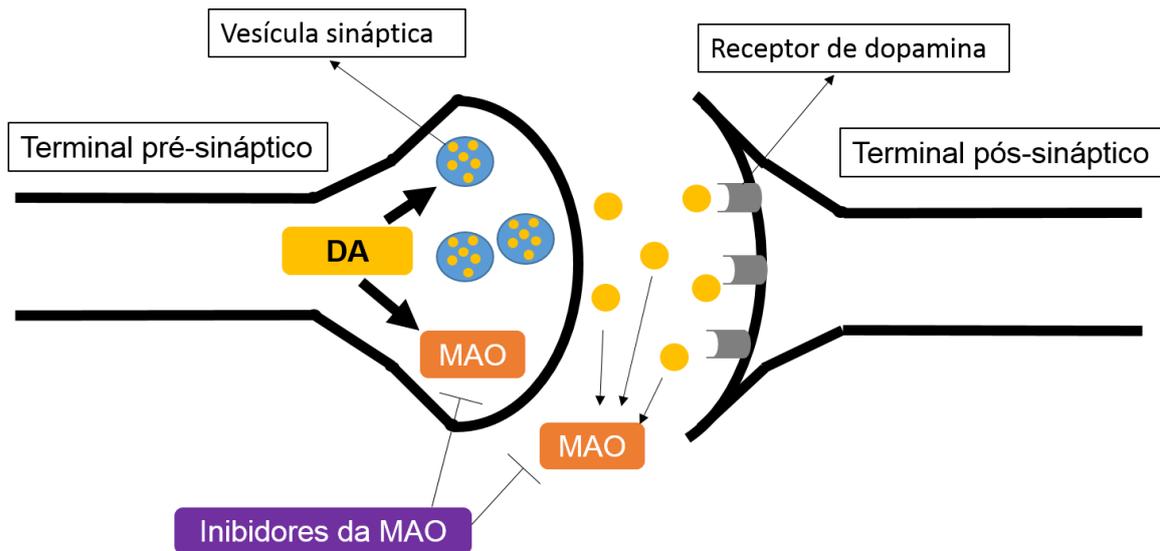


Figura 1: Efeito da inibição da monoamina oxidase sobre a quantidade de dopamina. MAO = monoamina oxidase; DA = dopamina [Adaptado de Youdim et al., (2006)]

A segunda manobra terapêutica foca em compensar a falta central de dopamina através do uso de agonistas desse neurotransmissor. Essas drogas agem no sistema nervoso central nos receptores dopaminérgicos e se ligam nestes de maneira semelhante a dopamina. Como exemplo destes medicamentos temos: Bromocriptina, Pergolide, Piribedil, Lisurida, Cabergolina, Pramipexol, Ropinirol, Rotigotina e Apomorfina (GRALL-BRONNEC et al., 2018).

Geralmente seu uso é indicado quando o paciente não tolera bem o uso de precursores dopaminérgicos ou quando a resposta obtida no tratamento foi abaixo do esperado, ou ainda, para evitar efeitos colaterais como ocorrido no trato gastrointestinal (WYLIE et al., 2012). Os agonistas podem ainda ser usados no início do tratamento como uma monoterapia, afim de evitar o uso precoce da L-DOPA (WOOD et al., 2015).

A terceira abordagem farmacológica de tratamento da DP é uso de um medicamento chamado Levodopa composto por L-DOPA, um precursor da dopamina, que permanece até os dias de hoje como tratamento padrão da DP (WYLIE et al., 2012). A droga ameniza os efeitos causados pela diminuição da DA nos núcleos da base, trazendo melhora nos sintomas parkinsonianos e na qualidade de vida dos pacientes acometidos (BEIGI et al., 2016).

A L-DOPA foi isolada primeiramente, a partir do vegetal *Vicia faba* em 1910 e sua estrutura química estabelecida em 1913 (CASSANI et al., 2016). Objetivando estabelecer a relação entre DP, DA e L-DOPA, foram realizados experimentos no modelo animal da reserpina na década de 50. Nestes, os animais tratados com L-DOPA apresentaram melhora motora, confirmando a hipótese do fármaco como precursor da DA e com possível efeito terapêutico no tratamento da DP (ARREOLA et al., 2016).

Nos humanos, apesar do alívio trazido ao paciente, o uso da droga deve ser bem controlado, pois o uso do medicamento em estágios muito iniciais da doença tendem a prejudicar redes neurais do estriado que são pouco afetados nesse estágio da doença (BEIGI et al., 2016; LITIM; MORISSETTE; DI PAOLO, 2016).

Além disso, a administração da L-DOPA por um longo tempo pode causar flutuações motoras e movimento involuntários anormais, também chamado discinesia induzida por L-DOPA (HUANG et al., 2018). Zhong et al., (2014) relataram que o tratamento com L-DOPA tem potencial de causar estresse oxidativo, devido ao fato da conversão do precursor a DA produzir espécies reativas de oxigênio que podem causar danos na população de neurônios dopaminérgicos remanescentes, podendo ainda exacerbar a perda neuronal. Os autores relatam ainda que os efeitos adversos começam a surgir iniciados 2 a 5 anos de tratamento.

Vale lembrar ainda, que com o passar do tempo o efeito da droga diminui, induzindo o aumento da dosagem da mesma, e por consequência piorando os efeitos colaterais citados.

2.4 A dopamina e a Doença de Parkinson

A dopamina (3-hidroxitramina ou 3,4-di-hidroxi-fenetilamina, $C_8H_{11}NO_2$), é uma catecolamina conhecida por sua função neurotransmissora (ARREOLA et al., 2016), foi identificada inicialmente no mesencéfalo a cerca de 50 anos e

acreditava-se ser apenas um precursor químico da norepinefrina (LOHR et al., 2017).

Os estudiosos da época estavam em parte corretos, visto que a DA é realmente o precursor dos neurotransmissores catecolaminérgicos norepinefrina e epinefrina, também chamados noradrenalina e adrenalina, respectivamente. Dessa forma alterações na concentração de DA alteram a produção das demais catecolaminas (FEINSTEIN; KALININ; BRAUN, 2016; LEVITE, 2016).

Este grupo é chamado de catecolamina por serem formados por um anel de benzeno, chamado catecol, conectado a um grupo amina por uma ponte etil (VELÁZQUEZ-PANIAGUA et al., 2016). Além disso, as catecolaminas são agrupadas ainda num conjunto maior chamado monoaminas que compreendem além das catecolaminas, a serotonina e a histamina (DI GIOVANNI et al., 2016; XIE et al., 2018; YAMANE, 2014).

Atualmente sabe-se que a DA é um dos mais importantes neurotransmissores do sistema nervoso humano envolvida com respostas comportamentais e funções cerebrais (DIAZ-DIESTRA et al., 2017), representando cerca de 80% do total de neurotransmissores catecolaminérgicos do encéfalo de mamíferos (ORENDAIN-JAIME; ORTEGA-IBARRA; LÓPEZ-PÉREZ, 2016).

Como mensageiro químico, a DA é um importante neurotransmissor que está envolvido em diversas atividades do sistema nervoso central, tais como regulação de movimentos e comportamentos, tomada de decisão e motivação-recompensa (DRAGICEVIC; SCHIEMANN; LISS, 2015; IKEMOTO; YANG; TAN, 2015; LIU et al., 2018).

As catecolaminas além de agir no sistema nervoso central, atuam também periféricamente como reguladora do sistema imune e está relacionada ainda à função de órgãos e tecidos como rim e tecido adiposo, além de modular a função cardíaca e a motilidade gastrointestinal (ARREOLA et al., 2016; VELÁZQUEZ-PANIAGUA et al., 2016).

A biossíntese da DA ocorre através de uma série de reações enzimáticas. A via clássica inicia-se com a produção de L-Tirosina a partir da L-

fenilalanina pela enzima fenilalanina 4-hidroxilase (FAH), o passo seguinte é referente a conversão de L-Tirosina em L-DOPA, sendo essa reação catalisada pela enzima Tirosina Hidroxilase (TH), vale ressaltar que este passo é vital para a biossíntese das demais monoaminas (NE e EPI) (ARREOLA et al., 2016) e a inibição de TH pode causar diminuição de todas as catecolaminas (TRESSEDER; JACKSON; JENNER, 2000).

A etapa seguinte consiste na transformação da L-DOPA em DA, realizada pela enzima DOPA descarboxilase (LOKE; HARLEY; LEE, 2015). É válido ressaltar que tanto TH quanto DOPA descarboxilase são reguladas por autoreceptores de DA que levam a diminuição dos níveis de DA intracelular quando a concentração no meio extracelular está elevada (MOSHAROV; BORGKVIST; SULZER, 2015) (**Figura 2**).

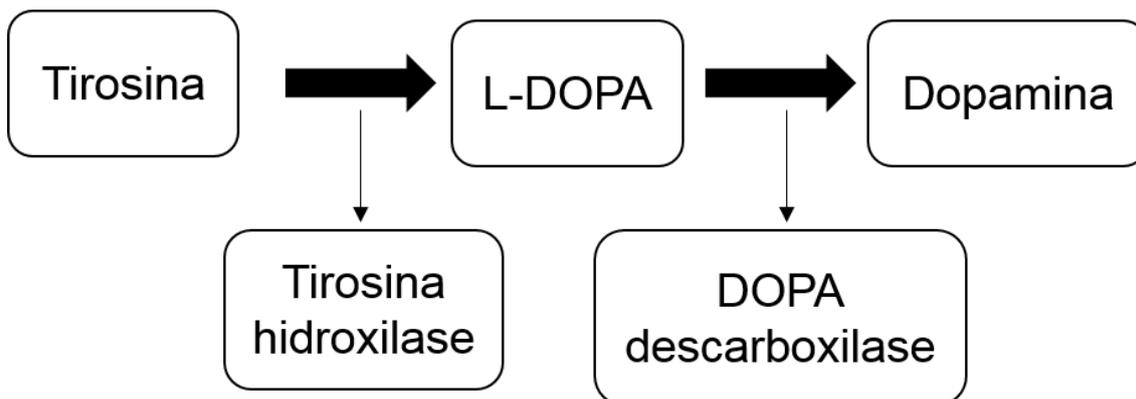


Figura 2: Via de biossíntese de dopamina [Adaptado de Arreola et al., (2016) e Loke; Harley; Lee, (2015)].

Nos neurônios dopaminérgicos a via se encerra neste ponto. Já em neurônios que secretam NE a DA é convertida pela enzima dopamina beta-hidroxilase, podendo ainda haver a conversão de NE em EPI pela feniletanolamina n-metil transferase (BEART, 2016) (**Figura 3**).

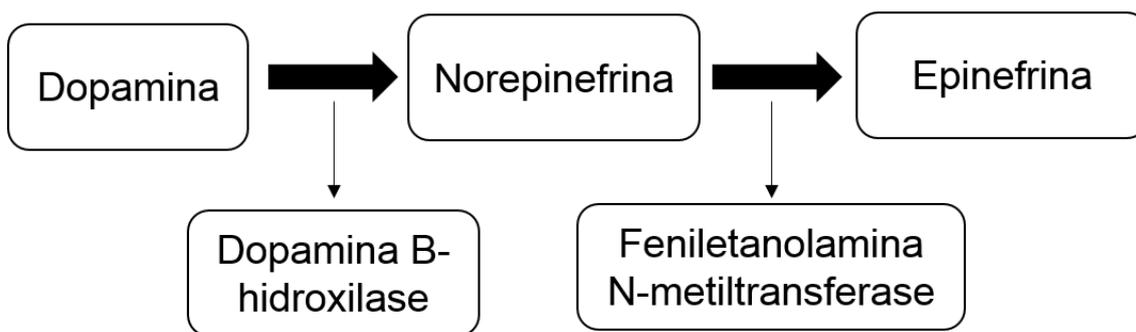


Figura 3: Via de biossíntese da dopamina em epinefrina [Adaptado de Beart, (2016)].

Uma vez sintetizada, todas as monoaminas são armazenadas em compartimentos chamados vesículas onde ficam retidas até o momento da sua liberação na fenda. No caso deste grupo de neurotransmissores, a principal vesicular de transporte é o TVMA (Transportador vesicular de monoamina) (DI GIOVANNI et al., 2016).

Essa vesícula, além de sua importância na liberação do neurotransmissor, atua também como ‘protetora’ da DA, visto que quando há a recaptação do sinalizador, este é capsulado pelo TVMA prevenindo a oxidação do mesmo e impedindo os danos causados pelas ERO liberadas durante a metabolização da DA. Além disso, a vesícula pode ainda capturar neurotoxinas protegendo os neurônios dessas moléculas (XU et al., 2016).

Essa característica é de suma importância nesse grupo de neurônios, visto que estes são particularmente vulneráveis a danos provenientes de estresse oxidativo devido a presença de pouca quantidade de enzimas antioxidantes (BHATTACHARJEE et al., 2016).

As moléculas de DA são produzidas no citoplasma e transportadas por vesículas que a armazenam e liberam. A maior parte do neurotransmissor é recaptado pelo transportador de dopamina (TDA). Esse transportador é o principal responsável pela remoção do excesso de dopamina extracelular trazendo-a de volta para o meio intracelular (RECKZIEGEL et al., 2016), encerrando assim a neurotransmissão dopaminérgica por conta dessa remoção do transmissor da fenda (CARTIER et al., 2019). Esse transportador tem papel fundamental da homeostase dopaminérgica do sistema nervoso central (XU et al., 2016).

O que não é capturado pelo TDA é degradado tanto na fenda sináptica, quanto no citoplasma do neurônio pelas enzimas MAO A e B e pela catecol o-metiltransferase (COMT) (RAMSAY; TIPTON, 2017). Vale lembrar que a MAO metaboliza não apenas a DA mas também a NE e EPI, além de serotonina (HERRAIZ; GUILLÉN, 2018).

A neurotransmissão é iniciada quando neurônios dopaminérgicos são estimulados por um potencial de ação, que leva a abertura de canais de cálcio. A partir disso ocorre o transporte do transmissor pelas vesículas e posteriormente fusão destas com a membrana celular do neurônio. Após a fusão o transmissor é liberado por exocitose. Esse processo é regulado por diversos fatores como síntese de DA, absorção e transporte da catecolamina, homeostase de Ca^{2+} (SULZER; CRAGG; RICE, 2016; VELÁZQUEZ-PANIAGUA et al., 2016).

Para desencadear seus efeitos na área alvo a dopamina se liga em receptores específicos (ORENDAIN-JAIME; ORTEGA-IBARRA; LÓPEZ-PÉREZ, 2016), estes podendo ser pós sinápticos localizados no neurônio seguinte da via ou autoreceptores (JACKOWSKA; KRYSINSKI, 2013).

Esses receptores são agrupados em 5 tipos D1, D2, D3, D4 e D5 (TRESSEDER; JACKSON; JENNER, 2000). Estes são agrupados ainda em 2 famílias: Família D1 (FD1), que compreende os subtipos D1 e D5; Família D2 (FD2), que compreende os subtipos D2, D3 e D4 (ERNST; LUCIANA, 2015). Ambos os grupos são receptores acoplados a proteína G. No entanto a FD1 são receptores excitatórios, enquanto que os da FD2 são inibitórios (PURVES-TYSON et al., 2017) e são a partir desses receptores que a dopamina desempenha suas funções (ORENDAIN-JAIME; ORTEGA-IBARRA; LÓPEZ-PÉREZ, 2016) (**Figura 4**).

