



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PÓS-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

AUDERLAN MENDONÇA DE GOIS

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS SOBRE AS
ALTERAÇÕES MOTORAS E NEUROQUÍMICAS EM UM MODELO
EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO**

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2020

AUDERLAN MENDONÇA DE GOIS

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS SOBRE
AS ALTERAÇÕES MOTORAS E NEUROQUÍMICAS EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal
de Sergipe como requisito para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO - SE

2020

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

G616p Gois, Auderlan Mendonça de
Participação dos receptores noradrenérgicos sobre as
alterações motoras e neuroquímicas em um modelo experimental
de parkinsonismo / Auderlan Mendonça de Gois ; orientador José
Ronaldo dos Santos. – São Cristóvão, SE, 2020.
114 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade
Federal de Sergipe, 2020.

1. Parkinson, Doença de. 2. Noradrenalina. 3. Alfa-sinucleína. I.
Santos, José Ronaldo dos, orient. II. Título.

CDU 612.8:616.858

AUDERLAN MENDONÇA DE GOIS

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS SOBRE
AS ALTERAÇÕES MOTORAS E NEUROQUÍMICAS EM UM
MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal
de Sergipe como requisito para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

1º Examinador: Prof^a. Dr^a. Margarete Zanardo Gomes

2º Examinador: Prof^a. Dr^a Sandra Lauton Santos

3º Examinador: Prof. Dr Luís Felipe Souza da Silva

4º Examinador: Prof^a Dr^a Patricia Rodrigues Marques de Souza

AGRADECIMENTOS

A trajetória foi longa e árdua, com muitos espinhos, mas também com muitas rosas que me fizeram entender a necessidade de cada espinho ao longo dessa caminhada. Nunca pensar em desistir e acreditar em meus objetivos, mesmo nos momentos mais difíceis, foi fundamental para concluir esse ciclo.

Às vezes é difícil acreditar que realmente esse ciclo se fechou. Quando paro para pensar e lembro que ainda criança já ia para o sítio “catar pedras” na roça, acordava de madrugada para ajudar meu pai na feira ou quando precisava ir com minha mãe ao riacho lavar roupas e ela me fazia voltar com bacia de roupas molhadas na cabeça respondendo todas as perguntas da prova, nunca imaginaria que aquele menino alcançaria seus objetivos.

Mas eu não tenho dúvidas que esse sonho só foi possível devido aos esforços, confiança e apoio dos meus pais, Josefa Mendonça de Gois e José de Gois, que sempre foram o alicerce nos momentos de dificuldades e que desde cedo me incentivaram a estudar.

Essa vitória também não seria possível sem todo o apoio de minha noiva, meu amor, Jussany Oliveira, que acompanhou toda a trajetória de perto, todos os momentos de dificuldades e de vitórias que são proporcionados pela pós-graduação. Sempre companheira, amorosa e compreensiva me ajudou a enfrentar e superar os problemas de cabeça erguida, o que tornou o fardo mais leve.

Mas sem a orientação, os conselhos, a confiança e amizade do professor/amigo, Dr. José Ronaldo dos Santos, seria muito mais difícil realizar esse sonho. Pessoa de coração enorme que não mede esforços para ajudar a quem está do seu lado alcançar seus objetivos. Obrigado pela oportunidade, ensinamentos e paciência ao longo desses anos. Pela dedicação e comprometimento com seus alunos. E por nos mostrar que é possível trabalhar em harmonia quando todos se ajudam.

Ao Prof. Dr. Murilo Marchioro, pela paciência, calma, bom humor e ensinamentos através de suas perguntas desafiadoras.

À minha segunda família Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) e Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE), pela união, apoio, comprometimento, amizade e pelos momentos de diversão que tornaram o fardo mais leve. Aos amigos que ganhei

na pós-graduação e vou levá-los comigo a vida inteira, que foram muito importantes ao longo dessa trajetória, tanto para os experimentos e aprendizado quanto para os momentos de descontração: Edson Rezende, Katty Anne Amador, Marina Freire, Thassya Fernanda, João Melo, Heitor Franco, Rodolfo Santos, Lívia Lins e Pollyana Leal. Sem esquecer dos meus queridos “ICs”, Milayne Mendonça e Wesley Santana. Em especial, ao meu amigo/irmão, Marcos Meneses, meu braço direito nos experimentos, excerto uma vez (kkk), sempre foi muito responsável e dedicado, agradeço por toda ajuda.

Aos amigos que sempre estiveram presentes em minha vida, dando-me força e proporcionado momentos de descontração, e que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho. Em especial a Ramon, Janisson e Rafael Preto.

Aos amigos que mesmos distantes sempre estão presentes. Em especial, Luciana, Lucas e Silvânio.

Aos técnicos, secretários administrativos, e as pessoas que trabalham no setor de serviço gerais da UFS, pelas dicas, ajuda e manutenção do nosso ambiente de trabalho. Em especial Renivan e Michelle. Obrigado por tudo!

À banca PROASA e de qualificação, pelo acompanhamento de cada etapa, dando sugestões construtivas para o enriquecimento científico do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela enorme contribuição para minha formação.

Aos animais experimentais utilizados para o desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade Federal de Sergipe, PROCfis, CAPES, FAPITEC e CNPq pelo apoio estrutural e financeiro.

RESUMO

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS SOBRE AS ALTERAÇÕES MOTORAS E NEUROQUÍMICAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO

Introdução: A doença de Parkinson (DP) é uma doença multifatorial sem etiologia definida e fisiopatologicamente caracterizada por morte progressiva de neurônios dopaminérgicos. No entanto, indícios mostram que disfunção noradrenérgica está associada a progressão da DP. Além disso, estudos epidemiológicos mostram que o uso de agonistas adrenérgicos β_2 reduz o risco para DP. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a participação dos receptores noradrenérgicos frente aos déficits monoaminérgicos induzido por reserpina. **Método:** Foram utilizados ratos Wistar de 6 a 8 meses de idade. Os animais foram divididos em seis grupos: grupo controle (CTR); grupo reserpina (RES); grupo salbutamol (SALB); grupo reserpina-salbutamol (RES-SALB); grupo propranolol (PRO); e grupo reserpina-propranolol (RES-PRO). Todos os animais receberam 12 injeções por via s.c. da solução RES (0,1 mg/kg) ou veículo (CTR) administradas durante 25 dias, uma a cada 48 horas. Após o 16º (8ª injeção de RES), todos os animais foram tratados com SALB (5 mg/kg), PRO (20 mg/kg) ou veículo por via i.p., durante 8 dias, uma a cada 24 horas. Os animais foram submetidos aos testes comportamentais de catalepsia I (realizada a cada 48 horas, ao longo de todo experimento), catalepsia II (realizada no 16º dia, 30, 60, 120 minutos, 24 e 48 horas após a 1ª injeção de SALB e PRO), campo aberto (realizado no 16º dia, 60 minutos após a 1ª injeção de SALB e PRO) e movimentos orais (MOFS) (realizado no 16º dia, 120 minutos após a 1ª injeção de SALB e PRO, 18º e 24º dia) e 48 horas após a última injeção de RES, os animais foram anestesiados, perfundidos e os encéfalos submetidos a imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH), dopamina β -hidroxilase (D β H) e α -sinucleína (α -syn). **Resultados:** Observou-se que uma única injeção de SALB e PRO atenuou o aumento nos MOFS, mastigação no vácuo e protusão de língua, induzido por RES. Enquanto a administração repetida de SALB reduziu progressivamente o tempo de catalepsia e PRO atenuou o aumento de MOFS, mastigação no vácuo e tremor oral, induzido por RES. Em relação a expressão imunorreativa, observou-se que tanto SALB quanto PRO protegeu contra a redução da imunorreatividade para TH na substância negra parte compacta (SNpc), área tegmentar ventral (VTA - *ventral tegmental area*) e estriado, bem como para D β H no *locus coeruleus* (LC) e contra o aumento da imunorreatividade para α -syn na substância negra reticulada (SNr), estriado, área subventricular ventral (ASV), CA1, CA3, giro denteado (GD) e córtex pré-frontal medial (CPFm) provocado por RES. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a modulação dos RA β promove um efeito neuroprotetor sobre as alterações motoras e neuroquímicas do modelo experimental de parkinsonismo induzido por RES, uma vez que foi observada uma melhora na condição motora e aumento na marcação de TH e D β H e redução de α -syn no modelo experimental de parkinsonismo.

Palavras-chave: Doença de Parkinson; noradrenalina; receptores noradrenérgicos, α -sinucleína.

ABSTRACT

PARTICIPATION OF NORADRENERGIC RECEPTORS ON MOTOR AND NEUROCHEMICAL CHANGES IN AN EXPERIMENTAL PARKINSONISM MODEL

Introduction: Parkinson's disease (PD) is a multifactorial disease with no defined etiology and pathophysiology characterized by progressive death of dopaminergic neurons. However, evidence shows that noradrenergic dysfunction is associated with the progression of PD. Besides, epidemiological studies show that the use of β 2-adrenergic agonists reduces the risk of PD. Therefore, this study aimed to evaluate the participation of noradrenergic receptors in response to the monoaminergic deficit induced by reserpine. **Method:** Wistar rats (6- to 8-month-old) were used. The animals were divided into six groups: control group (CTL); reserpine group (RES); salbutamol group (SALB); reserpine-salbutamol group (RES-SALB); propranolol group (PRO); and reserpine-propranolol group (RES-PRO). All animals received 12 subcutaneous injections of RES solution (0.1 mg/kg) or vehicle (CTL) throughout 25 days, one every 48 hours. After the 16th day (8th injection of RES), all animals were treated intraperitoneally with SALB (5 mg/kg), PRO (20 mg/kg) or vehicle for 8 days, one every 24 hours. The animals were submitted to behavioral tests of catalepsy I (performed every 48 hours, throughout the experiment), catalepsy II (performed on the 16th day - 30, 60, 120 minutes, 24 and 48 hours after the 1st injection of SALB and PRO), open field (performed on the 16th day, 60 minutes after the 1st injection of SALB and PRO) and oral movements (performed on the 16th day, 120 minutes after the 1st injection of SALB and PRO, on the 18th and the 24th day). Forty-eight hours after the last injection of RES, the animals were anesthetized, perfused and the brains were submitted to immunohistochemical analysis of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine β -hydroxylase (D β H) and α -synuclein (α -syn). **Results:** It was observed that a single injection of SALB and PRO attenuated the increase of oral movements such as vacuum chewing and tongue protrusion, induced by RES. On the other hand, repeated administration of SALB progressively reduced the time of catalepsy; and PRO attenuated the increase of oral movements (vacuum chewing and oral tremor) induced by RES. Regarding immunohistochemical analysis, it was observed that both SALB and PRO protected against the reduction of TH immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta (SNpc), ventral tegmental area (VTA) and striatum, as well as for D β H in the locus coeruleus (LC); and against the increase of α -syn immunoreactivity in the substantia nigra pars reticulata (SNr), striatum, ventral subventricular area (VSA), CA1, CA3, dentate gyrus (DG) and medial prefrontal cortex (mPFC) caused by RES. **Conclusion:** Our results suggest that the modulation of RA β promotes a neuroprotective effect on motor and neurochemical changes in the experimental model of parkinsonism induced by RES since an improvement in motor condition and an increase in TH and D β H immunoreactivity and a reduction of α -syn immunoreactivity in the experimental model of parkinsonism were observed.

Keywords: Parkinson's disease; noradrenaline; noradrenergic receptors, α -synuclein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática do circuito córtico-estriato-pálido-talâmico-cortical. A) representa o funcionamento normal das vias direta e indireta.	29
Figura 2: Mecanismo de ação do salbutamol e propranolol no receptores β -adrenérgicos.....	31
Figura 3: Representação esquemática do estadiamento da patologia de Lewy na doença de Parkinson.	37
Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de ação das neurotoxinas utilizadas na modelagem de modelos animais da doença de Parkinson.	42
Figura 5: Representação esquemática da evolução da doença de Parkinson em humanos e os modelos animais induzidos por 6-OHDA e MPTP.....	43
Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental.	47
Figura 7: Aparato de catalepsia. Fonte:	48
Figura 8: Aparato de campo aberto. Fonte:	49
Figura 9: Aparato utilizado para avaliação de movimentos orais.	50
Figura 10: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no comportamento de catalepsia.	55
Figura 11: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na atividade exploratória de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	57
Figura 12: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) sobre o número de mastigação no vácuo de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	59
Figura 13: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) sobre o número de protusão de língua de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	60
Figura 14: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) sobre o tempo de tremor oral de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	61
Figura 15: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	62

Figura 16: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no número de células TH ⁺ na substância negra parte compacta (SNpc), área tegmental ventral (VTA), locus coeruleus (LC), área de células noradrenérgicas A5 (NA5) e bulbo olfatório (BO) de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).....	64
Figura 17: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na DOR para TH ⁺ no estriado dorsal de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).....	65
Figura 18: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH). Imagem representativa da marcação para TH na substância negra parte compacta (NSpc), área tegmental ventral (VTA) e estriado dorsal de um modelo experimental de parkinsonismo.	66
Figura 19: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH).	67
Figura 20: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no número de células DβH ⁺ no locus coeruleus (LC) de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	68
Figura 21: Imuno-histoquímica para Dopamina β-Hidroxilase (DβH). Imagem representativa da marcação para DβH no locus coeruleus (LC) de um modelo experimental de parkinsonismo.	69
Figura 22: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na DOR para α-syn ⁺ na substância negra reticulada (SNr), estriado dorsal, área subventricular (ASV) e bulbo olfatório (BO) de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	70
Figura 23: Imuno-histoquímica para α-sinucleína (α-syn).	71
Figura 24: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na DOR para α-syn ⁺ nas áreas hipocâmpais (CA1, CA3, GD), córtex pré-frontal medial (CPFm) e córtex entorrinal de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	72
Figura 25: Imuno-histoquímica para α-sinucleína (α-syn).	73
Figura 26: Imuno-histoquímica para α-sinucleína (α-syn).	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Loci gênicos envolvidos na patogênese da doença de Parkinson.	25
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ABC	Complexo avidina biotina (<i>Avidin biotin complex</i>)
AM	Amígdala
ANOVA	Análise de Variância
ASV	Área subventricular
ATP	Trifosfato de adenosina
ATP13A2	ATPase lisossomal tipo P5 (<i>Lysosomal ATPase type P5</i>)
BO	Bulbo olfatório
CA1	Cornos de Amon 1
CA3	Cornos de Amon 3
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CF	Córtex frontal
CHCHD2	<i>Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2</i>
Cl	Claustro
CL	Córtex límbico
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CTR	Controle
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina
DAT	Transportador de dopamina
DJ-1	Desglicase associada ao parkinsonismo (<i>Parkinsonism associated deglyase</i>)
DM	Disfunção mitocondrial
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNAJC6	Proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) membro C6 (<i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C6</i>)
DOR	Densitometria óptica relativa

DP	Doença de Parkinson
DSUP	Disfunção do sistema ubiquitina-proteasoma
DβH	Dopamina β-hidroxilase
E.P.M	Erro padrão da média
EIF4G1	Fator 4 y-1 de iniciação da tradução eucariótica (<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1</i>)
FBXO7	Proteína F-box 7 (<i>F-box protein 7</i>)
GABA	Ácido gama-aminobutírico (<i>Gamma-aminobutyric acid</i>)
GAT	Transportador de GABA (<i>Gamma-aminobutyric acid transporters</i>)
GBA	Proteína glucocerebrosidase (<i>Glucocerebrosidase protein</i>)
GD	Giro denteado
GIGYF2	Proteína GYF2 interagindo a GRB10 (<i>GRB10 interacting GYF protein 2</i>)
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
HL	Hipotálamo lateral
HTRA2	Htra-serina peptidase 2 (<i>HtrA serine peptidase 2</i>)
i.p.	Intraperitoneal
LC	Locus coeruleus
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRK2	Quinase-2 rica em leucina (<i>Leucine rich repeat kinase 2</i>)
MAO	Monoamina oxidase
MDV	Núcleo motor dorsal do vago
MOFS	Movimentos orais
MPP+	1-metil-4fenilpiridínio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetra-hidropiridina
MR	Núcleo magnus da rafe
n.a.	Não se aplica
NA	Noradrenalina

NA5	Área de células noradrenérgica A5
NAT	Transportador de noradrenalina (<i>Noradrenaline transporter</i>)
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NEM	Neurônios espinhosos médios
NIL	Núcleos intralaminares
NMR	Núcleo mediano da rafe
NOS	Núcleo do trato solitário
NPP	Núcleo pendunculopontino
NRGP/NRG	Núcleo reticular paragigantocelular e gigantocelular
NST	Núcleo subtalâmico
PB	Prosencéfalo basal
PFA	Paraformaldeído
PINK1	Quinase-1 induzida por PTEN (<i>PTEN induced putative kinase 1</i>)
PLA2G6	Fosfolipase A2 grupo VI (<i>Phospholipase A2 group VI</i>)
PRNK	Proteínas ligase ubiquitina E3 RBR parkin (<i>Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase</i>)
PRO	Propranolol
RA	Receptores adrenérgicos
REM	Movimento rápido dos olhos
RES	Reserpina
RIC3	Chaperona do receptor acetilcolina RIC3 (<i>RIC3 acetylcholine receptor chaperone</i>)
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
s.c.	Subcutânea
SALB	Salbutamol
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciências e Animais de Laboratório
Se	Septo
SNCA	Gene da α -sinucleína
SN_{pc}	Substância negra parte compacta
SN_r	Substância negra reticulada

SYNJ1	Sinaptojanina 1 (<i>Synaptojanin 1</i>)
TF	Tampão fosfato
TFS	Tampão fosfato de sódio
TH	Tirosina hidroxilase
TMEM230	Proteína transmembrana 230 (<i>Transmembrane protein 230</i>)
UCHL1	Terminal C da ubiquitina hidrolase (<i>Ubiquitin C-terminal hydrolase L1</i>)
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas (<i>Vesicular monoamine transporter</i>)
VPS13C	Proteína vacuolar 13 homólogo C (<i>Vacuolar protein sorting 13 homolog C</i>)
VPS35	Proteína vacuolar 35 (<i>VPS35, retromer complex component</i>)
VTa	Área tegmentar ventral (<i>Ventral tegmental area</i>)
ZI	Zona incerta
α-syn	α -sinucleína

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Doença de Parkinson	18
2.2. Envelhecimento, fatores genéticos e ambientais e o risco para doença de Parkinson 20	
2.3. Circuito e susceptibilidade neuronal da doença de Parkinson	26
2.4. Mecanismos fisiopatológicos que influenciam a susceptibilidade neuronal na doença de Parkinson.....	33
2.5. Modelos animais para estudo da doença de Parkinson.....	38
3. OBJETIVOS.....	44
3.1. Objetivo geral.....	44
3.2. Objetivos específicos	44
4. MATERIAL E MÉTODO.....	45
4.1. Animais.....	45
4.2. Drogas.....	45
4.3. Delineamento experimental.....	45
4.4. Testes comportamentais	47
4.4.1. Teste de catalepsia.....	47
4.4.2. Atividade exploratória em campo aberto.....	48
4.4.3. Avaliação dos movimentos orais (MOFS).....	49
4.4.4. Peso Corporal	50
4.4.5. Perfusão dos animais.....	50
4.5. Análise morfológica.....	51
4.5.1. Imuno-histoquímica	51
4.5.2. Aquisição de imagens	52
4.5.3. Contagem de células	52

4.5.4.	Avaliação da densitometria óptica relativa (DOR)	53
4.6.	Análise estatística.....	53
5.	RESULTADOS	54
5.1.	Efeito da administração repetida de salbutamol e propranolol no comportamento motor de um modelo de parkinsonismo	54
5.1.1.	Teste de catalepsia.....	54
5.1.2.	Atividade exploratória em campo aberto.....	56
5.1.3.	Avaliação dos movimentos orais.....	58
5.1.4.	Peso corporal	62
5.2.	Efeito da administração repetida de salbutamol e propranolol na imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase, dopamina β -hidroxilase e α -sinucleína.....	63
5.2.1.	Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH ⁺)	63
5.2.2.	Imuno-histoquímica para dopamina β -hidroxilase (D β H ⁺)	68
5.2.3.	Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -syn ⁺)	70
6.	DISCUSSÃO.....	75
7.	CONCLUSÃO.....	84
8.	PERSPECTIVAS.....	85
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
	ANEXO I - COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)	114

1. INTRODUÇÃO

A doença de Parkinson (DP) é a desordem neurodegenerativa com disfunção motora mais comum e a segunda doença neurodegenerativa associada ao envelhecimento mais prevalente entre os idosos acima de 60 anos de idade (HIRSCH et al., 2016; MANTRI et al., 2019; MOISAN et al., 2016; RAY DORSEY et al., 2018). A DP é uma doença multifatorial sem etiologia definida e fisiopatologicamente caracterizada por morte seletiva e progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc), depleção de dopamina (DA) no estriado (via nigroestriatal), associada ao acúmulo proteico de α -sinucleína (α -syn) e formação de corpos de Lewy, levando a sintomas motores observados em pacientes da doença (ANDICA et al., 2018; BRAAK et al., 2003; CAMINITI et al., 2017; FEARNLEY JM; LEES AJ, 1991). No entanto, estudos recentes mostram que pacientes da DP apresentam, em estágios iniciais da doença, comprometimento de várias funções não motoras, como déficit cognitivo, distúrbio do sono, ansiedade, depressão, hiposmia e constipação, as quais estão associadas a outras vias neuronais, como a noradenérgica e serotoninérgica (LI et al., 2018; MANN et al., 2018; POLITIS et al., 2010; RANA et al., 2018).

Entre os principais fatores de risco associado à etiopatogênese da DP, o envelhecimento tem sido considerado um dos principais fatores, uma vez que estudos epidemiológicos mostram um aumento significativo na taxa de incidência e prevalência da doença à medida que envelhecemos, principalmente a partir dos 60 anos de idade (HIRSCH et al., 2016; MANTRI et al., 2019; MOISAN et al., 2016; RAY DORSEY et al., 2018). Além disso, a participação de fatores genéticos e ambientais é considerada forte influente na patogênese da doença, de modo que a maioria dos casos da DP se manifesta na forma esporádica e apenas 15% dos casos apresentam um histórico familiar, sugerindo que o entendimento entre a interação entres fatores genéticos e ambientais pode ser de grande importância para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados à doença (CABALLERO et al., 2018; DENG; WANG; JANKOVIC, 2018; GUNNARSSON; BODIN, 2019; KALINDERI; BOSTANTJOPOULOU; FIDANI, 2016).

Apesar da susceptibilidade neuronal da via nigroestriatal à diferentes fatores de risco e mecanismos fisiopatológicos, também tem sido apontado uma susceptibilidade e participação de outras vias neuronais na patogênese da DP. Estudos recentes têm mostrado que disfunções na neurotransmissão da noradrenalina (NA) e serotonina (5-HT) estão associadas a sintomas não motores, em um estado prodromico da doença (LEAL et al., 2019a, 2019b; MANN et al., 2018; RANA et al., 2018; WILSON et al., 2018). Por outro lado, outros estudos também

mostram que a estimulação da via noradrenérgica (NA e ou seus receptores), através de um mecanismo compensatório, pode aumentar a liberação de DA, reduzir a expressão de ácido ribonucleico mensageiro (RNAm – *Messenger ribonucleic acid*) do gene *SNCA*, α -syn, ativação microglial, mediadores pró-inflamatórios e atenuar a neurodegeneração e disfunção motora em modelos experimentais da doença (JIANG et al., 2015; KREINER et al., 2019; MITTAL et al., 2017; O'NEILL et al., 2019; RYAN et al., 2013; YSSEL et al., 2018). Além disso, estudos epidemiológicos mostram que o uso crônico de anti-hipertensivos, principalmente o antagonista não seletivo dos receptores β -adrenérgicos (RA β), propranolol (PRO), aumentam o risco para a DP, enquanto o uso de fármacos agonistas RA β 2, bastante utilizados no tratamento de asma, como o salbutamol (SALB), estão associados a um menor risco de desenvolver a doença (GRONICH et al., 2018; MITTAL et al., 2017; SEARLES NIELSEN et al., 2018). Esses estudos suportam, ainda mais, a ideia que a disfunção da via noradrenérgica pode contribuir para a neurodegeneração dopaminérgica e acelerar o aparecimento dos sintomas motores, bem como, sugere que a disfunção na via nigroestriatal seja uma consequência secundária à disfunção de outras vias neuronais em estágios mais iniciais da DP.

Grande parte do conhecimento sobre as características fisiopatológicas da DP se deve, principalmente, aos estudos em modelos animais induzidos por neurotoxinas, como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,4-tetra-hidropiridina (MPTP), caracterizados pela degeneração seletiva de neurônios dopaminérgicos (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014; JAGMAG et al., 2016; LU et al., 2018). Por outro lado, vários estudos em um modelo animal induzido por reserpina (RES) mostram que esse modelo representa a característica progressiva da doença com disfunção da via nigroestriatal e outras vias neuronais, associadas aos sintomas motores e não motores da DP (BISPO et al., 2019; DE FREITAS et al., 2016; LEAL et al., 2019a, 2019b; LEÃO et al., 2017; SANTOS et al., 2013).

Com base nesse contexto, nossa hipótese é que a estimulação dos RA β 2 protege contra os danos celulares e déficits motores induzido por RES. Dessa forma, no presente estudo avaliamos a participação dos receptores noradrenérgicos frente ao déficit monoaminérgico induzido por RES.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doença de Parkinson

A DP é uma desordem neurodegenerativa progressiva caracterizada pela morte seletiva de neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo cerebral, principalmente, na SNpc, provocando a depleção de DA no estriado dorsal. Essas alterações causam um comprometimento da via nigroestriatal, responsável pelo controle motor (ANDICA et al., 2018; BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; CAMINITI et al., 2017; DE FREITAS et al., 2016; FEARNLEY JM; LEES AJ, 1991; GREFFARD et al., 2006; PARK et al., 2018; SANTOS et al., 2013; VIDYADHARA et al., 2017). Assim, a DP é considerada a desordem motora mais comum na população acima de 60 anos de idade entre as doenças neurodegenerativas associadas ao envelhecimento (HIRTZ et al., 2007).

Ao longo dos anos muitos estudos contribuíram para a caracterização dos sintomas clínicos e mecanismos fisiopatológicos associados à DP. Desde 1680 relatos de neurologistas mostram que alguns pacientes apresentavam sintomas, como fraqueza muscular e tremor, os quais foram associados a outras desordens, inicialmente chamadas de “*Tremores Paralytoidei*” (MICHAEL JEFFERSON, 1973; PEARCE, 1989; STERN, 1989). Alguns anos depois, em 1817, James Parkinson, médico inglês, auxiliado por esses relatos anteriores, observou e descreveu com maior precisão esses sintomas em seus pacientes e os nomeou de “*Paralisia Agitante*” do inglês “*Shaking a Palsy*”. Ele acompanhou alguns pacientes, os quais apresentavam movimentos involuntários (tremor), redução de força, inclinação do tronco para frente e aceleração do ritmo da caminhada (MICHAEL JEFFERSON, 1973; PALACIOS-SÁNCHEZ et al., 2017). Por sua vez, nessa época, James Parkinson não fez referência aos sintomas de bradicinesia (lentidão para iniciar o movimento) e acinesia (ausência de movimento), observados por Jean-Martin Charcot, em 1876, quando distinguiu tremor intencional e tremor em repouso, além de descrever o tremor como sintoma cardinal de movimentos lentos e fracos, associando-os à rigidez muscular. Essas características fizeram Charcot acreditar que o nome “*Paralisia Agitante*” era inadequado para a doença e sugeriu o epônimo “*Doença de Parkinson*”, do francês “*La Maladie de Parkinson*”, em homenagem a James Parkinson (PEARCE, 1989).

Vale ressaltar, que nos relatos de James Parkinson foram descartados comprometimentos cognitivos, os quais, atualmente, estão entre os sintomas não motores da DP (BRAAK et al., 2003; BRAAK; DEL TREDICI, 2017; HÖGLINGER et al., 2015;

PALACIOS-SÁNCHEZ et al., 2017; SANTOS et al., 2013; YARNALL; ARCHIBALD; BURN, 2012). Quase um século depois, em 1912, Friedrich Heinrich Lewy relatou a presença de inclusões intracelulares em neurônios mesencefálicos de pacientes da DP, depois nomeados de corpos de Lewy, principal fator neurotóxico associado à morte dos neurônios dopaminérgicos (BRAAK et al., 2003; ENGELHARDT; ENGELHARDT, 2017; RODRIGUES E SILVA et al., 2010). Mais tarde, em 1925 Foix e Nicolesco mostraram a morte de neurônios com alta pigmentação de neuromelanina em regiões mesencefálicas de pacientes com DP, com ênfase para a substância negra (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2010). Posteriormente, a identificação da depleção de DA em núcleos estriatais possibilitou associar a diminuição desse neurotransmissor à perda dos neurônios mesencefálicos, denominados neurônios dopaminérgicos, os quais, sua morte, estaria envolvida com o surgimento dos sintomas motores da DP (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; DE FREITAS et al., 2016; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2010; MHYRE et al., 2012; SANTOS et al., 2013). Sem dúvida, esses estudos foram importantes para a caracterização atual da DP, uma vez que, na época, não existiam métodos de avaliação e classificação sofisticados. Desde então, muitos estudos têm sido realizados para esclarecer as características etiológicas e mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DP.

Desde que foi descrita pela primeira vez, as causas que iniciam e que estão envolvidas na progressão da DP ainda permanecem desconhecidas. Nessa linha, vários estudos foram realizados para entender a etiologia e as características fisiopatológicas da DP. Etiologicamente, a DP é classificada como uma doença multissistêmica, resultando da convergência de diferentes fatores, sejam eles intrínsecos ou extrínsecos ao meio celular, genéticos, ambientais e envelhecimento. Entre os principais fatores de risco associados a etiopatogênese da doença, estão as mutações genéticas, disfunção mitocondrial, desregulação da homeostase proteica, neuroinflamação, excitotoxicidade ao glutamato, envelhecimento e a exposição a fatores ambientais, como neurotoxinas, pesticidas, herbicidas e metais pesados (GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2010; LU et al., 2004; MATTSON; MAGNUS, 2006; RAWJI et al., 2016).

Fisiopatologicamente, a doença está relacionada à degeneração seletiva e progressiva de neurônios dopaminérgicos localizados em regiões mesencefálicas, SNpc e área tegmentar ventral (VTA – *ventral tegmental area*), de onde enviam projeções para o estriado (via estriatal), regiões límbicas (via mesolímbica) e regiões corticais (via mesocortical) (CAMINITI et al., 2017; FEARNLEY JM; LEES AJ, 1991; GREFFARD et al., 2006; HALLIDAY et al., 2014). No entanto, a maior parte dos neurônios dopaminérgicos afetados estão concentrados na

SNpc, provocando uma diminuição da liberação de DA no estriado, levando às disfunções motoras, como bradicinesia, tremor em repouso, rigidez muscular e alteração da postura e na marcha à medida que a doença progride (ANDICA et al., 2018; BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; CAMINITI et al., 2017; DE FREITAS et al., 2016; PARK et al., 2018; SANTOS et al., 2013; VIDYADHARA et al., 2017; YARNALL; ARCHIBALD; BURN, 2012).

A disfunção dopaminérgica tem sido associada a diversos mecanismos os quais são poucos compreendidos, mas a superexpressão de α -syn e a formação de corpos de Lewy, associada a essa proteína, são os principais mecanismos neuropatológicos associados à morte dos neurônios dopaminérgicos na DP (BRAAK et al., 2003). Entretanto, outros mecanismos também têm sido associados à disfunção dopaminérgica, como o estresse oxidativo (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019), seja produzido pela degradação da DA ou mecanismos subjacentes aos processos de degradação e acúmulo proteico, especialmente de α -syn (GANGULY et al., 2018), disfunção mitocondrial (RYAN et al., 2015; WINKLHOFER; HAASS, 2010), neuroinflamação (CRABBÉ et al., 2019; VIVEKANANTHAM et al., 2015), entre outros (ZHOU et al., 2019), sejam eles provocados por alterações genéticas, exposição a fatores ambientais ou pela convergência entre os diversos fatores. Por outro lado, além do comprometimento dopaminérgico, a disfunção de outras vias, noradrenérgica e serotoninérgica, também tem sido associada aos sintomas motores e, principalmente, não motores da DP (HALLIDAY et al., 2014; HOU et al., 2017; LEAL et al., 2019a; LUO et al., 2017; MANN et al., 2018; WANG et al., 2009). No entanto, ainda não é possível explicar por que o sistema dopaminérgico apresenta uma maior susceptibilidade na evolução da doença.

2.2. Envelhecimento, fatores genéticos e ambientais e o risco para doença de Parkinson

O envelhecimento é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sugerindo que alguns grupos celulares sejam mais vulneráveis, como as células do sistema nervoso. Dessa forma, com o aumento da expectativa de vida da população mundial, as doenças neurodegenerativas, associadas ao envelhecimento, como doença de Alzheimer, doença de Parkinson, e Esclerose Lateral Amiotrófica, têm aumentado significativamente (HIRTZ et al., 2007). Nesse espectro, a DP se destaca como a desordem do movimento mais comum entre as doenças neurodegenerativas e a segunda doença neurodegenerativa com maior incidência na população mundial, perdendo

apenas para doença de Alzheimer (DE LAU; BRETELER, 2006; RAY DORSEY et al., 2018; WIRDEFELDT et al., 2011). De forma semelhante às outras doenças neurodegenerativas já mencionadas, a DP afeta, principalmente, pessoas acima de 65 anos de idade, no entanto, alguns casos podem se manifestar antes dos 60 anos de idade (MANTRI et al., 2019; MICHEL; HIRSCH; HUNOT, 2016; MOISAN et al., 2016; RAY DORSEY et al., 2018).

