



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

MILENA CAROLINE NUNES MONTEIRO DE CARVALHO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO SALBUTAMOL SOBRE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE UM MODELO
EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO**

**São Cristóvão-SE
2023**

MILENA CAROLINE NUNES MONTEIRO DE CARVALHO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO SALBUTAMOL SOBRE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE UM MODELO
EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO**

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

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Auderlan Mendonça de Gois

**São Cristóvão-SE
2023**

MILENA CAROLINE NUNES MONTEIRO DE CARVALHO

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO SALBUTAMOL SOBRE
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE UM MODELO
EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO**

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

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Auderlan Mendonça de Gois

Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Presidente da banca

Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

1º Examinador (Avaliador Interno)

Prof. Dra. Vanessa Pereira Tortelli

2º Examinador (Avaliadora Externa)

AGRADECIMENTOS

Esses dois anos de mestrado passaram voando, embora tiveram momentos em que o tempo parecia se arrastar, e foi nesses momentos que vieram as maiores provações. O medo de não conseguir, medo de decepcionar a todos que acreditam em mim, e até a mim que sonhei muito com tudo isso. Foram nesses momentos que a família e os amigos foram essenciais para seguir em frente. Tem uma música que diz “Deus não disse que era fácil, só que era possível” (composição de Mauro Davi dos Santos Nepomuceno e colaboradores), esse trecho descreve bem a parte intensa da vida de pós-graduação.

Começo agradecendo a Deus por, entre tantas coisas, me permitir ter o suporte para conseguir me dedicar apenas ao mestrado, e a Nossa Senhora das Graças, minha mãezinha. Só ela sabe a luta que foi, as incontáveis novenas e todas as vezes em que só ela calava meu choro, e dizia em meu coração que tudo iria se alinhar de novo e dar certo de uma maneira que eu nem poderia imaginar.

Agradeço aos meus pais que nunca duvidaram que eu conseguiria, com suas particularidades, mas com o mesmo amor. Painho acompanhando os experimentos de pertinho nas idas para Itabaiana, perguntando tudo e dando sugestões, e me mostrando seu orgulho nos olhos marejados todas as vezes que entrava no laboratório, mesmo que eu mostrasse a coisa mais básica que eu tinha feito. Te amo painho, obrigada por me fazer acreditar que posso ser cientista.

Mainha, meu modelo de silêncio e oração de Maria, agradeço por todas as vezes que você rezou por mim e comigo, por todas as vezes que quando eu duvidei firmemente, você acreditou firmemente e quando acabava a atividade que estava me afligindo, você sempre me dizia com um grande sorriso: “Tá vendo menina, eu sabia que você conseguiria, você é inteligente!!” Te amo mainha, obrigada por acreditar sempre.

Agradeço aos meus irmãos, meu Guga que mesmo longe se faz sempre perto, e é meu norte em diversos momentos. Você me fez repensar e me recolocar em situações ímpares nesse período e por toda a nossa vida, te amo demais. Mariazinha que foi minha companhia nas viagens pra Itabaiana nos domingos de experimento, minha ouvinte nos ensaios de apresentações (dedicada e com dúvidas kkkkkk). Amo você lindinha, boa parte do meu empenho aqui é por você, pra te mostrar que uma mulher pode fazer ciência e fazer o que quiser, para que você cresça sem medo de sonhar Fluffy.

Agradeço ao amor da minha vida, que me acompanha desde a escola, Matheus, hoje meu marido, viveu comigo toda a loucura do mestrado, me aguentou sonhando e falando dos

experimentos até quando dormia, foi companheiro nas viagens nos domingos, mesmo acordando no susto já na hora de ir. Agradeço a sua dedicação e compreensão em cada situação, seja para passar dias e dias sem fazer mais nada além de estudar, ou para me fazer lembrar que às vezes o melhor é parar um pouco, relaxar, ir ver o mar, ver um filme besta ou comer um doce. Agradeço também ao seu empenho em me lembrar de comemorar cada pequena conquista, cada etapa do caminho, me lembrar de olhar para trás e ver que na verdade já consegui muito, quando eu achava que não dava conta. Você me mostrava com exemplos que eu conseguiria, afinal já tinha feito algo parecido antes. Te amo meu menino, obrigada por tanto! Agradeço também aos meus sogros e meu cunhado, que me fizeram família, e torceram por cada etapa.

Agradeço aos meus orientadores Ronaldo e Auderlan que me guiaram nessa jornada. Ronaldo que me recebeu em seu laboratório e confiou em mim mesmo eu não tendo tanta experiência no trabalho *in vivo*. Agradeço por estar aqui ao longo de todo o processo, me mostrando que as coisas podem ser bem mais simples, que não é necessário se preocupar tanto, que é natural errar, o importante é estar disposto a recomeçar. Auderlan chegou no meu último ano do mestrado, mas foi de extrema importância nesse processo, agradeço por estar sempre disposto a ajudar (acho que essa é a sua melhor definição), agradeço pelas reuniões *on line* mesmo depois do dia todo de trabalho, por rever meus dados, resumos de congressos e modelos de apresentações mil e uma vezes até que eu me sentisse segura com eles. Vocês são incríveis, de verdade, obrigada!!