Família do receptor	D1	D2
Tipo de Proteína G	-Gs e Gq -Aumento de AMPc -Hidrolise de fosfatidilinositol bifosfato	-Gi -Diminuição de AMPc
Subtipos	-D1 e D5	-D2, D3 e D4

Figura 4: Tipos de receptores dopaminérgicos [Adaptado de Ernst; Luciana, (2015) e Purves-Tyson et al., (2017)]

Como dito a DA é um neurotransmissor amplamente difundido no encéfalo e para alcançar as mais distintas regiões, os corpos celulares produtores de dopamina projetam seus axônios para as regiões alvo, onde ocorre a neurotransmissão. Essas vias são conhecidas como vias dopaminérgicas e são divididas em : 1) Via mesolímbica, 2) Via mesocortical, 3) Via tuberoinfundibular e 4) Via nigroestriatal, sendo responsáveis pela regulação de várias funções centrais (LOKE; HARLEY; LEE, 2015) (**Figura 5**).

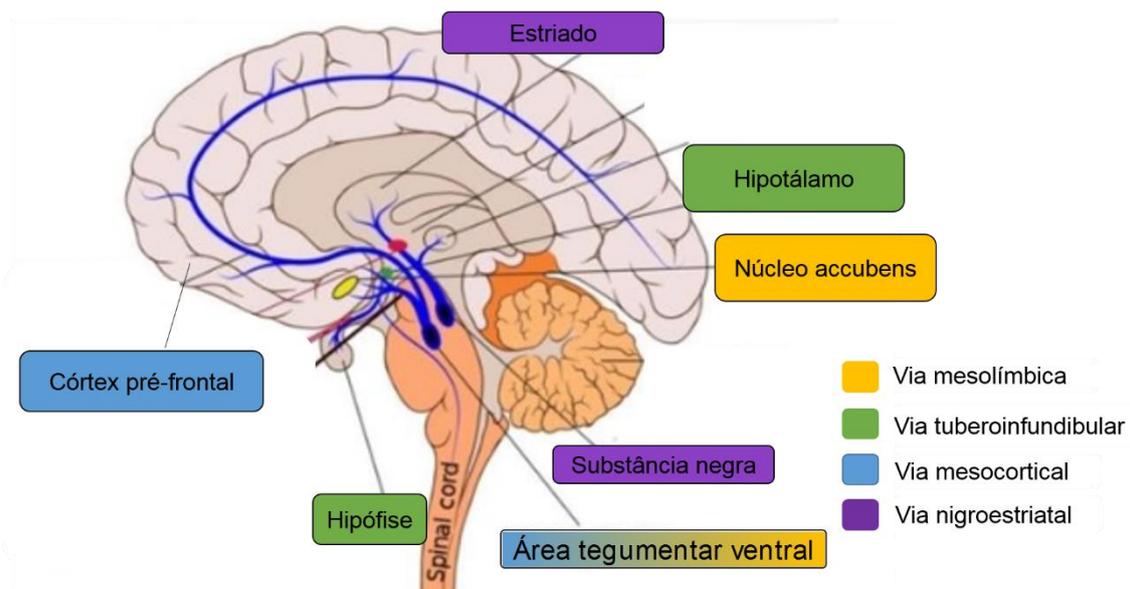


Figura 5: Vias de distribuição dopaminérgica no encéfalo [Adaptado Sayin, Umit. (2019)].

Na via mesolímbica os corpos dopaminérgicos, encontram-se na região ventro-tegmentar e se projetam para o núcleo accumbens. Essa via é responsável por regular comportamentos emocionais, sociais e associados a recompensa, motivação e alimentação. Na mesocortical os neurônios, encontram-se novamente na região ventro-tegmentar, porém nesta, eles projetam-se para o córtex pre-frontal e auxiliam na regulação da memória e cognição (ORENDAIN-JAIME; ORTEGA-IBARRA; LÓPEZ-PÉREZ, 2016).

Na via túbero infundibular, neurônios se originam no núcleo arqueado do hipotálamo e projetam-se através da eminência mediana até alcançar a hipófise, modulando a síntese de prolactina (BAIK, 2013; ERNST; LUCIANA, 2015).

A última via é chamada nigroestriatal que é uma das principais vias de controle do movimento, além de ser a mais afetada na DP (PADEL et al., 2016). Nesta via os núcleos produtores de dopamina são encontrados na SNpc e se projetam para o estriado, sendo as regiões com maiores níveis de DA do encéfalo (LIU et al., 2018; SCHULTZ, 2016). Além do controle do movimento, esta via está envolvida também com processos relacionados a motivação, memória de trabalho, atenção e aprendizado (LOHANI et al., 2018) (**Figura 6**).

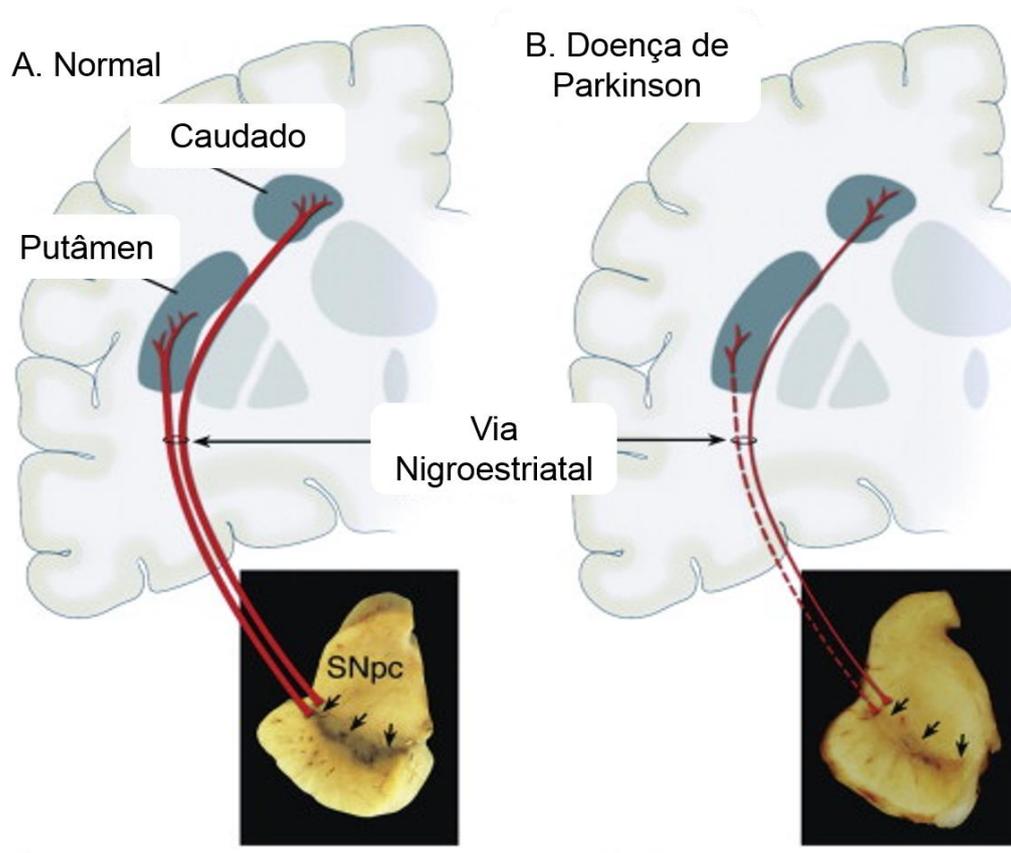


Figura 6: Esquema da via dopaminérgica nigroestriatal. As linhas em vermelho representam as projeções dos corpos celulares da substância negra (SNpc) para o estriado (formado pelo caudado e putâmen) [Dauer e Przedborski (2003)]

Na via em questão, a DA liberada no estriado se liga a receptores pós-sinápticos D1 e D2, permitindo a manutenção do equilíbrio e controle do movimento (VELÁZQUEZ-PANIAGUA et al., 2016). Ao se ligar nestes receptores o neurotransmissor estimula 2 vias distintas que se convergem chamadas de via 'direta' e 'indireta' e é através da modulação destas que o controle motor é realizado (MCCUTCHEON; ABI-DARGHAM; HOWES, 2019).

Na via direta a dopamina se liga a receptores do tipo D1, enquanto a que na via indireta se liga a receptores do tipo D2 (YAPO et al., 2017). Vale ressaltar que ambas populações de receptores são coativos quando a dopamina alcança o estriado (LINDAHL; HELLGREN KOTALESKI, 2016).

Na via direta quando os receptores D1 são estimulados e as células que possuem estes produzem gaba (neurotransmissor inibitório, em geral) que é liberado no globo pálido interno (GPi) e os neurônios daqui se comunicam com o tálamo (TAL), que por sua vez se conecta com o córtex motor (CM)

umentando a atividade motora. O GPi inibido pelos neurônios dopaminérgicos do estriado (visto que este produz gaba) não libera gaba no TAL, deixando-o ativo. Este por sua vez produz glutamato (neurotransmissor excitatório) e os libera no CM aumentando sua atividade (BAMFORD; WIGHTMAN; SULZER, 2018; MAIA; FRANK, 2017; PLANERT; BERGER; SILBERBERG, 2013) (**Figura 7**).

Já na via indireta os receptores D2 do estriado, estimulados pela dopamina faz que os neurônios desta área produzam gaba semelhante ao que ocorre na via direta. Porém nesta via a comunicação do estriado é feita com o globo pálido externo [(GPe), produtor de gaba], este se comunica com o núcleo subtalâmico [(NST), produtor de glutamato]. O NST então envia projeções para o GPi que transmite informações para o TAL e este com o CM, sendo estes 2 últimos passos semelhantes ao ocorrido na via direta. Com o GPe inibido pelo estriado, o NST permanece ativo e estimula (através do glutamato) o GPi. Este estimulado, produz gaba e o libera no TAL inibindo-o. Esta inibição faz que este não libere glutamato no CM, diminuindo assim a atividade motora (LINDROOS et al., 2018; MCCUTCHEON; ABI-DARGHAM; HOWES, 2019). Desta maneira a DA exerce efeito excitatório pela via direta e inibitório pela via indireta (PLANERT; BERGER; SILBERBERG, 2013) (**Figura 7**).

EM pacientes com a DP, as concentrações alteradas de DA, acarreta o efeito apostro. Há diminuição da ativação da via direta e uma superativação da via indireta, levando a diminuição do movimento (PLANERT; BERGER; SILBERBERG, 2013).

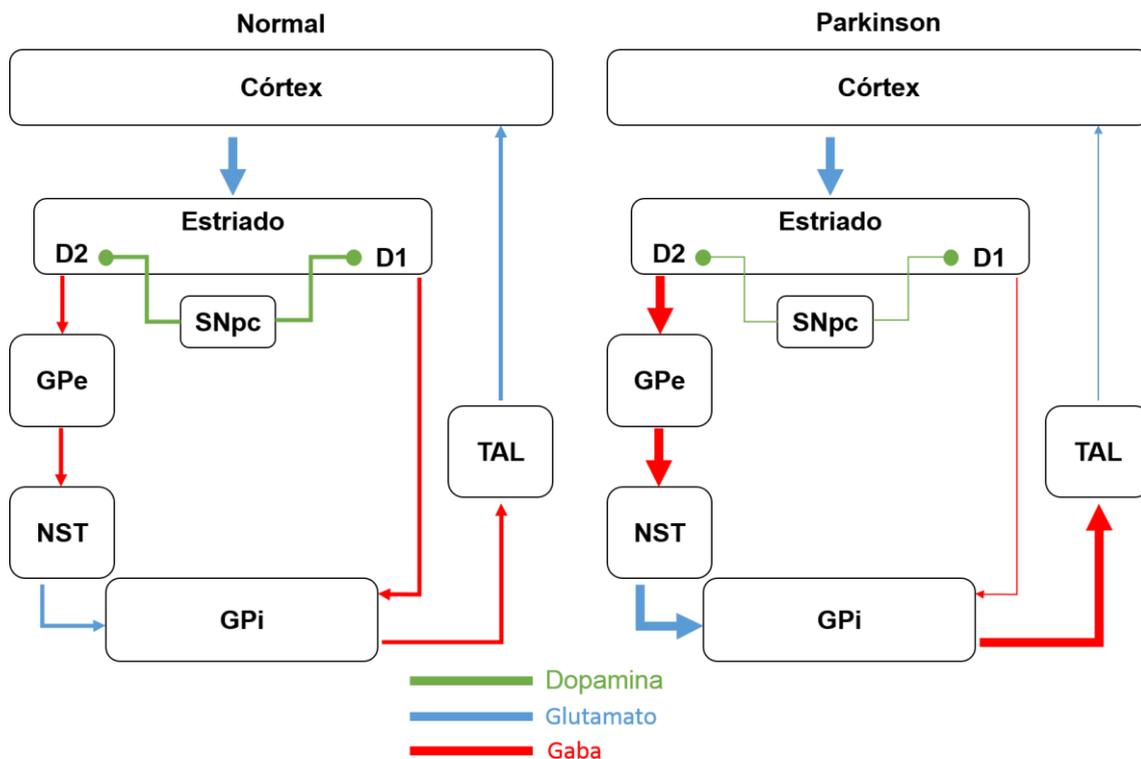


Figura 7: Esquemas das vias diretas e indiretas em pacientes saudáveis e acometido com doença de Parkinson. D1 = receptor dopaminérgico tipo D1, D2 = receptor dopaminérgico tipo D2, GPe = globo pálido externo, GPI = globo pálido interno, NST = núcleo subtalamico, TAL = tálamo, SNpc = substancia negra parte compacta [Adaptado de Pretegianni; Optican, (2017)].

2.5 Modelos animais da doença de Parkinson

Nos dias de hoje existem vários modelos experimentais da DP que são utilizados para melhor entender como se origina e se desenvolve a patologia (RECKZIEGEL et al., 2016). Com o avanço da ciência, os modelos mais recentes focam em super-expressão ou nocaute de genes que podem estar envolvidos com a DP, porém modelos mais clássicos, baseados na depleção da dopamina ainda possuem grande validade, principalmente na questão de acompanhar a progressão da doença semelhante ao observado em pacientes (LEÃO et al., 2015; VISANJI et al., 2016).

As descobertas realizadas em modelos animais têm servido como base no direcionamento de novas abordagens terapêuticas, formas de tentar intervir na progressão ou ‘simplesmente” melhorar o entendimento a respeito da DP (BENTEA; VERBRUGGEN; MASSIE, 2016; VISANJI et al., 2016).

O primeiro modelo experimental utilizado em pesquisas da DP foi descoberto pelo pesquisador Carlsson e sua equipe em 1957 (OBESO et al., 2017). Os estudiosos perceberam que seus pacientes hipertensos, após tratamento com reserpina (RES) começavam a exibir comportamentos semelhantes aos de pacientes com DP (FAHN, 2015). Além disso, perceberam que os sintomas eram revertidos após o tratamento com L-DOPA (ARREOLA et al., 2016; DUTY; JENNER, 2011).