A DP tem maior incidência em homens do que em mulheres, e esse índice aumenta à medida que a idade avança (HIRSCH et al., 2016; MOISAN et al., 2016; RIEDEL et al., 2016). A taxa de incidência em homens acima de 40 anos de idade é de 61,21 casos por 100.000 habitantes, enquanto em mulheres, da mesma faixa etária, a incidência é de 37,55 casos por 100.000 habitantes. A taxa de incidência entre as mulheres aumenta constantemente, de 3,26 casos por 100.000 habitantes até os 49 anos para 103,48 casos até os 80 anos, sendo o pico entre 70 a 79 anos de idade. Em homens nas mesmas faixas etárias, a taxa de incidência aumenta de 3,37 para 258,47 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, e essa taxa cresce à medida que aumenta a sobrevida dos pacientes (ELBAZ et al., 2015; HIRSCH et al., 2016). Do mesmo modo, baseado em estudos com pessoas acima de 65 anos de idade, a prevalência da DP é de aproximadamente 1680 casos por 100.000 habitantes, sendo mais prevalentes em homens, 1729 casos por 100.000 habitantes, do que em mulheres, 1644 casos por 100.000 habitantes, e esses números aumentam para idades mais avançadas (ELBAZ et al., 2015; PRINGSHEIM et al., 2014; RIEDEL et al., 2016). No entanto, alguns estudos mostram diferentes taxas quando são restritos a regiões geográficas específicas (ELBAZ et al., 2015; MOISAN et al., 2016; MUANGPAISAN; HORI; BRAYNE, 2009; RAY DORSEY et al., 2018).

A DP afeta pessoas de todas as raças e etnias em todo o mundo. No entanto, alguns estudos apontam uma maior prevalência em pessoas brancas em comparação a negros e asiáticos, sugerindo que a DP é relativamente mais frequente na população ocidental (ABBAS; XU; TAN, 2018; PRINGSHEIM et al., 2014; SAUERBIER et al., 2018; WRIGHT WILLIS et al., 2010). Por outro lado, a DP por ser uma doença multifatorial, outros estudos sugerem que esses grupos étnicos menos afetados, podem expressar variedades fenotípicas da DP, as quais podem estar associadas a genes específicos nessas populações, bem como à expectativa de vida regionais e diferenças socioculturais, geográficas, genéticas e ambientais que podem influenciar no risco de desenvolver DP em diferentes grupos étnicos (ABBAS; XU; TAN, 2018; OKUBADEJO et al., 2018; SAUERBIER et al., 2018).

Além disso, a DP é cerca de duas vezes mais comum em homens do que em mulheres, da mesma forma que a idade de início é ligeiramente mais tarde com sintomas motores mais

brandos em mulheres, quando comparado a homens (ELBAZ et al., 2015; HAAXMA et al., 2007; HIRSCH et al., 2016; MOISAN et al., 2016; PRINGSHEIM et al., 2014; RIEDEL et al., 2016). Essa maior preferência pelo sexo masculino pode estar relacionada a uma maior atividade do estrogênio em mulheres, que por sua vez, pode levar a níveis mais altos de DA no estriado, provocando um efeito protetivo dos neurônios dopaminérgicos ou a uma progressão mais lenta da doença (HAAXMA et al., 2007), como também observado em modelos experimentais (BISPO et al., 2019).

Já se passaram mais de dois séculos após a descrição da DP e muitos avanços sobre a sintomatologia e mecanismos fisiopatológicos envolvidos na morte dos neurônios dopaminérgicos foram alcançados. Mas, apesar de todo conhecimento sobre a doença, ainda não se sabe qual o gatilho que desencadeia a DP. No entanto, o envelhecimento do sistema nervoso central, juntamente com a interação entre fatores genéticos e ambientais são os principais fatores de risco associados ao início da doença (BALL et al., 2019; KOLBER; KRÜGER, 2019; PAJARILLO et al., 2019).

Dentre os principais fatores de risco associados às doenças neurodegenerativas, entre elas a DP, o envelhecimento tem sido um dos fatores cruciais associados a essas doenças, uma vez que estudos epidemiológicos mostram um aumento progressivo na taxa de incidência e prevalência à medida que envelhecemos, principalmente a partir dos 60 anos de idade (HIRSCH et al., 2016; HIRTZ et al., 2007). Acredita-se que essa maior vulnerabilidade dos idosos às doenças neurodegenerativas esteja relacionada à perda de neurônios ao longo de toda a vida e não apenas durante o envelhecimento. Nas primeiras semanas após o nascimento, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, iniciado no período pré-natal, é observado um padrão acentuado de apoptose neuronal seguido por um declínio na idade adulta, mantendo-se até o envelhecimento (WHITE; BARONE, 2001). Essa perda constante de neurônios ao longo da vida e a deficiência na reposição dessas células na maioria dos núcleos cerebrais, frequentemente, pode levar à leves alterações cognitivas, tremor e fraqueza muscular que podem ser consideradas normais, mas por algum motivo, em alguns casos, essas alterações são mais agressivas, evoluindo para um quadro patológico associado, na maioria dos casos, às doenças neurodegenerativas (HOFER; BERG; ERA, 2003; MATTSON; MAGNUS, 2006). No entanto, ainda não se sabe por que alguns grupos neuronais são mais susceptíveis ao envelhecimento levando a desordens neurodegenerativas. Estudos têm mostrado que durante o envelhecimento alguns mecanismos envolvidos na desregulação de proteínas do ciclo celular, acúmulo de proteínas mal formadas, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, disfunção de

macrófagos e microglias, alterações de fatores pró e anti-inflamatórios, podem estar associados a mutações genéticas e fatores ambientais específicos e influenciar a susceptibilidade neuronal (BILLINGSLEY et al., 2019; LU et al., 2004; MATTSON; MAGNUS, 2006; RAWJI et al., 2016; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Por outro lado, durante o envelhecimento é observado um aumento de danos no ácido desoxirribonucleico (DNA - *deoxyribonucleic acid*) e na expressão de genes que medeiam as respostas ao estresse oxidativo, além de uma redução na expressão de genes específicos que desempenham a função neuronal, quando comparado a pessoas na idade adulta jovem (LU et al., 2004). Essa alteração na expressão gênica pode ser resultado de um mal funcionamento do sistema de reparo do DNA, que pode estar relacionado à maior expressão de proteínas (GENCER et al., 2012; LU et al., 2004) observado em casos de doenças neurodegenerativas. Além dessa relação entre o envelhecimento e um sistema de reparo do DNA defeituoso, Sepe et al. (2016) mostram que deficiência no sistema de reparo de excisão de nucleotídeos (um tipos de sistema de reparo de DNA), que tem uma relação com o sistema dopaminérgico, atuando principalmente em lesões causadas por danos oxidativos, provoca uma maior susceptibilidade de camundongos à neurotoxina MPTP (droga utilizada para induzir lesão dopaminérgica em modelos animais da DP), sugerindo que deficiência nesse sistema de reparo pode tornar o sistema dopaminérgico vulnerável a fatores ambientais, como os pesticidas, e mutações genéticas (GENCER et al., 2012; SEPE et al., 2016). Outros estudos também mostram uma associação entre a DP e uma falha nos sistemas que atuam na síntese, maturação e degradação de proteínas, que podem levar ao acúmulo de proteínas danificadas ou malformadas dentro e fora do neurônio levando à disfunção neuronal (FUSSI et al., 2018; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, 2010; JIANG et al., 2019; MCNAUGHT et al., 2001; SKIBINSKI et al., 2017; THIBAudeau; ANDERSON; SMITH, 2018; ZHOU et al., 2019). No entanto, esses mecanismos não explicam completamente a patogênese da DP, uma vez que a doença é considerada multifatorial. Nesse sentido, percebe-se que o envelhecimento associado a interação entre fatores genéticos e ambientais pode ser determinante para a condição patológica da DP.

Por ser uma doença sem uma causa definida, a maioria dos casos da DP se manifesta de maneira esporádica e apenas 15% dos casos apresentam um histórico familiar de predisposição genética. No entanto, nas últimas décadas se obteve grandes avanços na identificação de genes envolvidos na patogênese da DP e atualmente cerca de 23 *loci* e 19 genes são associados a algum tipo de parkinsonismo, seja na forma hereditária ou esporádica da

doença (DENG; WANG; JANKOVIC, 2018). Desses *loci* cromossômicos envolvidos na patogênese da doença, dez são autossômicos dominantes, nove autossômicos recessivos e quatro genes ainda não foram identificados (Tabela 1) (DENG; WANG; JANKOVIC, 2018; KALINDERI; BOSTANTJOPOULOU; FIDANI, 2016). Apesar desses genes estarem associados à DP, eles apresentam características patológicas distintas quanto a idade de início, sintomatologia, velocidade de progressão e agressividade da doença. Além disso, eles podem apresentar diferentes mutações ou variações genéticas, as quais contribuem para esse gradiente de características patológicas e um maior risco para a DP (DENG; WANG; JANKOVIC, 2018; DENG; YUAN, 2014; KALINDERI; BOSTANTJOPOULOU; FIDANI, 2016).

Entre os genes autossômicos dominantes, os mais estudados são o gene que codifica a proteína α -syn (*SNCA*) e o gene quinase-2 rica em leucina (*LRRK2 - Leucine rich repeat kinase 2*). O gene *SNCA* destaca-se por ter sido o primeiro gene associado à doença, pela superexpressão e acúmulo de proteína, provocados por mutações (A53T, A30P, H50Q, E46K, G51D e A53E), duplicções ou triplicações desse *locus* gênico e por ser uma das principais causas da morte dos neurônios dopaminérgicos na DP (BRAAK et al., 2003; DENG; WANG; JANKOVIC, 2018; DENG; YUAN, 2014; KALINDERI; BOSTANTJOPOULOU; FIDANI, 2016; KASTEN; KLEIN, 2013; POLYMEROPOULOS et al., 1996; SINGLETON et al., 2003). O gene *LRRK2* está envolvido com mutações genética mais comuns entre os pacientes da DP, tanto na forma familiar quanto na forma esporádica da doença (BERG et al., 2005). Da mesma forma, os genes autossômicos recessivos que recebem mais atenção, são os genes que codificam as proteínas ligase ubiquitina E3 RBR parkin (*PRNK*), quinase-1 induzida por PTEN (*PINK1*) e desglucose associada ao parkinsonismo (*DJ-1*) por apresentarem mais de 200 mutações genéticas e por representarem as causas mais grave e mais comuns de parkinsonismo juvenil autossômico recessivo (ABBAS et al., 1999; FERREIRA; MASSANO, 2017; KASTEN et al., 2018), além da possível participação, dessas proteínas, em uma via comum contra estresse oxidativo e danos mitocondriais (FITZGERALD; PLUN-FAVREAU, 2008; KASTEN et al., 2018; REQUEJO-AGUILAR et al., 2015; ZHANG et al., 2017).

Tabela 1: *Loci* gênicos envolvidos na patogênese da doença de Parkinson.

<i>Locus</i> gênico	Gene	Proteína codificada	Início da doença	Característica fisiopatológica	<i>Locus</i> de risco para DP esporádica
Herança Autossômica Dominante					
PARK1/PARK4 (4q22.1)	<i>SNCA</i>	α -syn	Precoce ou tardio*	Corpos de Lewy	<i>Locus de risco</i>
PARK3 (2p13)	<i>Não confirmado</i>	<i>Não confirmado</i>	Tardio	?	
PARK5 (4p13)	<i>UCHL1</i>	Terminal C da ubiquitina hidrolase	Precoce ou tardio*	DSUP	
PARK8 (12q12)	<i>LRRK2</i>	Quinase-2 rica em leucina	Tardio	Corpos de Lewy e disfunção lisossomal	<i>Locus de risco</i>
PARK11 (2q37.1)	<i>GIGYF2</i>	Proteína GYF2 interagindo a GRB10	Tardio	Disfunção dos receptores de insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina	
PARK13 (2p13.1)	<i>HTRA2</i>	Htra-serina peptidase 2	Tardio ou precoce*	DM	
PARK17 (16q11.2)	<i>VPS35</i>	Proteína vacuolar 35	Tardio	Disfunção da via de sinalização Wnt e transportador de metal/ferro	
PARK18 (3q27.1)	<i>EIF4G1</i>	Fator 4 y-1 de iniciação da tradução eucariótica	Tardio	DM	
PARK21 (20p13)	<i>TMEM230</i>	Proteína transmembrana 230	Tardio ou precoce*	Corpos de Lewy e disfunção no transporte endossômico	
PARK22 (7p11.2)	<i>CHCHD2</i>	<i>coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2</i>	Tardio ou precoce*	DM	
(11p15.4)	<i>RIC3</i>	Chaperona do receptor acetilcolina RIC3	Tardio ou precoce*	Disfunção do receptor nicotínico CHRNA7	
Herança Autossômica Recessiva					
PARK2 (6q26)	<i>PRKN</i>	Parkina (Ubiquitina ligase E3)	Precoce	DM e DSUP	
PARK6 (1p36)	<i>PINK1</i>	Quinase-1 induzida por PTEN	precoce	DM e DSUP	
PARK7 (1p36.23)	<i>DJ-1</i>	Desglicase associada ao parkinsonismo	Precoce	DM e estresse oxidativo	
PARK9 (1p36.13)	<i>ATP13A2</i>	ATPase lisossomal tipo P5	Precoce	Disfunção do retículo endoplasmático e endolisossomal	
PARK14 (22q13.1)	<i>PLA2G6</i>	Fosfolipase A2 grupo VI	Precoce	DM e peroxidação lipídica	
PAR15 (22q12.3)	<i>FBXO7</i>	Proteína F-box 7	Precoce	DM	
PARK19 (1p313)	<i>DNAJC6</i>	Família de proteínas de choque térmico DnaJ (Hsp40) membro C6	Precoce	Disfunção metabólica do receptor de DA, disfunção endocitose mediada por caltrina e disfunção da reciclagem de vesículas sinápticas.	
PARK20 (21q22.1)	<i>SYNJ1</i>	Sinaptojanina 1	Precoce	Disfunção endocitose mediada por caltrina e disfunção da reciclagem de vesículas sinápticas.	
PARK23 (15q22.2)	<i>VPS13C</i>	Proteína vacuolar 13 homólogo C	Precoce	DM e disfunção mitofigica	
Herança Ligada ao X					
PARK12 (Xq21-q25)	<i>Não confirmado</i>	<i>Não confirmado</i>	Tardio	?	
Genes Desconhecidos					
PARK10 (1p32)	<i>Não confirmado</i>	<i>Não confirmado</i>	Tardio	?	<i>Locus de risco</i>
PARK16 (1q32)	<i>Não confirmado</i>	<i>Não confirmado</i>	?	?	<i>Locus de risco</i>
Outros Genes					
(1q22)	<i>GBA</i>	Proteína glicocerebrosidase	Precoce	Disfunção da enzima lisossomal	<i>Locus de risco</i>

(*) poucos casos; (?) sem informação; (DM) disfunção mitocondrial; (DSUP) disfunção do sistema ubiquitina-proeassoma; (α -syn) α -sinucleína.

Além dos casos hereditários da DP, vários outros *loci* gênicos e variantes genéticos que surgem aleatoriamente e com maior frequência na população, são potenciais fatores de risco

para a doença na forma esporádica (DENG; WANG; JANKOVIC, 2018; KALINDERI; BOSTANTJOPOULOU; FIDANI, 2016). Entre os principais genes que apresentam uma associação de risco mais evidente são os genes da *SNCA* (variante Rep1) (LEE et al., 2015b; SHU et al., 2018), *LRKK2* (variantes R1628P e G2385R) (GOPALAI et al., 2014; SHU et al., 2019), *GBA* (ARKADIR et al., 2019; BLAUWENDRAAT et al., 2018) e *MAPT* (BJØRNARÅ et al., 2018; DAVIS et al., 2016). Ainda não se sabe exatamente por que alterações nesses genes são mais frequentes e predominantes na patogênese da DP, mas acredita-se que a associação com fatores ambientais específicos aumenta a suscetibilidade à forma esporádica da doença.

Nos últimos anos, a hipótese de que a interação entre fatores genéticos e ambientais aumenta o risco de DP tem sido cada vez mais consistente, uma vez que vários estudos mostram que pacientes expostos a algumas substâncias em determinados períodos da vida desenvolveram sintomas da doença em idade mais avançada, especialmente pessoas da zona rural expostas a pesticidas em lavouras agrícolas (CABALLERO et al., 2018; GUNNARSSON; BODIN, 2017, 2019; JAMES; HALL, 2015; KAB et al., 2017; NARAYAN et al., 2017). Além disso outros estudos relatam que a administração de substâncias como pesticidas ou neurotoxinas em modelos animais, podem levar a um quadro sintomatológico e fisiopatológico semelhante ao observado em pacientes da DP (CHINTA et al., 2018; HOU et al., 2017; LA COGNATA et al., 2018; MIYARA et al., 2016; SOUZA et al., 2018). Por outro lado, substâncias como tabaco (nicotina), cafeína, urato, álcool e a prática de exercício físico, entre outras, têm sido relacionadas a uma redução da progressão e um menor risco de DP (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; DELAMARRE; MEISSNER, 2017; MANALO; MEDINA, 2018; NICHOLATOS et al., 2018; PAUL et al., 2019). No entanto, ainda é controverso a verdadeira participação dessas substâncias para o risco da doença, mas o entendimento da relação entre fatores ambientais e genéticos são determinantes para esclarecer os mecanismos patogênicos da doença (DUTHEIL et al., 2010; GUTTUSO et al., 2019; LUAN et al., 2018; POSTUMA et al., 2017).

2.3. Circuito e susceptibilidade neuronal da doença de Parkinson

Apesar da influência dos fatores genéticos e ambientais na patogênese das doenças neurodegenerativas, uma das características básicas comum a essas doenças é a vulnerabilidade seletiva de grupos de neurônios específicos afetados nessas desordens. No geral, esses neurônios são tipicamente grandes, mielinizados que se projetam para outras regiões cerebrais

ou do sistema nervoso central para alvos periféricos (MATTSON; MAGNUS, 2006). Dentre os distúrbios neurodegenerativos associados à idade, os principais tipos neuronais afetados, na doença de Alzheimer, são os neurônios piramidais hipocâmpais e corticais (MANN, 1996; RODRIGUES; FREITAS, 2017), neurônios motores superiores e inferiores na Esclerose Lateral Amiotrófica (HADZIPASIC et al., 2014; ROWLAND; SHNEIDER, 2001; SANKARANARAYANI et al., 2010) e os neurônios dopaminérgicos na DP (ANDICA et al., 2018; CAMINITI et al., 2017; FEARNLEY JM; LEES AJ, 1991).

A fisiopatologia da DP foi melhor compreendida com o entendimento funcional dos circuitos dos núcleos da base e participação da DA na execução e controle dos movimentos voluntários (CALIGIORE; MANNELLA; BALDASSARRE, 2019; MALLET et al., 2019). Os núcleos da base estão conectados ao córtex cerebral formando um circuito representado por um conjunto de neurônios corticais e mesencefálicos, formado pelo estriado (núcleo caudado e putâmen), globo pálido externo (GPe), globo pálido interno (GPi), núcleo subtalâmico (NST), SNpc e substância negra parte reticulada (SNr). O estriado, principal núcleo de entrada de projeções corticais, é composto por neurônios espinhosos médios (NEM), GABAérgicos, neurônios produtores de ácido gama-aminobutírico (GABA - *Gamma-aminobutyric acid*), que expressam receptores dopaminérgicos D1 e D2 (GAGNON et al., 2017) e esses neurônios são projetados para GPi/SNr e GPe. Por outro lado, GPi e SNr são os principais núcleos de saída, com projeções inibitórias tônica para o tálamo, o qual envia suas projeções excitatórias para o córtex motor fechando o circuito (DELONG; WICHMANN, 2015; MALLET et al., 2019; OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010).

A modulação do movimento voluntário pelos núcleos da base se dá pela interação entre dois circuitos estriatais representados pela via direta – monossináptica e pela via indireta – polissináptica. Resumidamente, impulsos corticais glutamatérgicos enviados ao estriado estimulando, paralelamente, os NEM-D1 e NEM-D2 seguem caminhos distintos. Pela via direta os NEM-D1 enviam impulsos inibitórios fásicos ao GPi/SNr reduzindo a inibição tônica desses núcleos ao tálamo, permitindo-o enviar impulsos excitatórios glutamatérgicos ao córtex motor favorecendo o movimento voluntário. Pela via indireta, os NEM-D2 enviam impulsos inibitórios fásicos ao GPe, reduzindo a inibição tônica ao NST e GPi, permitindo que o NST, o qual também recebe impulsos excitatórios hiperdiretos do córtex cerebral, envie sinais excitatórios glutamatérgicos ao GPi/SNr, os quais inibirão os impulsos glutamatérgicos do tálamo ao córtex motor, inibindo os movimentos voluntários, principalmente, movimentos indesejados. Além da estimulação glutamatérgica cortical, os NEM-D1 e D2 estriatais também

recebem aferências dopaminérgicas da SNpc, as quais estimularão o movimento através da ação da DA nos receptores D1 e D2 desses neurônios. Nos NEM-D1, via direta, a DA tem ação excitatória em D1, proporcionando maior estimulação dessa via, inibindo GPi/SNr e liberando o tálamo, estimulando o movimento. Nos NEM-D2, via indireta, a DA tem ação inibitória D2, permitindo que GPe iniba o NST, impedindo-o de estimular GPi/SNr, liberando o tálamo para enviar sinais excitatórios ao córtex motor estimulando o movimento. Logo, a ação da DA na via direta e indireta favorece o movimento voluntário (DELONG; WICHMANN, 2015; MALLET et al., 2019; OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010).

Por outro lado, em uma condição patológica como na DP, a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc e a consequente depleção de DA no estriado, na via direta, reduz a estimulação dos NEM-D1, os quais reduzem a inibição ao GPi/SNr, permitindo assim a inibição do tálamo e a redução de estímulos excitatórios ao córtex motor. Na via indireta, a depleção de DA provoca menor inibição dos NEM-D2, os quais promovem inibição excessiva de GPe, liberando o NST para estimular GPi/SNr, fortalecendo a inibição talâmica e assim os estímulos ao córtex motor. Dessa forma, a depleção de DA estriatal provoca redução dos movimentos voluntários, associados a lentidão do movimento e o tremor em repouso em pacientes da DP (DELONG; WICHMANN, 2015; OBESO et al., 2008; REDGRAVE et al., 2010; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018). Além disso, a redução de DA prejudica a modulação dos interneurônios estriatais GABAérgicos, colinérgicos e colinérgicos com liberação dupla de acetilcolina e GABA, responsáveis por limitar os sinais glutamatérgicos corticais que estimulam os NEM (LOZOVAYA et al., 2018; LOZOVAYA; BEN-ARI; HAMMOND, 2018; OBESO et al., 2008) (Figura 1).

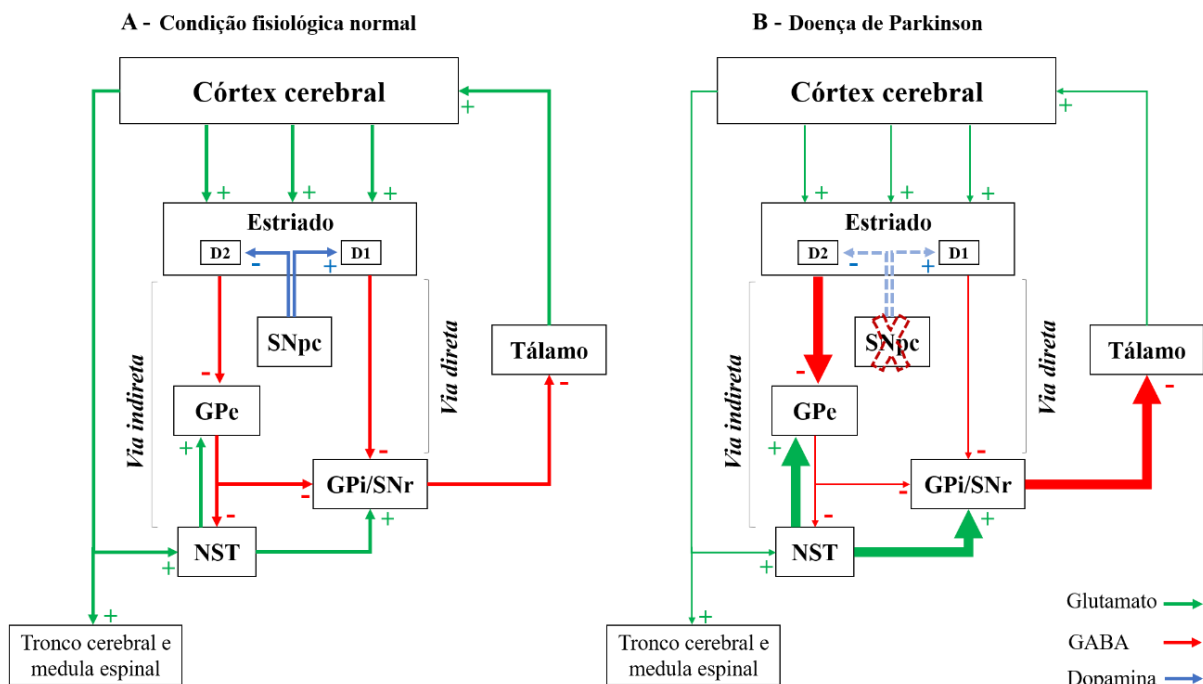


Figura 1: Representação esquemática do circuito córtico-estriato-pálido-talâmico-cortical. A) representa o funcionamento normal das vias direta e indireta. B) representa o funcionamento do circuito na condição patológica da doença de Parkinson. GPe: globo pálido externo; GPi: globo pálido interno; NST: núcleo subtalâmico; SNpc: substância negra parte compacta; SNr: Substância negra parte reticulada; D1 e D2; receptores de dopamina. Figura adaptada de DeLong; Wichmann (2015).

O aumento da inibição em GPe provocado pela depleção de DA estriatal, na via indireta, está associada à disfunção ou menor expressão do transportador GABAérgico GAT-3 (GAT - *Gamma-aminobutyric acid transporters*) em astrócitos, deixando o GABA por mais tempo na fenda sináptica e provocando uma inibição tônica em GPe (CHAZALON et al., 2018). De modo semelhante, a morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos na SNpc provoca um aumento da taxa de disparos dos neurônios do NST, fortalecendo a inibição talâmica pelos núcleos de saída e levando ao déficit motor observado em pacientes da DP (PARK et al., 2018). Também tem sido relatado que o déficit dopaminérgico provoca alterações na taxa de disparo dos neurônios da SNr de acordo com o grau de comprometimento dos neurônios dopaminérgicos, sugerindo que a disfunção da SNr progride discretamente correlacionada com a transição do estado prodrômico e sintomático da doença (WILLARD et al., 2019).

Apesar da degeneração dos neurônios dopaminérgicos na via nigrostriatal ser a responsável por provocar os sintomas motores da DP, estudos recentes têm mostrado que a disfunção de outras vias, noradrenérgica e serotoninérgica, podem estar associadas aos sintomas pré-motores da doença (BARBER et al., 2018; LEAL et al., 2019a; LI et al., 2018; LUO et al., 2017; POLITIS; NICCOLINI, 2015; RANA et al., 2018; WILSON et al., 2018, 2013).

Alguns indícios suportam a ideia de que a disfunção noradrenérgica está associada ao estágio prodromático da doença. De acordo com a hipótese do estadiamento de Braak, os neurônios do *locus coeruleus* (LC), responsável por enviar projeções noradrenérgicas para praticamente todas as regiões cerebrais (SARA, 2009), são afetados antes dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (BRAAK et al., 2003), da mesma forma que a densidade de neurônios no LC em idosos não diagnosticados com DP está associada à gravidade do parkinsonismo (BUCHMAN et al., 2012), indicando uma compatibilidade com a fase pré-motora da doença. Estudos experimentais mostram que lesões na via nigrostriatal provocam alteração na atividade elétrica dos neurônios noradrenérgicos no LC (WANG et al., 2009), o que pode estar associado ao distúrbio comportamental do sono, ansiedade e depressão em pacientes da DP (RANA et al., 2018). Além disso, lesões no LC podem provocar prejuízo cognitivo (LI et al., 2018; WILSON et al., 2013) e déficit na memória emocional e na memória espacial de trabalho pode ser restaurado pela administração de um inibidor do recaptador de NA (LUO et al., 2017) e por agonista do $RA\alpha_2$ (JING XIA CAI et al., 1993), respectivamente.

Além da participação da via noradrenérgica na fase pré-motora, alguns estudos mostram que a co-estimulação dos $RA\beta_1$ e β_2 aumenta o efluxo de DA no núcleo accumbens (AONO et al., 2013) e a administração de agonistas de $RA\beta_2$ reduziu a expressão de *SNCA* e α -syn *in vitro*, e atenuou a perda de neurônios dopaminérgicos *in vivo* (MITTAL et al., 2017), além de gerar um fenótipo anti-inflamatório em resposta à neurodegeneração induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (O'NEILL et al., 2019; O'NEILL; HARKIN, 2018; RYAN et al., 2013). A superexpressão de α -syn no LC reduz a produção de NA (KIM et al., 2014) e reproduz características morfológicas semelhantes à DP (HENRICH et al., 2018), sugerindo que a noradrenalina pode melhorar a condição motora e amenizar os danos provocados pela α -syn na DP. Além disso, outros estudos têm mostrado um papel neuroprotetor da NA na progressão da DP, uma vez que o pré-tratamento com NA reduziu a ativação microglial e a produção de mediadores pró-inflamatórios (JIANG et al., 2015) e a inibição seletiva do recaptador de NA isoladamente ou combinada ao antagonista do $RA\alpha_2$, inibe a ativação microglial, abole a neurodegeneração dopaminérgica e atenua a disfunção motora (YSSEL et al., 2018), bem como a estimulação dos $RA\alpha_1$ apresentaram resultados semelhantes (KREINER et al., 2019). De acordo com esses estudos, pode-se presumir que a redução do aporte noradrenérgico desempenha importante participação na progressão da DP, incluindo sua participação nos aspectos motores e não motores da doença. Essas evidências ganham mais força quando associadas aos resultados de estudos epidemiológicos que mostram uma associação do uso

crônico de PRO, um fármaco anti-hipertensivo, antagonista não seletivo para $\text{RA}\beta$, com o aumentam do rico para DP; enquanto fármacos agonistas $\text{RA}\beta_2$, utilizados para tratamento de asma, como o SALB por exemplo (Figura 2), estão associados a um menor risco de desenvolver a doença (GRONICH et al., 2018; HOSTE, 2015; MITTAL et al., 2017; SEARLES NIELSEN et al., 2018).

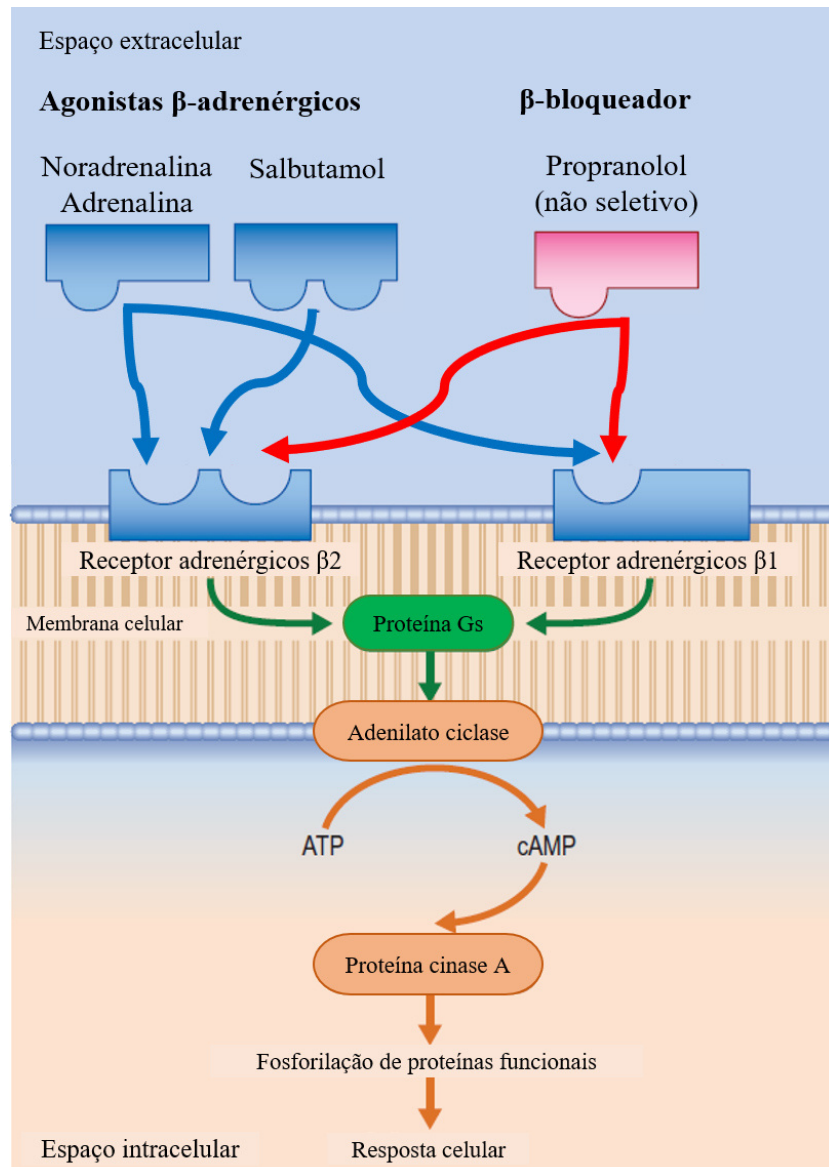


Figura 2: Mecanismo de ação do salbutamol e propranolol no receptores β -adrenérgicos. ATP: Adenosina trifosfato; cAMP: Monofosfato cíclico de adenosina. Figura adaptada de Hoste (2015).

Assim como a NA, a disfunção serotoninérgica tem importante participação na progressão DP, desde os sintomas não motores aos sintomas motores (POLITIS; NICCOLINI, 2015). Os neurônios serotoninérgicos têm sua origem nos núcleos da rafe localizados no tronco

cerebral de onde enviam suas projeções para várias regiões cerebrais (GAGNON et al., 2018; HORNUNG, 2003). Segundo o estadiamento de Braak, assim como acontece no LC, os neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, seriam afetados pela formação de corpos de Lewy, antes dos neurônios dopaminérgicos na SNpc (BRAAK et al., 2003), o que pode estar de acordo com a redução na marcação do transportador de 5-HT em diferentes núcleos cerebrais e estágios da doença nos pacientes (POLITIS et al., 2010). A redução na densidade de receptores 5-HT_{2A} em modelos animais da DP (MANN et al., 2018), pode justificar o surgimento de sintomas não motores na fase prodrômica da doença. Além disso, estudos de imagens mostram que pacientes com distúrbio do sono, fase de sono com movimento rápido dos olhos (REM), associado ao estágio pré-motor da DP, apresentam alto índice de apatia, implicando que essa condição emocional está associada à disfunção serotoninérgica no núcleo dorsal da rafe (BARBER et al., 2018), bem como em outras regiões cerebrais afetadas na patologia da DP (WILSON et al., 2018).