Agradeço a minha equipe de experimento (Mylaine, Camila, Micaelle, Carlos, Léo e Ana), que aguentou o meu processo de aprender a realizar um experimento longo *in vivo*, agradeço pelo empenho nas duas rodadas de experimentos (75 dias consecutivos não é pra qualquer um). Agradeço em especial às meninas Camila e Micaelle que foram ICs do projeto e acabaram se tornando grandes amigas. Mylaine que por vezes foi meu respiro e “segura o surto” quando as coisas davam errado no experimento, agradeço também pela amizade, pelos domingos super divertidos e os almoços acolhedores e animados na sua casa depois das rodadas de injeções (agradece também à sua família por mim).

Agradeço também a toda a família LaNCE, Katty (obrigada pelas caronas, pelas conversas, pela amizade, você é demais, um baita exemplo de qual é a meta dessa jornada), João (obrigada por ser meu parceiro de troca, amigo e uma das pessoas mais divertidas que conheço), Edson (obrigada por estar sempre disposto a tirar dúvidas e ensinar técnicas), professora Lívia (obrigada por lembrar sempre de que a saúde mental é importante e não deve ser descuidada), Polly (obrigada por estar comigo em uma etapa desafiadora do experimento e

pelo seu jeito super carinhoso e acolhedor), Heitor (agradeço pela amizade e por todas as vezes que me aguentou perguntando do R e me ajudou com os programas do computador e análise dos dados), Marcos, Marina, Thassya, Leilinha (obrigada por estar em todas as imunos mesmo não estando na equipe do meu experimento, por toda a ajuda, por me colocar para dar aula pela primeira vez, por ser um ponto de carinho sempre), Abraão (obrigada por todas as histórias mega divertidas que desestressam o dia), Tamires, Cássia, Geovânio, Marcelo, Roberta e Wesley. Vocês são incríveis e essa jornada não seria nem metade sem companhia de cada um de vocês.

Agradeço também aos professores do programa pelos grandes ensinamentos e em especial aos professores da banca PROASA, pelos conselhos e sugestões.

Agradeço aos professores da banca de qualificação. Professor Enilton que me acompanhou desde o PROASA e esteve também em uma das etapas para doutorado. Te agradeço pela segurança que o senhor passa, por me tranquilizar sempre e estar sempre dando ótimas sugestões. Agradeço a professora Vanessa, que é uma grande amiga, esteve aqui desde o começo da graduação, quando eu decidi seguir em carreira acadêmica, obrigada por todos os conselhos, sugestões e por todos os momentos super divertidos que passamos juntas.

Agradeço a UFS, por mesmo diante de tantos cortes que enfrentamos nesse período, ter resistido firme e permitido que muitos alunos como eu, pudessem continuar buscando o conhecimento. Agradeço também ao apoio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPITEC, que viabilizaram esse projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO SALBUTAMOL SOBRE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO, Milena Caroline Nunes Monteiro de Carvalho, São Cristóvão, 2023.

A doença de Parkinson (DP), é caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, no entanto, a disfunção de outras vias neuronais também é associada à sua progressão. Nesse sentido, estudos têm suportado a ideia de que o uso de fármacos agonistas adrenérgicos- β_2 pode diminuir o risco para desenvolver a doença. O presente estudo avaliou o efeito da administração crônica do salbutamol (agonista adrenérgicos- β_2) sobre alterações motoras e comportamentais em um modelo experimental de parkinsonismo induzido por reserpina. Foram utilizados 45 ratos *Wistar*, de 4 a 6 meses de idade, divididos em 4 grupos: controle (n=9), salbutamol (n=10), reserpina (n=12) e reserpina-salbutamol (n=14), tratados com salbutamol 5 mg/kg ou veículo, s.c., diariamente por 75 dias. Após 45 dias de tratamento com salbutamol, os animais foram induzidos ao parkinsonismo por 15 injeções de reserpina 0,1 mg/kg, s.c, uma a cada 48h, até o dia 75 e submetidos aos testes comportamentais de catalepsia, movimentos orais (MO), campo aberto (CA) e alternância espontânea (AE), e 48 horas após a última injeção de reserpina os animais foram anestesiados e perfundidos para coleta dos encéfalos, os quais foram posteriormente processados e submetidos a imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) e α -sinucleína (α -sin). CEPA, nº 4200070621. Após a análise dos dados comportamentais, observou-se que no teste de catalepsia, o grupo RES apresentou maior latência comparado ao CTR, do dia 12 ao 30 ($p < 0,05$); já o grupo RES-SALB apresentou menor latência comparado ao grupo RES, do dia 16 ao 30 ($p < 0,05$) e maior latência comparado ao grupo SALB, do dia 14 ao 30 ($p < 0,05$). No teste de MO, os grupos RES e RES-SALB apresentaram maior número de mastigação no vácuo, protrusão de língua e maior tempo de tremor oral, nos dias 18 e 30, comparados ao CTR e SALB, respectivamente, ($p < 0,05$). No teste de CA, o grupo RES-SALB apresentou maior tempo de permanência no centro do aparato, comparado aos demais grupos CTR, SALB e RES ($p < 0,05$). No teste de AE, os grupos RES e RES-SALB apresentam menor número de alternâncias corretas, comparados ao grupo CTR ($p < 0,05$). O grupo SALB teve um aumento significativo de massa comparado ao grupo CTR, enquanto os grupos RES e RES-SALB tiveram uma redução significativa de massa comparado ao CTR e SALB ($p < 0,05$), respectivamente. Além disso, o grupo RES-SALB apresentou maior perda de massa comparado ao grupo RES ($p < 0,05$). Em relação a imunorreatividade, observou-se que o salbutamol preveniu contra a redução de células imunorreativas para TH, na substância negra parte compacta (SNpc), estriado dorsal e na área tegumentar ventral (VTA), comparando o grupo RES ao grupo RES-SALB ($p < 0,05$). No entanto, para o acúmulo de α -sin, o salbutamol não foi preventivo, os grupos RES e RES-SALB apresentaram uma maior densidade, na substância negra reticular (SNr), estriado e córtex pré-frontal medial (CPFm), comparados ao grupo CTR ($p < 0,05$). Nossos resultados sugerem que o tratamento crônico com salbutamol pode atenuar o déficit motor na catalepsia e prevenir a depleção de TH, mas não contra o aumento de α -sin, induzida por reserpina. No entanto, são necessários mais estudos para esclarecer a relação entre o efeito atenuante do tratamento crônico com salbutamol e os danos motor e neuroquímicos associados ao modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, noradrenalina, salbutamol, receptores β_2 noradrenérgicos.