A reserpina (RES) é um alcaloide, retirado das raízes da espécie *Rauwolfia serpentina*, conhecida principalmente na Índia por suas propriedades medicinais. Na década de 40 era usada como potente anti-hipertensivo, além de apresentar também propriedades calmante e depressora do SNC, principalmente sobre o sistema adrenérgico e dopaminérgico (PANDEY; RADHA; DEY, 2016). Por anos, a droga foi usada no tratamento contra transtornos mentais, como por exemplo esquizofrenia e paranoia. Contudo foi trocado por medicamentos menos tóxicos (KUMAR et al., 2016; NUR; ADAMS, 2016).

A relação da RES com os sintomas da DP ocorre devido a ela se ligar de maneira irreversível ao VMAT, inibindo a função desta proteína de envelopar a DA para que esta seja levada ao terminal sináptico para posterior liberação (NUR; ADAMS, 2016; YAFFE et al., 2016). Com o acúmulo da monoamina no meio intracelular, a mesma passa a ser degradada pela MAO, contudo essa degradação acarreta no aumento do estresse oxidativo (DI GIOVANNI et al., 2016). Isso acarreta em menos DA circulando, o que posteriormente levará ao aparecimento gradativo das alterações motoras como ocorre na DP.

Lee et al., (2015) relataram que o tratamento com RES é capaz de diminuir a quantidade de TH na substância negra, que por sua vez ocasiona a diminuição da DA. Além disso, estudos tem mostrado os efeitos da reserpina sobre o sistema dopaminérgico, incluindo déficits motores e não motores, a exemplo depressão e ansiedade, semelhante ao que ocorre na DP (FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2015; SANTOS et al., 2013). Por esses motivos a RES mimetiza bem a progressão patológica da DP (DUTY; JENNER, 2011) (**Figura 8**).

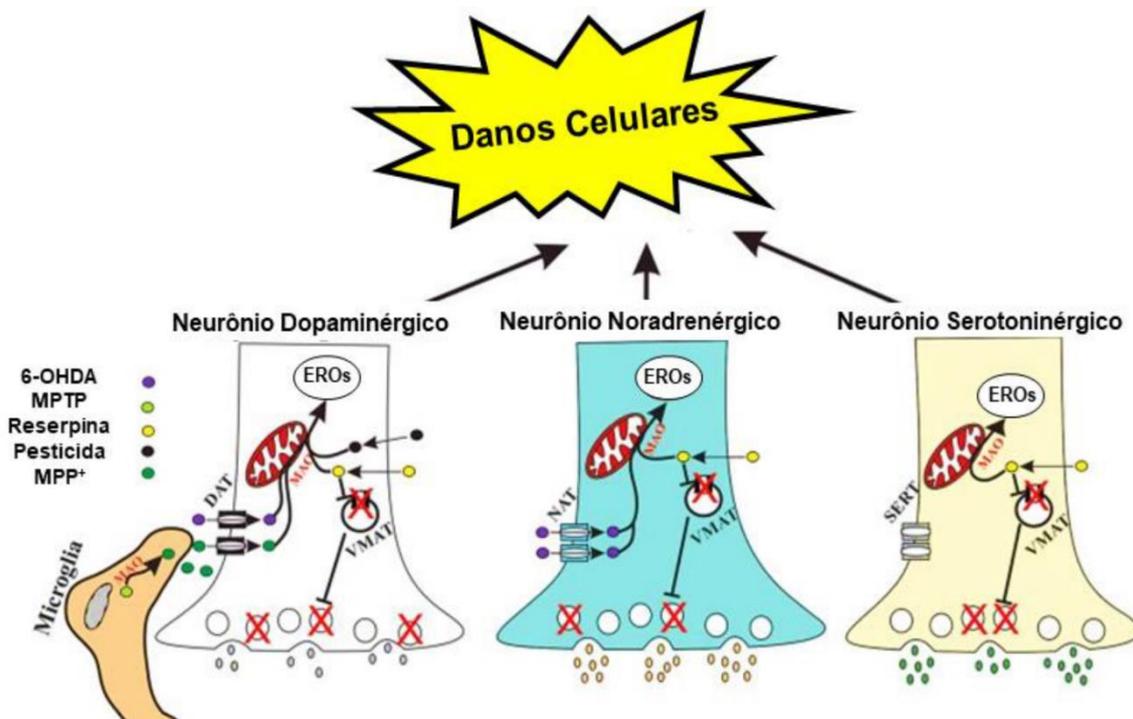


Figura 8: Mecanismo de ação da reserpina sobre os neurônios monoaminérgicos. EROs = espécie reativa de oxigênio, VMAT = transportador vesicular de monoaminas, DAT = transportador de dopamina, NAT = transportador de noradrenalina, SERT = transportador de serotonina [Leal et al. (2016)].

Contudo, os efeitos da reserpina sobre a neurodegeneração dopaminérgica ainda não são completamente compreendidos (RECKZIEGEL et al., 2016). Porém, o modelo é bastante válido para se estudar mecanismos específicos que ocorrem na doença e de bastante relevância para estudos de intervenções neuroprotetoras (EL-GHAZALY et al., 2015; LEAL et al., 2016).

Além disso, a maioria dos trabalhos realizados com roedores em modelos animais da DP, utilizam animais muito jovens ou adultos. Entretanto a doença de Parkinson é uma patologia que como dito atinge majoritariamente indivíduos de idade avançada, desta maneira o uso de animais idosos talvez seja o mais adequado para se estudar a evolução da doença. Desta forma se faz necessário o estudo para verificar se a idade dos animais é um fator determinando no desenvolver do modelo em questão.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Interferência da idade na progressão de parkinsonismo no modelo da reserpina em ratos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a progressividade das alterações motoras de animais idosos em um modelo de parkinsonismo induzido por reserpina;
- Examinar a suscetibilidade de animais idosos sobre a perda de peso causada pela administração de reserpina;
- Avaliar a susceptibilidade dos animais idosos aos efeitos deletérios da reserpina na quantidade de TH na substância negra, estriado e área tegumentar ventral;
- Avaliar a reversão das alterações motoras, na concentração de TH e no peso após a interrupção do tratamento com reserpina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Foram utilizados 36 animais da espécie *Rattus norvegicus* heterogênicos da linhagem Wistar machos, pesando entre 300 e 500 gramas com 6 a 8 meses (n=18) e 18 a 24 meses de idade (n=18), sendo estes provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS). A idade dos animais considerados idosos, foram baseadas em estudos prévios, a citar Norrara et al., (2018) e Zaman et al., (2008).

Os animais foram mantidos no biotério alojados em gaiolas (33 x 40 x 17 cm), com 3 a 4 animais por gaiola. Os animais foram mantidos sob ventilação e temperatura controladas ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e comida.

Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela lei brasileira para o uso de animais em pesquisas nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca) e Resolução Normativa CONCEA 26/2016. 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 82/2018 (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%; Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União), Cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União) e Reserpina (RES) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 99,95%.

4.3 Procedimentos Gerais

Os animais foram submetidos a um período de 5 minutos de manipulação, diariamente, durante 5 dias antes do início dos experimentos. A finalidade desse procedimento foi habituá-los ao toque e à presença do experimentador.

Todos os experimentos foram realizados, preferencialmente, no mesmo horário (12:00 – 16:00 p.m.). Entre as sessões nos testes comportamentais os aparelhos foram limpos com uma solução de etanol a 10% para evitar possíveis pistas de odores deixadas por outro animal. Os parâmetros comportamentais do teste de campo aberto foram quantificados por um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, EUA).

A RES (pureza 99,95%) foi preparada da seguinte forma: Inicialmente foi pesado 0,05g de reserpina que foi dissolvida em 50 µL de ácido acético glacial e em seguida diluída em 50 mL água destilada. A solução controle consistiu no mesmo volume de ácido acético e água como na solução de reserpina, sendo 50 µL de ácido acético em 50 mL da solução.

4.4 Delineamento Experimental

Os 36 ratos utilizados foram divididos inicialmente em 2 grupos idosos e adultos e estes foram subdivididos em animais controle e animais reserpina. Dessa forma, obtivemos ao total 6 grupos com 6 animais por grupo: CONTROLE-IDOSO (CI) (n=6), RESERPINA-IDOSO (RI) (n=6), RESERPINA-IDOSO ABSTINENCIA (RI-ABS) (n=6) CONTROLE-ADULTO (CA) (n=6) e RESERPINA-ADULTO (RA) (n=6), RESERPINA-ADULTO ABSTINENCIA (RA-ABS) (n=6).

O termo ABS é referente a abstinência, visto que os animais desse grupo pararam de receber injeções de reserpina do dia 30 ao dia 60 do experimento. Todos os animais receberam 15 injeções (via subcutânea) de reserpina (0,1 mg/kg) ou veículo administradas a cada 48 horas por 30 dias. No trigésimo dia,

os animais dos grupos RI e RA foram eutanasiados por perfusão intracardíaca. Já os animais dos grupos CI e CA, juntamente com os animais RI-ABS e RA-ABS continuaram no protocolo experimental por mais 30 dias.

No sexagésimo dia, os animais dos grupos CI, RI-ABS, CA, RA-ABS foram eutanasiados da mesma maneira mencionada. No decorrer dos dias, 0 ao 60, os animais foram pesados a cada 4 dias afim de obter controle do peso dos mesmos e para fins de ajuste de volume de administração. Após a perfusão, os encéfalos dos animais foram removidos e utilizados em análises imunohistoquímicas para tirosina hidroxilase.

Objetivando facilitar o entendimento dos resultados, tantos os animais reserpina que foram sacrificados no dia 30 (RES) quanto os do dia 60 (RES-ABS), estão nomeados como RES apenas, visto que até o dia 30 tanto os animais RES quanto os RES-ABS receberam exatamente o mesmo tratamento sob o mesmo protocolo. Além disso, as análises dos dados foram realizadas em dois blocos, dia 0 ao 30 e 32 ao 60, mas para melhor visualização dos resultados, os dois gráficos foram unidos numa única imagem. Essa manobra foi realizada afim de evitar poluir a apresentação dos dados obtidos, porém isso foi realizado apenas nas avaliações comportamentais.

Ao longo do experimento, todos os animais, adultos e idosos, foram submetidos as seguintes avaliações comportamentais: Teste de catalepsia, realizado a cada 48 horas e atividade geral do campo aberto, realizado 24 horas após a administração da segunda injeção de reserpina ou veículo, o desenho experimental pode ser observado na **Figura 9**.

O teste de atividade geral no campo aberto foi realizado numa fase inicial da administração de reserpina com o intuito de verificar se os animais de idade avançada apresentam resultado alterados em comparação com animais mais jovens. Vale ressaltar que estudos anteriores em animais adultos mostram que no mesmo período, os animais tratados com reserpina não apresentam diferenças do controle, entretanto um dos objetivos do presente estudo é justamente ver se os animais idosos diferem dos mais jovens nas tarefas realizadas.

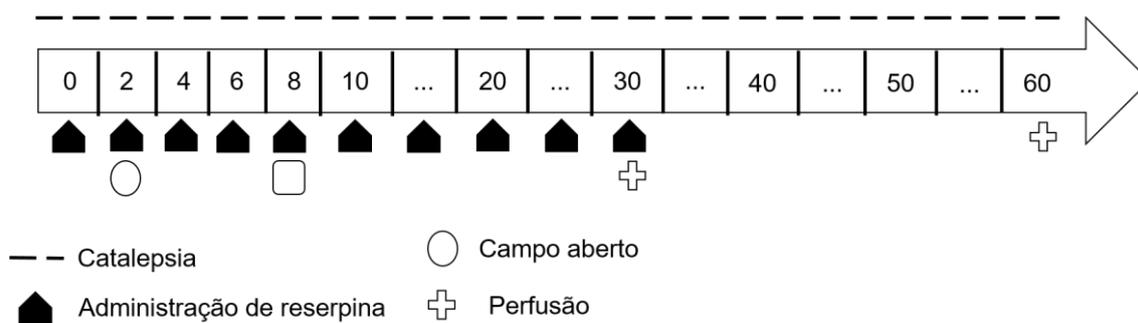


Figura 9: Ilustração esquemática do delineamento experimental.

4.5 Testes Comportamentais

4.5.1 Teste de Catalepsia

A catalepsia é definida como um estado comportamental caracterizado por ausência de movimento e rigidez muscular que pode ser induzido experimentalmente por uma depleção de dopamina, que ocorre após o tratamento com reserpina (GERLACH; RIEDERER, 1996). O comportamento de catalepsia foi avaliado a cada 48 horas, colocando-se o animal com ambas as patas dianteiras sobre uma barra horizontal de vidro elevada a 9,0 cm da superfície de apoio das patas traseiras (**Figura 10**). O tempo de permanência nesta posição foi considerado como medida da catalepsia e foi mensurada a latência para o animal realizar um movimento de retirada da pata dianteira da barra ou movimento da mesma pata para ajuste de postura. Os animais foram submetidos três vezes consecutivas ao aparato até um limite de 180 segundos e para cada dia foi realizado um média do tempo durante as três tentativas (SANTOS, 2013).

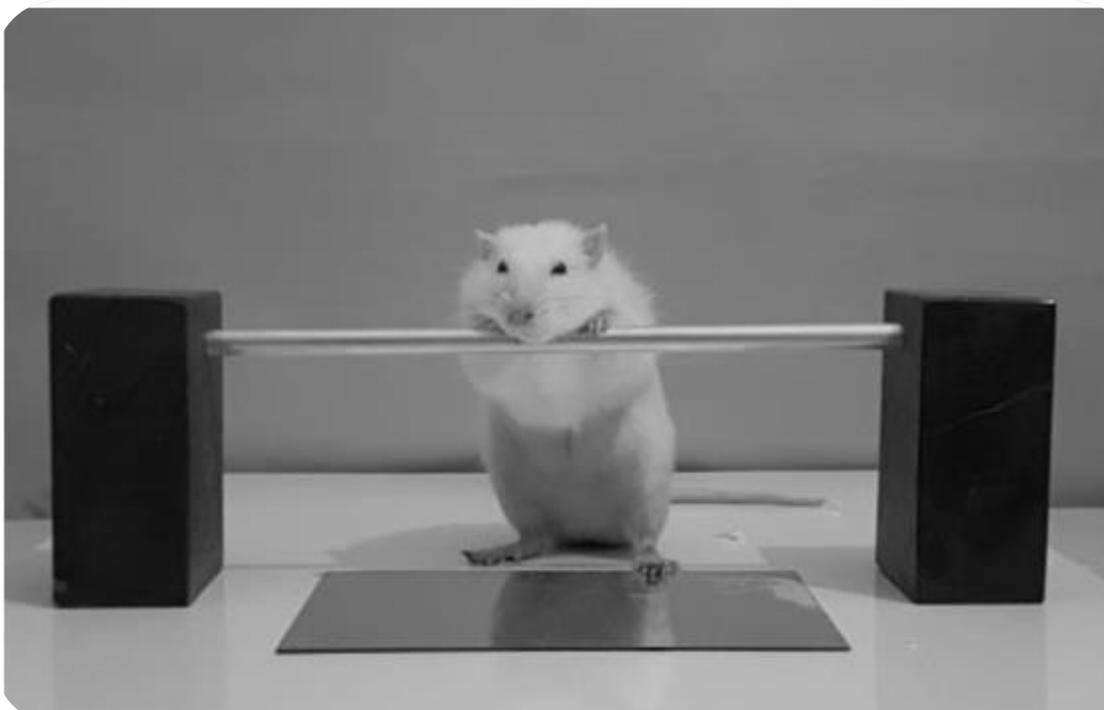


Figura 10: Ilustração do aparato usado para a realização do teste de catalepsia (Fonte: produção própria).