Além disso, estudos em modelos animais têm mostrado que o tratamento com baixa dose de RES, um bloqueador do transportador vesicular de monoaminas do tipo 1 e 2 (VMAT – *Vesicular monoamine transporter*), provoca prejuízo cognitivo, comportamento tipo ansiogênico, redução na imunorreatividade para 5-HT no núcleo dorsal da rafe, córtex pré-frontal medial (CPFm) e hipocampo, além de alterações ultraestruturais nos axônios dos neurônios serotoninérgicos em estágios iniciais do parkinsonismo em animais (LEAL et al., 2019a, 2019b). Da mesma forma, o modelo animal transgênico com superexpressão de α -syn apresentou redução significativa de projeções axonais serotoninérgicas, alterações morfológicas e aumento de varicosidades axonais no córtex pré-frontal. No entanto, também foi observado um aumento nos níveis de cinesina-1a, VMAT-2 e triptofano-hidroxilase-2 nos núcleos da rafe, o que aponta para um mecanismo compensatório do sistema serotoninérgico em condições mais graves da doença (WIHAN et al., 2019), ou ser resultado de uma axonopatia retrógrada (LEAL et al., 2019a).

Esses estudos demonstram que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos é crucial para o desequilíbrio do circuito córtico-estriato-pálido-talâmico-cortical que leva aos prejuízos motores observados na DP. Por outro lado, a ideia de que a disfunção de outras vias envolvidas, principalmente em estágios mais iniciais da doença, pode acelerar a progressão da DP, é cada vez mais evidente. Ainda não está claro se alguns grupos de neurônios apresentam maior suscetibilidade em detrimento a outros, ou se devido ao estágio silencioso da doença, alguns grupos neuronais foram mais negligenciados. No entanto, acredita-se que a suscetibilidade dos

neurônios afetados na DP, principalmente os neurônios dopaminérgicos, se deva à convergência de diversos fatores de risco intrínsecos e extrínsecos ou neurônio.

2.4. Mecanismos fisiopatológicos que influenciam a susceptibilidade neuronal na doença de Parkinson

Entre os fatores e mecanismos associados à susceptibilidade neuronal na DP, a síntese e acúmulo de neuromelanina, a disfunção mitocondrial e a superexpressão de α -syn têm sido associados a susceptibilidade neuronal, bem como ao comprometimento de outras vias neuronais associadas a DP.

A neuromelanina, pigmento escuro, sintetizado a partir da oxidação da DA, é característica dos neurônios catecolaminérgicos, principalmente os neurônios dopaminérgicos da SNpc e tem sido associada à patogênese da DP (VILA, 2019; XU; CHAN, 2015). Curiosamente, entre os mamíferos, a concentração de neuromelanina aumenta progressivamente à medida que, evolutivamente, aproxima-se da espécie humana, e está ausente em espécies menos derivadas (MARSDEN, 1961), bem como em roedores (FEDOROW et al., 2005). Nos humanos, a quantidade desse pigmento é extremamente alta comparada a outras espécies, sendo esse aumento relacionado ao avanço da idade, tornando mais próxima sua relação com a DP (XING et al., 2018).

Alguns estudos mostraram que a neuromelanina pode estar envolvida no processo de agregação de α -syn (HALLIDAY et al., 2005; XU; CHAN, 2015). Esse agregado proteico, além de estar associado à formação dos corpos de Lewy, atua possibilitando uma superexpressão de tirosinase em roedores. Por sua vez, a tirosinase é uma enzima associada a síntese da neuromelanina no tecido cerebral e, seu progressivo acúmulo, provoca disfunção no sistema de proteases, formação de inclusões citoplasmáticas, déficit motor e neurodegeneração nigroestriatal progressiva, semelhante ao observado em pacientes da DP (CARBALLO-CARBAJAL et al., 2019). Nesse sentido, o acúmulo desse pigmento ao longo da vida é sugerido como um fator determinante para o risco da DP.

Outro fator que chama atenção em relação a susceptibilidade neuronal na DP é a disfunção mitocondrial. Em condições fisiológicas normais, as mitocôndrias desempenham papel fundamental no funcionamento celular, com o fornecimento de adenosina trifosfato (ATP), participação na sinalização celular, produção de radicais livres e apoptose, os quais

podem estar alterados em condições patológicas (RYAN et al., 2015; WINKLHOFER; HAASS, 2010).

A associação entre disfunção mitocondrial e a vulnerabilidade neuronal na DP começou a ser investigada após a descoberta de que a exposição a uma neurotoxina, MPTP, e depois pesticidas, podem induzir ao parkinsonismo através da inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (BASTIOLI et al., 2019; CHINTA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2018; HSIEH; MOUNSEY; TEISMANN, 2011; LANGSTON et al., 1983; LANGSTON; BALLARD, 1983). É sugerido que o comprometimento da função dos complexos mitocondriais, em especial o complexo I, estaria diretamente associado a patogênese da DP, por provocar a redução na síntese de ATP e um aumento de espécies reativas de oxigênio (KEENEY et al., 2006), promover a morfologia e distribuição mitocondrial anormal (PARK et al., 2019), alteração no mecanismo de importação de proteínas mitocondriais (FRANCO-IBORRA et al., 2018), desregulação da homeostase de cálcio (TABATA et al., 2018), déficit na transmissão sináptica (BASTIOLI et al., 2019), prejudicar a proliferação celular (CABELLO-RIVERA et al., 2019), pode induzir a senescência celular (CHINTA et al., 2018) e deficiência na autofagia celular (MCWILLIAMS; MUQIT, 2017; WISE et al., 2018). No entanto, além da disfunção dos complexos transportadores de elétrons, estudos recentes mostram que vários genes ligados a função mitocondrial (Tabela 1) estão associados ao risco da DP, o quais, podem causar mecanismos fisiopatológicos semelhantes aos citados anteriormente (BILLINGSLEY et al., 2019; DENG; WANG; JANKOVIC, 2018). Logo, o entendimento da disfunção mitocondrial é crucial para a compreensão da susceptibilidade neuronal na DP. Mas, por outro lado, sua relação com a DP é altamente complexa, com múltiplos processos mitocondriais distintos, provavelmente envolvidos em diferentes estágios da doença.

Além da neuromelanina e da disfunção mitocondrial outro fator que afeta a susceptibilidade dos neurônios dopaminérgicos é a agregação proteica de α -syn, um dos principais componentes dos corpos Lewy e neurites de Lewy, relacionados à patogênese da DP (SPILLANTINI et al., 1997; VERMILYEA; EMBORG, 2015). A α -syn é uma proteína citosólica, abundante em todo cérebro, principalmente nos terminais pré-sinápticos, com peso molecular de 14 kDa, composta por 140 aminoácidos (VORONKOV et al., 2017). É codificada pelo gene *SNCA* e mutações que afetam o domínio N-terminal da proteína, bem como a duplicação ou triplicação desse *locus* gênico que provocam uma maior expressão de α -syn, estão relacionadas à DP na forma familiar (FERESE et al., 2015; POLYMERPOULOS et al.,

1996; SINGLETON et al., 2003; ZAFAR et al., 2018). Variantes e polimorfismos desse gene estão associados à forma esporádica da doença (NALLS et al., 2014; SIMÓN-SÁNCHEZ et al., 2009). Além disso, mutações em outros genes associados à DP também podem apresentar corpos de Lewy (BERG et al., 2005), sugerindo que a compreensão dos mecanismos subjacentes à síntese, função e degradação dessa proteína, seja fundamental para desvendar a patogênese da doença.

A α -syn está presente no meio intracelular em diferentes estados conformacionais, como em forma de monômeros, tetrâmeros, oligômeros, fibrilas e agregados (MANE; STEPANOVA, 2016; WONG; KRAINIC, 2017; ZHANG et al., 2018). Apesar de grande debate sobre os estados conformacionais da α -syn, nativamente ela se apresenta em conformações monomérica e tetramérica solúveis, em equilíbrio dinâmico. Os tetrâmeros são menos propensos à agregação e podem ser reduzidos a monômeros, então após modificações pós-transcricionais ou mutações no gene *SNCA*, há uma diminuição do estado tetramérico e um aumento de monômeros, os quais se tornam mais dobrados, podendo formar diversas conformações potencialmente tóxicas de espécies oligoméricas solúveis e fibrilares insolúveis (FUSCO et al., 2017; GANGULY et al., 2018; WONG; KRAINIC, 2017; ZHANG et al., 2018). Apesar das formas fibrilares serem um dos principais componentes dos corpos de Lewy, acredita-se que os oligômeros desempenham papel fundamental na toxicidade neuronal (FUSCO et al., 2017; ILJINA et al., 2017; ROBERTS; WADE-MARTINS; ALEGRE-ABARRATEGUI, 2015). No entanto, a toxicidade desses estados conformacionais, principalmente entre oligoméricos e fibrilares, é controverso (CHAVARRÍA et al., 2018; HAYDEN et al., 2015; ILJINA et al., 2017; LI et al., 2019; MAHUL-MELLIER et al., 2015). Apesar de ser uma proteína abundante no tecido nervoso, ainda não é bem compreendido qual a principal função da α -syn em condições fisiológicas normais, mas por ser predominante em terminais pré-sinápticos, acredita-se que a α -syn tenha um papel específico na liberação de neurotransmissores e na plasticidade sináptica, uma vez que sua ausência prejudica a função neuronal (BURRÉ et al., 2010; VORONKOV et al., 2017). Por outro lado, sua superexpressão pode provocar agregação proteica, junto a outras proteínas, formando os corpos de Lewy, os quais podem levar à morte dos neurônios dopaminérgicos por diferentes vias (BASTIOLI et al., 2019; FRAHM et al., 2018; GANGULY et al., 2018; KANG et al., 2018; MOSHAROV et al., 2009; TOLÖ et al., 2018; WONG; KRAINIC, 2017). Em contra partida, alguns estudos sugerem que a formação de corpos de Lewy seria um mecanismo de defesa devido a disfunção no sistema

de degradação proteica ubiquitina-proteassoma e autofagia-lisossomal (FUSSI et al., 2018; JIANG et al., 2019; MCNAUGHT et al., 2001; THIBAUDEAU; ANDERSON; SMITH, 2018).

Atualmente acredita-se que a deposição de α -syn em corpos de Lewy seja a principal causa da DP (Figura 3A). É sugerido que essa deposição inicie em regiões periféricas e ascendam para o cérebro por meio de seis estágios sequenciais: iniciando no bulbo olfatório, sistema nervoso autônomo visceral e núcleo motor dorsal dos nervos glossofaríngeo e vagal (estágio 1); avançando para bulbo e tegmento pontinho no tronco encefálico (estágio 2); seguindo para SNpc (estágio 3); córtex temporal (estágio 4) e progredindo para o neocórtex (estágio 5 e 6) (Figura 3B) (BRAAK et al., 2003; COLETTTO et al., 2019; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; HÖGLINGER et al., 2015; POEWE et al., 2017; SURMEIER; OBESO; HALLIDAY, 2017), no entanto, outras hipóteses não são descartadas, como a hipótese da telencefalização onde sugere que a atividade córtico estriatal pode ser um estressor crítico para os neurônios dopaminérgicos (DIEDERICH et al., 2019; FOFFANI; OBESO, 2018).

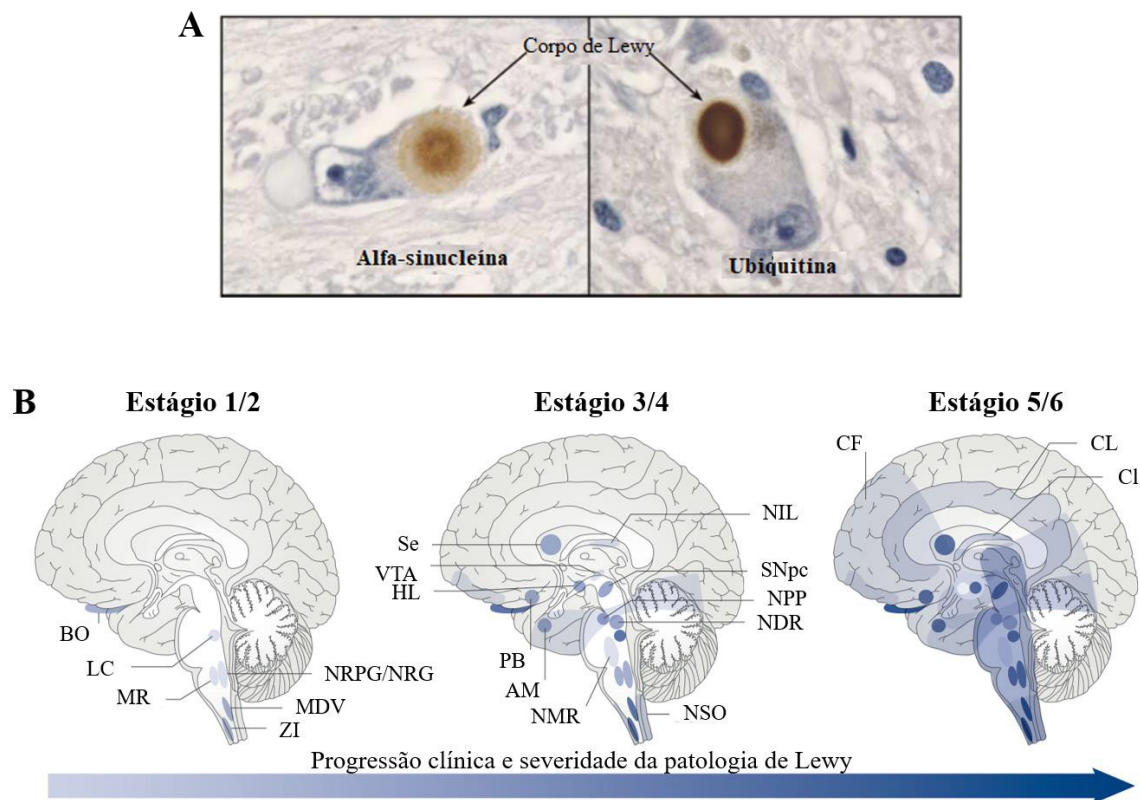


Figura 3: Representação esquemática do estadiamento da patologia de Lewy na doença de Parkinson. A) Marcação imuno-histoquímica demonstrando inclusões citoplasmáticas, corpos de Lewy, com deposição de α -syn e ubiquitina. B) Representação anatômica da propagação da patologia de Lewy ao longo do eixo caudo-rostral, a qual inicia em regiões mais periféricas e ascende para o cérebro através de seis estágios. AM, amígdala; BO, bulbo olfatório; CF, córtex frontal; CL, córtex límbico; CI, cláustro; HL, hipotálamo lateral; LC, locus coeruleus; MDV, núcleo motor dorsal do vago; MR, núcleo magnus da rafe; NDR, núcleo dorsal da rafe; NMR, núcleo mediano da rafe, NRGP/NRG, núcleo reticular paraventricular e gigantocelular; NPP, núcleo penduncular; NOS, núcleo do trato solitário; NIL, núcleos intralaminares; PB, Prosencéfalo basal; Se, septo; SNpc, substância negra parte compacta; VTA, área tegmentar ventral; ZI, zona incerta. Figura adaptada de Dauer; Przedborski (2003) e Surmeier; Obeso; Halliday (2017).

Além de afetar os neurônios dopaminérgicos, o acúmulo de α -syn também tem sido associado à susceptibilidade dos neurônios noradrenérgicos (HENRICH et al., 2018; MATSUI; KENMOCHI; NAMIKAWA, 2019). Segundo a hipótese da patologia de Braak, os corpos de Lewy afetam o LC (estágio 2) antes de afetar a SNpc (estágio 3) (Figura 3), sugerindo que o comprometimento da via noradrenérgica está associada a estágios iniciais da DP e contribui para a progressão da doença (BRAAK et al., 2003). Além disso, outros estudos mostram que superexpressão de α -syn provoca a degeneração dos neurônios noradrenérgicos no LC com características morfológicas semelhantes ao observado na doença (HENRICH et al., 2018), redução na expressão do transportador de noradrenalina (NAT - *Noradrenaline transporter*) (WERSINGER; JEANNOTTE; SIDHU, 2006) e interfere na regulação da transcrição de tirosina hidroxilase (TH) e dopamina β -hidroxilase (D β H) reduzindo a produção de NA (KIM

et al., 2014; KIM; MOON; CHOI, 2011), da mesma forma que o controle da expressão de α -syn previne contra a neurodegeneração monoaminérgica (ALARCÓN-ARÍS et al., 2018). Adicionalmente, a estimulação da via noradrenérgica, através dos RA β 2, pode reduzir a quantidade de RNAm do gene *SNCA* e a expressão de α -syn (MITTAL et al., 2017). Dessa forma, esses estudos mostram que α -syn pode afetar os neurônios noradrenérgicos e a homeostase de NA por diferentes mecanismos. No entanto, esses mecanismos subjacentes a associação entre a via noradrenérgica e α -syn não são bem compreendidos na progressão da DP, e estudos em modelos animais são importantes ferramentas para ajudar na compreensão desses mecanismos.

Apesar de estudos sobre esses fatores terem sido de grande importância na investigação sobre a susceptibilidade neuronal na DP, outros fatores, como estresse oxidativo (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019), neuroinflamação (CRABBÉ et al., 2019; VIVEKANANTHAM et al., 2015) e disfunção no sistema de proteases (MCNAUGHT et al., 2001; ZHOU et al., 2019) têm sido associados à morte dos neurônios dopaminérgicos na DP. No entanto, ainda não se sabe qual desses mecanismos é o evento primário na patogênese da doença.

2.5. Modelos animais para estudo da doença de Parkinson

Como discutido anteriormente, a DP é uma doença sem etiologia definida e cerca de 90% dos casos se manifestam de forma esporádica na população, o que implica que fatores de risco ambientais e genéticos contribuem para o surgimento da doença. Além disso, a variedade de mecanismos fisiológicos envolvidos na susceptibilidade neuronal, bem com a heterogeneidade de fenótipo clínico dos pacientes e a ausência de marcadores eficazes que possam identificar a doença em estágios iniciais, dificultam a busca por estratégias terapêuticas que possam controlar a progressão da doença.

Diante desse cenário complexo, estudos em modelos animais experimentais que representam características fisiopatológicas e clínicas da doença, tem possibilitado aprofundar nossa compreensão sobre a DP e outras doenças multifacetadas. No entanto, dificilmente um único modelo animal representará todas as características patológicas e clínicas da doença, sendo necessário uma grande diversidade de modelos animais que melhor representem as características da doença (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014).

A representação da DP em animais experimentais baseia-se em alterações genéticas, modelos animais com alterações nos principais genes envolvidos, principalmente os que representam a forma hereditária da doença, como por exemplo, *SNCA* (DUFFY et al., 2018; FRAHM et al., 2018), *LRRK2* (TOZZI et al., 2018), *PINK1* (TORRES-ODIO et al., 2017), *PARKIN* (MATHEOUD et al., 2019) e *DJ-1* (YANG et al., 2018), e na indução das características patológicas através de fármacos e neurotoxinas. Entre essas substâncias utilizadas, destacam-se agentes farmacológicos e ou tóxicos, como haloperidol (HERRERA-MEZA et al., 2014), lipopolissacarídeo (O'NEILL et al., 2019), RES (BISPO et al., 2019; CARLSSON, 1975; SANTOS et al., 2013), pesticidas (rotenona e paraquat/maneb) (HOU et al., 2017; WISE et al., 2018) e, os mais utilizados, 6-OHDA (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; PARK et al., 2018) e MPTP (FRANCO-IBORRA et al., 2018; VIDYADHARA et al., 2017). No entanto, apesar desses modelos genéticos conseguirem mimetizar mecanismos fisiopatológicos subjacentes a forma familiar da DP, eles não são os mais utilizados por não apresentarem um fenótipo patológico e comportamental mais próximo da maioria dos casos na condição humana. Por outro lado, os modelos animais induzidos por neurotoxinas, apesar de não apresentarem formação bem definida de corpos de Lewy, são os mais estudados por representarem com maior precisão a degeneração dos neurônios dopaminérgicos na via nigrostriatal, semelhante a casos da DP, acompanhada de déficits motores (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014).

Com base nos modelos animais da DP induzidos por neurotoxinas, destacamos os modelos induzidos por 6-OHDA, MPTP e RES. A 6-OHDA é uma neurotoxina catecolaminérgica seletiva, análoga a DA e NA, com alta afinidade com os transportadores de DA (DAT) e NA, por ser hidrofóbica, não atravessar a barreira hematoencefálica e precisa ser injetada diretamente no cérebro, principalmente na SNpc, feixe prosencefálico medial e estriado, e dependendo da concentração e local da injeção a degeneração dos neurônios dopaminérgicos podem levar de 12 horas a 3 semanas aproximadamente (BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; LU et al., 2018; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018). Esse modelo animal é amplamente estudado por provocar morte acentuada, principalmente, dos neurônios dopaminérgicos em um curto intervalo de tempo, levando à neurodegeneração dopaminérgica e a redução de DA estriatal, através da produção de peróxido de hidrogênio, espécies reativas de oxigênio e quinonas (Figura 4) (BOVÉ; PERIER, 2012; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007; SOTO-OTERO et al., 2000). No entanto, esse modelo não apresenta inclusões citoplasmáticas de corpos de Lewy e um quadro de morte neuronal

progressivo compatível com o surgimento gradual dos sintomas não motores e motores em pacientes da DP (POEWE et al., 2017).

O modelo animal da 6-OHDA tem sido alvo de crítica por não simular, de forma mais precisa, as condições patológicas da DP (LI et al., 2018; WILSON et al., 2018). Além disso, a disfunção motora observada em roedores segue um padrão rotacional devido a lesão unilateral provocada pela toxina, distante dos distúrbios motores observados na DP (RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007). Por outro lado, estudos recentes mostram que o modelo animal induzido por 6-OHDA é uma importante ferramenta para o estudo de diferentes mecanismos envolvidos na DP, uma vez que a susceptibilidade neuronal pode aumentar quando são associadas lesões em núcleos diferentes, por agentes variados (BENSAID et al., 2016). Lesões provocadas por essa neurotoxina podem permitir o estudo de mecanismos de agentes oxidantes (TONG et al., 2018), pró-inflamatórios (HAAS et al., 2016), disfunção glial (CHAZALON et al., 2018), atividade elétrica estriatal e mecanismos que levam à discinesia induzida por levodopa (PARK et al., 2018; RYAN; BAIR-MARSHALL; NELSON, 2018), entre outros (BECK et al., 2016; BOIX; VON HIEBER; CONNOR, 2018; GAGNON et al., 2017; HÖGLINGER et al., 2015).

Outra neurotoxina bastante utilizada para induzir parkinsonismo é a MPTP. Ela foi descoberta e associada a DP após usuários de drogas administrarem, por via intravenosa, heroína contaminada com MPTP e pouco tempo depois desenvolverem sintomas e neurodegeneração dopaminérgica semelhante a observada na doença (LANGSTON et al., 1983; LANGSTON; BALLARD, 1983). Desde então, essa toxina tem sido amplamente utilizada para indução do parkinsonismo, principalmente, em primatas não humanos e camundongos (BLESA; PRZEDBORSKI, 2014; TIEU, 2011). Além disso, por sua característica lipofílica, pode ser administrada perifericamente por diferentes vias, principalmente intraperitoneal, intramuscular e subcutânea (HUANG et al., 2018; PHILIPPENS et al., 2019; TIEU, 2011; VIDYADHARA et al., 2017).

No cérebro, a MPTP é capturado pela microglia e convertido em 1-metil-4fenil-2,3-dihidropiridínio pela enzima monoamina oxidase – B (MAO-B), seguido por oxidação formando o agente tóxico 1-metil-4fenilpiridínio (MPP⁺), o qual é transportado para o interior dos neurônios dopaminérgicos através do DAT. No meio intracelular a MPP⁺ inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétron mitocondrial, provocando a morte dos neuronal por diversos mecanismos discutidos anteriormente (Figura 4) (BASTIOLI et al., 2019; FRANCO-IBORRA et al., 2018; LANGSTON et al., 1983; LEAL et al., 2016; PARK et al., 2019). Assim como no modelo animal da 6-OHDA, a morte dos neurônios dopaminérgicos e a redução de

DA estriatal, dependendo da dose, pode ocorrer em poucas horas após a administração da toxina, bem como, os déficits motores que podem ser recuperados poucos dias após a administração aguda de MPTP, impossibilitam uma progressão dos sintomas motores característicos da DP (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007; SEDELIS; SCHWARTING; HUSTON, 2001; VIDYADHARA et al., 2017). Mas por outro lado, subtipos de neurônios dopaminérgicos da N_{Sp}c apresentam uma maior vulnerabilidade ao MPTP (POULIN et al., 2014), da mesma forma que os terminais sinápticos localizados no putâmen são mais afetados do que aqueles localizados no núcleo caudado, fenótipo fisiopatológico muito semelhante ao observado em casos da DP (BLESA et al., 2010).

Além das neurotoxinas 6-OHDA e MPTP, outra droga que se destaca na modelagem animal da DP é a RES, um alcaloide extraído da raiz da *Rauwolfia serpentina*, inicialmente utilizada como fármaco para o tratamento de paciente hipertensos, devido a sua potente ação hipotensiva (MCQUEEN; DOYLE; SMIRK, 1954). No entanto, Arvid Carlsson, após observar o estado deprimido, acinético, de pacientes hipertensos tratados com RES, demonstrou que esse efeito acinético em coelhos era revertido pela administração do precursor da DA, L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), constatando que a RES provocava a depleção de catecolaminas (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957). A partir desses achados, estudos subsequentes demonstraram que o tratamento L-DOPA podia controlar os sintomas motores de pacientes da DP (FAHN, 2008).

A RES é um bloqueador irreversível do VMAT do tipo 1 e 2, expresso principalmente no sistema nervoso periférico e central, respectivamente (ERICKSON; EIDEN, 1993). Por atravessar facilmente a barreira hematoencefálica e a membrana plasmática dos neurônios monoaminérgicos, bloqueia a proteína VMAT-2, impedindo o envesiculamento de DA, e outras monoaminas (Figura 4) (ERICKSON; EIDEN; HOFFMAN, 1992; LEAL et al., 2016; STAHL, 2018; YAMAMOTO et al., 2007), o que provoca um aumento da concentração de monoaminas citoplasmáticas e, conseqüentemente, a metabolização dessas substâncias gera espécies reativas de oxigênio, quinonas altamente reativas, que podem provocar estresse oxidativo, e danos celulares (LEÃO et al., 2015). Por essa característica peculiar de afetar os neurônios monoaminérgico, responsáveis pela produção de DA, NA e 5-HT, o modelo animal induzido por RES consegue mimetizar características sintomatológica, neuroquímica e farmacológica da DP (BISPO et al., 2019; LEAL et al., 2019a, 2019b; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013).

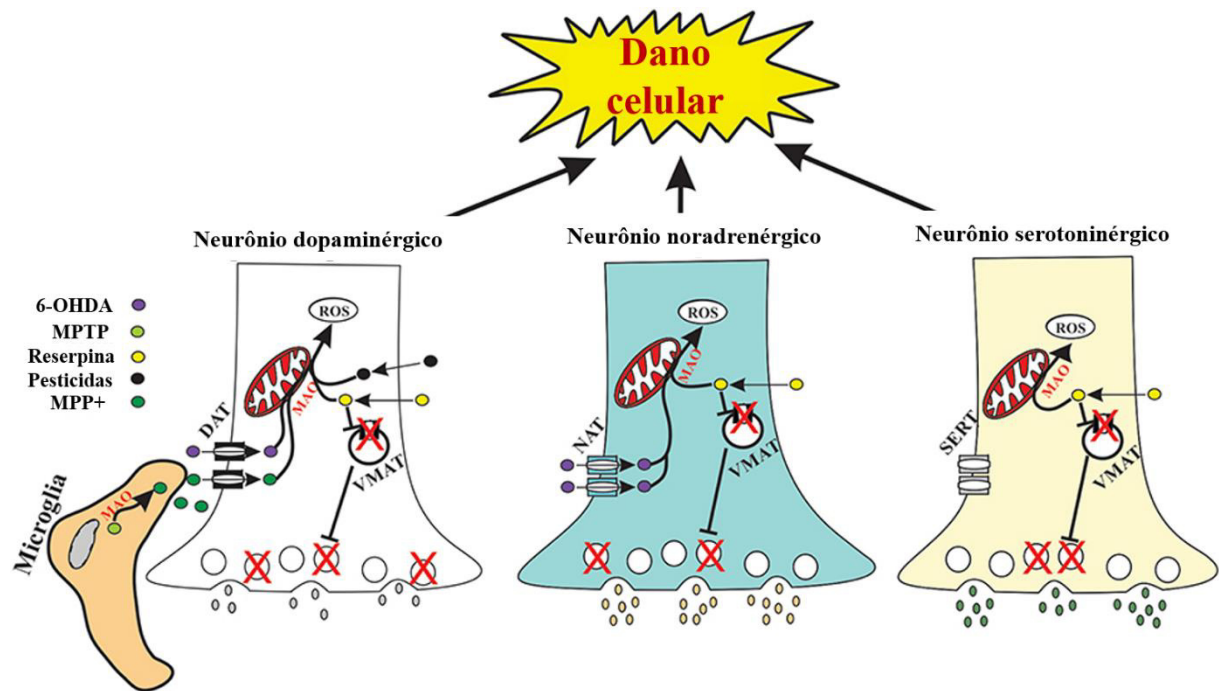


Figura 4: Representação esquemática do mecanismo de ação das neurotoxinas utilizadas na modelagem de modelos animais da doença de Parkinson. Diferente das demais toxinas, a reserpina atua nos diferentes neurônios monoaminérgicos, através do bloqueio irreversível do VMAT-2, provocando a depleção de DA, noradrenalina e serotonina na fenda sináptica. Figura adaptada de Leal et al. (2016).

Os modelos animais induzidos por 6-OHDA e MPTP têm como principal característica a redução abrupta dos neurônios dopaminérgicos, o que dificulta mimetização da característica progressiva dos sintomas motores e não motores da doença. Por outro lado, o modelo animal induzido por RES apresenta as características fisiopatológicas do parkinsonismo, semelhante ao observado em diferentes estágios da DP (Figura 5) (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). Esse modelo animal tem um desenvolvimento gradual e progressivo dos sintomas motores e redução de células imunorreativas a TH (BISPO et al., 2019; DE FREITAS et al., 2016; SANTOS et al., 2013), aumento nos níveis de α -syn solúvel e peroxidação lipídica (LEÃO et al., 2017) que comprometem o funcionamento de outras vias, levando a sintomas não motores associados a estágios iniciais da DP (LEAL et al., 2019a, 2019b; LUO et al., 2017). Recentemente, um estudo em drosófila mostrou que RES pode provocar morte celular por inibição do fluxo autofágico (LEE et al., 2015a). Além disso, o modelo de RES tem apresentado boa resposta a novas substâncias com potencial terapêutico para a DP (BESERRA-FILHO et al., 2019; LINS et al., 2018; PERES et al., 2016).

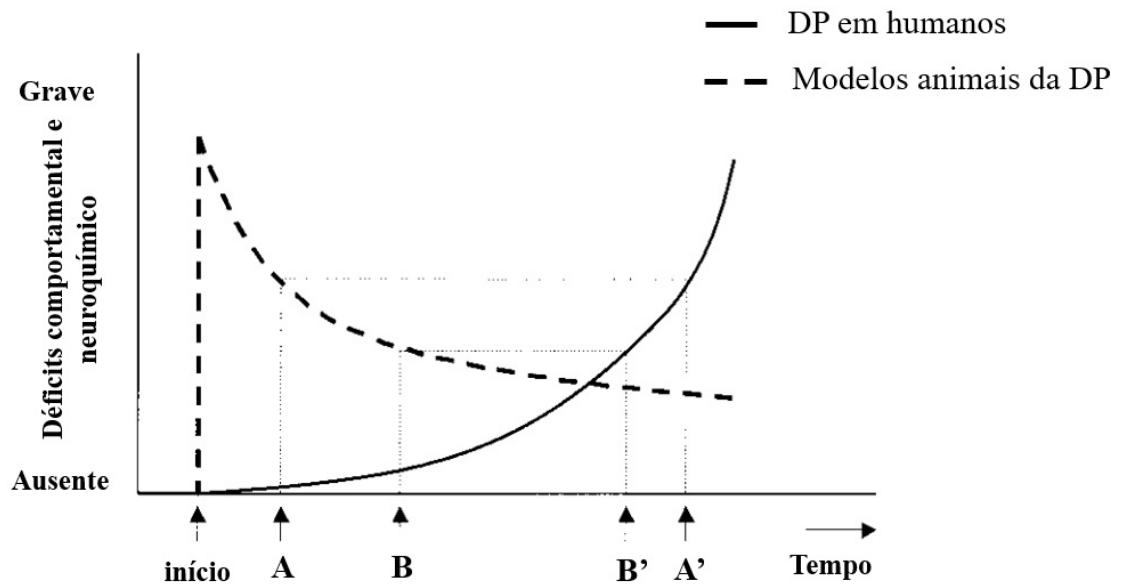


Figura 5: Representação esquemática da evolução da doença de Parkinson em humanos e os modelos animais induzidos por 6-OHDA e MPTP. Os nos modelos animais induzidos por 6-OHDA e MPTP apresentam alto nível de déficits comportamentais e neuroquímicos no início da doença e com o passar do tempo apresentam uma recuperação, enquanto a doença, em humanos, apresenta um aumento progressivo dos déficits comportamentais e neuroquímico. Figura adaptada de Deumens; Blokland; Prickaerts (2002).