4.5.2 Atividade Geral em Campo Aberto

O campo aberto é um teste utilizado para avaliar o comportamento locomotor e exploratório dos animais, podendo ainda ser utilizado para análises de comportamento do tipo medo/ansiedade. A estrutura do campo aberto é feita com uma caixa d'água de acrílico, de interior pintado de preto, para aumentar o contraste e favorecer o reconhecimento do animal pelo programa, e com dimensões de 80 cm de diâmetro e 40 cm de altura (**Figura 11**). Os animais foram colocados no centro do aparato e permaneceram nele 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, EUA). Os seguintes parâmetros foram avaliados: 1- Distância total percorrida, 2 – Distância percorrida na zona central, 3 – Tempo gasto na zona central e 4- Número de eventos de rearing, o rearing é um comportamento, no qual o animal se apoia nas patas traseiras e eleva seu corpo para realizar um movimento de

exploração vertical. Cada animal foi avaliado individualmente e o aparato limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes (SANTOS et al, 2013).

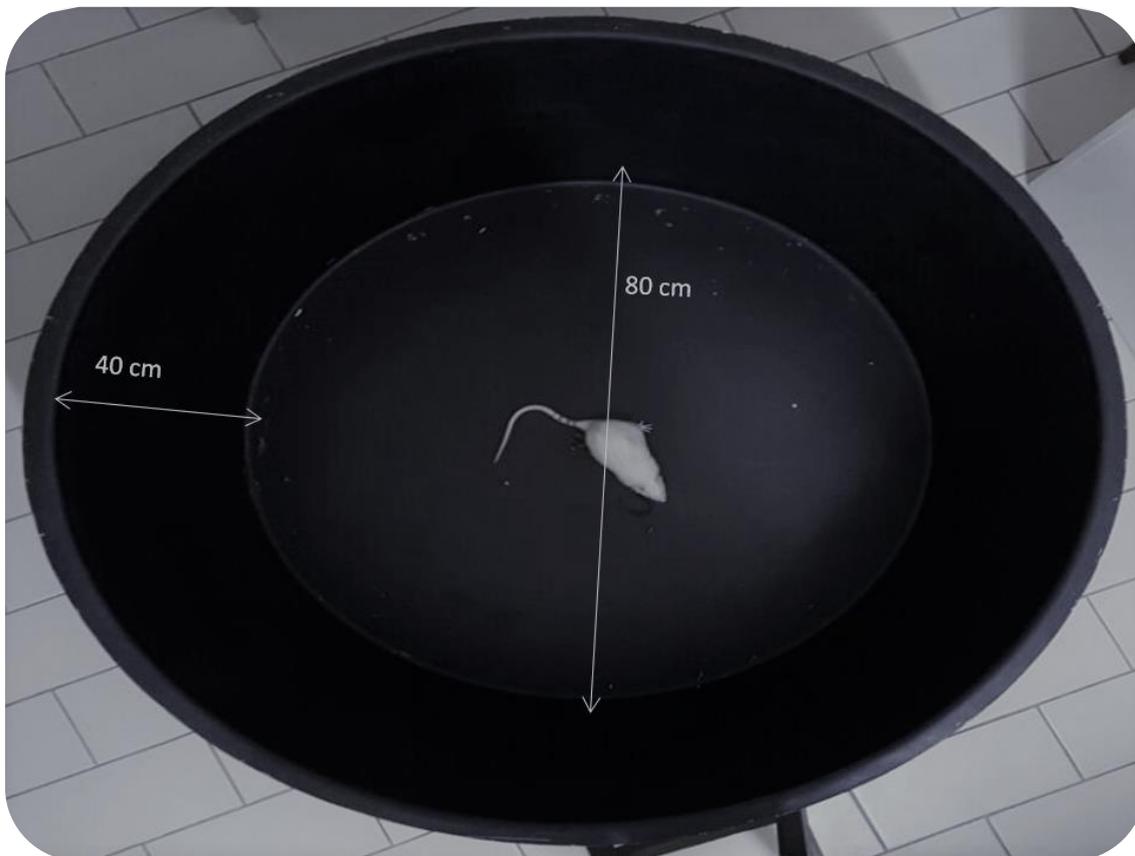


Figura 11: Ilustração do aparato usado para a realização do Campo Aberto (Fonte: produção própria).

4.6 Avaliação do Peso

Ao longo do experimento foram realizadas medidas do peso dos animais a cada quatro dias. Essa medição teve a finalidade de acompanhar alterações do peso referente a administração de reserpina, além de ser o padrão utilizado para ajuste de volume administrado no decorrer do trabalho.

Para a obtenção do valor de peso perdido em porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de peso} = (PA/PB) \times 100$$

Onde PA é referente ao peso atual e PB é o peso basal, ambos em gramas.

4.7 Perfusão dos Animais

Ao final dos testes comportamentais realizados nos 30^o e 60^o dias, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado foi realizado um acesso a cavidade torácica seccionando-se a pele e partes moles.

Ao se expor a cavidade abdominal foi feita uma incisão no diafragma para exposição do coração. Os animais foram perfundidos de forma intracardiaca com tampão fosfato salina (TFS; pH 7,2-7,4) para a lavagem dos vasos, por 5 minutos, e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (pH 7,4; 100 mM), por 10 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e mergulhados em PFA a 4%, a 4°C, por 24 horas. Em seguida, os encéfalos foram crioprotetidos por 48 horas 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 perfurocortantes foram armazenados em caixas de perfurocortantes 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 5 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos correspondeu a 1 de 5 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.

4.8 Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH)

A bateria de imuno-histoquímica consistiu nos seguintes passos: 1) lavagem dos tecidos em tampão fosfato (TF) 0,1 M, pH 7,4, quatro vezes, por cinco minutos cada; 2) lavagem dos tecidos em TF + água oxigenada (H_2O_2), para bloqueio da peroxidase endógena, por vinte minutos; 3) repetição do procedimento 1; 4) lavagem do material em leite desnatado, para bloqueio de ligações inespecíficas, durante quinze minutos; 5) encubação dos tecidos no anticorpo primário monoclonal anti-TH produzido em coelho (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, U.S.A); diluído em Triton-X 100 e mantidos overnight (de 12 horas a 18 horas) em agitador automático; 6) repetição do procedimento 1; 7) incubação dos tecidos no anticorpo secundário biotiniliado anti-anticorpo primário para TH (anti-coelho produzido em cabra, Sigma Chemical Company, concentração de 1:1000, diluído em Triton-X 100 e mantido sob agitação automática por duas horas; 8) repetição do procedimento 1; 9) incubação do material no ABC (Complexo Avidina-Biotina, ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, EUA concentração de (1:1000), diluído em Triton-X 100 0,4% + NaCl 0,9%, e mantido no agitador por duas horas; 10) repetição do procedimento 1; 11) revelação do material por meio de lavagens dos tecidos em uma solução de Diaminobenzidina (DAB) + H_2O_2 ; 12); repetição do procedimento 1; 13) montagem do tecido em lâminas gelatinizadas.

Após a montagem, o material foi reidratado, intensificado em tetróxido de ósmio 0,1% e submetido a uma bateria de desidratação em álcool e xilol. As lâminas foram cobertas com meio de montagem e fixação de uma lamínula.

Todos os procedimentos acerca da realização da perfusão e da imunohistoquímica, foram feitos seguindo protocolos realizados nos trabalhos de Bispo et al., (2019) e Lins et al., (2018).

4.9 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., EUA).

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 marcadas nos tecidos. A contagem de células 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.

As áreas analisadas foram a SNpc e a área tegumentar ventral. Todas as células marcadas para TH 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.

4.10 Avaliação da Densitometria Óptica Relativa – DOR

Para a análise da DOR, as imagens foram obtidas em um mesmo momento, submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho e contraste, uma vez que os valores em pixels encontrados em cada imagem correspondem a uma intensidade maior ou menor de marcação de determinada substância no tecido analisado. A área analisada nessa avaliação foi Estriado Dorsal e todas as imagens foram analisadas no programa Image J (versão 1.46i, NIH).

Cada animal foi representado por 4 imagens consecutivas para cada área. Na mesma imagem também foi selecionado um campo de igual tamanho em uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação de TH no tecido. O número médio de pixels calculados nos três campos de interesse foi subtraído do número de pixels da área controle no mesmo tecido. Assim como na contagem de células, os valores para cada animal foram normalizados pela

média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle de cada etapa.

4.11 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 e alteração do peso foi utilizada a ANOVA de 2 vias de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Fisher's. No teste do campo aberto e Imunohistoquímica para TH foi utilizada a ANOVA de 2 vias, seguida do pós-teste de Fisher's. 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 significativas. As análises foram realizadas com a utilização do software *Graphpad Prism 6.0*.

5 RESULTADOS

5.1 Comportamento de catalepsia

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(15, 510)=31,59, p<0,0001$], tratamento [$F(3, 34)=20,45, p<0,0001$] e interação tempo x tratamento [$F(45, 510)=8,022, p<0,0001$] para o bloco de 0 a 30 dias (**Figura 12**). Assim como efeito do tempo (dias de tratamento) [$F(14, 322) = 10,50, p<0,0001$], tratamento [$F(3, 23)=6,960, p=0,0017$] e interação tempo x tratamento [$F(42, 322)=4,072, p<0,0001$] para o bloco de 32 a 60 dias (**Figura 12**).

O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que do 12° ao 46° dia o grupo RES-IDOSO (RI) apresentou aumento do tempo de catalepsia quando comparado ao grupo CTR-IDOSO (CI) ($p_{12}=0,0051$; $p_{14}=0,0007$; $p_{16}=0,0010$; $p_{18}<0,0001$; $p_{20}<0,0001$; $p_{22}<0,0001$; $p_{24}<0,0001$; $p_{26}<0,0001$; $p_{28}<0,0001$ e $p_{30}<0,0001$; $p_{32}<0,0001$; $p_{34}<0,0001$; $p_{36}<0,0001$; $p_{38}=0,0005$; $p_{40}=0,0037$; $p_{42}=0,0402$ $p_{46}=0,0050$).

Do 18° ao 42° dia, o grupo RES-ADULTO (RA) permaneceu mais tempo na barra quando comparado ao CTR-ADULTO (CA) ($p_{18}=0,0010$; $p_{20}=0,0033$; $p_{22}<0,0001$; $p_{24}<0,0001$; $p_{26}<0,0001$; $p_{28}<0,0001$ e $p_{30}<0,0001$; $p_{32}<0,0001$; $p_{34}=0,0327$; $p_{36}=0,0315$; $p_{38}=0,0126$; $p_{40}=0,0344$; $p_{42}=0,0048$).

Já do 12° ao 36° dia, os animais do grupo RI apresentaram maior latência para início do primeiro movimento quando comparados ao grupo RA ($p_{12}=0,0399$; $p_{14}=0,0041$; $p_{16}=0,0207$; $p_{18}=0,0021$; $p_{20}=0,0001$; $p_{22}<0,0001$; $p_{24}=0,0009$; $p_{26}=0,0001$; $p_{28}<0,0001$ e $p_{30}<0,0001$; $p_{32}=0,0029$; $p_{34}<0,0119$; $p_{36}=0,0154$), como pode ser observado na **figura 12**.

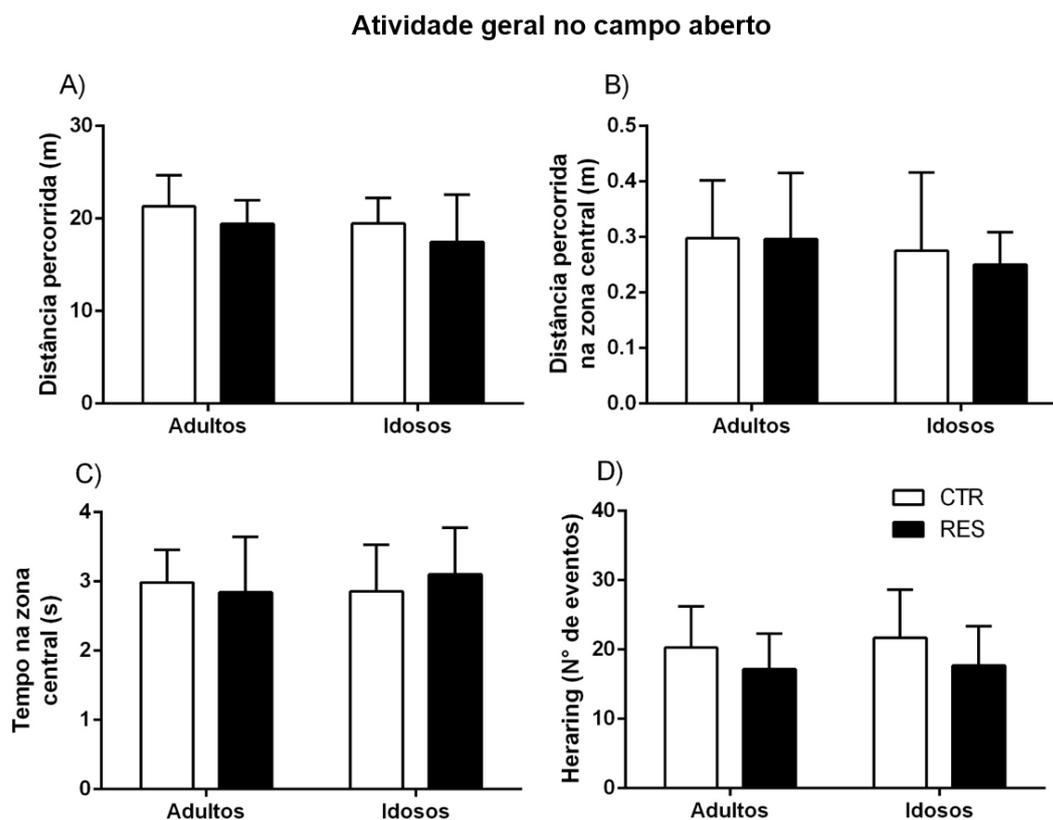


Figura 13: Efeito da administração de reserpina (0,1 mg/kg) sobre a atividade motora de animais adultos e idosos no campo aberto. Em A - distância total percorrida; B – distância percorrida na zona; C – tempo na zona central e D- número de eventos de rearing. Não houve efeito da reserpina sobre os parâmetros acima citados. Os valores são expressos como média \pm E.P.M.

5.3 Alterações de Peso

A ANOVA de duas vias de medidas repetidas mostra efeito da interação (tempo \times tratamento/idade) [$F(18, 204)=2,357, p=0,0021$], tempo [$F(6, 204)=4,620, p=0,0002$] e tratamento/idade [$F(3, 34)=5,075, p=0,0052$] para o bloco de 0 a 30 no peso dos animais.

Para o bloco de 32 a 60, ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito da interação (tempo \times tratamento/idade) [$F(21, 147)=4,072, p<0,0001$], tempo [$F(7, 147)=6,400, p<0,0001$] e tratamento/idade [$F(3, 21)=5,270, p=0,0072$].

O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que do 12° ao 48° dia, o grupo RA apresentou diminuição no peso corporal se comparado ao grupo CA ($p_{12} =$

0,0249; p16= 0,0084; p20= 0,0031; p24= 0,0006; p28< 0,0001; p32= 0,0003; p36< 0,0001; p40< 0,0001; p44= 0,0145 p48= 0,0316). Do 16° ao 52° e no 60° dia o grupo RI apresentou diminuição do peso corporal se comparado ao CI (p16= 0,0365; p20= 0,0147; p24= 0,0041; p28= 0,0098; p32= 0,0073; p36= 0,0035; p40= 0,0032; p44= 0,0150 p48= 0,0357; p52= 0,0434, p60= 0,0416) (figura 14).

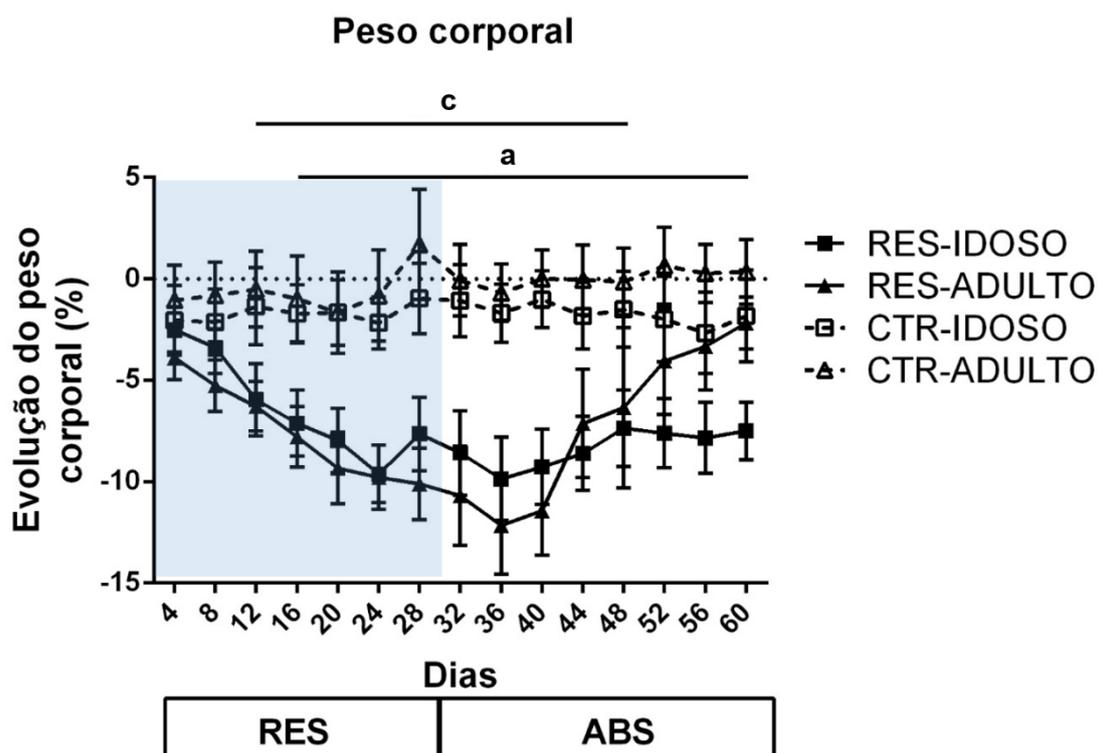


Figura 14: Efeito da administração de reserpina (0,1 mg/kg) sobre a alteração do peso em ratos adultos e idosos. pA < 0,05, comparando RI x CI, pC < 0,05, comparando RA x CA. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Fisher's).

5.4 Imunohistoquímica para tirosina hidroxilase (TH)

Para o número de neurônios TH positivos (TH⁺) na SNpc, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da interação [(idade x tratamento) F(2, 12)=1,161, P=0,3461]}, porém mostrou efeito da idade [F(1, 12) = 41,34, p<0,0001] e do tratamento [F(2, 12)=10,36, p=0,0024] (figura 15). O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que os animais dos grupos RA e RI apresentaram diminuição no número

de neurônios TH⁺ quando comparados a seus respectivos controles ($p=0,0009$ e $p=0,0032$, respectivamente). Foi observado ainda, que o grupo RI apresentou menores níveis de TH quando comparado ao grupo RA-ABS ($p=0,0313$). Além disso, foi observado diminuição de TH no grupo RI-ABS quando comparados ao CI ($p=0,0093$).

Em relação ao número de neurônios TH positivos (TH⁺) em VTA, a ANOVA de duas vias não revelou efeito da interação {(idade x tratamento) $F(2, 12)=0,7343$, $p=0,5002$ }, nem da idade [$F(1, 12)=4,484$, $p=0,0558$], mas mostrou efeito do tratamento [$F(2, 12)=3,955$, $p=0,0479$] (**Figura 15**). O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que os animais RA apresentaram diminuição da marcação para TH quando comparados ao CA ($p=0,0166$).

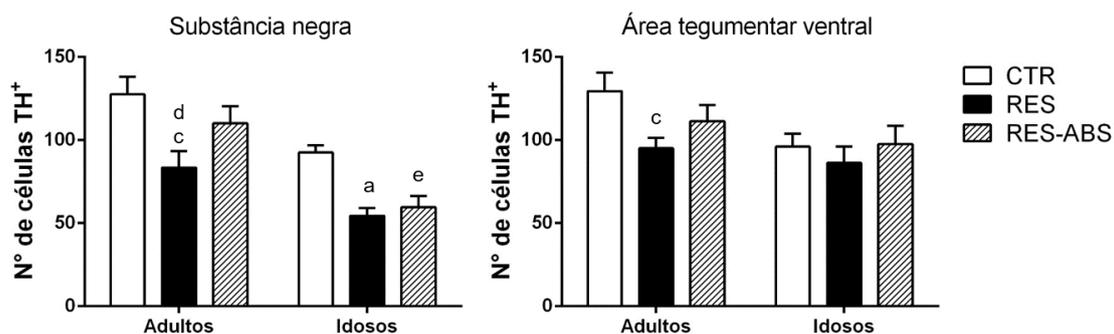


Figura 15. Efeito da administração de reserpina (0,1 mg/kg) sobre o número de células TH⁺ na SNpc (A) e VTA (B) de ratos adultos e idosos. $p_a < 0,05$, comparando RI x CI, $p_c < 0,05$, comparando RA x CA, $p_d < 0,05$, comparando RA x RA-ABS, $p_e < 0,05$, comparando RI-ABS x CI. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Fisher's).

Para a análise da densidade óptica relativa no estriado dorsal, a ANOVA de duas vias revelou que não houve efeito na interação {[interação (idade x tratamento) $F(2, 8)=1,905$, $p=0,2106$]}, mas houve efeito da idade [$F(1, 4)=55,07$, $p=0,0018$] e do tratamento [$F(2, 8)=18,46$, $p=0,0010$] (**figura 16**). O pós-teste de Fisher's LSD mostrou que os animais dos grupos RA e RI apresentaram diminuição na densidade óptica relativa quando comparados a seus respectivos controles ($p=0,0026$ e $p=0,0043$, respectivamente). Foi observado também, que o grupo RA apresentou diminuição da DOR quando

comparado ao grupo RA-ABS ($p=0,0086$). Além disso, foi observado diminuição de TH no grupo RI-ABS quando comparados ao CI ($p=0,0161$).

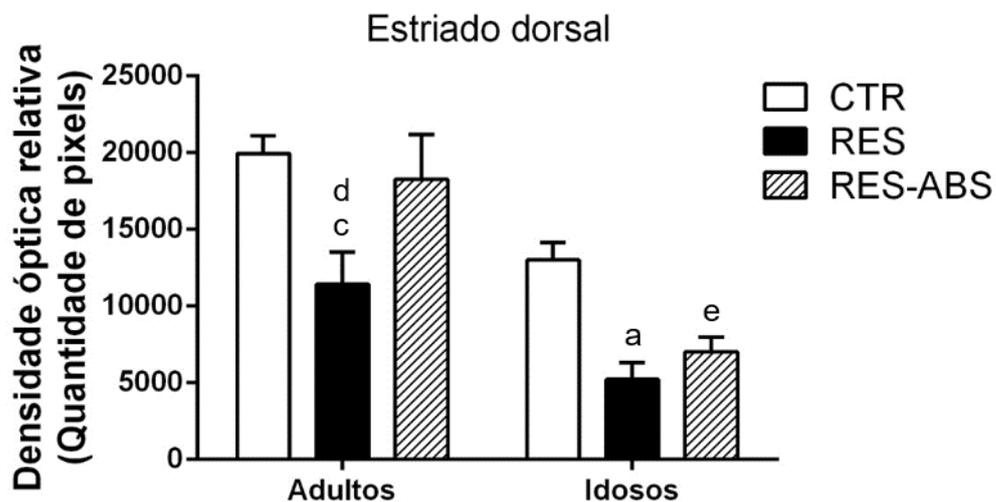


Figura 16. Efeito da administração de reserpina (0,1 mg/kg) sobre a densidade óptica relativa no estriado dorsal em ratos adultos e idosos. $p_a < 0,05$, comparando RES idoso x CTR idoso, $p_c < 0,05$, comparando RES adulto x CTR adulto, $p_d < 0,05$, comparando RES adulto x RES-ABS adulto, $p_e < 0,05$, comparando RES-ABS idoso x CTR idoso. Os valores são expressos como média \pm E.P.M. (ANOVA de duas vias seguido do pós-teste de Fisher's).

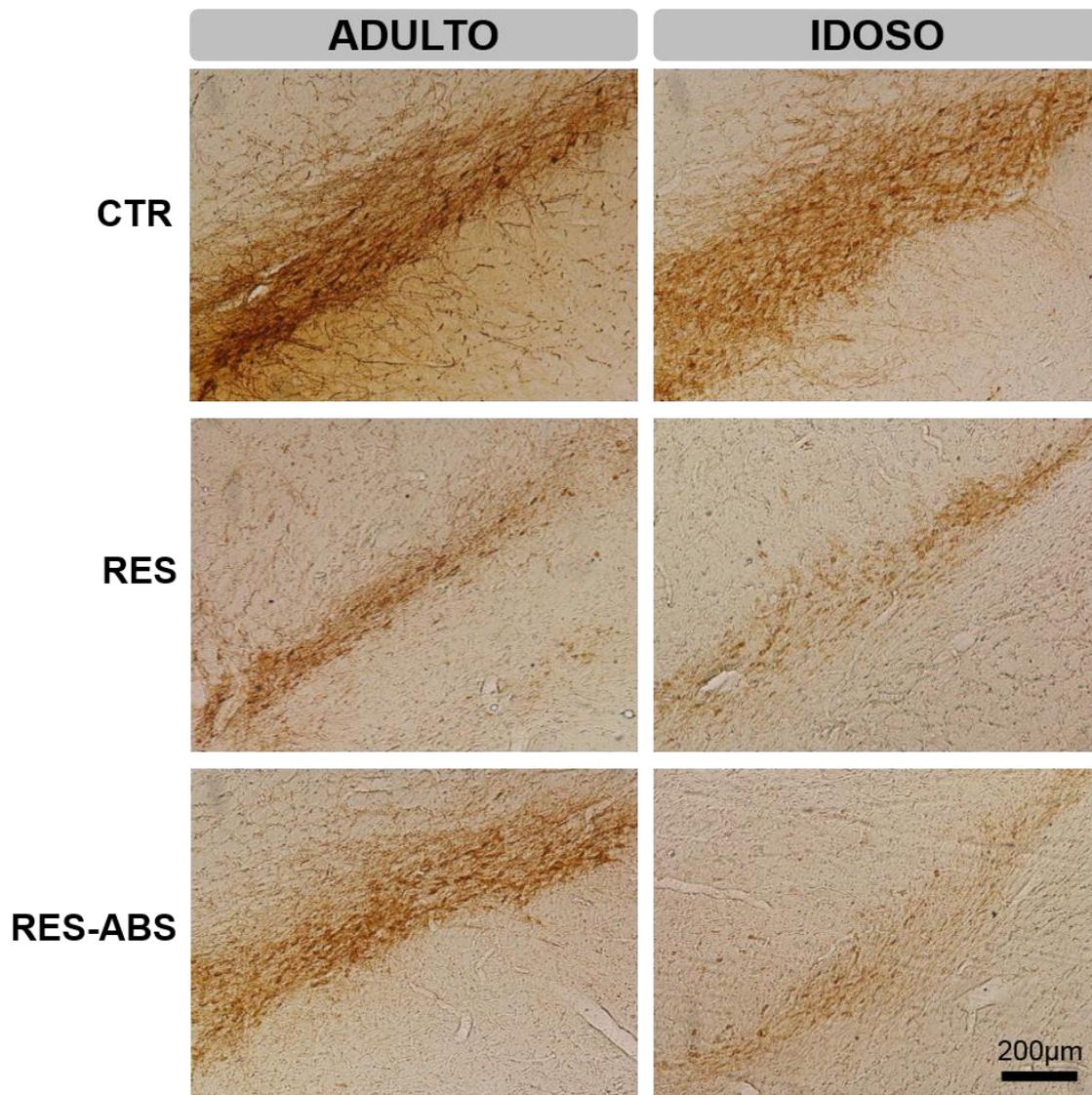


Figura 17. Imagens representativas do número de neurônios TH+ na Substância Nigra parte compacta de animais adultos e idosos que receberam veículo de reserpina (CTR), reserpina (RES) e após cessar a administração de reserpina por 30 dias (RES-ABS). Barra de escala: 200 µm.