Com base nessas características, a utilização do modelo animal induzido por RES é o mais indicado para o presente estudo. Uma vez que, há a necessidade de mimetizar a natureza progressiva da DP, frente a desafios sobre a via noradrenérgica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a participação dos receptores noradrenérgicos frente aos déficits monoaminérgicos induzido por reserpina.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da manipulação farmacológica dos RA β e sobre os déficits motores do modelo experimental de parkinsonismo;

Avaliar o efeito da manipulação farmacológica dos RA β frente aos déficits monoaminérgicos e a expressão de tirosina hidroxilase, dopamina β -hidroxilase e α -sinucleína no cérebro de ratos induzidos ao parkinsonismo;

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Animais

Foram utilizados 67 ratos Wistar de 6 e 8 meses de idade, com peso entre 350 a 500 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e mantidos no Biotério do Laboratório de Neurofisiologia da UFS. Os animais foram alojados, em número de no máximo 5 animais, em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm) com grade de aço inoxidável, sob condições de ventilação e temperatura controladas ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro de 12h/12h (luzes acesas às 6 h) e acesso livre à água e ração. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Sociedade Brasileira de Ciências e Animais de Laboratório (SBCAL) e pela lei brasileira para o uso de animais em pesquisas (Lei Arouca, nº 11.794/2008) e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da UFS (CEPA/UFS) sob protocolo de número 13/2018 (Anexo I). Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.

4.2. Drogas

A RES (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 0,1 mg/kg foi dissolvida em ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, BR) 99,7% (50 µL) e diluída em água destilada (50 mL). O veículo consiste na mesma quantidade de ácido acético e água destilada usados na solução de reserpina.

SALB (5 mg/kg) e PRO (20 mg/kg) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio (TFS) 0,1 M a pH 7,4 e o como veículo dessas soluções foi administrado a solução TFS.

Cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União) 100 mg/kg, Cloridrato de xilazina (Calmiun®, Agener União) 10 mg/kg.

4.3. Delineamento experimental

Antes do início dos testes experimentais os animais foram submetidos a um período de manipulação diária de 5 minutos, durante 5 dias, com finalidade de habituar os animais ao experimentador (SANTOS et al., 2013). Todos experimentos foram realizados, preferencialmente, no mesmo horário, obedecendo o período entre 8:00 às 17:00 horas., e os

animais foram observados nos testes comportamentais alternadamente entre os grupos. Entre as sessões 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).

Os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos: (1) CTR, grupo controle (n = 11), tratado com veículo da reserpina e veículo do SALB e PRO; (2) RES, grupo reserpina (n = 12); (3) SALB, grupo salbutamol (n = 10); (4) RES-SALB, grupo reserpina-salbutamol (n = 10); (5) PRO, grupo propranolol (n = 11); e (6) RES-PRO, grupo reserpina-propranolol (n = 13). Após o período de manipulação, todos os animais receberam 12 injeções por via subcutânea (s.c.) da solução RES (0,1 mg/kg) ou veículo da RES, respectivamente, administradas durante 25 dias, uma a cada 48 horas (BISPO et al., 2019; SANTOS et al., 2013). Após a 8ª injeção de RES, 16º dia de experimento, todos os animais foram tratados com SALB (5 mg/kg), PRO (20 mg/kg) ou veículo da solução por via intraperitoneal (i.p.), durante 8 dias, um a cada 24 horas (CARTER; LYNCH, 1994; O'NEILL et al., 2019). Todas as injeções foram administradas sempre após os testes comportamentais. Ao longo do experimento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de (1) catalepsia I (realizada a cada 48 horas, ao longo de todo experimento); (2) catalepsia II (realizada no 16º dia, 30, 60, 120 minutos, 24 e 48 horas após a 1ª injeção de SALB e PRO); (3) campo aberto (realizado no 16º dia, 60 minutos após a 1ª injeção de SALB e PRO) e (4) movimentos orais (MOFS) (realizado no 16º dia, 120 minutos após a 1ª injeção de SALB e PRO, 18º e 24º dia). No 24º dia, 24 horas após a última injeção de SALB e PRO (8ª injeção) os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão transcardíaca para fixação e coleta dos encéfalos e posterior processamento dos tecidos a serem submetidos a imuno-histoquímica (Figura 6).

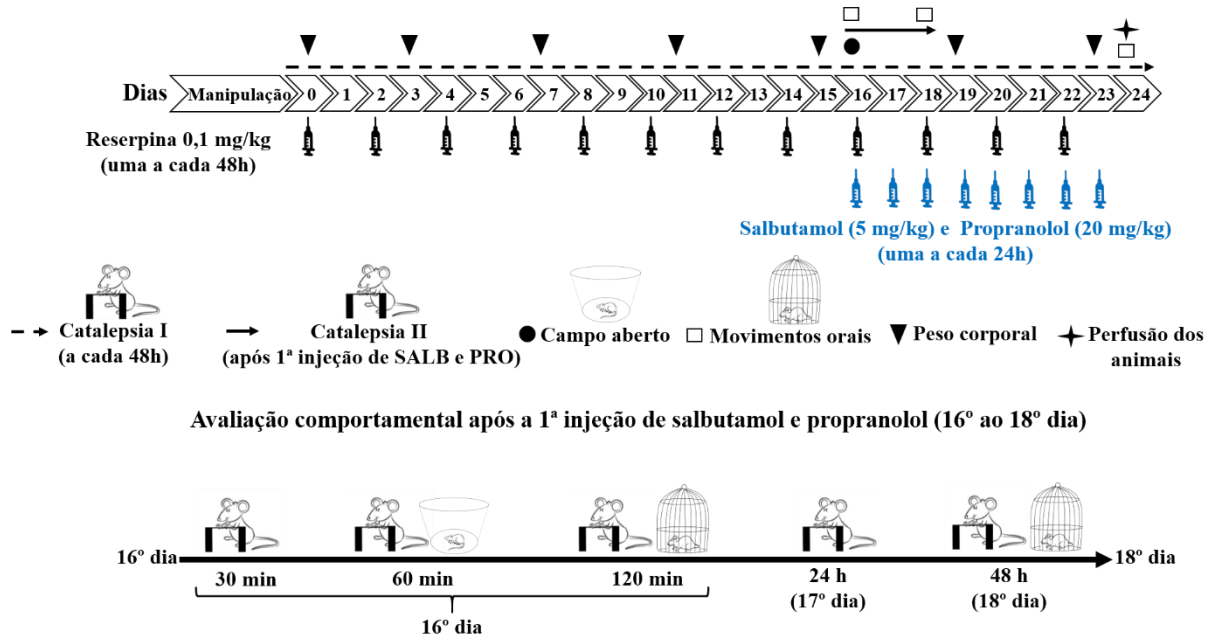


Figura 6: Representação esquemática do delineamento experimental. O experimento foi realizado em um período de 25 dias, período no qual os animais receberam 12 injeções de reserpina e 8 injeções de salbutamol e propranolol.

4.4. Testes comportamentais

4.4.1. Teste de catalepsia

A catalepsia é caracterizada por um estado comportamental de ausência de movimento e rigidez muscular induzido pela depleção de DA (GERLACH; RIEDERER, 1996). O teste de catalepsia é utilizado para avaliar a atividade motora em modelos animais, cuja avaliação é feita através da análise do período de latência para iniciar o movimento. O comportamento de catalepsia foi avaliado a cada 48 horas, colocando-se as patas dianteiras do animal sobre uma barra horizontal metálica, elevada 9 cm da superfície de apoio das patas traseiras. Foi medida a latência para o animal realizar um movimento completo de retirada da pata da barra, ou seja, sair da posição inicial. Os animais foram submetidos ao aparato três vezes consecutivas, em cada dia de avaliação, até um limite de 180 segundos e para cada dia foi realizada uma média do tempo de latência para cada animal (BISPO et al., 2019; LEAL et al., 2019a; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013) (Figura 7).

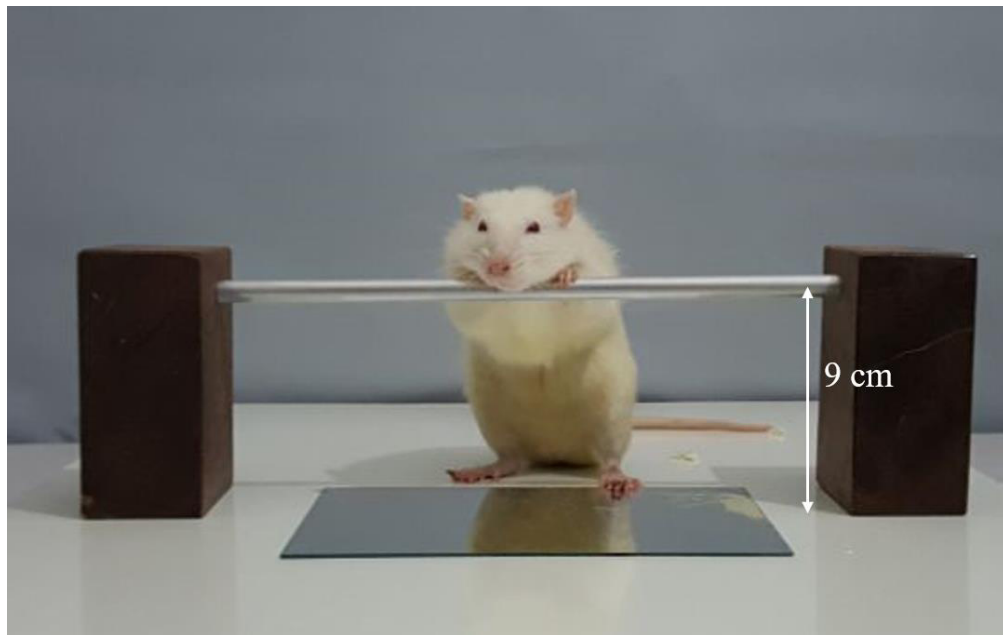


Figura 7: Aparato de catalepsia. *Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS).*

4.4.2. Atividade exploratória em campo aberto

O campo aberto é um teste utilizado para avaliar a atividade locomotora, comportamento exploratório e estado de ansiedade de animais experimentais (BISPO et al., 2019; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013; SOUZA et al., 2018). O campo aberto é um aparato circular (diâmetro = 80 cm, altura = 40 cm), com a parte interna pintada de preto para aumentar o contraste e favorecer a identificação da posição do animal. Para a realização dos experimentos, cada animal foi colocado individualmente no centro do aparato para livre exploração por 5 minutos e filmados com uma câmera posicionada sobre o campo aberto a uma altura de 230 cm e conectada a um computador. Os parâmetros comportamentais de distância percorrida, velocidade média e tempo de permanência no centro, foram registrados pelo programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, Wood Dale, IL, USA) (Figura 8).

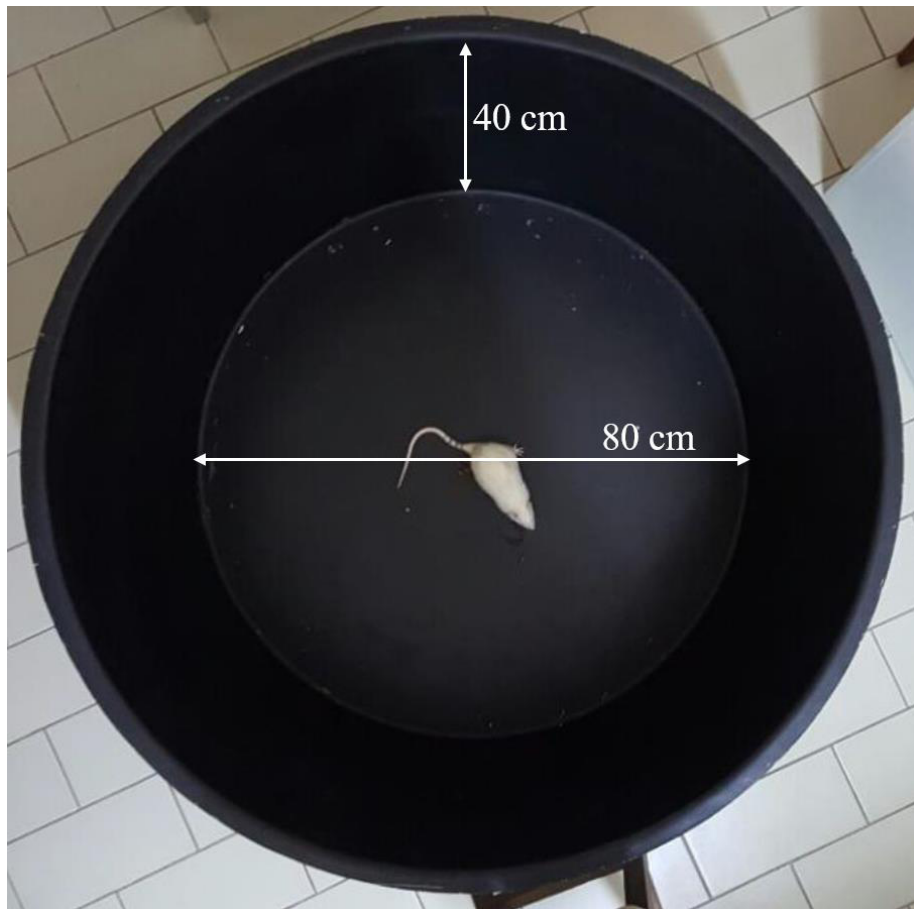


Figura 8: Aparato de campo aberto. *Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS).*

4.4.3. Avaliação dos movimentos orais (MOFS)

O teste utilizado para avaliar os movimentos involuntários na região oral de animais experimentais. O animal foi colocado em uma gaiola gradeada (40 cm × 40,5 cm × 20 cm) com espelhos posicionados sob e atrás da gaiola, a fim de permitir que o observador visualizasse o animal em qualquer posição. Foi avaliado o número de movimentos de mastigação no vácuo (movimento rápido da mandíbula que se assemelha ao movimento de mastigação, porém não direcionado a um estímulo particular), o número de movimentos de protusão de língua (a protusão de língua foi considerado quando o animal projetou a língua para fora da cavidade bucal) e o tempo de tremor oral (período de tempo que o animal apresentou tremor na região oral), foram quantificados durante 10 minutos. Estes movimentos não foram considerados quando ocorreram durante um período de *grooming* (LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018) (Figura 9).



Figura 9: Aparato utilizado para avaliação de movimentos orais. *Fonte: Laboratório de Neurofisiologia (LNFS).*

4.4.4. Peso Corporal

Para acompanhar a variação do peso corporal dos animais ao longo do experimento, o peso dos animais foi aferido a cada 4 dias. Para aferir o peso dos animais foi utilizado uma balança portátil com cuba, onde os animais foram colocados. Para avaliar a variação o peso corporal utilizamos a razão $P = [(Pf/Pi) - 1] \times 100$, onde P (peso), Pf (peso final), Pi (peso inicial).

4.4.5. Perfusão dos animais

Após o período de realização dos testes comportamentais realizados no 24^a dia, 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, seccionando a pele e partes moles, a cavidade torácica.

Após a exposição da cavidade abdominal, foi feita uma incisão no diafragma para exposição do coração. Os animais foram perfundidos intracardiacamente com tampão fosfato de sódio (TFS; pH 7,4) para a lavagem dos vasos, por 10 minutos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (TF; pH 7,4; 100 mM), por 20 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e mergulhados em uma solução fixadora de sacarose 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 adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital.

Os cérebros foram levados a um criostato de deslizamento (Leica, EUA) onde foram congelados à -20°C para obtenção de secções coronais de 50 µm, as quais foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos corresponde a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma secção e a seguinte seja de aproximadamente 250 µm. Estes cortes foram armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e TF e posteriormente conservados a 4 °C até as reações de imuno-histoquímica.

4.5. Análise morfológica

4.5.1. Imuno-histoquímica

Após as fases de testes experimentais, perfusão e secção dos encéfalos, as secções dos tecidos foram submetidas a técnica de imuno-histoquímica a temperatura ambiente (22-25°C). Os tecidos foram lavados em TF 0,1 M (4 vezes de 5 minutos, sob agitação automática), e em seguida foram pré-tratadas com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3% e TF por 20 minutos, para inativação da peroxidase endógena. Posteriormente, os tecidos foram lavados em leite desnatado 5% e TF durante 15 minutos, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário, e ao retirá-los do leite foram lavados em TF por 5 minutos, em seguida encubados em anticorpos primários, todos produzidos em coelho, monoclonal anti-DβH (ab209487 Abcam, EUA, 1:750) e policlonais, anti-α-syn (cat # sc-7011-R, Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, EUA, 1:1000) e anti-TH (#AB152 Millipore/Sigma, EUA, 1:5000), diluídos em TF contendo Triton-X 100 a

0,4% (ICN Biomedicals) e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2% durante 24 horas (22 °C). Em seguida, os tecidos foram encubados em anticorpo secundário biotinilado anti-coelho (sc2004 Santa Cruz Biotechnology, EUA, 1:1000), diluído em TF contendo Triton-X 100 a 0,4%, por 2 horas. Após o anticorpo secundário, as secções foram lavadas em TF e encubadas durante 2 horas no complexo avidina biotina (ABC – *avidin biotin complex*, Elite kit, Vector Labs, Burlingame, EUA). Para revelação, os tecidos foram colocados em contato com o cromógeno, a diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA) a 2,5% diluída em TF (0,1 M/pH 7,4) e 0,01% de H₂O₂.

4.5.2. Aquisição de imagens

Após a imuno-histoquímica as secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas, e em seguida foram intensificadas em solução de tetróxido de ósmio 0,006% e desidratadas através da exposição a concentrações crescentes de álcoois, clareadas com xilol e as lamínulas fixadas com Entellan (Merck). As secções foram examinadas por iluminação de campo claro (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporatin inc., Japan) e as imagens capturadas utilizando-se uma câmera digital (Ds-fi1c, Nikon Corporatin inc., Japan) e programa específico para essa finalidade (Imaging Software NIS Elements, Nikon, versão 4.30), os quais estavam acoplados ao microscópio, e as localizações das áreas foram determinadas usando o atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007).

4.5.3. Contagem de células

Para cada animal foram feitas imagens dos cortes em aumento de 100x (objetiva de 10x), nas quais foi possível ver em detalhes a presença ou ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem de célula foi realizada em 4 secções de cada animal (10 a 5 animais por grupo) e o número de células para cada um deles corresponde à média entre as 4 secções analisadas. As áreas analisadas foram a área de células noradrenérgica A5 (NA5), bulbo olfatório (BO), LC, SNpc e VTA. Todas as células imunorreativas a TH⁺ nas áreas de interesse foram contadas utilizando o software Image J (versão 1.6.0, 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”, de forma 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.

4.5.4. 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. Cada animal foi representado por 4 imagens consecutivas para cada área, área subventricular (ASV), BO, CPFm, córtex entorrinal, estriado dorsal, hipocampo [CA1, CA3 e giro denteado (GD)] e SNr as quais foram analisadas utilizando o software Image J (versão 1.6.0, NIH). Na mesma imagem também foi selecionado um campo de igual tamanho em uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação no tecido. O número médio de pixels calculados nos 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.

4.6. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e apresentaram distribuição normal para todas as variáveis, então foram aplicados testes paramétricos apropriados. Os dados comportamentais do teste de catalepsia e peso corporal foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados de campo aberto, movimentos orais e contagem de células e DOR foram submetidos a ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Fisher's LSD. Os dados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M.) e foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas através do software Graph Pad Prism versão 6.0 (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito da administração repetida de salbutamol e propranolol no comportamento motor de um modelo de parkinsonismo

5.1.1. Teste de catalepsia

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo (dias de tratamento) [$F(12, 732) = 95,91$; $p < 0,001$], tratamento [$F(5, 61) = 27,79$; $p < 0,001$] e interação tempo x tratamento [$F(61, 732) = 3,48$; $p < 0,001$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou aumento significativo no tempo de catalepsia dos grupos RES-SALB e RES-PRO, a partir do dia 16 (48 horas após a 8ª injeção de RES) e do grupo RES, a partir do dia 18 (48 horas após a 9ª injeção de RES), quando comparados aos grupos SALB ($^{16}p = 0,01$; $^{18, 20, 22, 24}p < 0,001$), PRO ($^{16, 18, 20, 22, 24}p < 0,001$) e CTR ($^{18, 20, 22, 24}p < 0,001$), respectivamente. Os grupos RES-SALB e RES-PRO apresentaram menor tempo de catalepsia, a partir do dia 18 (48 horas após a 9ª injeção de RES e 24 horas após a 1ª injeção de SALB e PRO), quando comparado ao grupo RES ($^{18, 20, 22, 24}p < 0,001$) e ($^{18}p < 0,001$), respectivamente. Além disso, o pós-teste de Fisher's LSD revelou que o grupo RES-SALB apresentou um menor tempo de catalepsia, a partir do dia 18 (48 horas após a 9ª injeção de RES e 24 horas após a 1ª injeção de SALB e PRO), quando comparado ao grupo RES-PRO ($^{18}p = 0,03$; $^{20, 22, 24}p > 0,001$) (Figura 10A).

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo (dias de tratamento) [$F(5, 305) = 44,70$; $p < 0,001$], tratamento [$F(5, 61) = 30,58$; $p < 0,001$] e interação tempo x tratamento [$F(25, 305) = 11,73$; $p < 0,001$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento significativo no tempo de catalepsia dos grupos RES, RES-SALB e RES-PRO, após a 1ª injeção de SALB e PRO no 16º dia, quando comparado aos grupos CTR ($^{60'}p = 0,002$; $^{120', 24h, 48h'}p < 0,001$), SALB ($^{30'}p = 0,01$; $^{60', 120', 24h, 48h}p < 0,001$) e PRO ($^{60'}p = 0,01$; $^{120'}p = 0,005$; $^{24h, 48h}p < 0,001$), respectivamente. RES-SALB também apresentou maior tempo de catalepsia, 60 e 120 minutos após a 1ª injeção de SALB e PRO, quando comparado aos grupos RES ($^{60'}p = 0,004$; $^{120'}p < 0,001$) e RES-PRO ($^{60', 120'}p < 0,001$), respectivamente. O pós-teste de Fisher's LSD também revelou um menor tempo de catalepsia dos grupos RES-SALB e RES-PRO, 48 horas após a 1ª injeção de SALB e PRO (18º dia), quando comparado ao grupo RES ($^{48h}p < 0,001$) e ($^{48h}p = 0,01$), respectivamente (Figura 10B).

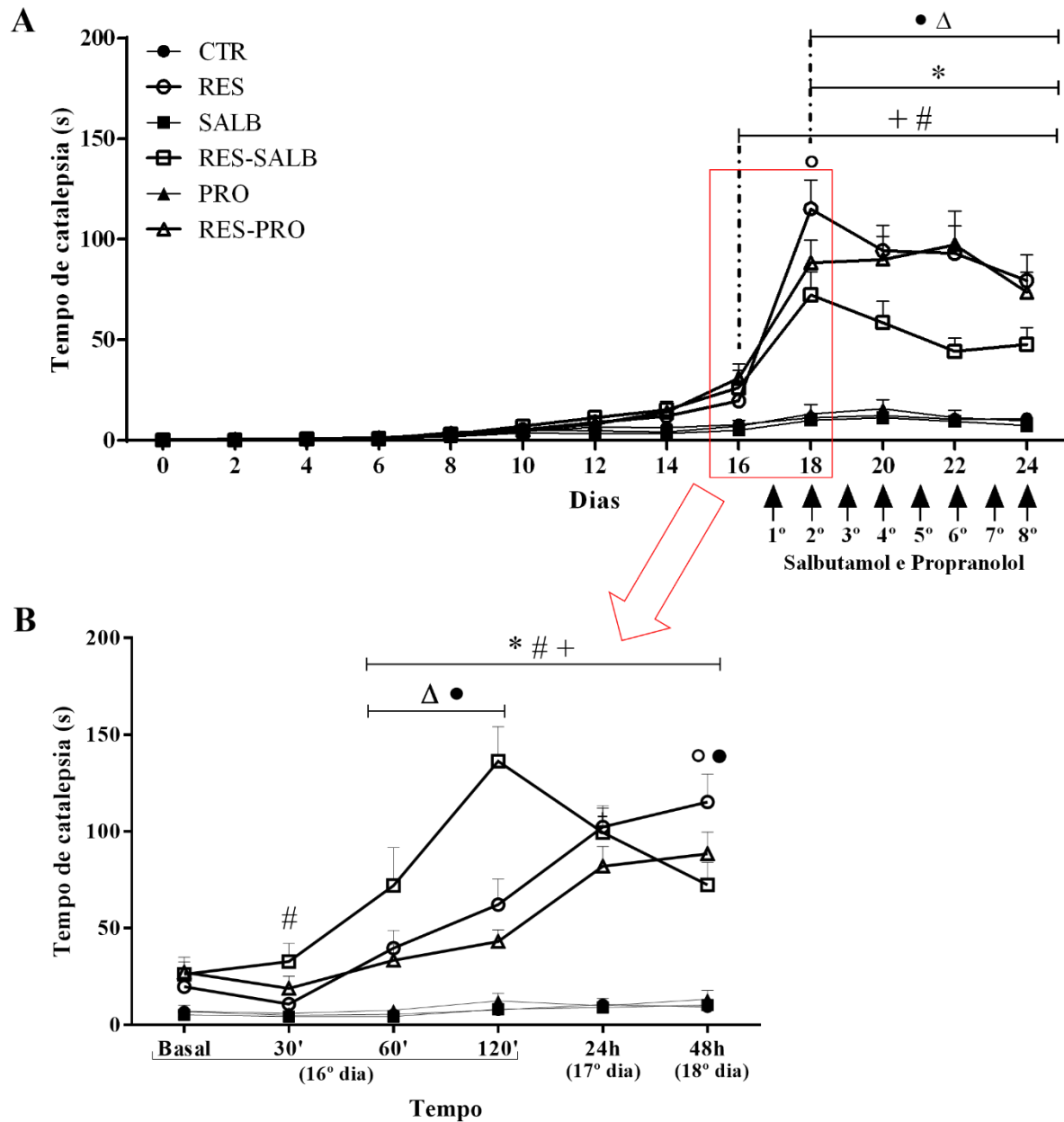


Figura 10: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no comportamento de catalepsia. (A) A RES provocou um aumento no tempo de catalepsia dos grupos RES-SALB, RES-PPRO e RES, a partir do 16° e 18° dia, comparados aos grupos SALB, PRO e CTR, respectivamente. Mas administração de SALB provocou uma redução significativa no tempo de catalepsia do grupo RES-SALB, a partir d 18° dia, comparado aos grupos RES e RES-PRO. (B) No 16° dia, o grupo RES-SALB apresentou maior tempo de catalepsia, no intervalo entre 60 e 120 minutos após a 1ª injeção de SALB e PRO, comparado aos grupos RES e RES-PRO, e no 18° dia RES-SALB e RES-PRO apresentaram menor tempo de catalepsia comparado ao grupo RES. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado CTR x RES; # $p < 0,05$ quando comparado SALB x RES-SALB; + $p < 0,05$ quando comparado PRO x RES-PRO; • $p < 0,05$ quando comparado RES-SALB x RES; $\Delta p < 0,05$ quando comparado RES-SALB x RES-PRO; ° $p < 0,05$ quando comparado RES-PRO x RES. (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

5.1.2. Atividade exploratória em campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado 60 minutos após a 1ª injeção de SALB e PRO, no 16º dia. A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento na distância percorrida [$F(5, 61) = 7,45$; $p < 0,001$], velocidade média [$F(5, 61) = 6,93$; $p < 0,001$] e tempo de permanência no centro [$F(5, 61) = 5,55$; $p < 0,001$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa na distância percorrida dos grupos RES e SALB, RES-SALB e RES-PRO, quando comparados aos grupos CTR ($p < 0,001$ e $p = 0,02$), SALB ($p = 0,02$) e PRO ($p = 0,004$), respectivamente (Figura 11A). Também foi observada uma redução significativa na velocidade média dos grupos RES e SALB, RES-SALB e RES-PRO, quando comparados aos grupos CTR ($p < 0,001$ e $p = 0,03$), SALB ($p = 0,03$) e PRO ($p = 0,004$), respectivamente (Figura 11B). Além disso, O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento significativa no tempo de permanência no centro do grupo RES-SALB, quando comparados aos grupos SALB ($p < 0,001$), RES ($p = 0,01$) e RES-PRO ($p < 0,001$) (Figura 11C).

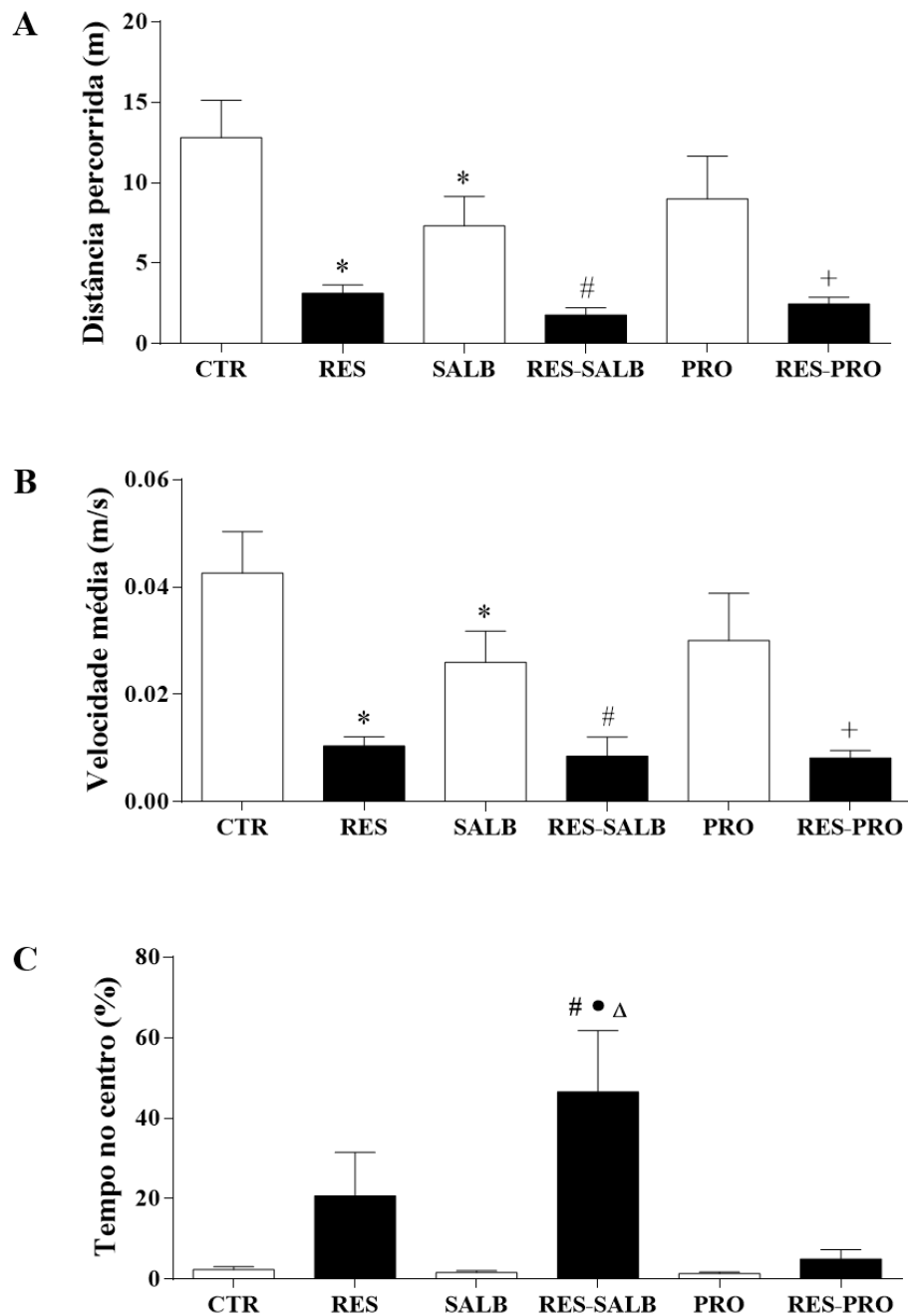


Figura 11: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na atividade exploratória de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). A administração de reserpina provocou redução na (A) distância percorrida e (B) velocidade média dos grupos RES e SALB, RES-SAL e RES-PRO, quando comparados aos grupos CTR, SALB e PRO, respectivamente. (C) O grupo RES-SALB apresentou um aumento na porcentagem de tempo no centro, quando comparado aos grupos SALB, RES e RES-PRO. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SALB; + $p < 0,05$, comparado ao grupo PRO; • $p < 0,05$ comparado ao grupo RES; Δ $p < 0,05$ comparado ao grupo RES-PRO. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

5.1.3. Avaliação dos movimentos orais

O teste de MOFS foi realizado no 16º (2 horas após a 1ª injeção de SALB e PRO), 18º e 24º dia. A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento para a mastigação no vácuo [$F(5, 60) = 7,07$; $p < 0,001$] e protusão de língua [$F(5, 60) = 9,17$; $p < 0,001$] no 16º, 18º [$F(5, 61) = 6,44$; $p < 0,001$] e [$F(5, 61) = 3,36$; $p = 0,009$] e 24º dia [$F(5, 61) = 13,54$; $p < 0,001$] e [$F(5, 61) = 4,11$; $p = 0,002$], respectivamente. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento no número de mastigação no vácuo do grupo RES-SALB quando comparado ao grupo SALB ($p = 0,03$) e aumento de mastigação no vácuo e protusão de língua do grupo RES quando comparado aos grupos CTR ($p < 0,001$), RES-SALB ($p = 0,001$ e $p < 0,001$) e RES-PRO ($p < 0,001$), respectivamente, no 16º dia (Figura 12A e 13A). Também foi observado um aumento no número de mastigação no vácuo dos grupos RES, RES-SALB e RES-PRO, quando comparado aos grupos CTR ($p = 0,03$), SALB ($p < 0,001$), e PRO ($p < 0,001$), respectivamente, e um aumento no número de protusão de língua do grupo RES-SALB, quando comparado ao grupo SALB ($p = 0,03$), e do grupo RES-PRO, quando comparado aos grupos PRO ($p = 0,005$) e RES ($p = 0,01$) no 18º dia (Figura 12B e 13B). Além disso, o pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento mastigação no vácuo do grupo RES, quando comparado aos grupos CTR ($p < 0,001$) e RES-PRO ($p = 0,03$), e do grupo RES-SALB quando comparado aos grupos SALB ($p < 0,001$), RES ($p = 0,01$) e RES-PRO ($p < 0,001$) e aumento no número de protusão de língua dos grupos RES, RES-SALB e RES-PRO, quando comparado aos grupos CTR ($p = 0,02$), SALB ($p = 0,01$) e PRO ($p = 0,006$), respectivamente, no 24º dia (Figura 12C e 13C).