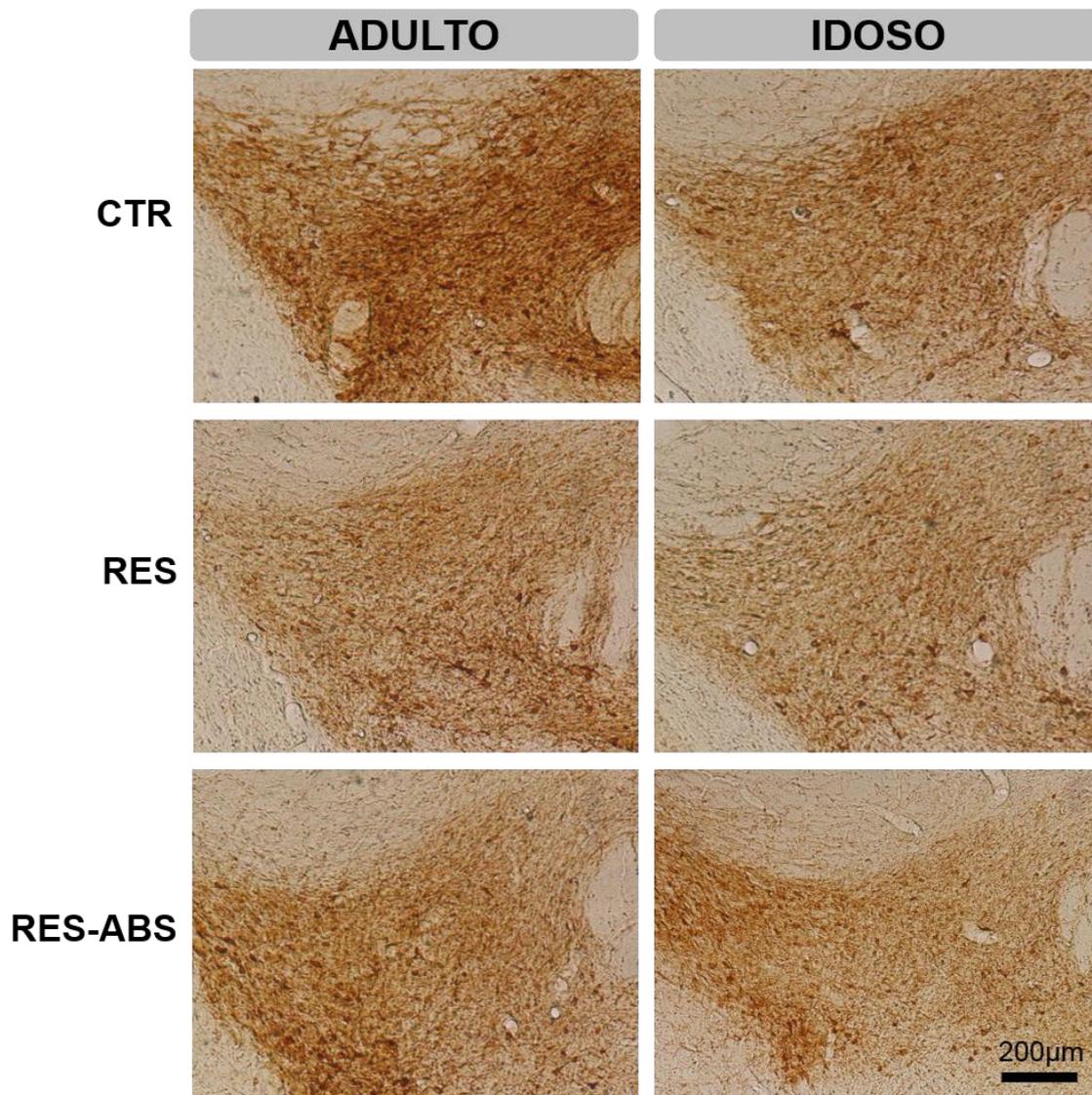


Figura 18. Imagens representativas do número de neurônios TH+ na Área tegumentar ventral de animais adultos e idosos que receberam veículo de reserpina (CTR), reserpina (RES) e após cessar a administração de reserpina por 30 dias (RES-ABS). Barra de escala: 200 μ m.

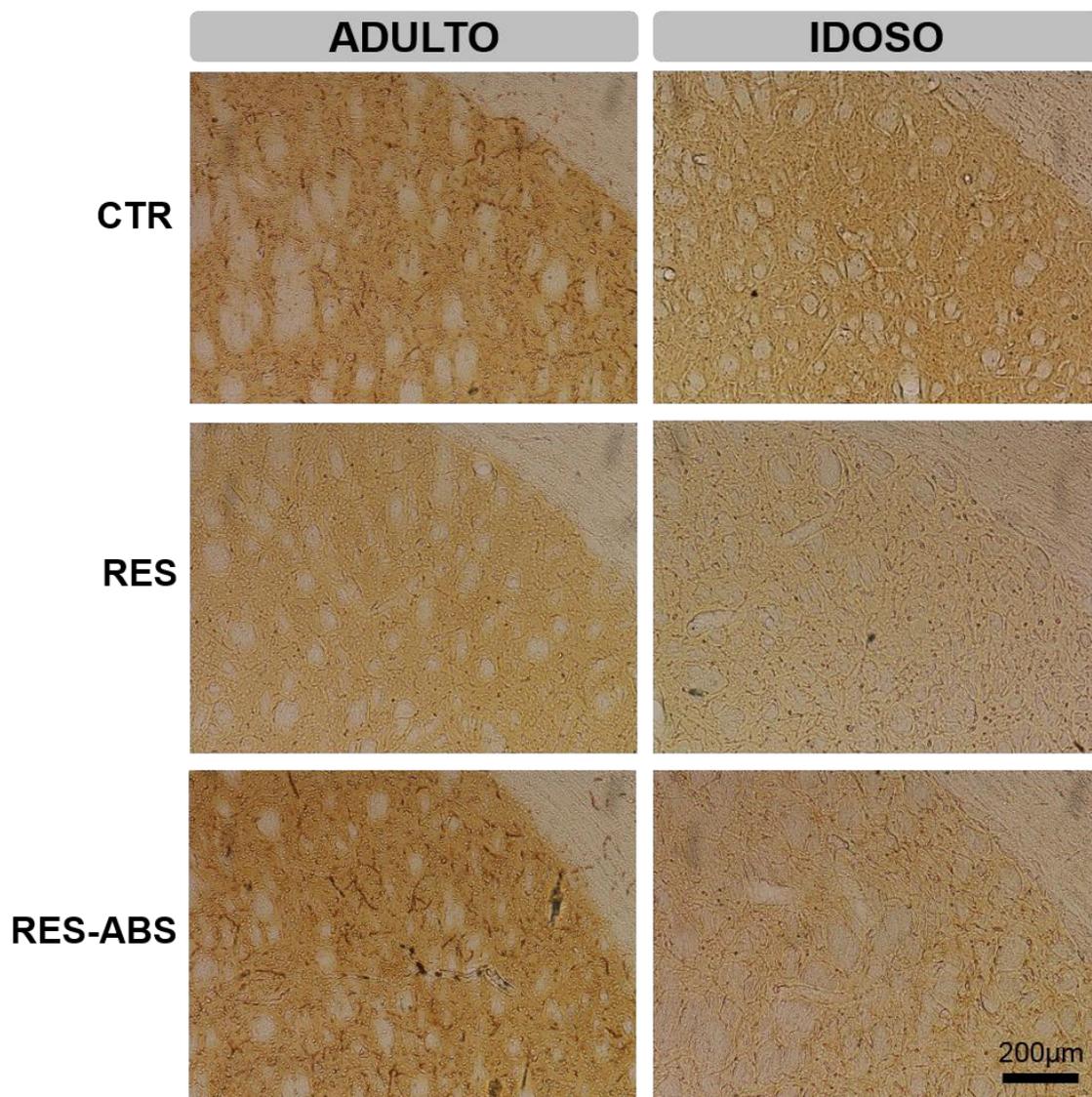


Figura 19. Imagens representativas do número de neurônios TH+ do Estriado dorsal de animais adultos e idosos que receberam veículo de reserpina (CTR), reserpina (RES) e após cessar a administração de reserpina por 30 dias (RES-ABS). Barra de escala: 200 μ m

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho nós investigamos o efeito do envelhecimento sobre a progressividade das alterações motoras, emocionais e neuroquímicas causadas pela administração repetida de baixas doses de RES em ratos. Nós observamos que os animais idosos apresentaram um maior comprometimento motor no teste de catalepsia. Esse comprometimento foi acompanhado de uma menor marcação para TH em áreas motoras, como SNpc e STR. Vale ressaltar que os animais idosos apresentaram início de alterações motoras, na catalepsia, antes dos animais adultos. Também foi observada uma redução do peso dos animais adultos e idosos tratados repetidamente com RES. Entretanto, após a interrupção do tratamento, apenas os animais do grupo adulto, tratados com RES, recuperaram o peso.

A DP é uma enfermidade conhecida principalmente pelos seus sintomas motores cardinais, entre eles bradicinesia (lentidão), instabilidade postural, rigidez e tremor (AARSLAND et al., 2017; WYLIE et al., 2012), que são os sinais usados para diagnosticar a doença (YOUNG et al., 2016). Essas alterações motoras tem sido amplamente estudada em modelos animais, entre eles, pode-se destacar o modelo da reserpina, que causa depleção de monoaminas (ZENG; GENG; JIA, 2018; ZHANG et al., 2018). A RES inibe irreversivelmente a proteína VMAT, o que causa a diminuição de dopamina, noradrenalina e serotonina na fenda sináptica. Consequentemente, os animais passam a apresentar comportamentos similares aos de pacientes com a DP (RECKZIEGEL et al., 2016). Um ponto interessante do modelo é que, por ser um modelo progressivo, este mimetiza melhor a natureza progressiva da patologia em humanos (VISANJI et al., 2016).

Fernandes et al., (2012), administrando repetidas doses de RES, observaram alteração motora progressiva em ratos, no teste de catalepsia. Esse teste avalia a latência do animal para realizar o primeiro movimento e tem sido amplamente utilizado para avaliar o comportamento motor em modelos animais da DP (LEÃO et al., 2015). Resultados semelhantes aos apresentados por Fernandes et al., (2012), foram observados por Bispo et al., (2019), Leão et al., (2017), Lins et al., (2018) e Santos et al., (2013). No presente trabalho,

corroborando os dados já apresentados na literatura, a administração repetida de RES na dose de 0,1 mg/kg causou aumento progressivo do prejuízo motor observado no teste de catalepsia.

Adicionalmente, quando comparados animais adultos e idosos tratados com RES, os idosos foram mais suscetíveis aos efeitos deletérios causados pela RES, na catalepsia, quando comparado aos animais adultos. No grupo RI as diferenças começaram a surgir no 12º dia (48 horas após a 5ª injeção de RES) e se estenderam até o 46º dia (18 dias após a última administração de RES), quando comparado ao seu controle (CI). Já no grupo RA as alterações iniciaram no dia 18 (48 horas após a 9ª injeção de RES) e permaneceram até o dia 42 (14 dias após a última injeção de RES) dia quando comparado ao seu controle (CA). Sendo assim, a idade avançada dos animais (18 a 24 meses) induziu prejuízo motor precoce e pior capacidade motora na tarefa, quando comparados aos animais adultos (6 a 8 meses).

Abílio et al., (2004) relataram que a RES pode causar alterações motoras relacionadas a idade o que pode resultar de uma maior sensibilidade a estresse oxidativo devido à idade avançada. Em complemento, Holmes et al., (2016) relataram que a perda do equilíbrio entre agentes antioxidantes e ERO é de grande importância na evolução de doenças neurodegenerativas. Possivelmente, em nosso estudo, a senescência dos animais foi a responsável pela perda motora precoce no teste de catalepsia. Essa hipótese também é corroborada pelos resultados observados quanto a magnitude do prejuízo motor nos animais idosos, quando comparados aos adultos.

Vale ressaltar que o modelo de parkinsonismo induzido por reserpina, na dose de 0,1 mg/kg apresenta reversibilidade das alterações motoras. No presente estudo, no trigésimo dia (48 horas após a 15ª injeção) metade dos animais RES de cada um dos grupos (a lembrar RI e RA) pararam de receber a droga. Ao cessar a intervenção, o prejuízo motor continuou até o 46º dia (18 dias após a última injeção de RES) no grupo RI e até o 42º dia (14 dias após a última injeção de RES) no grupo RA, mostrando uma maior susceptibilidade dos animais mais velhos ao modelo. Após esses dias os animais RES não apresentaram mais diferenças se comparados aos seus respectivos controles. Semelhante ao que observamos, Santos et al., (2013) observaram que em animais adultos a

reversibilidade da perda motora ocorreu 20 dias após cessar a administração da RES.

O avanço da idade é um fator de risco para a DP (MITRA et al., 2016). Acredita-se que os hormônios sexuais possuem papel importante nessa susceptibilidade. Com o envelhecimento, há também queda dos níveis de hormônios sexuais associados a andropausa e menopausa (WANG et al., 2016). Esse declínio pode induzir modificações deletérias no sistema nervoso central (SNC), sendo este, um fator importante para a ocorrência das doenças neurodegenerativas (DUARTE et al., 2016). Estudos como os de Khasnavis et al., (2013), Quillinan et al., (2014) e Soultanov et al., (2016) já mostram efeitos positivos do tratamento hormonal sobre a neuroproteção. Além disso, Liu et al., (2010) relata que a manutenção em concentrações fisiológicas de testosterona confere proteção contra danos neurais.

Nesse sentido, no presente estudo, o fato dos animais adultos estarem, provavelmente, com concentrações hormonais ótimas (devido a faixa etária) pode ter ocasionado neuroproteção ao grupo adulto que possibilitou melhora motora poucos dias após o cessar da administração da reserpina. Essa inferência faz sentido, visto que os animais do grupo RA apresentaram também prejuízo motor mais tardio e em magnitude menor se comparados aos animais do grupo RI. Entretanto, seria necessárias dosagens hormonais sexuais para comprovar a hipótese aqui levantada.

As alterações motoras observadas aqui no presente trabalho foram acompanhadas de uma redução na marcação para TH na SNpc e no STR, núcleos envolvidos com o controle do movimento. Esses dados são corroborados pelos de Bispo et al., (2019), Leão et al., (2017), Lins et al., (2018) e Santos et al., (2013). A TH é uma enzima responsável pela conversão de L-tirosina em L-DOPA, passo vital para a produção não apenas da dopamina, mas também de todas as catecolaminas (ARREOLA et al., 2016) por esse motivo, a inibição da TH pode causar também diminuição de todas as catecolaminas (TRESIEDER; JACKSON; JENNER, 2000) . Em humanos, a DP é caracterizada pela morte de neurônio dopaminérgicos na SNpc, causando uma diminuição da dopamina nos nas áreas afetadas por esse núcleo.

Na via dopaminérgica também observamos um efeito marcante da idade dos animais, uma vez que, animais idosos não recuperaram a quantidade de TH na SNpc e no STR, enquanto animais adultos foram capazes de recuperar esse parâmetro, 32 dias após a última administração de reserpina. É importante observar também que quando comparados os grupos controles idosos e adultos, os mesmos já apresentam diferenças quanto a imunorreatividade para TH, sendo o grupo idoso o que apresenta menores valores. Esses resultados mostram que, mesmo na ausência de indução de estados alterados, como o de parkinsonismo, animais mais velhos apresentam um maior prejuízo na via dopaminérgica. Esses dados coincidem com dados prévios da literatura que mostram que em humanos idosos a concentração de TH é em média 15% mais baixos que em indivíduos adultos (CAMPOLO et al., 2017). Além disso, nosso achado corrobora ao trabalho de Norrara et al., (2018). No trabalho, observaram que houve redução gradual de TH em ATV e no núcleo accumbens em animais de 3 faixa etárias diferentes (3, 10 e 18 meses de idade).