Em relação ao tremor oral, a ANOVA de uma via não mostrou efeito do tratamento no 16º [$F(5, 60) = 0,91$; $p = 0,47$] nem no 18º dia [$F(5, 61) = 1,05$; $p = 0,39$]. No entanto, a ANOVA mostrou efeito do tratamento no 24º dia [$F(5, 61) = 4,54$; $p = 0,001$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento significativo no tempo de tremor oral nos grupos RES e RES-SALB, quando comparados aos grupos CTR ($p = 0,001$) e SALB ($p = 0,002$), respectivamente, no 24º dia (Figura 14C).

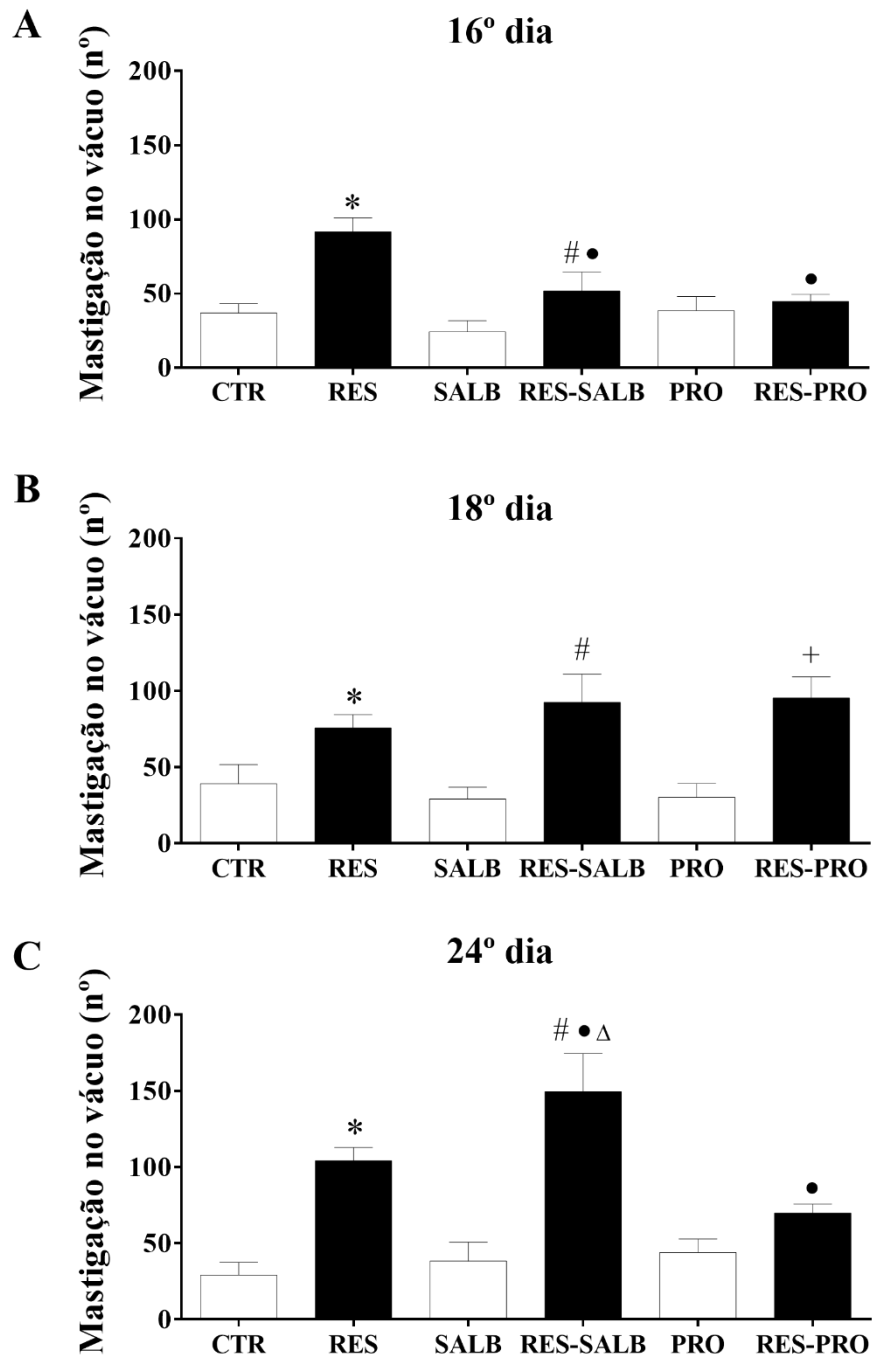


Figura 12: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) sobre o número de mastigação no vácuo de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). (A) O grupo RES apresentou um aumento no número de mastigação no vácuo comparado aos grupos CTR, RES-SALB e RES-PRO no 16° dia. (B) No 18° dia, os grupos RES, RES-SALB e RES-PRO, apresentaram aumento no número de mastigação no vácuo comparado aos grupos CTR, SALB e PRO, respectivamente. (C) No 24° dia o grupo RES-SALB apresentou um aumento no número de mastigação no vácuo comparado aos grupos SALB, RES e RES-PRO, enquanto o grupo RES apresentou um aumento no número de mastigação comparado aos grupos CTR e RES-PRO. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SALB; + $p < 0,05$, comparado ao grupo PRO; • $p < 0,05$ comparado ao grupo RES; $\Delta p < 0,05$ comparado ao grupo RES-PRO. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

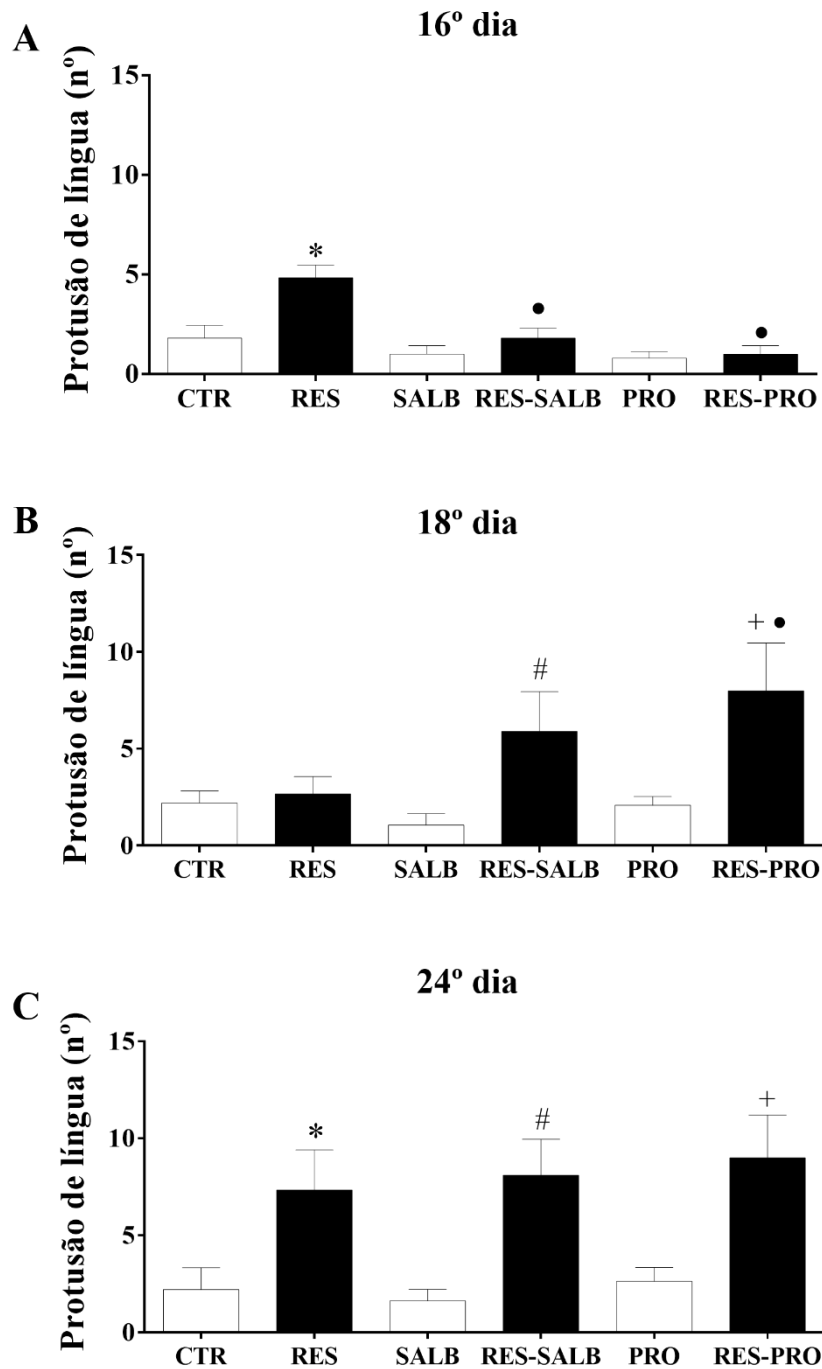


Figura 13: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) sobre o número de protusão de língua de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). (A) O grupo RES apresentou um aumento no número de protusão de língua comparado aos grupos CTR, RES-SALB e RES-PRO no 16º dia. (B) No 18º dia, os grupos RES-SALB, apresentou um aumento no número de protusão de língua comparado ao grupo SALB e o grupo RES-PRO apresentou um maior número de protusão de língua comparado aos grupos PRO e RES. (C) No 24º dia os grupos RES, RES-SALB, RES-PRO apresentaram um aumento no número de protusão de língua comparado aos grupos RES, SALB e PRO, respectivamente. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SALB; + $p < 0,05$, comparado ao grupo PRO; • $p < 0,05$ comparado ao grupo RES. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

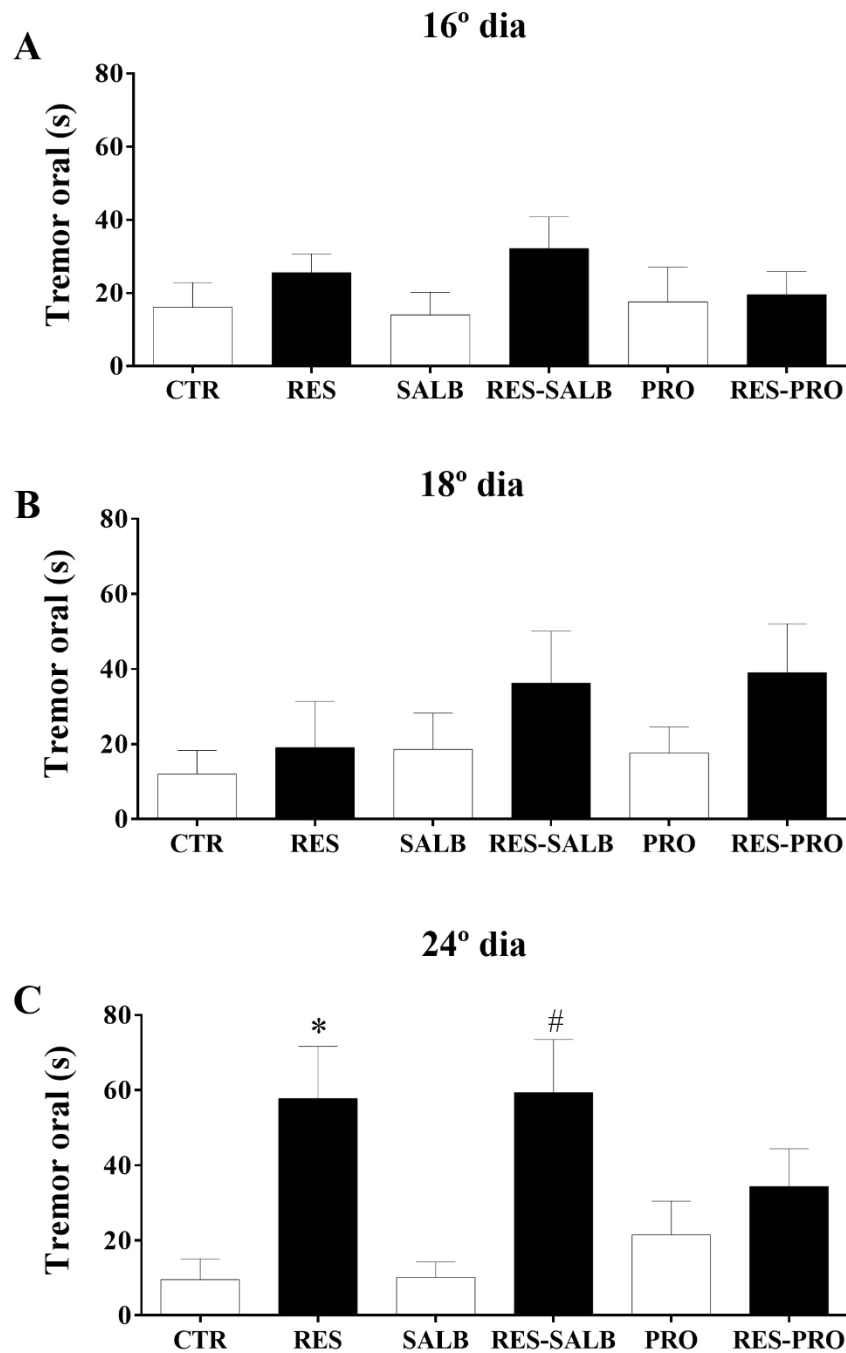


Figura 14: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) sobre o tempo de tremor oral de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). (A e B) Não foi observada diferença significativa no tempo de tremor oral entre os grupos avaliados no 16º e 18º dia. (C) No 24º dia, os grupos RES e RES-SALB apresentam um aumento no tempo de tremor oral comparado aos grupos CTR e SALB, respectivamente, enquanto o grupo RES-PRO não apresentou diferença significativa no tempo de tremor oral comparado ao grupo PRO. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparado ao grupo SALB. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

5.1.4. Peso corporal

O peso dos animais foi aferido ao longo de todo o experimento, a cada 4 dias. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo (dias de Tratamento) [$F(6, 366) = 113,9$; $p < 0,001$], tratamento [$F(5, 61) = 7,34$; $p < 0,001$] e interação tempo x tratamento [$F(30, 366) = 17,53$; $p < 0,001$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa do peso corporal dos grupos RES-SALB e RES-PRO, a partir do 11º dia (6ª injeção de RES), quando comparados aos grupos SALB ($^{11}p = 0,004$; $^{15}p = 0,01$; $^{19, 23}p < 0,001$) e PRO ($^{11}p = 0,01$; $^{15}p = 0,001$; $^{19, 23}p < 0,001$), respectivamente. Também foi observada uma redução do peso corporal no grupo RES, a partir do 15º dia (8ª injeção de RES), quando comparado ao grupo CTR ($^{15}p = 0,03$; $^{19, 23}p < 0,001$). Além disso, o pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução do peso corporal do grupo RES-PRO, a partir do 19º dia (10ª injeção de RES), quando comparado ao grupo RES ($^{19}p = 0,006$, $^{23}p = 0,02$) e no 23º dia (12ª injeção de RES) o grupo SALB apresentou maior peso corporal que o grupo CTR ($^{23}p = 0,042$)(Figura 15).

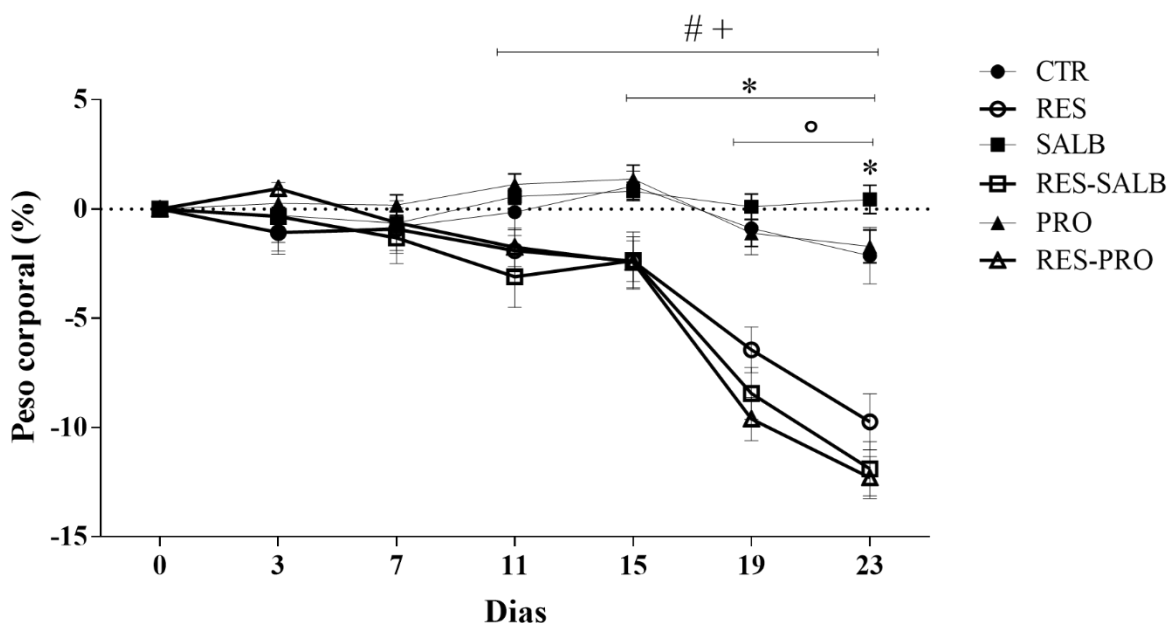


Figura 15: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no peso corporal de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Os grupos RES-SALB e RES-PRO apresentaram redução significativa do peso corporal a partir do 11º dia, enquanto o grupo RES apresentou redução do peso corporal a partir do 15º dia, comparado aos grupos SALB, PRO e CTR, respectivamente. O grupo RES-PRO apresentou menor peso corporal a partir do 19º dia comparado ao grupo RES. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado CTR x RES; # $p < 0,05$ quando comparado SALB x RES-SALB; + $p < 0,05$ quando comparado PRO x RES-PRO; $\hat{p} < 0,05$ quando comparado RES-PRO x RES. (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

5.2. Efeito da administração repetida de salbutamol e propranolol na imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase, dopamina β -hidroxilase e α -sinucleína

5.2.1. Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH⁺)

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa para o número de células TH⁺ na SNpc [F (5, 54) = 3,73; p = 0,005)], VTA [F (5, 54) = 4,39; p = 0,002)], LC [F (5, 54) = 2,57; p = 0,030)] e na área NA5 [F (5, 44) = 21,32; p < 0,001)] entre os grupos experimentais entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa no número de células TH⁺ na SNpc e VTA do grupo RES quando comparado aos grupos CTR (p < 0,001), RES-SALB (p = 0,003 e p = 0,001) e RES-PRO (p = 0,02 e p < 0,001), respectivamente (Figura 16A e B). O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa de células TH⁺ no LC dos grupos RES (p = 0,07), SALB (p = 0,007) e PRO (p = 0,004) quando comparado ao grupo CRT (Figura 16C). Na área NA5, o pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento de células TH⁺ no grupo RES quando comparado aos grupos CTR (p < 0,001) e RES-PRO (p < 0,001) e no grupo RES-SALB quando comparado aos grupos SALB (p < 0,001) e RES-PRO (p < 0,001) (Figura 16D). Também foi observado que o grupo SALB apresentou uma redução de células TH⁺ quando comparado ao grupo CTR (p = 0,003) respectivamente (Figura 16D)

A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa para o número de células TH⁺ no BO [F (5,46) = 1, 40; p = 0,24)] (Figura 16E).

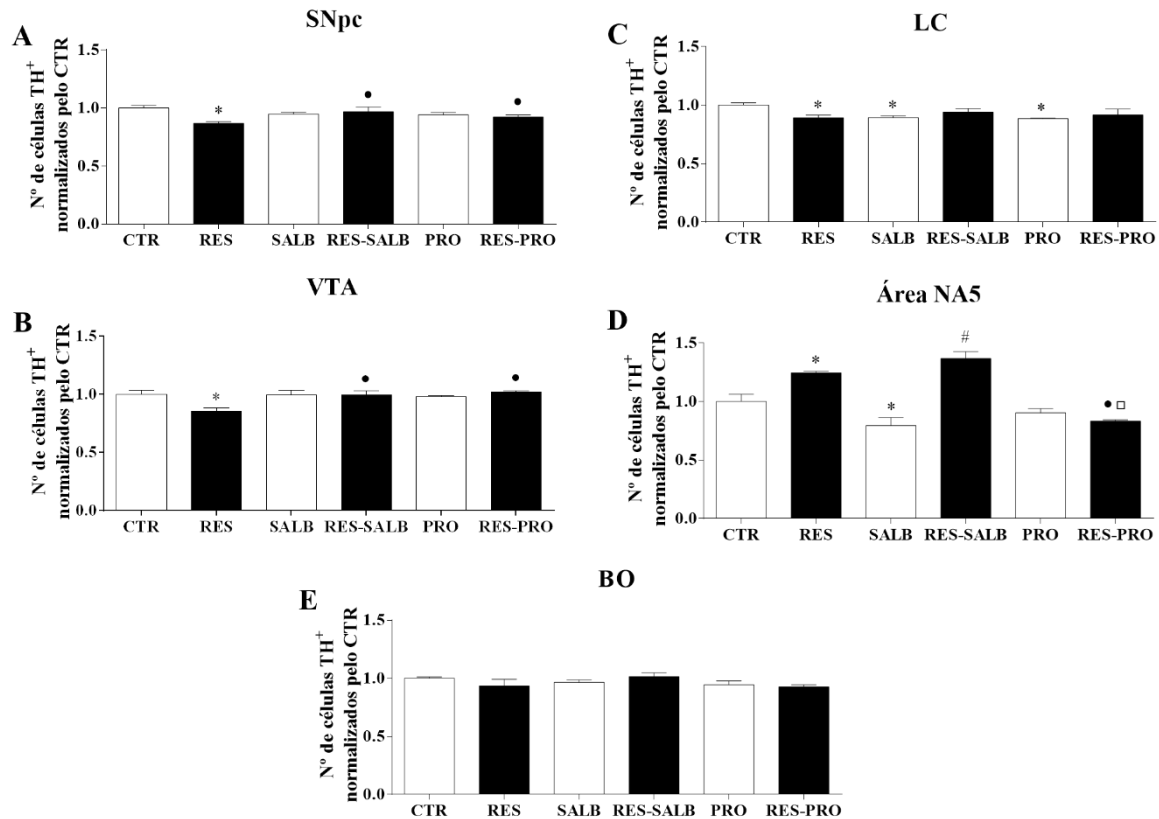


Figura 16: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no número de células TH⁺ na substância negra parte compacta (SNpc), área tegmental ventral (VTA), *locus coeruleus* (LC), área de células noradrenérgicas A5 (NA5) e bulbo olfatório (BO) de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). O grupo RES apresentou diminuição no número de células TH⁺ na SNpc e VTA comparado aos grupos CTR, RES-SALB e RES-PRO (A e B). No LC foi observado uma redução de células nos grupos RES, SALB e PRO comparado ao grupo CTR (C). Na área NA5, o grupo RES e RES-SALB apresentaram um aumento no número de células comparados aos grupos CTR e SALB, respectivamente. E no grupo RES-PRO apresentou menor número células comparado aos grupos RES e RES-SALB (D). Não houve diferença significativa no número de células do BO entre os diferentes grupos (E). Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; # $p < 0,05$ quando comparado ao SALB; • $p < 0,05$ quando comparado ao RES; □ $p < 0,05$ quando comparado ao RES-PRO. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa na DOR para TH⁺ no estriado dorsal [$F(5, 54) = 2,53$; $p = 0,039$] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa na DOR no estriado dorsal do grupo RES quando comparado com os grupos CTR ($p = 0,039$), RES-SALB ($p = 0,001$) e RES-PRO ($p = 0,016$) (Figura 17).

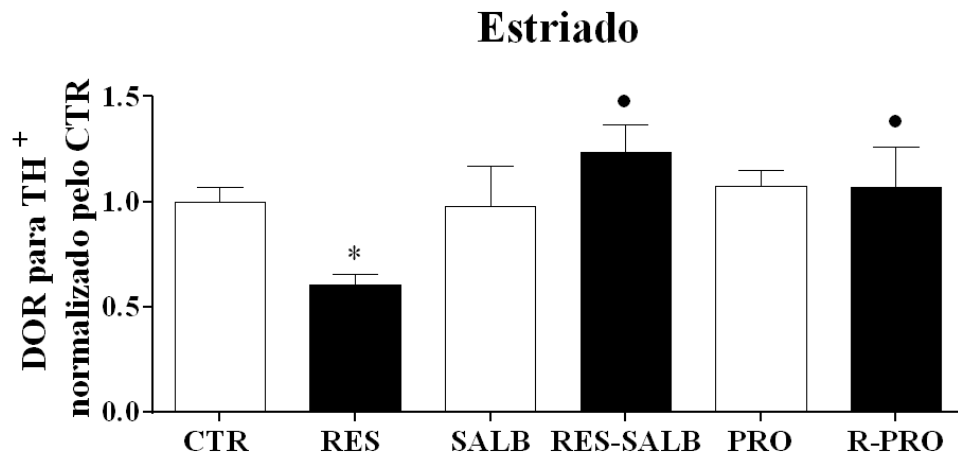


Figura 17: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na DOR para TH⁺ no estriado dorsal de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). O grupo RES apresentou uma redução na DOR para TH⁺ comparado ao grupo CTR, RES-SALB e RES-PRO. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; • $p < 0,05$ quando comparado ao RES. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

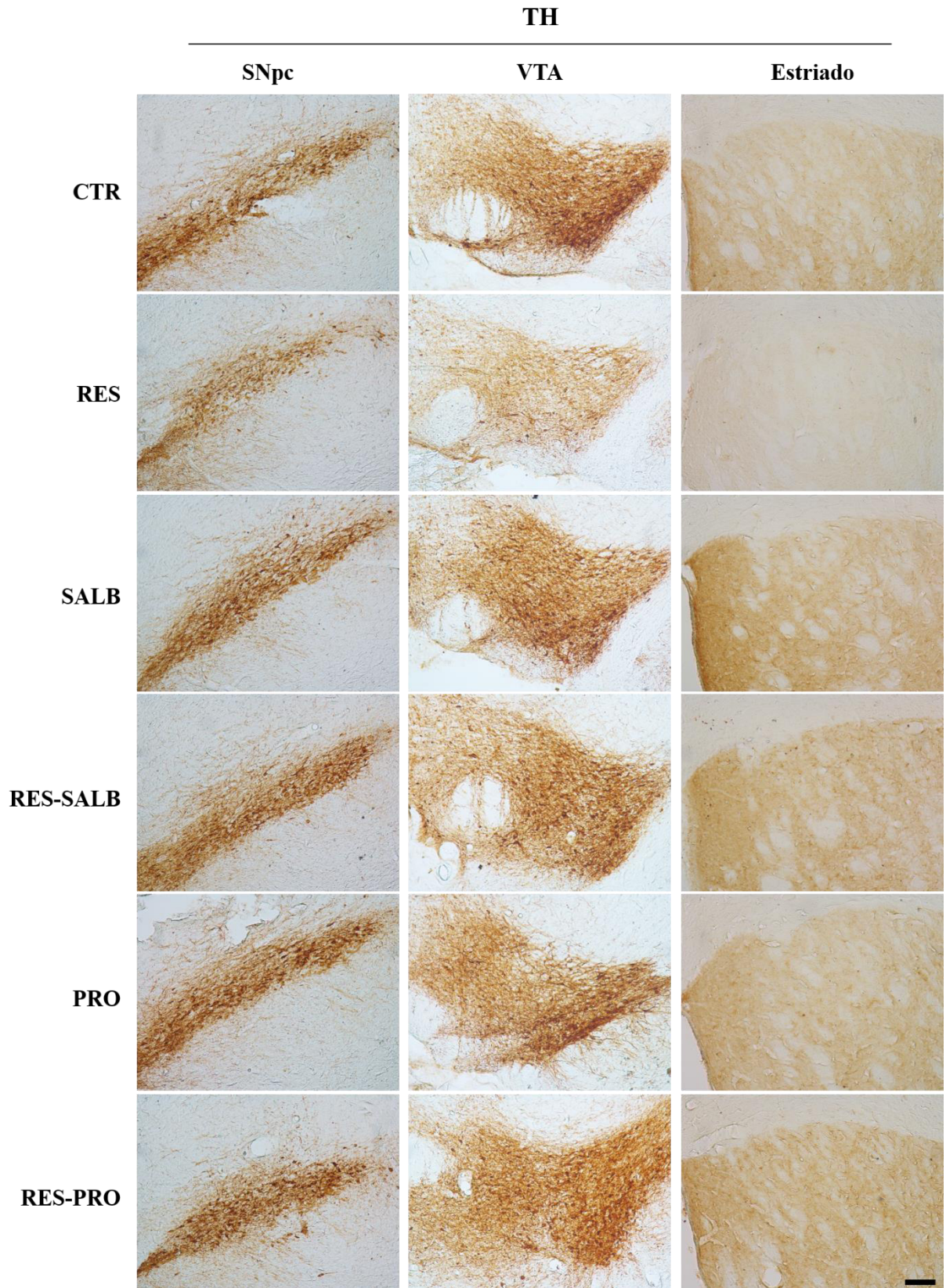


Figura 18: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH). Imagem representativa da marcação para TH na substância negra parte compacta (NSpc), área tegmental ventral (VTA) e estriado dorsal de um modelo experimental de parkinsonismo. CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol. Barra de escala: 200 μ m.

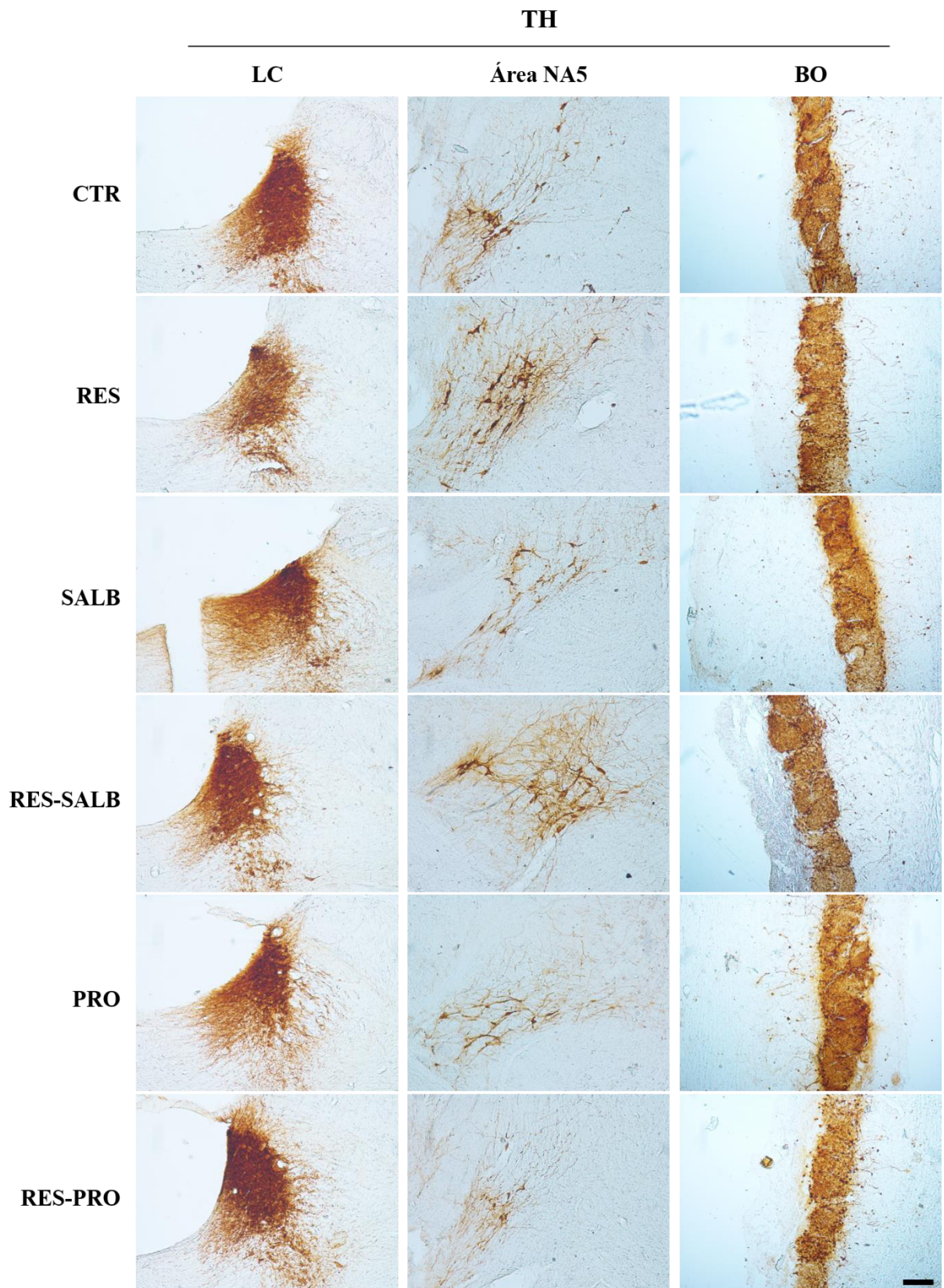


Figura 19: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH). Imagem representativa da marcação para TH no *locus coeruleus* (LC), células noradrenérgica A5 (NA5) e bulbo olfatório (BO) de um modelo experimental de parkinsonismo. CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol. Barra de escala: 200 μ m.

5.2.2. Imuno-histoquímica para dopamina β -hidroxilase ($D\beta H^+$)

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa para o número de células $D\beta H^+$ no LC [$F(5, 22) = 3,66$; $p = 0,014$] entre os grupos experimentais entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa no número de células $D\beta H^+$ no LC do grupo RES quando comparado aos grupos CTR ($p < 0,02$), RES-SALB ($p < 0,001$) e RES-PRO ($p = 0,02$). O grupo RES-SALB apresentou um aumento de células $D\beta H^+$ na SNpc quando comparado ao grupo SALB ($p = 0,011$) (Figura 20).