Além das áreas motoras, também avaliamos a marcação para TH em ATV. Os animais adultos apresentaram uma redução dessa marcação para os animais que foram sacrificados 2 dias após a 15 injeção, seguida por uma recuperação parcial desse prejuízo 32 dias após o fim do tratamento com reserpina, uma vez que o grupo RA-ABS não se difere do grupo CA. Nos animais idosos essas alterações não foram observadas. Entretanto, os animais do grupo CI já apresenta uma redução natural da marcação da via dopaminérgica, quando comparado ao grupo CA. Esse fator pode ter contribuído substancialmente para que nesse núcleo não observássemos redução de TH após o tratamento com RES. Possivelmente, esse núcleo, em animais idosos pode ter apresentado maior resistência aos efeitos da reserpina, por apresentar maior proteção dos danos neurodegenerativas dopaminérgicos. Os dados obtidos por Alberico; Cassell; Narayanan, (2015) confirmam essa nossa hipótese, em seu estudo, os autores mostraram que na SNpc a diminuição de TH chega próximo de 70%, enquanto que em ATV essa redução é menos acentuada, cerca de 53%.

Outro teste bastante utilizado em modelos animais é o teste de atividade geral no campo aberto. O teste pode ser usado tanto para avaliação de parâmetros motores espontâneos, quanto a não motores, associados a

comportamentos do tipo medo/ansiedade (PARK et al., 2018). No presente estudo, não foi possível observar efeito do tratamento de reserpina em nenhum dos parâmetros analisados (distância total percorrida, distância percorrida na zona central, tempo na zona central e número de eventos de rearing para ambas as condições (adulto e idoso). Diante disso podemos afirmar que não há prejuízo motor em estágios iniciais (24 horas após a 2º injeção) da intervenção. Esse dado corrobora ao que encontramos na catalepsia, onde no mesmo período também não foi possível observar prejuízo motor.

Resultados semelhantes ao nosso foi observado em estudos anteriores, a citar Leão et al., (2017), Santos et al., (2013) e Fernandes et al., (2012). Em nenhum destes trabalhos foi possível observar o efeito da RES em estágios iniciais da intervenção. Vale ressaltar que a dose, volume e regime de administração de reserpina dos 3 trabalhos são idênticos aos realizados no presente trabalho. Curiosamente, mesmo quando o regime de administração é agudo o resultado observado é o mesmo. Peres et al., (2016), utilizaram animais Wistar de 3 meses e administraram 2 injeções de reserpina com intervalo de 48 h entre elas (intervalo igual ao realizado no presente trabalho). De maneira semelhante ao nosso, 24 h após a 2ª administração de reserpina, os animais foram submetidos ao teste e mesmo com uma dose superior a utilizada no nosso trabalho, não foi observada diferença entre o grupo reserpina e controle. De Freitas et al., (2016) desenvolveram um trabalho realizando 4 injeções de reserpina em dias consecutivos e com doses diferentes em ratos Swiss, com dose igual à utilizada no presente trabalho (0,1 mg/kg). No estudo de De Freitas não conseguiu observar efeito da reserpina no campo aberto em fases iniciais, apenas uma dose dez vezes maior (1 mg/kg) induziu efeito.

Podemos inferir que esse resultado está relacionado ao efeito gradual da reserpina na depleção de monoaminas (FERNANDES et al., 2012). Dessa forma a aplicação do teste numa fase muito inicial pode ter ocasionado o comportamento inalterado dos animais. O estudo realizado por Leão et al., (2017) comprova essa hipótese. No trabalho, sob efeito da 2ª injeção não foi possível ver diferenças entre reserpina e controle, corroborando ao que observamos no nosso trabalho. Já sob efeito da 15ª injeção essa diferença surgiu como observado por Bispo et al., (2019).

A alteração do peso dos animais foi outro parâmetro avaliado no estudo. Aqui foi possível observar diminuição na porcentagem de peso dos animais que receberam RES. A diferença surgiu a partir do 20º dia (48 horas após a 10ª injeção de RES) e se estendeu até o final do experimento (32 dias após a última administração de RES) quando comparamos RI com RA, mostrando que mesmo após suspensão do tratamento a perda de peso não foi revertida. Já quando comparados os animais RA e CA os animais RES apresentaram diminuição do parâmetro do dia 12 (48 horas após a 6ª injeção) ao 48 (20 dias após a última injeção). Favero et al., (2017) também observou perda de peso dos animais tratados com reserpina após 30 e após 60 dias. Contudo no estudo a intervenção foi realizada diariamente por 3 dias e com uma dose 10 vezes maior que a usada no presente estudo. Wells et al., (2017) com protocolo semelhante também demonstraram que os animais que receberam reserpina apresentaram diminuição do peso corporal semanal. Apesar da curiosa perda de peso dos animais destes trabalhos, com apenas 3 injeções de RES, a literatura tem mostrado possíveis fatores que podem ter ocasionado o fato.

Devido ao mecanismo de ação da RES, diminuindo todas as monoaminas, uma alta dose da droga é capaz de causar abrupta queda na concentração de DA e serotonina (ZHANG et al., 2018). A perda desses neurotransmissores pode acarretar um quadro de depressão (LEAL et al., 2019) associado a perda da motivação e do apetite (SCHULTZ, 2016; XIE et al., 2018). Esses fatores, em conjunto, podem ter levado o animal a não buscar alimento, ocasionando desta forma a perda de peso. Em complemento a nossa hipótese, Minaiyan et al., (2015) que demonstraram que uma única dose alta de RES já é capaz de induzir comportamento do tipo depressivo em ratos. Quando encerrada a intervenção com RES no 30º dia de experimento, os animais do grupo RI não apresentaram reversão do parâmetro. Podemos levantar a hipótese de que com a suspensão da intervenção com reserpina, os parâmetros comportamentais vão sendo normalizados por mecanismos compensatórios, como relatado por Santos et al., (2013). A suposição faz sentido, quando se pensa que do 30º dia em diante as concentrações de TVMA vão sendo normalizados, levando a aumento da neurotransmissão monoaminérgica, que refletiu na gradual normalização dos

parâmetros relatados. Entretanto, para o ganho de peso, talvez mais tempo fosse necessário para os animais regularizarem a ingestão de alimentos.

Os achados do presente estudo, mostram que o modelo de parkinsonismo induzido por baixas doses repetidas de reserpina apresenta diferenças sobre a progressividade e reversão, motora e da alteração de peso, entre animais idosos e adultos. Observamos que animais mais novos apresentam menor suscetibilidade a perda motora e de peso, acompanhadas de menor diminuição de TH na SNpc, STR e VTA. Além disso, observamos também que quando comparados os animais controles, há uma natural diminuição de TH nos idosos. Para compreender melhor as alterações sobre as situações proposta do trabalho, faz-se necessário estudos complementares, a citar avaliação de morte celular nas condições propostas, avaliação dos níveis de hormônios sexuais e uma possível postergação do teste de campo aberto para verificar quando alterações do tipo emocionais começam a surgir.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, observamos que animais idosos foram mais susceptíveis aos efeitos deletérios da administração repetida de baixas doses de RES, observados no comportamento de catalepsia, no peso dos animais e na quantidade de TH marcada em áreas motoras. Além disso, animais idosos, apesar de apresentarem reversibilidade das alterações motoras na catalepsia, não apresentaram reversibilidade na marcação para TH na SNpc e no STR, indicando que estes animais, no protocolo realizado, são incapazes de recuperar os prejuízos neuronais causados pela reserpina nas regiões citadas após cessar a administração da droga.

8 Perspectivas

Diante dos resultados obtidos com o desenvolver do trabalho, pretendemos investigar quais mecanismos em específico podem estar envolvidos com a produção de resultados diferentes entre os animais idosos e adultos. Exemplos de análises que podem ser realizadas é a dosagem hormonal dos animais afim de verificar se as concentrações de hormônios circulantes podem exacerbar ou atenuar os efeitos da reserpina. Pretendemos realizar também análise da concentração de enzimas antioxidantes e espécies reativas de oxigênio para verificarmos como o estresse oxidativo pode afetar os resultados. Além disso pretendemos também realizar análises imunohistoquímica para caspase-3, um indicador de morte celular, e verificar se há morte celular no tecido nervoso dos animais e se há diferença do observado entre ratos adultos e idosos.

REFERÊNCIAS

AARSLAND, D. et al. Cognitive decline in Parkinson disease. **Nature reviews. Neurology**, v. 13, n. 4, p. 217–231, abr. 2017.

ABBAS, M. M.; XU, Z.; TAN, L. C. S. **Epidemiology of Parkinson's Disease—East Versus West** *Movement Disorders Clinical Practice* Wiley-Blackwell, , 1 jan. 2018.

ABE, P. T. et al. Análise do equilíbrio nos pacientes com doença de Parkinson grau leve e moderado através da fotogrametria. **Neurociências**, v. 12, p. 73–76, 2004.

ACAZ-FONSECA, E. et al. Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions. **Progress in Neurobiology**, v. 144, p. 5–26, 2016.

ALBERICO, S. L.; CASSELL, M. D.; NARAYANAN, N. S. **The vulnerable ventral tegmental area in Parkinson's disease** *Basal Ganglia* Elsevier GmbH, , 1 ago. 2015.

ARBABI, E. et al. Estrogen agonist genistein differentially influences the cognitive and motor disorders in an ovariectomized animal model of Parkinsonism. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 19, n. 12, p. 1285–1290, dez. 2016.

ARREOLA, R. et al. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–31, 2016.

BAIK, J.-H. Dopamine signaling in food addiction: role of dopamine D2 receptors. **BMB reports**, v. 46, n. 11, p. 519–26, nov. 2013.

BAMFORD, N. S.; WIGHTMAN, R. M.; SULZER, D. Dopamine's Effects on Corticostriatal Synapses during Reward-Based Behaviors. **Neuron**, v. 97, n. 3, p. 494–510, 2018.

BEART, P. M. Synaptic signalling and its interface with neuropathologies: snapshots from the past, present and future. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 76–90, out. 2016.

BEIGI, M. et al. Levodopa medication improves incidental sequence learning in

Parkinson's disease. **Neuropsychologia**, v. 93, p. 53–60, 2016.

BEKKERS, E. M. J. et al. Balancing between the two: Are freezing of gait and postural instability in Parkinson's disease connected? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 94, p. 113–125, nov. 2018.

BENTEA, E.; VERBRUGGEN, L.; MASSIE, A. The Proteasome Inhibition Model of Parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. Preprint, n. Preprint, p. 1–33, 11 out. 2016.

BETANCOURT, E. et al. The impact of biological sex and sex hormones on cognition in a rat model of early, pre-motor Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2016.

BHATTACHARJEE, N. et al. Chronic exposure of homocysteine in mice contributes to dopamine loss by enhancing oxidative stress in nigrostriatum and produces behavioral phenotypes of Parkinson's disease. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 6, p. 47–53, 2016.

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, 2 maio 2019.

BOHUSH, A.; NIEWIADOMSKA, G.; FILIPEK, A. Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, 29 set. 2018.

CAMPOLO, M. et al. The Neuroprotective Effect of Dimethyl Fumarate in an MPTP-Mouse Model of Parkinson's Disease: Involvement of Reactive Oxygen Species/Nuclear Factor- κ B/Nuclear Transcription Factor Related to NF-E2. **Antioxidants & redox signaling**, v. 27, n. 8, p. 453–471, 2017.

CARTIER, E. et al. The SUMO-Conjugase Ubc9 Prevents the Degradation of the Dopamine Transporter, Enhancing Its Cell Surface Level and Dopamine Uptake. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 13, p. 35, 2019.

CASSANI, E. et al. Mucuna pruriens for Parkinson's disease: Low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 365, p. 175–180, 2016.

CHRISTOFOLETTI, G. et al. Eficácia de tratamento fisioterapêutico no equilíbrio estático e dinâmico de pacientes com doença de Parkinson. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 17, n. 3, p. 259–263, set. 2010.

CONNOR-ROBSON, N. et al. Combinational losses of synucleins reveal their differential requirements for compensating age-dependent alterations in motor behavior and dopamine metabolism. **Neurobiology of Aging**, v. 46, p. 107–112, 2016.

COPPEDÈ, F.; STOCCORO, A. Mitoepigenetics and Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 86, 2019.

COVA, I. et al. Validation of the Italian version of the Non Motor Symptoms Scale for Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, 2016.

DAHODWALA, N.; PEI, Q.; SCHMIDT, P. Sex Differences in the Clinical Progression of Parkinson's Disease. **Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing**, v. 45, n. 5, p. 749–756, set. 2016.

DI GIOVANNI, G. et al. Monoaminergic and Histaminergic Strategies and Treatments in Brain Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 541, 24 nov. 2016.

DIAZ-DIESTRA, D. et al. L-cysteine capped ZnS:Mn quantum dots for room-temperature detection of dopamine with high sensitivity and selectivity. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 693–700, 2017.

DINIZ, L. P. et al. α -synuclein oligomers enhance astrocyte-induced synapse formation through TGF- β 1 signaling in a Parkinson's disease model. **Journal of Neurochemistry**, p. jnc.14710, 22 abr. 2019.

DRAGICEVIC, E.; SCHIEMANN, J.; LISS, B. Dopamine midbrain neurons in health and Parkinson's disease: Emerging roles of voltage-gated calcium channels and ATP-sensitive potassium channels. **Neuroscience**, v. 284, p. 798–814, 2015.

DUARTE, A. C. et al. Sex Hormone Decline and Amyloid β Synthesis, Transport and Clearance in the Brain. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 11, nov. 2016.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **British journal of pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1357–91, out. 2011a.

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

EGEA, J. et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). **Redox biology**, v. 13, p. 94–162, 2017.

EL-GHAZALY, M. A. et al. Neuroprotective effect of EGb761(R) and low-dose whole-body -irradiation in a rat model of Parkinson's disease. **Toxicology and Industrial Health**, v. 31, n. 12, p. 1128–1143, 1 dez. 2015.

ELGUETA, D. et al. Pharmacologic antagonism of dopamine receptor D3 attenuates neurodegeneration and motor impairment in a mouse model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**, v. 113, p. 110–123, 2017.

ERNST, M.; LUCIANA, M. Neuroimaging of the dopamine/reward system in adolescent drug use. **CNS spectrums**, v. 20, n. 4, p. 427–41, ago. 2015.

FAHN, S. The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 4–18, jan. 2015.

FAVERO, G. et al. Oral supplementation of melatonin protects against fibromyalgia-related skeletal muscle alterations in reserpine-induced myalgia rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 1 jul. 2017.

FEINSTEIN, D. L.; KALININ, S.; BRAUN, D. Causes, consequences, and cures for neuroinflammation mediated via the locus coeruleus: noradrenergic signaling system. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 154–178, out. 2016.

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. 154–63, 16 maio 2012.

FUJIOKA, S. et al. Hospital-based study on emergency admission of patients with Parkinson's disease. **eNeurologicalSci**, v. 4, p. 19–21, 2016.

GAMBINO, M.; CAPPITELLI, F. Mini-review: Biofilm responses to oxidative stress. **Biofouling**, v. 32, n. 2, p. 167–178, 7 fev. 2016.

GEERSE, D. J. et al. Assessing Walking Adaptability in Parkinson's Disease: "The Interactive Walkway". **Frontiers in neurology**, v. 9, p. 1096, 2018.