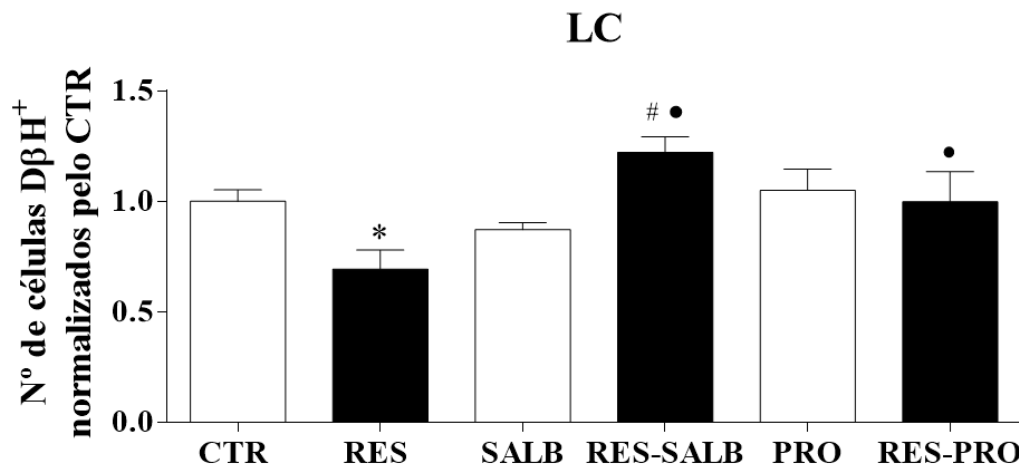


Figura 20: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) no número de células $D\beta H^+$ no *locus coeruleus* (LC) de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). O grupo RES apresentou uma redução de células $D\beta H^+$ no LC comparado aos grupos CTR, RES-SALB e RES-PRO. RES-SALB apresentou um aumento de células $D\beta H^+$ comparado ao grupo SALB. Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; • $p < 0,05$ quando comparado ao RES; # $p < 0,05$ quando comparado ao SALB. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.



Figura 21: Imuno-histoquímica para Dopamina β-Hidroxilase (DβH). Imagem representativa da marcação para DβH no *locus coeruleus* (LC) de um modelo experimental de parkinsonismo. CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol. Barra de escala: 200 μm.

5.2.3. Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -syn⁺)

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa na DOR para α -syn⁺ na SNr [F (5, 24) = 3,31; p = 0,02], estriado dorsal [F (5, 24) = 5,47; p = 0,001] e ASV [F (5, 24) = 3,96; p = 0,009] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento significativo da DOR para α -syn⁺ na SNr, estriado dorsal e ASV do grupo RES quando comparado aos grupos CTR (p = 0,02; p = 0,001 e p = 0,003), RES-SALB (p = 0,01; p = 0,002 e p = 0,02) e RES-PRO (p = 0,02; p < 0,001 e p = 0,002), respectivamente (Figura 22A, B e C).

A ANOVA de uma via não mostrou diferença significativa na DOR para α -syn⁺ no BO [F (5,46) = 1, 40; p = 0,24] (Figura 22D).

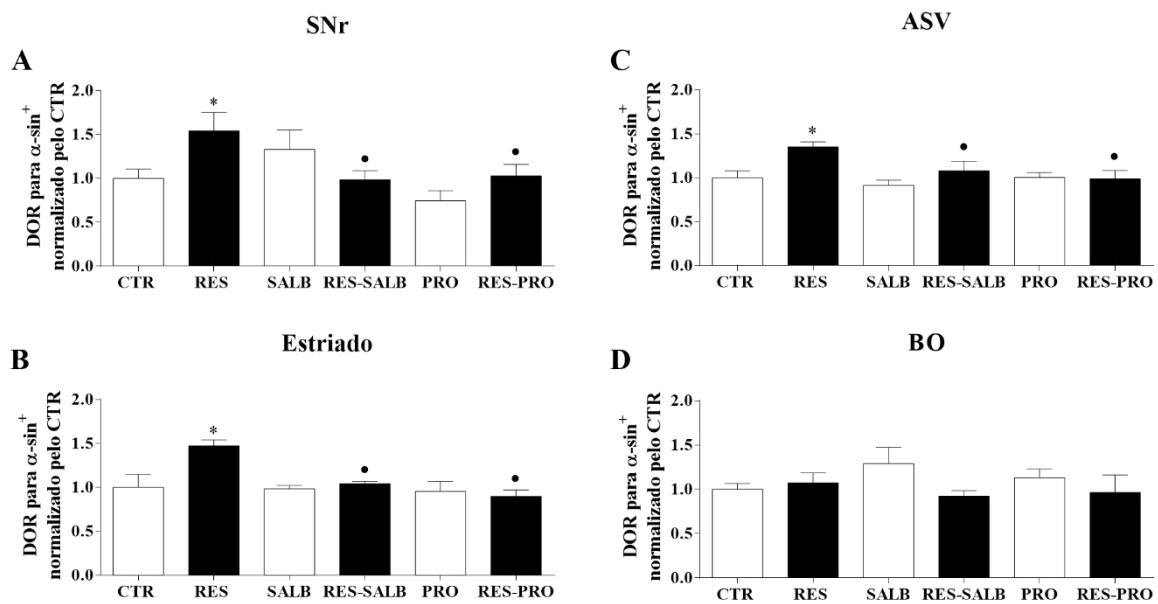


Figura 22: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na DOR para α -syn⁺ na substância negra reticulada (SNr), estriado dorsal, área subventricular (ASV) e bulbo olfatório (BO) de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). O grupo RES apresentou um aumento na DOR para α -syn⁺ comparado ao grupo CTR, RES-SALB e RES-PRO na SNr (A), estriado (B) e ASV (C). Não houve diferença significativa na DOR do BO entre os diferentes grupos (D). Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. *p < 0,05 quando comparado ao CTR; •p < 0,05 quando comparado ao RES. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

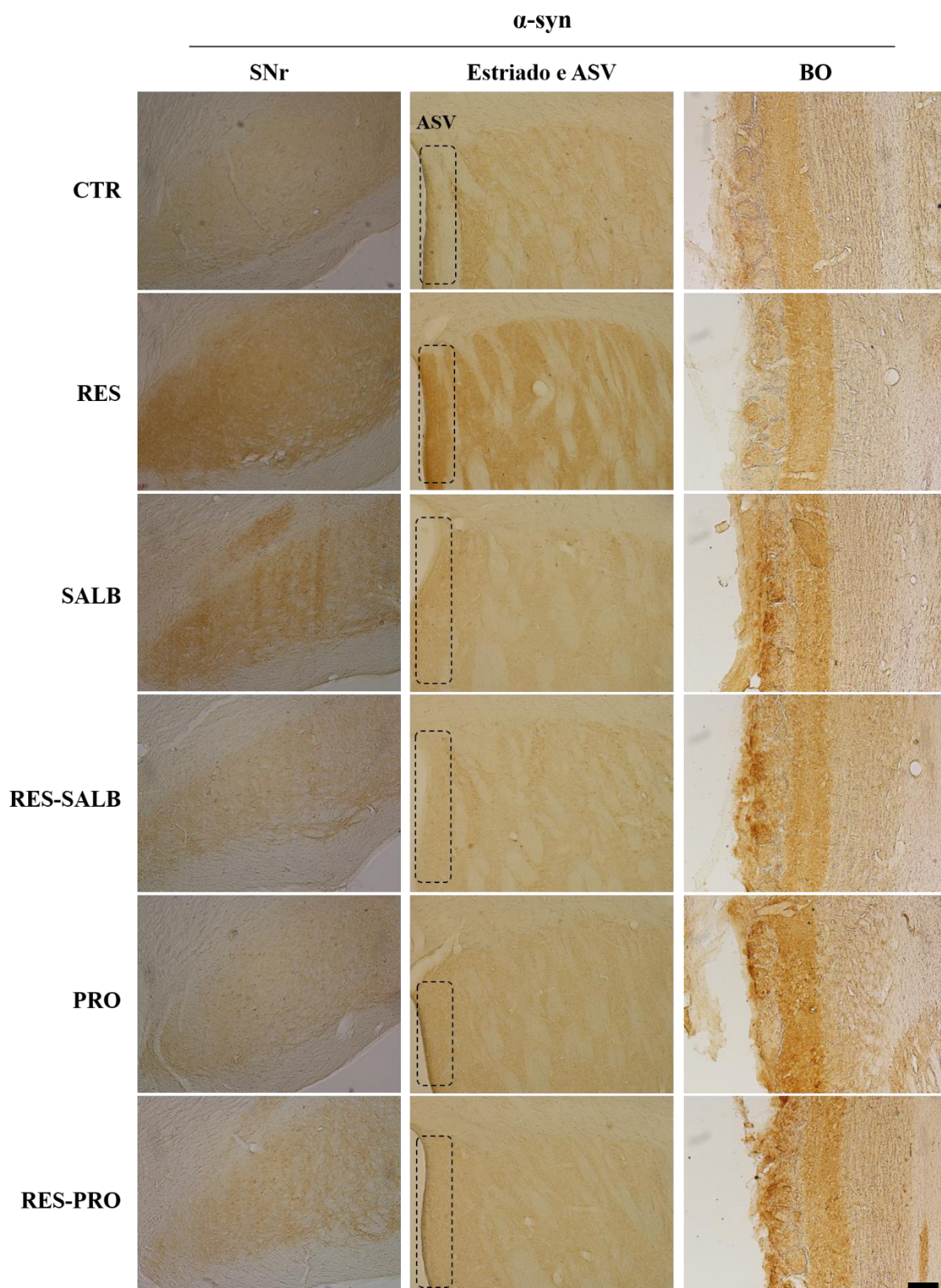


Figura 23: Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -syn). Imagem representativa da marcação para α -syn na substância negra reticulada (SNr), estriado dorsal, área subventricular ventral (ASV) e bulbo olfatório (BO) de um modelo experimental de parkinsonismo. CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol. Barra de escala: 200 μ m.

ANOVA de uma via mostrou diferença significativa na DOR para α -syn⁺ em CA1 [$F(5, 24) = 4,06$; $p = 0,008$], CA3 [$F(5, 24) = 3,31$; $p = 0,020$], GD [$F(5, 24) = 4,56$; $p = 0,004$], CPFm [$F(5, 24) = 4,22$; $p = 0,06$] e córtex entorrinal [$F(5, 24) = 3,35$; $p = 0,019$] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento significativo na DOR para α -syn⁺ na CA1, CA3, GD e CPFm do grupo RES quando comparado aos grupos CTR ($p = 0,003$; $p = 0,001$; $p < 0,001$ e $p = 0,009$), RES-SALB ($p = 0,005$; $p = 0,04$; $p = 0,01$ e $p = 0,02$) e RES-PRO ($p = 0,004$; $p = 0,03$; $p = 0,003$ e $p < 0,001$), respectivamente (Figura 24A, B, C e D). Também foi observado que o grupo SALB apresentou maior aumento da DOR para α -syn⁺ no CPFm quando comparado ao grupo CTR ($p = 0,04$) (Figura 24D). No córtex entorrinal, o pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento na DOR para α -syn⁺ no grupo RES quando comparado ao grupo CTR ($p = 0,003$) (Figura 24E).

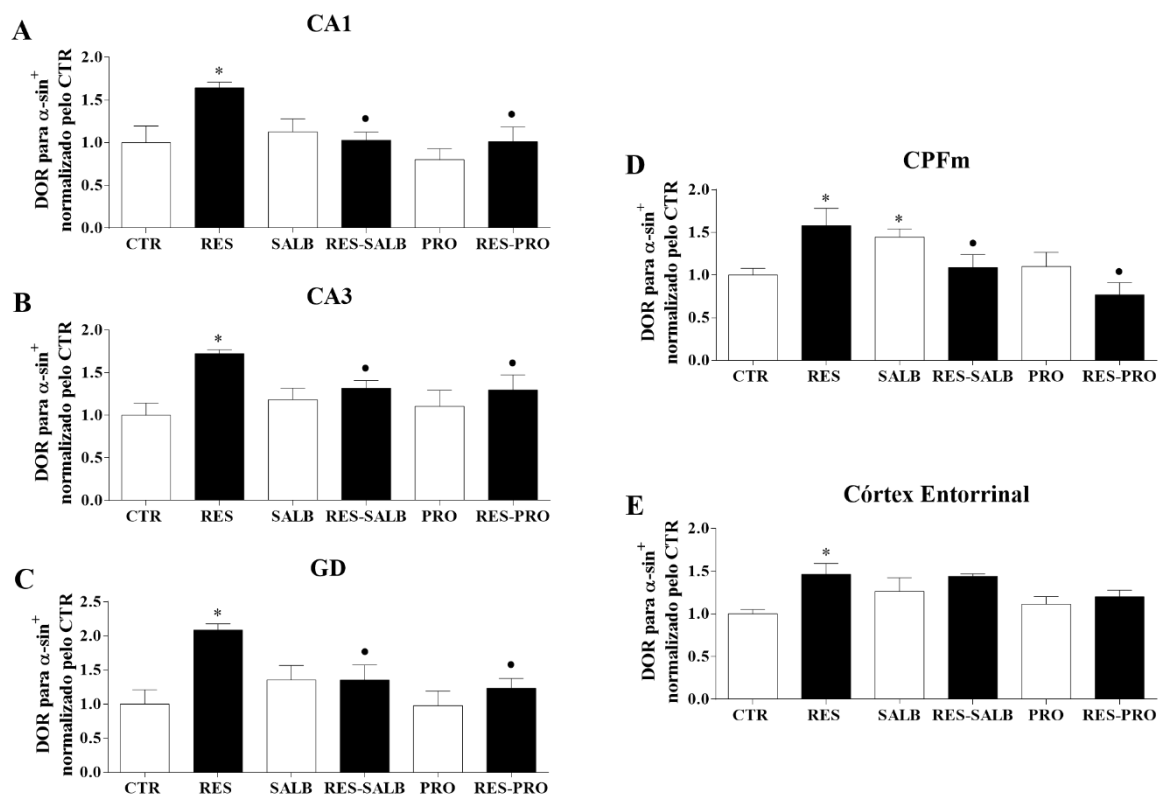


Figura 24: Efeito da administração de salbutamol (5 mg/kg) e propranolol (20 mg/kg) na DOR para α -syn⁺ nas áreas hipocâmpais (CA1, CA3, GD), córtex pré-frontal medial (CPFm) e córtex entorrinal de ratos submetidos ao modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). O grupo RES apresentou um aumento na DOR para α -syn⁺ comparado ao grupo CTR, RES-SALB e RES-PRO, em CA1 (A), CA3 (B), GD (C) e CPFm, onde o grupo SALB também apresentou um aumento da DOR comparado ao grupo CTR (D). No córtex entorrinal, o grupo RES apresentou um aumento na DOR comparado ao grupo CTR (E). Os valores foram expressos como média $\pm$ E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado ao CTR; • $p < 0,05$ quando comparado ao RES. (ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol.

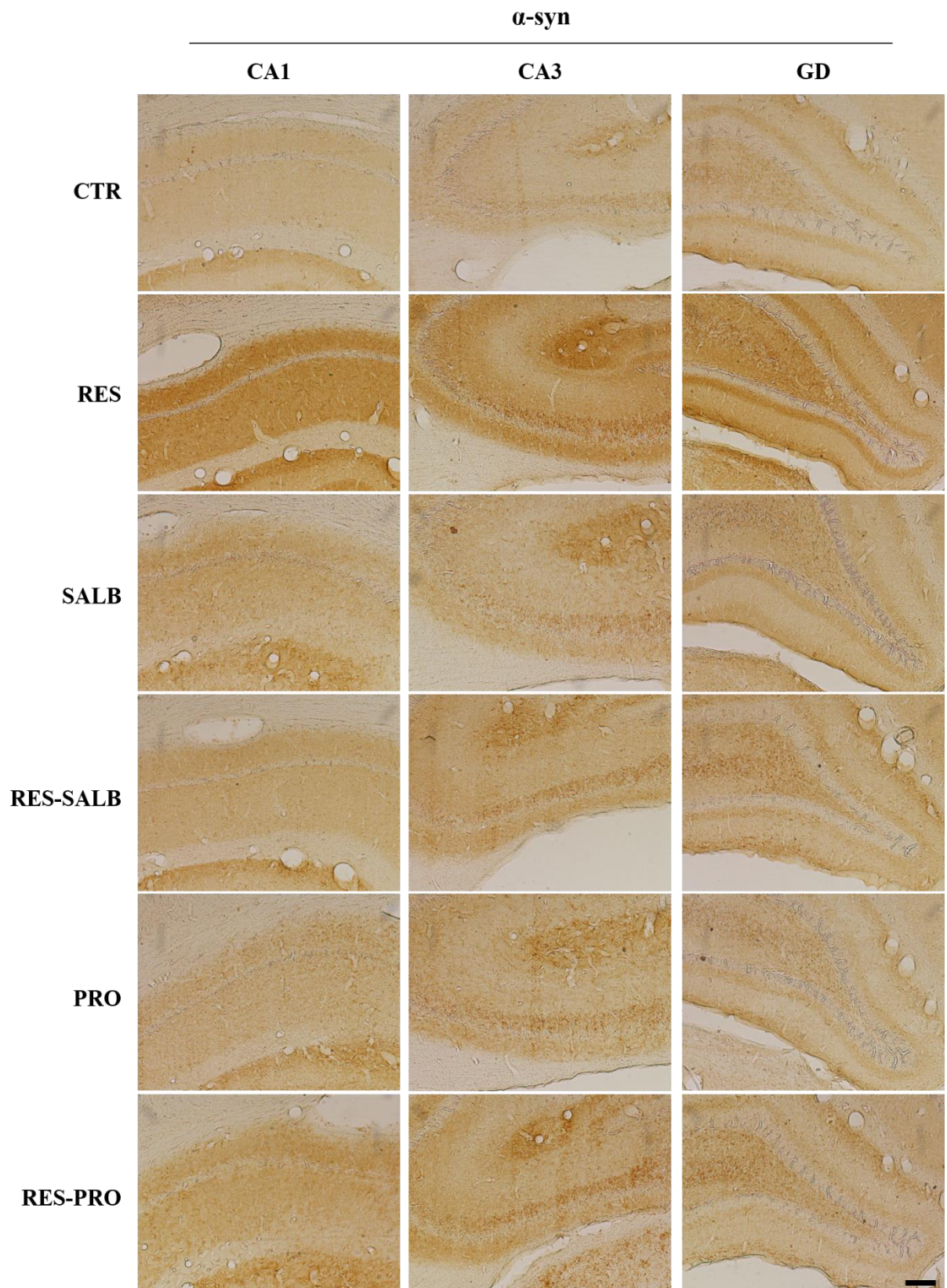


Figura 25: Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -syn). Imagem representativa da marcação para α -syn nas áreas hipocâmpais: CA1, CA3 e giro denteado (GD) de um modelo experimental de parkinsonismo. CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol. Barra de escala: 200 μ m.

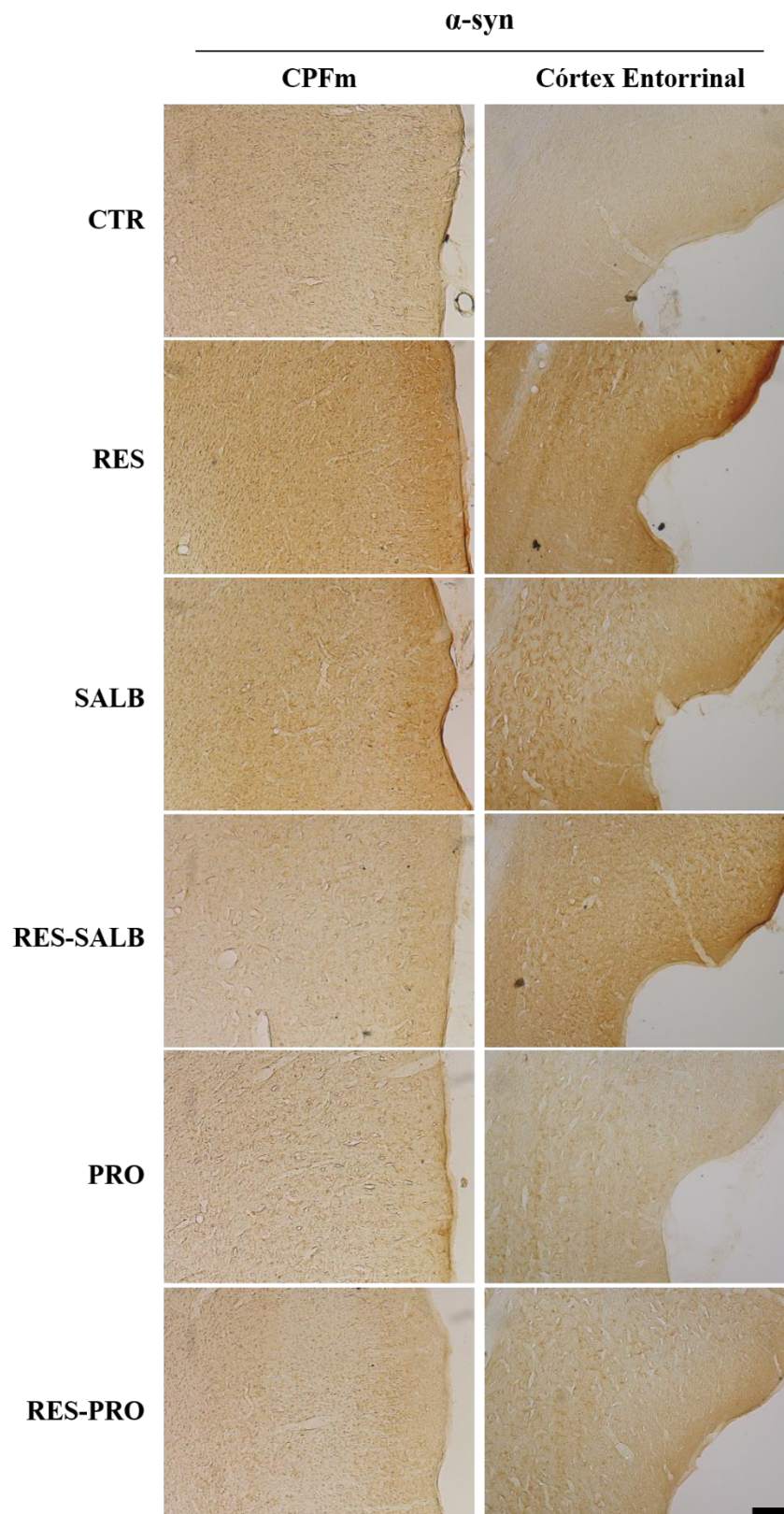


Figura 26: Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -syn). Imagem representativa da marcação para α -syn no córtex pré-frontal medial (CPFm) e córtex entorrinal de um modelo experimental de parkinsonismo. CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol; PRO = propranolol; RES-PRO = reserpina-propranolol. Barra de escala: 200 μ m.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a participação dos RA β noradrenérgicos, através da estimulação (SALB 5 mg/kg) e bloqueio (PRO 20 mg/kg) farmacológico desses receptores, em um modelo animal de parkinsonismo induzido por RES (0,1 mg/kg). Observamos que uma única injeção de SALB provocou aumento do tempo de catalepsia, maior tempo de permanência no centro do campo aberto, redução do número de mastigação no vácuo e protusão de língua, enquanto o PRO reduziu a mastigação e a protusão de língua. Em contrapartida, o tratamento repetido com SALB provocou uma redução no tempo de catalepsia e aumento da mastigação no vácuo, ao mesmo tempo que PRO reduziu a mastigação no vácuo e aumentou a perda de peso corporal provocados pela RES. Além disso, observamos que a administração repetida do agonista e antagonista dos RA β preveniu contra a redução da marcação para TH na SNpc, VTA e estriado dorsal, bem como a redução da marcação para D β H no LC e o aumento da marcação para α -syn na SNr, estriado dorsal, ASV, CA1, CA3, GD e CPFm, induzida por RES.

A administração de NA ou a estimulação dos RA β 2 atenua a neurodegeneração dopaminérgica, a expressão de α -syn e a liberação de fatores pró-inflamatórios envolvidos na DP (AONO et al., 2013; HENRICH et al., 2018; JIANG et al., 2015; MITTAL et al., 2017; O'NEILL et al., 2019; O'NEILL; HARKIN, 2018; RYAN et al., 2013; YSSEL et al., 2018). Além disso, estudos epidemiológicos mostram que o uso prolongado de SALB e outros agonistas RA β 2, mas não PRO um antagonista não seletivo para os RA β , está associado a um menor risco para desenvolver a DP (GRONICH et al., 2018; HOPFNER et al., 2019; SEARLES NIELSEN et al., 2018). No entanto, ainda não se sabe como esses fármacos podem agir diante de um quadro patológico com alterações motoras e neuroquímicas como observado em modelos animais progressivos da DP.

As alterações motoras provocadas pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos junto a redução de DA estriatal são os principais responsáveis pelo surgimento dos déficits motores que impossibilitam o desempenho de atividades cotidianas pelos pacientes da DP (CAMINITI et al., 2017; GREFFARD et al., 2006). Para amenizar esses déficits motores, os pacientes são tratados com levodopa, atualmente o mais eficaz entre as substâncias disponíveis para o tratamento da doença. No entanto, o tratamento prolongado com levodopa tem provocado um quadro de discinesia tardia nos pacientes e em modelos animais (BRODSKY; PARK; NUTT, 2010; RYAN; BAIRES-MARSHALL; NELSON, 2018). Isso mostra a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos que combatam os sintomas motores da DP sem provocar efeitos adversos a longo prazo. Com base nessa perspectiva,

avaliamos o efeito da administração repetida de SALB e PRO sobre o comportamento motor de ratos induzidos ao parkinsonismo.

No presente estudo, avaliamos o comportamento motor dos animais através do teste de catalepsia, que mede a latência para o animal realizar o movimento completo, levando em consideração a retirada das patas anteriores da sua posição inicial. Esse teste é amplamente utilizado para avaliar o déficit motor progressivo em modelos animais da DP (BESERRA-FILHO et al., 2019; LEAL et al., 2019a; LI et al., 2018; NISWENDER et al., 2008; SANTOS et al., 2013; VALDMAN et al., 2017). No presente estudo, observamos que o SALB aumentou significativamente o tempo de catalepsia induzido por RES, 1 hora após a primeira injeção (Figura 10B). No entanto, a administração repetida de SALB provocou uma redução progressiva no tempo de catalepsia dos animais tratados com RES-SALB ao longo do experimento (Figura 10A). Por outro lado, o tratamento com PRO provocou redução no tempo de catalepsia dos animais tratados com RES-PRO na fase aguda, 18º dia, mas na fase de administração repetida do fármaco não foi diferente do grupo RES. (Figura 10A e B).

Outro teste realizado para avaliar os déficits motores dos animais foi o teste de campo aberto que permite avaliar a atividade exploratória e locomotoras através da distância total percorrida e a velocidade média. Estudos anteriores mostraram que as alterações na atividade locomotora de animais que recebem RES pode surgir a partir da 4ª injeção de RES e aumentar progressivamente com administração prolongada dessa droga (BISPO et al., 2019; DE FREITAS et al., 2016; PERES et al., 2016; SANTOS et al., 2013). Neste trabalho, os animais foram submetidos ao campo aberto 1 hora após a primeira injeção de SALB e PRO, no 16º dia (após a 8ª injeção de RES), e observamos que nenhum dos fármacos RA β utilizados alterou a condição motora induzida por RES (Figura 11A e B). Entretanto, uma única injeção de SALB provocou um aumento significativo no tempo de permanência do centro do campo aberto nos animais tratados com RES-SALB (Figura 11C). O estudo realizado por Cowen et al. (1982) mostra que a atividade motora não foi estimulada pela administração de agonistas RA β 2 em ratos (COWEN et al., 1982). Por outro lado, Goldschmidt et al. (1984) e Dziedzicka-wasylewska et al. (2001) mostraram uma redução significativa na atividade motora espontânea, 30 minutos e 2 horas, respectivamente, após a administração de agonistas RA β 2, redução a qual não foi observada quando antagonistas RA β são administrados previamente (DZIEDZICKA-WASYLEWSKA et al., 2001; GOLDSCHMIDT; FRANCES; SIMON, 1984). Com base nesses estudos e em nossos resultados, acreditamos que o SALB contribuiu para a redução da atividade locomotora dos animais, uma vez que o grupo RES-SALB aumentou o tempo de

permanência no centro (Figura 11C) e o grupo SALB apresentou uma redução na atividade motora geral (Figura 11A e B). Já o PRO não alterou a condição motora induzida por RES. Talvez essa redução da atividade locomotora e o aumento no tempo de catalepsia dos animais tratados com SALB foi provocada por uma diminuição na densidade e sensibilidade dos RA β 2 (BUTLER et al., 1983; MOCHIZUKI et al., 2012; O'DONNELL, 1993), uma vez que o pico plasmático dessa substância ocorre 2 horas após a administração em humanos, apresentando uma meia-vida entre 4 a 6 hora (MAKHLOUF; WEINER; KHOURY, 2002) e, possivelmente, 8 injeções com baixas doses de RES não tenham sido suficiente para depletar toda NA. No entanto, acreditamos que seja preciso um tratamento mais prologado para haver alteração na densidade e sensibilidade dos receptores. Dessa forma, outra alternativa que tenha contribuído para a redução na atividade motora dos animais, na catalepsia e campo aberto, após a 1ª injeção de SALB, seja a estimulação de projeções de grupos de células noradrenérgicas pontinas para a medula espinal que pode alterar a atividade motora dos animais (BAJIC; PROUDFIT, 2013; BRUINSTROOP et al., 2012). Por outro lado, em um tratamento mais prolongado, a estimulação dos RA β 2 nos grupos de células noradrenérgicas que enviam suas projeções para todo encéfalo atenua o déficit motor induzido pela RES no teste de catalepsia (Figura 10A).

Uma característica do modelo animal induzido pela administração crônica de RES é o desenvolvimento de MOFS, como a mastigação no vácuo, protusão de língua e temor oral (ABÍLIO et al., 2004; FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2017; LINS et al., 2018; PERES et al., 2016; SANTOS et al., 2013). Em conjunto, os MOFS podem ser associados aos movimentos involuntários observados em pacientes da DP, os quais usualmente são relacionados ao tremor em repouso, normalmente nas mãos, mas também podem estar presente no queixo, lábios e língua (FABBRI et al., 2016; KUMAR; BOHRA; AGARWAL, 2018; NUMAO et al., 2017). No presente trabalho, observamos que uma única injeção de SALB ou PRO reduziu significativamente o número de mastigação no vácuo e protusão de língua nos animais tratados com RES-SALB e RES-PRO, respectivamente, 2 horas após a injeção (Figuras 12A e 13A). No entanto, a administração repetida de SALB não impediu o efeito da RES para esses parâmetros, incluindo tremor oral (Figuras 12C, 13C.e 14C), enquanto o PRO reduziu a mastigação no vácuo e atenuou o tremor oral induzido pela administração repetida de RES (Figuras 12C e 14C). Um estudo que avaliou o aumento de protusão de língua induzido por apomorfina, um agonista dopaminérgico, revelou que PRO, mas não SALB, reduz o número de protusão de língua em ratos (ZARRINDAST et al., 2000), sugerindo que esse mecanismo pode não estar envolvido com RA β 2, uma vez que PRO é um antagonista não seletivo de RA β .

No entanto, em nossos estudo a administração repetida de PRO não impediu o aumento de protusão de língua induzido por RES (Figura 13C).

Em relação a mastigação no vácuo e tremor oral, um estudo conduzido em humanos revelou que PRO, reduz o temor em pacientes que fazem uso do fármaco regulamente ou de maneira esporádica (BAKER; BAKER, 2012), da mesma forma que tem apresentado grande eficácia para o tratamento do tremor essencial (FERREIRA et al., 2019), enquanto SALB aumenta significativamente a gravidade do tremor (NIZET; BROEDERS; FOLGERING, 2004). Tomado em conjunto, observa-se que a ação desses fármacos nesses parâmetros comportamentais não está bem clara, uma vez que apresentam efeitos distintos ao longo do tratamento. No entanto, o PRO parece ser mais efetivo impedindo alterações no comportamento de mastigação no vácuo e tremor oral, enquanto o SALB parece ser eficiente apenas com o tratamento agudo. A difícil compreensão desses resultados pode estar relacionada ao baixo número de estudos sobre esses parâmetros, a variabilidade de modelos utilizados e ao fato de, em humanos, as origens desses tremores estarem associados a outros mecanismos que não apenas a DP, o que impede uma melhor acurácia dos efeitos do PRO e SALB.

Alguns estudos tem mostrado que SALB e outros agonistas noradrenérgicos provocam uma redução significativa de potássio no plasma de pacientes asmáticos e que essa redução apresenta uma correlação positiva com o tremor provocado pelo SALB (CLAUSEN, 1983; FOWLER; LIPWORTH, 2001; SCHEININ et al., 1987). Além disso, estudos mostram que PRO é capaz de reduzir a discinesia induzida por levodopa sem prejudicar a performance motora (BARNUM et al., 2012; LINDENBACH et al., 2011), através da modulação pré-sináptica do efluxo de DA induzido por levodopa (BHITE et al., 2015).

A perda de peso corporal progressiva é uma característica comum a muitos pacientes da DP (CERSOSIMO et al., 2018; CHEN et al., 2003; LOREFÄLT; TOSS; GRANÉRUS, 2009) e do modelo animal induzido por RES (FAVERO et al., 2017; FIBIGER; TRIMBACH; CAMPBELL, 1972; HALARIS; FREEDMAN, 1975; WELLS et al., 2017). Aqui nós observamos que o PRO, mas não SALB, acentuou a perda de peso induzida por RES (Figura 15). Na literatura está bem estabelecido que os agonistas dos RA β 2, como SALB e clenbuterol, provocam um aumento da massa corporal (BLUMENTHAL et al., 2014; CARTER; LYNCH, 1994; LIU et al., 2015), estudos que corroboram nossos achados, quando observamos que os animais do grupo SALB (Figura 15) apresentaram ganho de peso quando comparado aos demais grupos. No entanto, um estudo em suínos tratados com doses crescentes de SALB mostrou que o aumento do peso corporal não é dose dependente (MARCHANT-FORDE et al.,

2012). Além disso, apesar do SALB não ter provocado uma redução na perda de peso dos animais tratados com RES-SALB, um estudo realizado com pacientes da DP mostrou que o tratamento com essa substância melhora a resposta ao levodopa e aumenta a massa muscular esquelética dos pacientes (UC et al., 2003). Por outro lado, estudos mostram que β -bloqueadores podem contribuir para perda de peso, uma vez que a administração repetida de PRO provocou um aumento da perda de peso em animais com dieta rica em gordura, mas não em animais obesos (BAEK et al., 2018), bem como, em animais com inflamação sistêmica (SCHMITZ et al., 2007). Para explicar os achados, os autores demonstraram que a ativação microglial em cérebro de camundongos, induzida por estresse, foi impedida por PRO (SUGAMA et al., 2019), sugerindo que o bloqueio dos $RA\beta$ pode impedir a ativação de fatores anti-inflamatórios periférica e centralmente contribuindo para a complicação da condição patológica e assim da perda de peso corporal.

A DP é caracterizada fisiopatologicamente pela morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos em núcleos envolvidos no controle do movimento (ANDICA et al., 2018; BRAAK et al., 2003; CAMINITI et al., 2017; FEARNLEY JM; LEES AJ, 1991; GREFFARD et al., 2006). No entanto, vários indícios apontam para o envolvimento de outras vias, como a noradrenérgica, no surgimento de sintomas não motores em estágios iniciais e na progressão dos sintomas motores da doença (BUCHMAN et al., 2012; LI et al., 2018; LUO et al., 2017; TONG; HORNYKIEWICZ; KISH, 2006; WANG et al., 2009; WILSON et al., 2013; ZAROW et al., 2003). Com base nesses indícios, avaliamos o efeito do SALB e PRO na imunorreatividade para TH, D β H e α -syn em diferentes áreas do cérebro de ratos induzidos ao parkinsonismo.

Uma das características do modelo animal induzido por baixas doses de RES é a redução da imunorreatividade para TH nos núcleos dopaminérgicos (BISPO et al., 2019; DE FREITAS et al., 2016; LEAL et al., 2019a; LINS et al., 2018; SANTOS et al., 2013) e de células noradrenérgicas no LC (SANTOS et al., 2013). No presente trabalho, o tratamento com SALB e PRO preveniu a redução da imunoreatividade para TH na SNpc, VTA (Figuras 16A e B) e estriado (Figura 17), bem como uma redução de TH e D β H no LC (Figura 16C e 20, respectivamente). É bem conhecido que a RES provoca depleção de DA por impedir o seu transporte através do VMAT-2 para dentro das vesículas, provocando um aumento na concentração de DA no terminal axonal aumentando assim o metabolismo da DA gerando estresse oxidativo, quinonas reativa e peroxidação lipídica, além de reduzir os níveis de agentes antioxidantes, que podem levar a danos celulares e a ativação de fatores pró-inflamatórios

prejudicando ainda mais a condição celular (FERNANDES et al., 2012; LEÃO et al., 2015, 2017; NADE et al., 2013; PATIL; KASTURE, 2011). Acreditamos que o efeito preventivo proporcionado pelo SALB esteja associado a uma redução na peroxidação lipídica e aumento da atividade de agentes antioxidante, como a catalase, superóxido dismutase e glutathionas (UZKESER et al., 2012; ZHANG et al., 2015), bem como pela redução da microglise reativa, fatores pró-inflamatórios (O'NEILL; HARKIN, 2018; RYAN et al., 2013; YSSEL et al., 2018) e juntos apresentam fenótipo anti-inflamatório que protege contra os danos causados pela RES, o que pode justificar a melhora no tempo de catalepsia (Figura 10A).

O aumento de TH e D β H no LC suporta a ideia do efeito neuroprotetor da NA na progressão da DP, uma vez que muitos estudos mostram que a NA reduz a ativação microglial e a produção de mediadores pró-inflamatórios, aboli a neurodegeneração dopaminérgica e atenua a disfunção motora (JIANG et al., 2015; KREINER et al., 2019; YSSEL et al., 2018). Por outro lado, o tratamento de neurônios e glia *in vitro* com agonista RA β 2 induz a neurotoxicidade dopaminérgica através da ativação microglial por uma via dependente de ERK (quinasas regulas por sinais extracelulares) e produção de espécies reativas de oxigênio (QIAN et al., 2009), no entanto, a ativação microglial pode ser inibida pela ação de β -bloqueadores (SUGAMA et al., 2019), sugerindo que a redução da imureatividade para TH provocada por PRO pode estar associada a essa inibição microglial. Em contra partida, também foi demonstrado que o PRO aumenta a apoptose de células do sistema imune e a modulação da liberação citocinas IL-6 e INF- γ em um modelo animal de sepse (SCHMITZ et al., 2007). Acreditamos que vários fatores possam influenciar na modulação dos RA β , como tipo de célula, modelo animal e tempo de tratamento. Além disso, ressaltamos que PRO é um β -bloqueador não seletivo e dependendo da expressão desses receptores a ação desempenhada na célula pode ser diferente (LIU et al., 2019a; OSHIMA et al., 2014).

Um dos mecanismos fisiopatológicos associados à morte dos neurônios dopaminérgicos na DP é a formação de corpos de Lewy provocados pela agregação proteica, principalmente de α -syn (KLOS et al., 2005), os quais são observados inicialmente em regiões mais periféricas e depois ascendem para várias regiões cerebrais como explicado pela hipótese do estadiamento de Braak (BRAAK et al., 2003). Um estudo recente mostrou que a RES provoca um aumento dos níveis de α -syn solúvel na SNr e estriado de ratos (LEÃO et al., 2017). Além disso, altos níveis de α -syn solúvel, e não agregada, em áreas dopaminérgicas, hipocampus e corticais têm sido associados a algumas características fisiopatológicas da doença em modelos animais (JANEZIC et al., 2013; VORONKOV et al., 2017).

Adicionalmente, o aumento de DA citoplasmática, aumenta a interação entre α -syn e MAO-B, aumentando assim a produção de metabólitos e estresse oxidativo, os quais provocam danos celulares (KANG et al., 2018). Neste trabalho observamos que a administração de RES aumentou nos níveis de α -syn em várias áreas do cérebro de ratos, e o tratamento com SALB e PRO reduziu significativamente a imunorreatividade para α -syn na SNr, estriado (Figura 22A e B), hipocampo (CA1, CA3 e CG) e CPFm (24A-D). Estudos mostram que a alta expressão de α -syn provoca uma desregulação na síntese de TH e D β H interferindo na síntese de DA e NA (HENRICH et al., 2018; KIM et al., 2014; KIM; MOON; CHOI, 2011).

Os RA β 2 são amplamente expressos em células gliais e menos abundantes nos neurônios, no entanto estão presentes em várias regiões do cérebro assim como a expressão de α -syn (GAO et al., 2016; HANSEN; MANAHAN-VAUGHAN, 2015; HERTZ et al., 2010; LIU et al., 2019b; MILNER; SHAH; PIERCE, 2000; RYAN et al., 2013; STOWELL et al., 2019). Recentemente, foi relatado que a modulação por meio de agonistas, mas não de um antagonista não seletivo, dos RA β 2 está associada a regulação do gene da α -syn (*SNCA*) através da redução da acetilação da histona 3 lisina 27, *in vitro*, e que a administração aguda desses agonistas RA β 2 protegeu contra a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc, *in vivo* (MITTAL et al., 2017). Esse estudo suporta a ideia que o uso de fármacos agonistas RA β 2, utilizados para tratamento de asma, estão associados a um menor risco de desenvolver a doença (GRONICH et al., 2018; HOPFNER et al., 2019; MITTAL et al., 2017; SEARLES NIELSEN et al., 2018). Por outro lado, um estudo epidemiológico realizado com pacientes asmáticos em Taiwan, tratados com vários agonistas RA β 2, mostrou uma relação positiva entre a gravidade da asma e o risco para desenvolver DP (CHENG et al., 2015). Os resultados controversos entre esses estudos podem estar associados ao fato de que esses agonistas são prescritos para o tratamento de doenças pulmonares, muitas delas causadas pela exposição prolongada ao tabaco, onde a exposição à nicotina, *per si*, é considerado um fator neuroprotetor e está associada a um menor risco de DP (AASETH; DUSEK; ROOS, 2018; ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). Além disso, tem sido sugerido que a ação dos agonistas RA β 2 pode ser mediada pela exposição à nicotina, uma vez que outros medicamentos, como corticosteroides e anticolinérgicos inalatórios, utilizados no tratamento de doenças pulmonares não apresentaram relação positiva com o risco para DP (HOPFNER et al., 2019; SEARLES NIELSEN et al., 2018).

Em nosso estudo, observamos que PRO também foi capaz de reduzir a imunorreatividade para α -syn em ratos que receberam RES-PRO, no entanto, Mittal et al.

(2017) não relataram o efeito do PRO *in vivo* (MITTAL et al., 2017). Estudos epidemiológicos mostram que o uso de PRO, mas não outros β -bloqueadores, apresentam uma relação positiva com o risco para a DP (GRONICH et al., 2018; HOPFNER et al., 2019; SEARLES NIELSEN et al., 2018). Mais estudos, epidemiológicos e experimentais, são necessários para entender a relação entre os RA β e a DP.

Na DP, um dos sinais pré-motores que marcam o início da doença é a hiposmia provocada pela redução de neurônios dopaminérgicos no BO (UBEDA-BAÑON et al., 2014). Por outro lado, um estudo sugere que a hiposmia em pacientes da DP está associado a um aumento significativo de neurônios dopaminérgicos e da liberação de DA no BO desses pacientes (HUISMAN; UYLINGS; HOOGLAND, 2004). Apesar de alguns estudos mostrarem uma redução de células TH⁺ e um aumento da expressão de α -syn no BO (BRAAK et al., 2003; HÖGLINGER et al., 2015; UBEDA-BAÑON et al., 2014; VORONKOV et al., 2017), no presente trabalho, a RES não provocou alteração na imunorreatividade para TH e α -syn do BO (Figura 16E e 22D), mas aumentou os níveis de α -syn na ASV (Figura 22C), região com células-tronco que dão origem aos neurônios do BO (ALVAREZ-BUYLLA; GARCÍA-VERDUGO, 2002; CURTIS et al., 2007) área afetada na DP (BRANDT et al., 2017; LAZARINI et al., 2014; NAPOLI, 2017). Esse aumento de α -syn na ASV dos animais que receberam RES foi inibido por ambos os fármacos, SALB e PRO. Recentemente, foi relatado que a redução da expressão de VMAT-2 em camundongos submetidos a MPTP provocou déficit olfatório e redução da neurogênese no BO (MA et al., 2019). Como a RES é um bloqueador do VMAT-2, possivelmente o tempo de administração não tenha sido suficiente para provocar alterações na marcação para TH e α -syn no BO. Uma outra hipótese que não pode ser descartada é que o modelo experimental de parkinsonismo induzido pela administração repetida de baixa dose de RES (0,1mg/kg) pode estar associado às lesões iniciais, que envolve deservação retrógrada monoaminérgica (LEAL et al., 2019a), mas não na efetiva morte dessas células. Essa característica, do modelo em questão, fortalece a necessidade de estudos com o modelo da RES, uma vez que esse modelo possibilita, principalmente as alterações fisiopatológicas e comportamentais iniciais da DP.

Neste trabalho observamos que o uma única injeção de SALB e PRO atenuou alguns parâmetros motores, como a redução de MOFS, mastigação no vácuo e protusão de língua. Enquanto a administração repetida de SALB reduziu progressivamente o tempo de catalepsia e PRO atenuou o aumento de MOFS (mastigação no vácuo e tremor oral), induzidos por RES. Em relação aos aspectos neuroquímicos, observamos que tanto SALB quanto PRO protegeu

contra a depleção de TH e D β H e o aumento de α -syn provocado por RES. Acreditamos que para entender melhor a participação desses fármacos no comportamento motor do modelo experimental de parkinsonismo induzido por RES é preciso avaliar o desempenho motor desses animais em outros testes comportamentais durante um maior período de tratamento. Além disso, o efeito neuroprotetor provocado pela modulação dos RA β , nos parâmetros neuroquímicos observados em ratos tratados com RES-SALB e RES-PRO, parece envolver mecanismos que modulam a liberação de fatores pró e anti-inflamatórios e a ativação microglial. No entanto, são necessários outros estudos que possam esclarecer esses mecanismos.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que a modulação dos RA β promoveu um efeito neuroprotetor sobre as alterações motoras e neuroquímicas do modelo experimental de parkinsonismo induzido por RES. Dessa forma, assim como a noradrenalina, os agentes farmacológicos que modulam os RA β (SALB e PRO) parecem ser potenciais terapêuticos para impedir a progressão da DP. No entanto, novos estudos são necessários para entender os mecanismos desempenhados por esses receptores para promover um efeito neuroprotetor.

8. PERSPECTIVAS

No presente trabalho observamos que tanto o agonista RA β 2 quanto o antagonista não seletivo dos RA β promovem neuroproteção contra os déficits motores e principalmente neuroquímicos no modelo de parkinsonismo induzido por baixas doses de RES. Esses resultados abrem novas lacunas sobre o envolvimento desses receptores e da noradrenalina na modulação de mecanismos fisiopatológicos associados a progressão da DP. Dessa forma, estudos futuros são necessários para avaliar se a exposição prévia a esses fármacos é capaz de impedir os danos não motores, motores, neuroquímicos e aumentar os níveis de monoaminas na via nigroestriatal desse modelo animal. Investigar os mecanismos envolvidos na ativação microglial, modulação de fatores anti-inflamatórios e antioxidantes. E estudar, isoladamente, a participação dos RA β 1 e RA β 2 em mecanismos envolvidos na disfunção motora e neuroquímica no modelo experimental de parkinsonismo induzido por RES. Dessa forma, poderemos esclarecer o efeito neuroprotetor o envolvimento dos RA β nos mecanismos fisiopatológicos associados a DP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASETH, J.; DUSEK, P.; ROOS, P. M. Prevention of progression in Parkinson's disease. **BioMetals**, v. 31, n. 5, p. 737–747, 1 out. 2018.
- ABBAS, M. M.; XU, Z.; TAN, L. C. S. Epidemiology of Parkinson's Disease-East Versus West. **Movement disorders clinical practice**, v. 5, n. 1, p. 14–28, 2018.
- ABBAS, N. et al. A Wide Variety of Mutations in the Parkin Gene Are Responsible for Autosomal Recessive Parkinsonism in Europe. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 4, p. 567–574, 1 abr. 1999.
- ABÍLIO, V. C. et al. Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**, v. 47, n. 2, p. 263–272, ago. 2004.
- ALARCÓN-ARÍS, D. et al. Selective α -Synuclein Knockdown in Monoamine Neurons by Intranasal Oligonucleotide Delivery: Potential Therapy for Parkinson's Disease. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 2, p. 550–567, 7 fev. 2018.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCÍA-VERDUGO, J. M. **Neurogenesis in adult subventricular zone** *Journal of Neuroscience*, 1 fev. 2002.
- ANDICA, C. et al. Neurite orientation dispersion and density imaging of the nigrostriatal pathway in Parkinson's disease: Retrograde degeneration observed by tract-profile analysis. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 51, p. 55–60, 1 jun. 2018.
- AONO, Y. et al. Synergistic, but not separate, stimulation of accumbal $\beta 1$ - and $\beta 2$ -adrenoceptors alters the accumbal dopamine efflux in freely moving rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 715, n. 1–3, p. 363–369, 2013.
- ARKADIR, D. et al. Prodromal substantia nigra sonography undermines suggested association between substrate accumulation and the risk for *GBA* -related Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 26, n. 7, p. 1013–1018, 1 jul. 2019.
- ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 12, p. 1257–1272, 1 nov. 2016.
- BAEK, K. et al. The Time Point-Specific Effect of Beta-Adrenergic Blockade in Attenuating High Fat Diet-Induced Obesity and Bone Loss. **Calcified Tissue International**, n. 2, p. 1–10, 2018.

- BAJIC, D.; PROUDFIT, H. K. Projections from the rat cuneiform nucleus to the A7, A6 (locus coeruleus), and A5 pontine noradrenergic cell groups. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 50–51, n. 1, p. 11–20, 2013.
- BAKER, M. R.; BAKER, S. N. Beta-Adrenergic Modulation of Tremor and Corticomuscular Coherence in Humans. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49088, 20 nov. 2012.
- BALL, N. et al. Parkinson's Disease and the Environment. **Frontiers in Neurology**, v. 10, p. 218, 2019.
- BARBER, T. R. et al. Apathy in rapid eye movement sleep behaviour disorder is associated with serotonin depletion in the dorsal raphe nucleus. **Brain : a journal of neurology**, v. 141, n. 10, p. 2848–2854, 2018.
- BARNUM, C. J. et al. Effects of noradrenergic denervation on L-DOPA-induced dyskinesia and its treatment by α - And β -adrenergic receptor antagonists in hemiparkinsonian rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 3, p. 607–615, 2012.
- BASTIOLI, G. et al. Selective inhibition of mitochondrial sodium-calcium exchanger protects striatal neurons from α -synuclein plus rotenone induced toxicity. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 2, p. 80, 28 fev. 2019.
- BECK, M. H. et al. Short- and long-term dopamine depletion causes enhanced beta oscillations in the cortico-basal ganglia loop of parkinsonian rats. **Experimental Neurology**, v. 286, p. 124–136, 1 dez. 2016.
- BENSAID, M. et al. Role of pedunculopontine cholinergic neurons in the vulnerability of nigral dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 275, p. 209–219, 1 jan. 2016.
- BERG, D. et al. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease*. **Brain**, v. 128, n. 12, p. 3000–3011, 1 dez. 2005.
- BESERRA-FILHO, J. I. A. et al. Eplingiella fruticosa leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin produces a superior neuroprotective and behavioral profile in a mice model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, p. 17–29, 1 fev. 2019.
- BHIDE, N. et al. Effects of the beta-adrenergic receptor antagonist Propranolol on dyskinesia and L-DOPA-induced striatal DA efflux in the hemi-parkinsonian rat. **J Neurochem**, v. 2, n. 7, p. 222–232, 2015.

BILLINGSLEY, K. J. et al. Mitochondria function associated genes contribute to Parkinson's Disease risk and later age at onset. **npj Parkinson's Disease**, v. 5, n. 1, p. 8, 22 dez. 2019.

BISPO, J. M. M. et al. Sex differences in the progressive model of parkinsonism induced by reserpine in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 363, n. January, p. 23–29, 2019.

BJØRNARÅ, K. A. et al. Risk variants of the α -synuclein locus and REM sleep behavior disorder in Parkinson's disease: a genetic association study. **BMC Neurology**, v. 18, n. 1, p. 20, 21 fev. 2018.

BLAUWENDRAAT, C. et al. Coding variation in *GBA* explains the majority of the SYT11-GBA Parkinson's disease GWAS locus. **Movement Disorders**, v. 33, n. 11, p. 1821–1823, 1 nov. 2018.

BLESA, J. et al. Progression of dopaminergic depletion in a model of MPTP-induced Parkinsonism in non-human primates. An 18F-DOPA and 11C-DTBZ PET study. **Neurobiology of Disease**, v. 38, n. 3, p. 456–463, 1 jun. 2010.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n. DEC, p. 155, 2014.

BLUMENTHAL, S. R. et al. An electronic health records study of long-term weight gain following antidepressant use. **JAMA Psychiatry**, v. 71, n. 8, p. 889–896, 2014.

BOIX, J.; VON HIEBER, D.; CONNOR, B. Gait Analysis for Early Detection of Motor Symptoms in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 39, 6 mar. 2018.

BOVÉ, J.; PERIER, C. **Neurotoxin-based models of Parkinson's disease** NeurosciencePergamon, , 1 jun. 2012. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez20.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0306452211012668#bib306>>. Acesso em: 30 set. 2019

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 1 mar. 2003.

BRAAK, H.; DEL TREDICI, K. **Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff** Journal of Parkinson's DiseaseIOS Press, , 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28282810>>. Acesso em: 24 fev. 2019

BRANDT, M. D. et al. Early postnatal but not Late adult neurogenesis is impaired in the Pitx3-Mutant animal model of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. AUG, p. 1–10, 24 ago. 2017.

BRODSKY, M. A.; PARK, B. S.; NUTT, J. G. Effects of a dopamine agonist on the pharmacodynamics of levodopa in parkinson disease. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 1, p. 27–32, jan. 2010.

BRUINSTROOP, E. et al. Spinal projections of the A5, A6 (locus coeruleus), and A7 noradrenergic cell groups in rats. **Journal of Comparative Neurology**, v. 520, n. 9, p. 1985–2001, 2012.

BUCHMAN, A. S. et al. Locus coeruleus neuron density and parkinsonism in older adults without Parkinson's disease. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 27, n. 13, p. 1625–31, nov. 2012.

BURRÉ, J. et al. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5999, p. 1663–7, 24 set. 2010.

BUTLER, J. et al. Beta-adrenoceptor adaptation to acute exercise. **The Journal of Physiology**, v. 344, n. 1, p. 113–117, 1983.

CABALLERO, M. et al. Estimated residential exposure to agricultural chemicals and premature mortality by Parkinson's disease in Washington state. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 12, p. 11, 2018.

CABELLO-RIVERA, D. et al. Mitochondrial complex I function is essential for neural stem/progenitor cells proliferation and differentiation. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. JUN, p. 664, 26 jun. 2019.

CALIGIORE, D.; MANNELLA, F.; BALDASSARRE, G. Different Dopaminergic Dysfunctions Underlying Parkinsonian Akinesia and Tremor. **Frontiers in neuroscience**, v. 13, n. 5, p. 550, 2019.

CAMINITI, S. P. et al. Axonal damage and loss of connectivity in nigrostriatal and mesolimbic dopamine pathways in early Parkinson's disease. **NeuroImage: Clinical**, v. 14, n. 3, p. 734–740, 1 jan. 2017.

CARBALLO-CARBAJAL, I. et al. Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. **Nature Communications**, v.

10, n. 1, p. 973, 7 dez. 2019.

CARLSSON, A. Monoamine-depleting drugs. **Pharmacology And Therapeutics: Part B: General And Systematic**, v. 1, n. 3, p. 393–400, 1 jan. 1975.

CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenyl- alanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature**, v. 180, n. 11, p. 1200, 1957.

CARTER, J.; LYNCH, E. Comparison of the Effects of Salbutamol and Clenbuterol on Skeletal Muscle Mass and Carcass Composition in Senescent Rats. **Metabolism**, v. 43, n. 9, p. 1119–1125, 1994.

CERSOSIMO, M. G. et al. Weight Loss in Parkinson's Disease: The Relationship with Motor Symptoms and Disease Progression. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 7, p. 1–6, 2018.

CHAVARRÍA, C. et al. Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. **Biochemical Journal**, v. 475, n. 19, p. 3153–3169, 15 out. 2018.

CHAZALON, M. et al. GAT-3 Dysfunction Generates Tonic Inhibition in External Globus Pallidus Neurons in Parkinsonian Rodents. **Cell Reports**, v. 23, n. 6, p. 1678–1690, 8 maio 2018.

CHEN, H. et al. Weight loss in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 5, p. 676–679, 2003.

CHENG, C. M. et al. Risk of developing Parkinson's disease among patients with asthma: A nationwide longitudinal study. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 70, n. 12, p. 1605–1612, 2015.

CHINTA, S. J. et al. Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. **Cell Reports**, v. 22, n. 4, p. 930–940, 23 jan. 2018.

CLAUSEN, T. Adrenergic control of Na⁺-K⁺ homeostasis. **Acta Medica Scandinavica**, v. 672 (Suppl, p. 111–115, 1983.

COLETTI, E. et al. Contractile dysfunction and nitrergic dysregulation in small intestine of a primate model of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 5, n. 1, p. 10, 10 dez.

2019.

COWEN, P. J. et al. β -ADRENOCEPTOR AGONISTS ENHANCE 5-HYDROXYTRYPTAMINE-MEDIATED BEHAVIOURAL RESPONSES. **British Journal of Pharmacology**, v. 76, n. 2, p. 265–270, 1982.

CRABBÉ, M. et al. Increased P2X7 Receptor Binding Is Associated With Neuroinflammation in Acute but Not Chronic Rodent Models for Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. July, p. 1–9, 2019.

CURTIS, M. A. et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. **Science**, v. 315, n. 5816, p. 1243–1249, 2007.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 11 set. 2003.

DAVIS, A. A. et al. Variants in GBA, SNCA, and MAPT influence Parkinson disease risk, age at onset, and progression. **Neurobiology of Aging**, v. 37, n. 1, p. 209.e1-209.e7, 1 jan. 2016.

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

DE LAU, L. M. L.; BRETELER, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. JULY, p. 525–535, 1 jun. 2006.

DELAMARRE, A.; MEISSNER, W. G. Epidemiology, environmental risk factors and genetics of Parkinson's disease. **La Presse Médicale**, v. 46, n. 2, p. 175–181, 1 mar. 2017.

DELONG, M. R.; WICHMANN, T. Basal Ganglia Circuits as Targets for Neuromodulation in Parkinson Disease. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 11, p. 1354, 1 nov. 2015.

DENG, H.; WANG, P.; JANKOVIC, J. The genetics of Parkinson disease. **Ageing Research Reviews**, v. 42, n. 9, p. 72–85, 1 mar. 2018.

DENG, H.; YUAN, L. Genetic variants and animal models in SNCA and Parkinson disease. **Ageing Research Reviews**, v. 15, n. 1, p. 161–176, 2014.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, v. 175, n. 2, p. 303–317, 2002.

DIEDERICH, N. J. et al. Parkinson's disease: Is it a consequence of human brain evolution? **Movement Disorders**, v. 34, n. 4, p. 453–459, 2019.

DUFFY, M. F. et al. Quality over quantity: Advantages of using alpha-synuclein preformed fibril triggered synucleinopathy to model idiopathic Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. SEP, p. 621, 4 set. 2018.

DUTHEIL, F. et al. Interaction Between ABCB1 and Professional Exposure to Organochlorine Insecticides in Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 6, p. 739–745, 1 jun. 2010.

DZIEDZICKA-WASYLEWSKA, M. et al. SOME BEHAVIOURAL EFFECTS OF ANTIDEPRESSANT DRUGS ARE TIME-DEPENDENT. **Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat**, v. 25, n. 1, p. 373–393, 2001.

ELBAZ, A. et al. Epidemiology of Parkinson's disease. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 1, p. 14–26, 2015.

ENGELHARDT, E.; ENGELHARDT, E. Lafora and Trétiakoff: the naming of the inclusion bodies discovered by Lewy. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 10, p. 751–753, out. 2017.

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E. Functional Identification and Molecular Cloning of a Human Brain Vesicle Monoamine Transporter. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 6, p. 2314–2317, 1993.

ERICKSON, J. D.; EIDEN, L. E.; HOFFMAN, B. J. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 22, p. 10993–10997, 1992.

FABBRI, M. et al. Resting and Reemergent Tongue Tremor as Presenting Symptoms of Parkinson's Disease. **Movement Disorders Clinical Practice**, v. 4, n. 2, p. 273–274, 1 mar. 2016.

FAHN, S. **The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease** **Movement Disorders** John Wiley & Sons, Ltd, , 1 jan. 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/mds.22028>>. Acesso em: 10 set. 2019

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, p. 1–17, 2017.

FEARNLEY JM; LEES AJ. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. **Brain**, v. 114, n. 5, p. 2283–2301, 1991.

FEDOROW, H. et al. Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**, v. 75, n. 2, p. 109–124, 1 fev. 2005.

FERESE, R. et al. Four Copies of SNCA Responsible for Autosomal Dominant Parkinson's Disease in Two Italian Siblings. **Parkinson's Disease**, v. 2015, n. 10, p. 546462, 2015.

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

FERREIRA, J. J. et al. MDS evidence-based review of treatments for essential tremor. **Movement Disorders**, v. 34, n. 7, p. 950–958, 2019.

FERREIRA, M.; MASSANO, J. An updated review of Parkinson's disease genetics and clinicopathological correlations. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 135, n. 3, p. 273–284, 1 mar. 2017.

FIBIGER, H. C.; TRIMBACH, C.; CAMPBELL, B. A. Enhanced stimulant properties of (+)-amphetamine after chronic reserpine treatment in the rat: mediation by hypophagia and weight loss. **Neuropharmacology**, v. 11, n. 1, p. 57–67, 1972.

FITZGERALD, J. C.; PLUN-FAVREAU, H. Emerging pathways in genetic Parkinson's disease: Autosomal-recessive genes in Parkinson's disease – a common pathway? **The FEBS Journal**, v. 275, n. 23, p. 5758–5766, 1 dez. 2008.

FOFFANI, G.; OBESO, J. A. **A Cortical Pathogenic Theory of Parkinson's Disease** NeuronCell Press, , 19 set. 2018. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627318306263?via%3Dihub>>.

Acesso em: 16 set. 2019

FOWLER, S. J.; LIPWORTH, B. J. Pharmacokinetics and systemic β 2-adrenoceptor-mediated responses to inhaled salbutamol. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 4, p. 359–362, 2001.

FRAHM, S. et al. Alpha-Synuclein transgenic mice, h- α -SynL62, display α -Syn aggregation

and a dopaminergic phenotype reminiscent of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 339, p. 153–168, 26 fev. 2018.

FRANCO-IBORRA, S. et al. Defective mitochondrial protein import contributes to complex I-induced mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Cell Death and Disease**, v. 9, n. 11, p. 1–17, 2018.

FUSCO, G. et al. Structural basis of membrane disruption and cellular toxicity by alpha-synuclein oligomers. **Science**, v. 358, n. December, p. 1–4, 2017.

FUSSI, N. et al. Exosomal secretion of α -synuclein as protective mechanism after upstream blockage of macroautophagy. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 7, p. 757, 9 jul. 2018.

GAGNON, D. et al. Striatal Neurons Expressing D1 and D2 Receptors are Morphologically Distinct and Differently Affected by Dopamine Denervation in Mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41432, p. 16, 27 jan. 2017.

GAGNON, D. et al. Evidence for sprouting of dopamine and serotonin axons in the pallidum of parkinsonian monkeys. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 12, n. 5, p. 38, 15 maio 2018.

GANGULY, U. et al. Alpha-synuclein, Proteotoxicity and Parkinson's Disease: Search for Neuroprotective Therapy. **Current neuropharmacology**, v. 16, n. 7, p. 1086–1097, 2018.

GAO, V. et al. Astrocytic β 2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 30, p. 8526–31, 26 jul. 2016.

GENCER, M. et al. DNA Repair Genes in Parkinson's Disease. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 6, p. 504–507, 2012.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, n. 4, p. 987–1041, 1996.

GOLDSCHMIDT, P. L.; FRANCES, H.; SIMON, P. Stimulation of beta-adrenergic receptors and spontaneous motor activity in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 21, n. 2, p. 177–180, 1984.

GONÇALVES, C. L. et al. Lipopolysaccharide-Induced Striatal Nitrosative Stress and Impaired Social Recognition Memory Are Not Magnified by Paraquat Coexposure.

Neurochemical Research, v. 43, n. 3, p. 1–15, 23 mar. 2018.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, T. Vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 4, n. 10, p. 140, 20 out. 2010.

GOPALAI, A. A. et al. LRRK2 G2385R and R1628P mutations are associated with an increased risk of Parkinson's disease in the Malaysian population. **BioMed research international**, v. 2014, n. 7, p. 867321, 2014.

GREFFARD, S. et al. Motor score of the unified Parkinson disease rating scale as a good predictor of lewy body-associated neuronal loss in the substantia nigra. **Archives of Neurology**, v. 63, n. 4, p. 584–588, 1 abr. 2006.

GRONICH, N. et al. β 2-adrenoceptor agonists and antagonists and risk of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 33, n. 9, p. 1465–1471, 1 set. 2018.

GUNNARSSON, L. G.; BODIN, L. Parkinson's disease and occupational exposures: A systematic literature review and meta-analyses. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, v. 43, n. 3, p. 197–209, 2017.

GUNNARSSON, L. G.; BODIN, L. Occupational exposures and neurodegenerative diseases—a systematic literature review and meta-analyses. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 1, p. 17, 2019.

GUTTUSO, T. et al. Could high lithium levels in tobacco contribute to reduced risk of Parkinson's disease in smokers? **Journal of the Neurological Sciences**, v. 397, n. 1, p. 179–180, 15 fev. 2019.

HAAS, S. J.-P. et al. Expression of Tgfb β 1 and Inflammatory Markers in the 6-hydroxydopamine Mouse Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 9, p. 7, 3 jan. 2016.

HAAXMA, C. A. et al. Gender differences in Parkinson's disease. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 78, n. 8, p. 819–24, 1 ago. 2007.

HADZIPASIC, M. et al. Selective degeneration of a physiological subtype of spinal motor neuron in mice with SOD1-linked ALS. v. 111, n. 11, p. 1–6, 2014.

HALARIS, A. E.; FREEDMAN, D. X. Loss of body weight as a predictor of reserpine-induced amine depletion. **European Journal of Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 93–101, 1975.

- HALLIDAY, G. M. et al. α -Synuclein redistributes to neuromelanin lipid in the substantia nigra early in Parkinson's disease. **Brain**, v. 128, n. 11, p. 2654–2664, 1 nov. 2005.
- HALLIDAY, G. M. et al. The neurobiological basis of cognitive impairment in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 29, n. 5, p. 634–650, 15 abr. 2014.
- HANSEN, N.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Locus Coeruleus Stimulation Facilitates Long-Term Depression in the Dentate Gyrus That Requires Activation of β -Adrenergic Receptors. **Cerebral Cortex**, v. 25, n. 7, p. 1889–1896, 1 jul. 2015.
- HAYDEN, E. Y. et al. Heme Stabilization of α -Synuclein Oligomers during Amyloid Fibril Formation. **Biochemistry**, v. 54, n. 30, p. 4599–610, 4 ago. 2015.
- HENRICH, M. T. et al. A53T- α -synuclein overexpression in murine locus coeruleus induces Parkinson's disease-like pathology in neurons and glia. **Acta neuropathologica communications**, v. 6, n. 1, p. 39, 2018.
- HERRERA-MEZA, G. et al. Induction of mandibular tremor using electrolytic lesion of the ventrolateral striatum or using subchronic haloperidol therapy in male rats: An electromyographic comparison. **Neurología (English Edition)**, v. 29, n. 7, p. 416–422, 2014.
- HERTZ, L. et al. Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and $[Ca^{2+}]_i$. **Neurochemistry international**, v. 57, n. 4, p. 411–20, nov. 2010.
- HIRSCH, L. et al. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 4, p. 292–300, 2016.
- HIRTZ, D. et al. How common are the “common” neurologic disorders? **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 326–337, 30 jan. 2007.
- HOFER, S. M.; BERG, S.; ERA, P. Evaluating the interdependence of aging-related changes in visual and auditory acuity, balance, and cognitive functioning. **Psychology and Aging**, v. 18, n. 2, p. 285–305, 2003.
- HÖGLINGER, G. U. et al. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. **Acta Neuropathologica**, v. 130, n. 3, p. 333–348, 2015.
- HOPFNER, F. et al. Use of β 2-Adrenoreceptor agonist and antagonist drugs and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 93, n. 2, p. E135–E142, 2019.
- HORNUNG, J.-P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **Journal of**

Chemical Neuroanatomy, v. 26, n. 4, p. 331–343, 1 dez. 2003.