GILLIES, G. E.; MCARTHUR, S. Independent influences of sex steroids of systemic and central origin in a rat model of Parkinson's disease: A contribution to sex-specific neuroprotection by estrogens. **Hormones and behavior**, v. 57, n. 1, p. 23–34, jan. 2010.

GRALL-BRONNEC, M. et al. Dopamine Agonists and Impulse Control Disorders: A Complex Association. **Drug safety**, v. 41, n. 1, p. 19–75, jan. 2018.

HANAMSAGAR, R.; BILBO, S. D. Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 160, p. 127–133, 2016.

HERRAIZ, T.; GUILLÉN, H. Monoamine Oxidase-A Inhibition and Associated Antioxidant Activity in Plant Extracts with Potential Antidepressant Actions. **BioMed research international**, v. 2018, p. 4810394, 2018.

HOLMES, S. et al. Effects of Oxidative Stress and Testosterone on Pro-Inflammatory Signaling in a Female Rat Dopaminergic Neuronal Cell Line. **Endocrinology**, v. 157, n. 7, p. 2824–2835, jul. 2016a.

HOLMES, S. et al. Effects of Oxidative Stress and Testosterone on Pro-Inflammatory Signaling in a Female Rat Dopaminergic Neuronal Cell Line. **Endocrinology**, v. 157, n. 7, p. 2824–2835, jul. 2016b.

HUANG, Y. et al. L-DOPA-Induced Motor Impairment and Overexpression of Corticostriatal Synaptic Components Are Improved by the mGluR5 Antagonist MPEP in 6-OHDA-Lesioned Rats. **ASN neuro**, v. 10, p. 1759091418811021, 2018.

IKEMOTO, S.; YANG, C.; TAN, A. Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry. **Behavioural Brain Research**, v. 290, p. 17–

31, 2015.

IWAKI, H. et al. Genetic risk of Parkinson disease and progression: An analysis of 13 longitudinal cohorts. **Neurology: Genetics**, v. 5, n. 4, 1 ago. 2019.

JACKOWSKA, K.; KRYSINSKI, P. New trends in the electrochemical sensing of dopamine. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 11, p. 3753–71, abr. 2013.

KUMAR, S. et al. Structural characterization of monoterpene indole alkaloids in ethanolic extracts of Rauwolfia species by liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2016.

LEAL, P. C. et al. Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in neuroscience**, v. 10, p. 283, 2016.

LEAL, P. C. et al. Serotonergic dysfunction in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 96, p. 73–78, 1 mar. 2019.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain pathology (Zurich, Switzerland)**, v. 25, n. 4, p. 377–90, 1 jul. 2015.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) Are Resistant to a Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease: Differences in Motor Behavior, Tyrosine Hydroxylase and α -Synuclein Expression. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 9, p. 78, 2017.

LEE, K. IL et al. The anti-hypertensive drug reserpine induces neuronal cell death through inhibition of autophagic flux. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 462, n. 4, p. 402–408, jul. 2015.

LEVITE, M. Dopamine and T cells: dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases. **Acta Physiologica**, v. 216, n. 1, p. 42–89, jan. 2016.

LILL, C. M. Genetics of Parkinson's disease. **Molecular and Cellular Probes**, p. 101471, jan. 2020.

LINDAHL, M.; HELLGREN KOTALESKI, J. Untangling Basal Ganglia Network Dynamics and Function: Role of Dopamine Depletion and Inhibition Investigated in a Spiking Network Model. **eNeuro**, v. 3, n. 6, 2016.

LINDROOS, R. et al. Basal Ganglia Neuromodulation Over Multiple Temporal and Structural Scales-Simulations of Direct Pathway MSNs Investigate the Fast Onset of Dopaminergic Effects and Predict the Role of Kv4.2. **Frontiers in neural circuits**, v. 12, p. 3, 2018.

LINS, L. C. R. F. et al. Carvacrol prevents impairments in motor and neurochemical parameters in a model of progressive parkinsonism induced by reserpine. **Brain Research Bulletin**, v. 139, p. 9–15, 1 maio 2018.

LITIM, N.; MORISSETTE, M.; DI PAOLO, T. Neuroactive gonadal drugs for neuroprotection in male and female models of Parkinson's disease. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 67, p. 79–88, ago. 2016.

LIU, C. et al. Dopamine Secretion Is Mediated by Sparse Active Zone-like Release Sites. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 706- 718.e15, 2018.

LIU, C.; FANG, Y. New insights of poly(ADP-ribosylation) in neurodegenerative diseases: a focus on protein phase separation and pathologic aggregation. **Biochemical Pharmacology**, v. 167, 26 abr. 2019.

LIU, C.; LIANG, M. C.; SOONG, T. W. Nitric Oxide, Iron and Neurodegeneration. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, p. 114, 2019.

LOHANI, S. et al. Burst activation of dopamine neurons produces prolonged post-burst availability of actively released dopamine. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 10, p. 2083–2092, 2018.

LOHR, K. M. et al. Membrane transporters as mediators of synaptic dopamine dynamics: implications for disease. **The European journal of neuroscience**, v. 45, n. 1, p. 20–33, 2017.

LOKE, H.; HARLEY, V.; LEE, J. Biological factors underlying sex differences in neurological disorders. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 65, p. 139–150, 2015.

MAIA, T. V; FRANK, M. J. An Integrative Perspective on the Role of Dopamine in Schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 52–66, 2017.

MARTIN-JIMÉNEZ, C. A. et al. Relationship Between Obesity, Alzheimer's Disease, and Parkinson's Disease: an Astrocentric View. **Molecular Neurobiology**, 28 out. 2016.

MCCUTCHEON, R. A.; ABI-DARGHAM, A.; HOWES, O. D. Schizophrenia, Dopamine and the Striatum: From Biology to Symptoms. **Trends in neurosciences**, v. 42, n. 3, p. 205–220, 2019.

MELCANGI, R. C. et al. Neuroactive steroid levels in healthy and diseased states. **European Neuropsychopharmacology**, v. 26, p. S122, out. 2016.

MINAIYAN, M. et al. Effect of venlafaxine on experimental colitis in normal and reserpinised depressed rats. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 4, p. 295–306, 2015.

MITRA, S. et al. Alteration of nuclear factor-kappaB pathway promote neuroinflammation depending on the functions of estrogen receptors in substantia nigra after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment. **Neuroscience Letters**, v. 616, p. 86–92, 2016.

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. November 2018, p. 1–11, 2019.

MOSHAROV, E. V; BORGKVIST, A.; SULZER, D. Presynaptic effects of levodopa and their possible role in dyskinesia. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 30, n. 1, p. 45–53, jan. 2015.

MUSTAFA, S. et al. The role of TWEAK/Fn14 signaling in the MPTP-model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 319, p. 116–122, 2016.

NITKOWSKA, M. et al. Prolactin and sex hormones levels in males with Parkinson's disease. **Acta neurologica Scandinavica**, v. 131, n. 6, p. 411–6, 1 jun. 2015.

NORRARA, B. et al. Pattern of tyrosine hydroxylase expression during aging of mesolimbic pathway of the rat. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 92, p.

83–91, 1 out. 2018.

NUR, S.; ADAMS, C. E. Chlorpromazine versus reserpine for schizophrenia. In: NUR, S. (Ed.). . **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016.

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 : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 32, n. 9, p. 1264–1310, set. 2017.

ORENDAIN-JAIME, E. N.; ORTEGA-IBARRA, J. M.; LÓPEZ-PÉREZ, S. J. Evidence of sexual dimorphism in D1 and D2 dopaminergic receptors expression in frontal cortex and striatum of young rats. **Neurochemistry International**, v. 100, p. 62–66, 2016.

PADEL, T. et al. Platelet-derived growth factor-BB has neurorestorative effects and modulates the pericyte response in a partial 6-hydroxydopamine lesion mouse model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 94, p. 95–105, 2016.

PANDEY, D. K.; RADHA; DEY, A. A validated and densitometric HPTLC method for the simultaneous quantification of reserpine and ajmalicine in *Rauvolfia serpentina* and *Rauvolfia tetraphylla*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 553–557, 2016.

PERUMAL, S. V.; SANKAR, R. Gait and tremor assessment for patients with Parkinson's disease using wearable sensors. **ICT Express**, 2016.

PLANERT, H.; BERGER, T. K.; SILBERBERG, G. Membrane properties of striatal direct and indirect pathway neurons in mouse and rat slices and their modulation by dopamine. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e57054, 2013.

PURVES-TYSON, T. D. et al. Putative presynaptic dopamine dysregulation in schizophrenia is supported by molecular evidence from post-mortem human midbrain. **Translational psychiatry**, v. 7, n. 1, p. e1003, 2017.

RAMSAY, R. R.; TIPTON, K. F. Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase

Inhibitory Drugs. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 7, 15 jul. 2017.

RECKZIEGEL, P. et al. Extracellular dopamine and alterations on dopamine transporter are related to reserpine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 3, p. 633–645, 13 mar. 2016.

RODRIGUES-DE-PAULA, F. et al. Determinants of the use of physiotherapy services among individuals with Parkinson's disease living in Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 76, n. 9, p. 592–598, 1 set. 2018.

RUA RAFAEL, A. S. et al. Parkinson's Disease and development of levodopa induced motor complications: Influence of baseline features and first medical approach. **Porto Biomedical Journal**, v. 1, n. 4, p. 136–141, 2016.

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, 15 set. 2013.

SANYAL, A. et al. Alpha-Synuclein Is a Target of Fic-Mediated Adenylation/AMPylation: Possible Implications for Parkinson's Disease. **Journal of Molecular Biology**, 27 abr. 2019.

SCHULTZ, W. Dopamine reward prediction-error signalling: a two-component response. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 183–95, mar. 2016.

SCUTIERO, G. et al. Oxidative Stress and Endometriosis: A Systematic Review of the Literature. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 7265238, 2017.

SHEPHARD, F. et al. Analysis of Mitochondrial haemoglobin in Parkinson's disease brain. **Mitochondrion**, v. 29, p. 45–52, 2016.

SHIN, C. et al. Clonazepam for probable REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease: A randomized placebo-controlled trial. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 401, p. 81–86, 15 jun. 2019.

SMITH, P. F. Vestibular Functions and Parkinson's Disease. **Frontiers in neurology**, v. 9, p. 1085, 2018.

SULZER, D.; CRAGG, S. J.; RICE, M. E. Striatal dopamine neurotransmission:

Regulation of release and uptake. **Basal Ganglia**, v. 6, n. 3, p. 123–148, 2016.

TIGHILET, B. et al. Apamin treatment accelerates equilibrium recovery and gaze stabilization in unilateral vestibular neurectomized cats: Cellular and behavioral aspects. **Neuropharmacology**, v. 144, p. 133–142, jan. 2019.

TONG, J. et al. Brain monoamine oxidase B and A in human parkinsonian dopamine deficiency disorders. **Brain : a journal of neurology**, v. 140, n. 9, p. 2460–2474, 1 set. 2017.

TRESEDER, S. A.; JACKSON, M.; JENNER, P. The effects of central aromatic amino acid DOPA decarboxylase inhibition on the motor actions of L-DOPA and dopamine agonists in MPTP-treated primates. **British journal of pharmacology**, v. 129, n. 7, p. 1355–64, abr. 2000.

VELÁZQUEZ-PANIAGUA, M. et al. Current treatments in Parkinson's including the proposal of an innovative dopamine microimplant. **Revista Médica del Hospital General de México**, v. 79, n. 2, p. 79–87, 2016.

VENDEROVA, K.; PARK, D. S. Programmed cell death in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 8, 1 ago. 2012.

VISANJI, N. P. et al. α -Synuclein-Based Animal Models of Parkinson's Disease: Challenges and Opportunities in a New Era. **Trends in Neurosciences**, v. 39, n. 11, p. 750–762, 2016.

WEI, W. et al. Chinese medicine for idiopathic Parkinson's disease: A meta analysis of randomized controlled trials. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 27 out. 2016.

WELLS, J. A. et al. Functional MRI of the reserpine-induced putative rat model of fibromyalgia reveals discriminatory patterns of functional augmentation to acute nociceptive stimuli. **Scientific Reports**, v. 7, 12 jan. 2017.

WOOD, M. et al. Rotigotine is a potent agonist at dopamine D1 receptors as well as at dopamine D2 and D3 receptors. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 4, p. 1124–35, fev. 2015.

WYLIE, S. A. et al. Dopamine agonists and the suppression of impulsive motor actions in Parkinson disease. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 24, n. 8, p.

1709–24, ago. 2012.

XIE, Z. et al. Comprehensive, robust, and sensitive UPLC-MS/MS analysis of free biogenic monoamines and their metabolites in urine. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 1099, p. 83–91, 1 nov. 2018.

XU, W. et al. Glucocalyxin B Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Parkinson's Disease by Inhibiting TLR/NF- κ B and Activating Nrf2/HO-1 Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 6, p. 2091–2104, 2017.

XU, X. et al. Sex-related differences in striatal dopaminergic system after traumatic brain injury. **Brain Research Bulletin**, v. 124, p. 214–221, 2016.

YAFFE, D. et al. Emulating proton-induced conformational changes in the vesicular monoamine transporter VMAT2 by mutagenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201605162, 7 nov. 2016.

YAMANE, T. Genetic variation in the effect of monoamines on female mating receptivity and oviposition in the adzuki bean beetle, *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). **BMC evolutionary biology**, v. 14, p. 172, 6 ago. 2014.

YANG, W.-C. et al. Home-based virtual reality balance training and conventional balance training in Parkinson's disease: A randomized controlled trial. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 9, p. 734–743, 2016.

YAPO, C. et al. Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. **The Journal of physiology**, v. 595, n. 24, p. 7451–7475, 2017.

YOUNG, W. R. et al. Auditory cueing in Parkinson's patients with freezing of gait. What matters most: Action-relevance or cue-continuity? **Neuropsychologia**, v. 87, p. 54–62, 2016.

ZAMAN, V. et al. The nigrostriatal dopamine system of aging GFR α -1 heterozygous mice: neurochemistry, morphology and behavior. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 8, p. 1557–1568, out. 2008.

ZENG, X.-S.; GENG, W.-S.; JIA, J.-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN neuro**, v. 10, p. 1759091418777438, 2018.

ZHANG, S. et al. Reversal of reserpine-induced depression and cognitive disorder in zebrafish by sertraline and Traditional Chinese Medicine (TCM). **Behavioral and brain functions : BBF**, v. 14, n. 1, p. 13, 14 jun. 2018.

ZHONG, S.-Y. et al. Low-dose levodopa protects nerve cells from oxidative stress and up-regulates expression of pCREB and CD39. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95387, 2014.

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 "Alterações comportamentais e histopatológicas após administração de baixas doses de reserpina em ratos velhos", registrada com o nº 82/2018, 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 25/03/2019.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início:04/2019, Término:01/2020
Espécie/linhagem/raca	Rato/ Wistar heterogênicos
Nº de animais	24
Peso/Idade	350-500 g / 18-24 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do departamento de fisiologia de Universidade Federal de Sergipe

Josemar Sena Batista
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