HOSTE, A. M. Beta-Blockers. **Glaucoma: Second Edition**, v. 1, p. 548–558, 2015.

HOU, L. et al. Paraquat and maneb co-exposure induces noradrenergic locus coeruleus neurodegeneration through NADPH oxidase-mediated microglial activation. **Toxicology**, v. 380, n. 2, p. 1–10, 1 abr. 2017.

HSIEH, Y.-C.; MOUNSEY, R. B.; TEISMANN, P. MPP⁺-induced toxicity in the presence of dopamine is mediated by COX-2 through oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 384, n. 2, p. 157–167, 12 ago. 2011.

HUANG, B. et al. Phosphorylated α -Synuclein Accumulations and Lewy Body-like Pathology Distributed in Parkinson's Disease-Related Brain Areas of Aged Rhesus Monkeys Treated with MPTP. **Neuroscience**, v. 379, p. 302–315, 21 maio 2018.

HUISMAN, E.; UYLINGS, H. B. M.; HOOGLAND, P. V. A 100% increase of dopaminergic cells in the olfactory bulb may explain hyposmia in parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 19, n. 6, p. 687–692, 2004.

ILJINA, M. et al. Nanobodies raised against monomeric α -synuclein inhibit fibril formation and destabilize toxic oligomeric species. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 57, 3 dez. 2017.

JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 141–151, 15 jan. 2007.

JAGMAG, S. A. et al. Evaluation of models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. JAN, p. 503, 19 jan. 2016.

JAMES, K. A.; HALL, D. A. Groundwater Pesticide Levels and the Association With Parkinson Disease. **International Journal of Toxicology**, v. 34, n. 3, p. 266–273, 4 maio 2015.

JANEZIC, S. et al. Deficits in dopaminergic transmission precede neuron loss and dysfunction in a new Parkinson model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 1–10, 15 out. 2013.

JIANG, H. et al. Proteomic study of a parkinson's disease model of undifferentiated SH-SY5Y cells induced by a proteasome inhibitor. **International Journal of Medical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 84–92, 2019.

JIANG, L. et al. A novel role of microglial NADPH oxidase in mediating extra-synaptic function of norepinephrine in regulating brain immune homeostasis. **Glia**, v. 63, n. 6, p. 1057–1072, 2015.

JING XIA CAI et al. Reserpine impairs spatial working memory performance in monkeys: reversal by the α 2-adrenergic agonist clonidine. **Brain Research**, v. 614, n. 1–2, p. 191–196, 18 jun. 1993.

KAB, S. et al. Agricultural activities and the incidence of Parkinson's disease in the general French population. **European Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 3, p. 203–216, 9 mar. 2017.

KALINDERI, K.; BOSTANTJOPOULOU, S.; FIDANI, L. The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 134, n. 5, p. 314–326, 1 nov. 2016.

KANG, S. S. et al. α -Synuclein stimulation of monoamine oxidase-B and legumain protease mediates the pathology of Parkinson's disease. **The EMBO journal**, v. 16, n. 5, p. 1–19, 2018.

KASTEN, M. et al. Genotype-Phenotype Relations for the Parkinson's Disease Genes *Parkin*, *PINK1*, *DJ1*: MDSGene Systematic Review. **Movement Disorders**, v. 33, n. 5, p. 730–741, 1 maio 2018.

KASTEN, M.; KLEIN, C. The many faces of alpha-synuclein mutations. **Movement Disorders**, v. 28, n. 6, p. 697–701, 1 jun. 2013.

KEENEY, P. M. et al. Parkinson's Disease Brain Mitochondrial Complex I Has Oxidatively Damaged Subunits and Is Functionally Impaired and Misassembled. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 19, p. 5256–5264, 10 maio 2006.

KIM, S. et al. Alpha-synuclein interferes with cAMP/PKA-dependent upregulation of dopamine β -hydroxylase and is associated with abnormal adaptive responses to immobilization stress. **Experimental Neurology**, v. 252, p. 63–74, 1 fev. 2014.

KIM, S. S.; MOON, K. R.; CHOI, H. J. Interference of alpha-synuclein with cAMP/PKA-dependent CREB signaling for tyrosine hydroxylase gene expression in SK-N-BE(2)C cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 5, p. 837–845, 2011.

KLOS, K. J. et al. Alpha-synuclein immunohistochemistry in two cases of co-occurring

- idiopathic Parkinson's disease and motor neuron disease. **Movement Disorders**, v. 20, n. 11, p. 1515–1520, 1 nov. 2005.
- KOLBER, P.; KRÜGER, R. Gene-environment interaction and Mendelian randomisation. **Revue Neurologique**, n. 4, p. 1–7, 19 set. 2019.
- KREINER, G. et al. Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive parkinsonism. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5262, 27 dez. 2019.
- KUMAR, D.; BOHRA, G. K.; AGARWAL, M. **Re-emergent tremor of Parkinson's disease** *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.nmji.in>. Acesso em: 19 dez. 2019.
- LA COGNATA, V. et al. Differential expression of *PARK2* splice isoforms in an in vitro model of dopaminergic-like neurons exposed to toxic insults mimicking Parkinson's disease. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 1062–1073, 1 jan. 2018.
- LANGSTON, J. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 979–980, 1983.
- LANGSTON, J. W.; BALLARD, P. A. Parkinson's Disease in a Chemist Working with 1-Methyl-4-Phenyl-L,2,5,6-Tetrahydropyridine. **N Engl J Med**, v. 309, n. 5, p. 310, 1983.
- LAZARINI, F. et al. Adult neurogenesis restores dopaminergic neuronal loss in the olfactory bulb. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 43, p. 14430–14442, 22 out. 2014.
- LEAL, P. C. et al. Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. JUN, p. 1–4, 21 jun. 2016.
- LEAL, P. C. et al. Cognitive and anxiety-like impairments accompanied by serotonergic ultrastructural and immunohistochemical alterations in early stages of parkinsonism. **Brain Research Bulletin**, v. 146, n. October 2018, p. 213–223, 2019a.
- LEAL, P. C. et al. Serotonergic dysfunction in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 96, n. November 2018, p. 73–78, 2019b.
- 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**, v. 25, n. 4, p. 377–390, 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, n. MAR, p. 1–13, 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, 10 jul. 2015a.
- LEE, P. C. et al. Head injury, α -synuclein genetic variability and Parkinson's disease. **European Journal of Neurology**, v. 22, n. 5, p. 874–878, 1 maio 2015b.
- LI, X. et al. Early stages of aggregation of engineered α -synuclein monomers and oligomers in solution. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1734, 11 dez. 2019.
- LI, Y. et al. Investigation of behavioral dysfunctions induced by monoamine depletions in a mouse model of Parkinson's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 241, 2018.
- LINDENBACH, D. et al. Behavioral and cellular modulation of L-DOPA-induced dyskinesia by beta-adrenoceptor blockade in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 337, n. 3, p. 755–65, 1 jun. 2011.
- 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, n. 1, p. 9–15, 2018.
- LIU, A. G. et al. The effect of caffeine and albuterol on body composition and metabolic rate. **Obesity**, v. 23, n. 9, p. 1830–1835, 1 set. 2015.
- LIU, X. et al. Mechanism of β 2AR regulation by an intracellular positive allosteric modulator. **Science (New York, N.Y.)**, v. 364, n. 6447, p. 1283–1287, 28 jun. 2019a.
- LIU, Y. U. et al. Neuronal network activity controls microglial process surveillance in awake mice via norepinephrine signaling. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. November, p. 1771–1781, 2019b.
- LOREFÄLT, B.; TOSS, G.; GRANÉRUS, A. K. Weight loss, body fat mass, and Leptin in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 24, n. 6, p. 885–890, 2009.

- LOZOVAYA, N. et al. GABAergic inhibition in dual-transmission cholinergic and GABAergic striatal interneurons is abolished in Parkinson disease. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1422, 12 dez. 2018.
- LOZOVAYA, N.; BEN-ARI, Y.; HAMMOND, C. Striatal dual cholinergic /GABAergic transmission in Parkinson disease: friends or foes? **Cell stress**, v. 2, n. 6, p. 147–149, 27 maio 2018.
- LU, D. S. et al. Combination treatment of icariin and L-DOPA against 6-OHDA-lesioned dopamine neurotoxicity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 155, 16 maio 2018.
- LU, T. et al. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. **Nature**, v. 429, n. 6, p. 883–891, 9 jun. 2004.
- LUAN, Y. et al. Chronic caffeine treatment protects against α -synucleinopathy by reestablishing autophagy activity in the mouse striatum. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. MAY, p. 301, 2 maio 2018.
- LUO, Y. et al. Desipramine rescues emotional memory deficit induced by low doses of reserpine. **Behavioural Pharmacology**, v. 28, n. 6, p. 441–449, 2017.
- MA, K. et al. Reduced VMAT2 expression exacerbates the hyposmia in the MPTP model of Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 513, n. 2, p. 306–312, 28 maio 2019.
- MAHUL-MELLIER, A.-L. et al. Fibril growth and seeding capacity play key roles in α -synuclein-mediated apoptotic cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 12, p. 2107–2122, 3 dez. 2015.
- MAKHLOUF, K.; WEINER, H. L.; KHOURY, S. J. Potential of β 2-adrenoceptor agonists as add-on therapy for multiple sclerosis focus on salbutamol (albuterol). **CNS Drugs**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2002.
- MALLET, N. et al. Cellular and Synaptic Dysfunctions in Parkinson's Disease : Stepping out of the Striatum. v. 1005, n. 8, p. 1–31, 2019.
- MANALO, R. V. M.; MEDINA, P. M. B. Caffeine Protects Dopaminergic Neurons From Dopamine-Induced Neurodegeneration via Synergistic Adenosine-Dopamine D2-Like Receptor Interactions in Transgenic *Caenorhabditis elegans*. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. March, p. 1–9, 2018.

- MANE, J. Y.; STEPANOVA, M. Understanding the dynamics of monomeric, dimeric, and tetrameric α -synuclein structures in water. **FEBS Open Bio**, v. 6, n. 7, p. 666–686, 2016.
- MANN, D. M. A. Pyramidal nerve cell loss in Alzheimer's disease. **Neurodegeneration**, v. 5, n. 4, p. 423–427, 1996.
- MANN, T. et al. Dopamine, Noradrenaline and Serotonin Receptor Densities in the Striatum of Hemiparkinsonian Rats following Botulinum Neurotoxin-A Injection. **Neuroscience**, v. 374, p. 187–204, 15 mar. 2018.
- MANTRI, S. et al. State-level prevalence, health service use, and spending vary widely among Medicare beneficiaries with Parkinson disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 5, n. 1, p. 1, 24 dez. 2019.
- MARCHANT-FORDE, J. N. et al. The effects of R-salbutamol on growth, carcass measures, and health of finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 11, p. 4081–4089, 2012.
- MARSDEN, C. D. Pigmentation in the nucleus substantiae nigrae of mammals. **Journal of anatomy**, v. 95, p. 256–61, 1961.
- MATHEOUD, D. et al. Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in Pink1^{-/-} mice. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 565–569, 2019.
- MATSUI, H.; KENMOCHI, N.; NAMIKAWA, K. Age- and α -Synuclein-Dependent Degeneration of Dopamine and Noradrenaline Neurons in the Annual Killifish *Nothobranchius furzeri*. **Cell Reports**, v. 26, n. 7, p. 1727- 1733.e6, 12 fev. 2019.
- MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 278–294, 1 abr. 2006.
- MCNAUGHT, K. S. P. et al. Failure of the ubiquitin–proteasome system in Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 8, p. 589–594, ago. 2001.
- MCQUEEN, E. G.; DOYLE, A. E.; SMIRK, F. H. **Mechanism of hypotensive action of reserpine, an alkaloid of Rauwolfia serpentina** *Nature*, 1954.
- MCWILLIAMS, T. G.; MUQIT, M. M. PINK1 and Parkin: emerging themes in mitochondrial homeostasis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 45, p. 83–91, 1 abr. 2017.
- MHYRE, T. R. et al. Parkinson's Disease. **Subcell Biochem**, n. 65, p. 389–455, 2012.
- MICHAEL JEFFERSON. James Parkinson 1755-1824. **British Medical journal**, v. 2, p.

601–603, 1973.

MICHEL, P. P.; HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. **Neuron**, v. 90, n. 4, p. 675–691, 18 maio 2016.

MILNER, T. A.; SHAH, P.; PIERCE, J. P. β -Adrenergic receptors primarily are located on the dendrites of granule cells and interneurons but also are found on astrocytes and a few presynaptic profiles in the rat dentate gyrus. **Synapse**, v. 36, n. 3, p. 178–193, 2000.

MITTAL, S. et al. Beta2-Adrenoreceptor is a regulator of the alpha-synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. **Science**, v. 357, n. 7, p. 891–898, 2017.

MIYARA, M. et al. Mild MPP⁺ exposure impairs autophagic degradation through a novel lysosomal acidity-independent mechanism. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. 2, p. 294–308, 1 out. 2016.

MOCHIZUKI, H. et al. β 2-adrenergic receptor haplotype may be associated with susceptibility to desensitization to long-acting β 2-agonists in COPD patients..pdf. **Lung**, n. 3, p. 1–7, 2012.

MOISAN, F. et al. Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 87, n. 9, p. 952–957, 2016.

MOSHAROV, E. V et al. Interplay between Cytosolic Dopamine, Calcium, and α -Synuclein Causes Selective Death of Substantia Nigra Neurons. **Neuron**, v. 62, n. 2, p. 218–229, 2009.

MUANGPAISAN, W.; HORI, H.; BRAYNE, C. Systematic Review of the Prevalence and Incidence of Parkinson's Disease in Asia. **Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 6, p. 281–293, 2009.

NADE, V. S. et al. Protective effect of nebivolol on reserpine-induced neurobehavioral and biochemical alterations in rats. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 4, p. 316–321, 2013.

NALLS, M. A. et al. Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. **Nature genetics**, v. 46, n. 9, p. 989–93, set. 2014.

NAPOLI, E. Endogenous repair mechanisms enhanced in Parkinson's disease following stem cell therapy. **Brain Circulation**, v. 3, n. 3, p. 163, 2017.

NARAYAN, S. et al. Occupational pesticide use and Parkinson's disease in the Parkinson

Environment Gene (PEG) study. **Environment International**, v. 107, n. 4, p. 266–273, 1 out. 2017.

NICHOLATOS, J. W. et al. Nicotine promotes neuron survival and partially protects from Parkinson's disease by suppressing SIRT6. **Acta neuropathologica communications**, v. 6, n. 1, p. 120, 2018.

NISWENDER, C. M. et al. Discovery, characterization, and antiparkinsonian effect of novel positive allosteric modulators of metabotropic glutamate receptor 4. **Molecular pharmacology**, v. 74, n. 5, p. 1345–58, 1 nov. 2008.

NIZET, T. A. C.; BROEDERS, M. E. A. C.; FOLGERING, H. T. M. Tremor side effects of salbutamol, quantified by a laser pointer technique. **Respiratory Medicine**, v. 98, n. 9, p. 844–850, set. 2004.

NUMAO, A. et al. Resting and re-emergent tongue tremor in Parkinson's disease. **BMJ case reports**, n. 10, p. 1, 1 nov. 2017.

O'DONNELL, J. M. Differential sensitivity to the effects of albuterol on locomotor activity and operant behavior. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 243–249, 1993.

O'NEILL, E. et al. Pharmacological targeting of β 2 -adrenoceptors is neuroprotective in the LPS inflammatory rat model of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 6701, p. 0–1, 2019.

O'NEILL, E.; HARKIN, A. Targeting the noradrenergic system for anti-inflammatory and neuroprotective effects: implications for Parkinson's disease. **Neural regeneration research**, v. 13, n. 8, p. 1332–1337, ago. 2018.

OBESO, J. A. et al. The basal ganglia in Parkinson's disease: Current concepts and unexplained observations. **Annals of Neurology**, v. 64, n. SUPPL. 2, p. 30–46, 2008.

OKUBADEJO, N. U. et al. Leucine rich repeat kinase 2 (LRRK2) GLY2019SER mutation is absent in a second cohort of Nigerian Africans with Parkinson disease. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0207984, 3 dez. 2018.

OSHIMA, N. et al. Expression and functions of β 1 - and β 2-adrenergic receptors on the bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension**, v. 37, n. 11, p. 976–983, 2014.

PAJARILLO, E. et al. The role of posttranslational modifications of α -synuclein and LRRK2 in Parkinson's disease: Potential contributions of environmental factors. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1865, n. 8, p. 1992–2000, 1 ago. 2019.

PALACIOS-SÁNCHEZ, L. et al. James Parkinson and his essay on “shaking palsy”, two hundred years later. **Archivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 9, p. 671–672, set. 2017.

PARK, J. et al. Abnormal Mitochondria in a Non-human Primate Model of MPTP-induced Parkinson's Disease: Drp1 and CDK5/p25 Signaling. **Experimental Neurobiology**, v. 28, n. 3, p. 414, jun. 2019.

PARK, S. E. et al. Graded 6-OHDA-induced dopamine depletion in the nigrostriatal pathway evokes progressive pathological neuronal activities in the subthalamic nucleus of a hemiparkinsonian mouse. **Behavioural Brain Research**, v. 344, n. 2, p. 42–47, 15 maio 2018.

PATIL, R. A.; KASTURE, S. B. Protective effect of *Rubia cordifolia* on reserpine-induced orofacial dyskinesia. **Natural Product Research**, v. 26, n. 22, p. 2159–2161, 2011.

PAUL, K. C. et al. The association between lifestyle factors and Parkinson's disease progression and mortality. **Movement Disorders**, v. 34, n. 1, p. 58–66, 1 jan. 2019.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. [s.l.: s.n.]. v. 170

PEARCE, J. M. Aspects of the history of Parkinson's disease. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. Suppl, n. Suppl, p. 6–10, 1 jun. 1989.

PERES, F. F. et al. Cannabidiol prevents motor and cognitive impairments induced by reserpine in rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. SEP, p. 343, 28 set. 2016.

PHILIPPENS, I. H. C. H. M. et al. Involvement of the Red Nucleus in the Compensation of Parkinsonism may Explain why Primates can develop Stable Parkinson's Disease. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 880, 29 dez. 2019.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17013, 23 mar. 2017.

POLITIS, M. et al. Staging of serotonergic dysfunction in Parkinson's Disease: An in vivo ¹¹C-DASB PET study. **Neurobiology of Disease**, v. 40, n. 1, p. 216–221, 1 out. 2010.

POLITIS, M.; NICCOLINI, F. Serotonin in Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 136–145, 15 jan. 2015.

- POLYMEROPOULOS, M. H. et al. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. **Science**, v. 274, n. 5290, p. 1197–1199, 1996.
- POSTUMA, R. B. et al. Caffeine as symptomatic treatment for Parkinson disease (Café-PD). **Neurology**, v. 89, n. 17, p. 1795–1803, 2017.
- POULIN, J.-F. et al. Defining Midbrain Dopaminergic Neuron Diversity by Single-Cell Gene Expression Profiling. **Cell Reports**, v. 9, n. 3, p. 930–943, 6 nov. 2014.
- PRINGSHEIM, T. et al. The Prevalence of Parkinson's Disease : A Systematic Review and. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, 2014.
- QIAN, L. et al. β 2 adrenergic receptor activation induces microglial NADPH oxidase activation and dopaminergic neurotoxicity through an ERK-dependent/protein kinase A-independent pathway. **GLIA**, v. 57, n. 15, p. 1600–1609, 15 nov. 2009.
- RANA, A. Q. et al. Decreased sleep quality in Parkinson's patients is associated with higher anxiety and depression prevalence and severity, and correlates with pain intensity and quality. **Neurological Research**, v. 40, n. 8, p. 696–701, 2018.
- RAWJI, K. S. et al. Immunosenescence of microglia and macrophages: impact on the ageing central nervous system. **Brain**, v. 139, n. 3, p. 653–661, 1 mar. 2016.
- RAY DORSEY, E. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, 1 nov. 2018.
- REDGRAVE, P. et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 760–72, 2010.
- REQUEJO-AGUILAR, R. et al. DJ1 represses glycolysis and cell proliferation by transcriptionally up-regulating Pink1. **The Biochemical journal**, v. 467, n. 2, p. 303–10, 15 abr. 2015.
- RIEDEL, O. et al. Estimating the prevalence of Parkinson's disease (PD) and proportions of patients with associated dementia and depression among the older adults based on secondary claims data. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 31, n. 8, p. 938–943, ago. 2016.
- ROBERTS, R. F.; WADE-MARTINS, R.; ALEGRE-ABARRATEGUI, J. Direct

visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. **Brain**, v. 138, n. 6, p. 1642–1657, jun. 2015.

RODRIGUES E SILVA, A. M. et al. Who was the man who discovered the “Lewy bodies”? **Movement Disorders**, v. 25, n. 12, p. 1765–1773, 2010.

RODRIGUES, Y. E.; FREITAS, J. DA S. CA1 and CA3 pyramidal cell morphologies under Alzheimer's disease Amyloid beta interaction. **bioRxiv**, p. 187476, 12 set. 2017.

ROWLAND, L. P.; SHNEIDER, N. A. AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS. **English Journal**, v. 344, n. 22, p. 1688–1700, 2001.

RYAN, B. J. et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 200–210, 1 abr. 2015.

RYAN, K. J. et al. Stimulation of central β_2 -adrenoceptors suppresses NF κ B activity in rat brain: A role for I κ B. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 5, p. 368–378, 1 nov. 2013.

RYAN, M. B.; BAIR-MARSHALL, C.; NELSON, A. B. Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. **Cell Reports**, v. 23, n. 12, p. 3438–3446.e5, 19 jun. 2018.

SANKARANARAYANI, R. et al. Altered neuronal activities in the motor cortex with impaired motor performance in adult rats observed after infusion of cerebrospinal fluid from amyotrophic lateral sclerosis patients. **Behavioural Brain Research**, v. 206, p. 109–119, 2010.

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

SARA, S. J. **The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition** **Nature Reviews Neuroscience** Nature Publishing Group, , 4 mar. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn2573>>. Acesso em: 20 set. 2019

SAUERBIER, A. et al. Impact of ethnicity on the natural history of parkinson disease. **Medical Journal of Australia**, v. 208, n. 9, p. 410–414, 2018.

SCHEININ, M. et al. Hypokalaemia and other non-bronchial effects of inhaled fenoterol and salbutamol: a placebo-controlled dose-response study in healthy volunteers. **British Journal**

of **Clinical Pharmacology**, v. 24, n. 5, p. 645–653, 1987.

SCHMITZ, D. et al. β -Adrenergic blockade during systemic inflammation: Impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis. **Resuscitation**, v. 72, n. 2, p. 286–294, 2007.

SEARLES NIELSEN, S. et al. β 2-adrenoreceptor medications and risk of Parkinson disease. **Annals of Neurology**, v. 84, n. 5, p. 683–693, 1 nov. 2018.

SEDELIS, M.; SCHWARTING, R. K. .; HUSTON, J. P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 125, n. 1–2, p. 109–125, 8 nov. 2001.

SEPE, S. et al. Inefficient DNA Repair Is an Aging-Related Modifier of Parkinson's Disease. **Cell reports**, v. 15, n. 9, p. 1866–1875, 31 maio 2016.

SHU, L. et al. SNCA REP1 and Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 682, n. 5, p. 79–84, 24 ago. 2018.

SHU, L. et al. A Comprehensive Analysis of Population Differences in LRRK2 Variant Distribution in Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, n. 1, p. 13, 30 jan. 2019.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 11, n. 3–4, p. 151–167, 2007.

SIMÓN-SÁNCHEZ, J. et al. Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. **Nature Genetics**, v. 41, n. 12, p. 1308–1312, 15 dez. 2009.

SINGLETON, A. B. et al. α -Synuclein Locus Triplication Causes Parkinson's Disease. **Science**, v. 302, n. October, p. 841, 2003.

SKIBINSKI, G. et al. Nrf2 mitigates LRRK2- and α -synuclein-induced neurodegeneration by modulating proteostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 5, p. 1165–1170, 31 jan. 2017.

SOTO-OTERO, R. et al. Autoxidation and neurotoxicity of 6-hydroxydopamine in the presence of some antioxidants: Potential implication in relation to the pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1605–1612, 2000.

SOUZA, M. F. et al. Deltamethrin Intranasal administration induces memory, emotional and

tyrosine hydroxylase immunoreactivity alterations in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 142, n. September, p. 297–303, 2018.

SPILLANTINI, M. G. et al. α -Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839–840, 28 ago. 1997.

STAHL, S. M. Mechanism of action of vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) inhibitors in tardive dyskinesia: Reducing dopamine leads to less “go” and more “stop” from the motor striatum for robust therapeutic effects. **CNS Spectrums**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2018.

STERN, G. Did Parkinsonism occur before 1817? **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. Special Supplement**, p. 11–12, 1989.

STOWELL, R. D. et al. Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. **Nature Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 1782–1792, 21 nov. 2019.

SUGAMA, S. et al. Stress-induced microglial activation occurs through β -adrenergic receptor: noradrenaline as a key neurotransmitter in microglial activation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 266, 17 dez. 2019.

SURMEIER, D. J.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, G. M. **Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease** **Nature Reviews Neuroscience** Nature Publishing Group, , 1 fev. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrn.2016.178>>. Acesso em: 10 jan. 2019

TABATA, Y. et al. T-type Calcium Channels Determine the Vulnerability of Dopaminergic Neurons to Mitochondrial Stress in Familial Parkinson Disease. **Stem Cell Reports**, v. 11, n. 5, p. 1171–1184, 13 nov. 2018.

THIBAudeau, T. A.; ANDERSON, R. T.; SMITH, D. M. A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1097, 15 dez. 2018.

TIEU, K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson’s disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a009316, set. 2011.

TOLÖ, J. et al. Pathophysiological consequences of neuronal α -synuclein overexpression: Impacts on ion homeostasis, stress signaling, mitochondrial integrity, and electrical activity. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 3, p. 49, 7 mar. 2018.

- TONG, H. et al. Simvastatin Inhibits Activation of NADPH Oxidase/p38 MAPK Pathway and Enhances Expression of Antioxidant Protein in Parkinson Disease Models. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. 5, p. 165, 22 maio 2018.
- TONG, J.; HORNYKIEWICZ, O.; KISH, S. J. Inverse Relationship Between Brain Noradrenaline Level and Dopamine Loss in Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, v. 63, n. 12, p. 1724, 1 dez. 2006.
- TORRES-ODIO, S. et al. Progression of pathology in PINK1-deficient mouse brain from splicing via ubiquitination, ER stress, and mitophagy changes to neuroinflammation. **Journal of neuroinflammation**, v. 14, n. 1, p. 154, 2017.
- TOZZI, A. et al. Dopamine D2 receptor-mediated neuroprotection in a G2019S Lrrk2 genetic model of Parkinson's disease. **Cell death & disease**, v. 9, n. 2, p. 204, 2018.
- TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, n. July, p. 1–23, 2019.
- UBEDA-BAÑON, I. et al. α -Synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: Role of neural connections on spreading pathology. **Brain Structure and Function**, v. 219, n. 5, p. 1513–1526, 2014.
- UC, E. Y. et al. Albuterol improves response to levodopa and increases skeletal muscle mass in patients with fluctuating Parkinson disease. **Clinical Neuropharmacology**, v. 26, n. 4, p. 207–212, 2003.
- UZKESER, H. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of salbutamol on acute and chronic models of inflammation in rats: Involvement of an antioxidant mechanism. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, n. 2, p. 1–10, 2012.
- VALDMAN, E. et al. Evolution of anti-parkinsonian activity of monoterpenoid (1R,2R,6S)-3-methyl-6-(prop-1-en-2-yl)cyclohex-3-ene-1,2-diol in various in vivo models. **European Journal of Pharmacology**, v. 815, p. 351–363, 15 nov. 2017.
- VERMILYEA, S. C.; EMBORG, M. E. α -Synuclein and nonhuman primate models of Parkinson's disease. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 255, n. 11, p. 38–51, 30 nov. 2015.
- VIDYADHARA, D. J. et al. Admixing of MPTP-Resistant and Susceptible Mice Strains Augments Nigrostriatal Neuronal Correlates to Resist MPTP-Induced Neurodegeneration.

Molecular Neurobiology, v. 54, n. 8, p. 6148–6162, 4 out. 2017.

VILA, M. Neuromelanin, aging, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease.

Movement Disorders, n. 5, p. 1–12, 2019.

VIVEKANANTHAM, S. et al. Neuroinflammation in Parkinson's disease: Role in neurodegeneration and tissue repair. **International Journal of Neuroscience**, v. 125, n. 10, p. 717–725, 2015.

VORONKOV, D. N. et al. Localization of α -Synuclein in the Rat Brain and Its Relationship with Dopaminergic Structures. **Neuroscience and Behavioral Physiology**, v. 47, n. 9, p. 1147–1152, 2017.

WANG, T. et al. Firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons increases in a rodent model of Parkinsonism. **Neuroscience Bulletin**, v. 25, n. 1, p. 15–20, 2009.

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, n. April 2016, p. 1–9, 2017.

WERSINGER, C.; JEANNOTTE, A.; SIDHU, A. Attenuation of the norepinephrine transporter activity and trafficking via interactions with α -synuclein. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 3141–3152, 2006.

WHITE, L. D.; BARONE, S. Qualitative and quantitative estimates of apoptosis from birth to senescence in the rat brain. **Cell Death & Differentiation**, v. 8, n. 4, p. 345–356, 1 abr. 2001.

WIHAN, J. et al. Layer-specific axonal degeneration of serotonergic fibers in the prefrontal cortex of aged A53T α -synuclein-expressing mice. **Neurobiology of Aging**, v. 80, p. 29–37, 1 ago. 2019.

WILLARD, A. M. et al. State transitions in the substantia nigra reticulata predict the onset of motor deficits in models of progressive dopamine depletion in mice. **eLife**, v. 8, n. 3, p. 27, 6 mar. 2019.

WILSON, H. et al. Serotonergic dysregulation is linked to sleep problems in Parkinson's disease. **NeuroImage: Clinical**, v. 18, p. 630–637, 2018.

WILSON, R. S. et al. Neural reserve, neuronal density in the locus ceruleus, and cognitive decline. **Neurology**, v. 80, n. 13, p. 1202–1208, 2013.

WINKLHOFER, K. F.; HAASS, C. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, v. 1802, n. 1, p. 29–44, 1 jan. 2010.

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 9, p. 1–58, 2011.

WISE, J. P. et al. Autophagy disruptions associated with altered optineurin expression in extranigral regions in a rotenone model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, n. MAY, p. 289, 16 maio 2018.

WONG, Y. C.; KRAINIC, D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. **Nature Medicine**, v. 23, n. 2, p. 1–13, 1 fev. 2017.

WRIGHT WILLIS, A. et al. Geographic and Ethnic Variation in Parkinson Disease: A Population-Based Study of US Medicare Beneficiaries. **Neuroepidemiology**, v. 34, n. 3, p. 143–151, 2010.

XING, Y. et al. Life span pigmentation changes of the substantia nigra detected by neuromelanin-sensitive MRI. **Movement Disorders**, v. 33, n. 11, p. 1792–1799, 2018.

XU, S.; CHAN, P. Interaction between Neuromelanin and Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 1122–42, 5 jun. 2015.

YAMAMOTO, H. et al. Genetic deletion of vesicular monoamine transporter-2 (VMAT2) reduces dopamine transporter activity in mesencephalic neurons in primary culture. **Neurochemistry International**, v. 51, n. 2- 4 SPEC. ISS., p. 237–244, 1 jul. 2007.

YANG, K. M. et al. Characterization of oromotor and limb motor dysfunction in the DJ1 $-/-$ model of Parkinson disease. **Behavioural Brain Research**, v. 339, p. 47–56, 26 fev. 2018.

YARNALL, A.; ARCHIBALD, N.; BURN, D. Parkinson's disease. **Medicine**, v. 40, p. 529–535, 2012.

YSSEL, J. D. et al. Treatment with the noradrenaline re-uptake inhibitor atomoxetine alone and in combination with the α 2-adrenoceptor antagonist idazoxan attenuates loss of dopamine and associated motor deficits in the LPS inflammatory rat model of Parkinson's disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 69, p. 456–469, 1 mar. 2018.

ZAFAR, F. et al. Genetic fine-mapping of the Iowan SNCA gene triplication in a patient with

Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 4, n. 1, p. 18, 2018.

ZAROW, C. et al. Neuronal Loss Is Greater in the Locus Coeruleus Than Nucleus Basalis and Substantia Nigra in Alzheimer and Parkinson Diseases. **Archives of Neurology**, v. 60, n. 3, p. 337, 1 mar. 2003.

ZARRINDAST, M. R. et al. Effects of adrenoceptor agents on apomorphine-induced licking behavior in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, n. 2, p. 275–279, fev. 2000.

ZHANG, G. et al. New Perspectives on Roles of Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, n. 11, p. 20, 22 nov. 2018.

ZHANG, Y. et al. Rescue of Pink1 Deficiency by Stress-Dependent Activation of Autophagy. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 4, p. 471–480.e4, 20 abr. 2017.

ZHANG, Z. W. et al. Effects of beta 2 adrenergic agonists on axonal injury and mitochondrial metabolism in experimental autoimmune encephalomyelitis rats. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 13572–13581, 2015.

ZHOU, Z. D. et al. Molecular targets for modulating the protein translation vital to proteostasis and neuron degeneration in Parkinson's disease. **Translational Neurodegeneration**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 4 dez. 2019.

ANEXO I - COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)



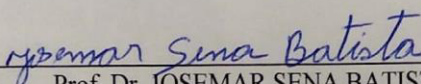
**UNIVERSIDADE DE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)**

CERTIFICADO

(2º VIA)

Certificamos que a proposta intitulada **"ATUAÇÃO DA VIA NORODRENÉRGICA E DOPAMINÉRGICA SOBRE AS ALTERAÇÕES MOTORAS E COGNITIVAS EM UM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA"**, registrada com o nº 13/2018, sob a responsabilidade da **Profª. Drª. 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 **14/05/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início:11/06/2018, Término: 31/01/2022
Espécie/linhagem/raca	Rato heterogênico /Wistar
Nº de animais	84
Peso/Idade	350-500g / 6 – 8 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.



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

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