ABSTRACT

EFFECT OF THE CHRONIC ADMINISTRATION OF SALBUTAMOL ON BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL ALTERATIONS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSONISM, Milena Caroline Nunes Monteiro de Carvalho, São Cristóvão, 2022.

Parkinson's disease (PD) is characterized by the death of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway, however, dysfunction of other neuronal pathways is also associated with its progression. In this regard, studies have supported the idea that the use of adrenergic- β 2 agonist drugs may decrease the risk for developing the disease. The present study evaluated the effect of chronic administration of salbutamol (an adrenergic- β 2 agonist) on motor and behavioral changes in an experimental model of reserpine-induced parkinsonism. We used 45 Wistar rats, aged 4 to 6 months, divided into 4 groups: control (n=9), salbutamol (n=10), reserpine (n=12) and reserpine-salbutamol (n=14), treated with salbutamol 5 mg/kg or vehicle, s.c., daily for 75 days. After 45 days of salbutamol treatment, the animals were induced to parkinsonism by 15 injections of reserpine 0.1 mg/kg, s. c, one every 48h, until day 75 and subjected to the behavioral tests of catalepsy, oral movements (MO), open field (AC) and spontaneous alternation (AE), and 48 hours after the last reserpine injection the animals were anesthetized and perfused for collection of the encephalons, which were subsequently processed and subjected to immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH) and α -synuclein (α -sin). CEPA, no. 4200070621. After the analysis of behavioral data, it was observed that in the catalepsy test, the RES group showed higher latency compared to the CTR, from day 12 to 30 ($p < 0.05$); on the other hand, the RES-SALB group showed lower latency compared to the RES group, from day 16 to 30 ($p < 0.05$) and higher latency compared to the SALB group, from day 14 to 30 ($p < 0.05$). In the MO test, the RES and RES-SALB groups had higher vacuum chewing, tongue protrusion, and longer oral tremor time on days 18 and 30 compared to the CTR and SALB, respectively, ($p < 0.05$). In the AC test, the RES-SALB group had longer dwell time in the center of the apparatus compared to the other groups CTR, SALB and RES ($p < 0.05$). In the AE test, the RES and RES-SALB groups had fewer correct alternations compared to the CTR group ($p < 0.05$). The SALB group had a significant increase in mass compared to the CTR group, while the RES and RES-SALB groups had a significant decrease in mass compared to CTR and SALB ($p < 0.05$), respectively. In addition, the RES-SALB group showed greater mass loss compared to the RES group ($p < 0.05$). Regarding immunoreactivity, it was observed that salbutamol prevented against the reduction of cells immunoreactive for TH, in the substantia nigra part compacta (SNpc), dorsal striatum and ventral tegumentary area (VTA), comparing the RES group to the RES-SALB group ($p < 0.05$). However, for α -sin accumulation, salbutamol was not preventive, the RES and RES-SALB groups showed a higher density, in the reticular substantia nigra (SNr), striatum and medial prefrontal cortex (CPFm), compared to the CTR group ($p < 0.05$). Our results suggest that chronic salbutamol treatment can attenuate motor deficit in catalepsy and prevent TH depletion, but not against reserpine-induced increase in α -sin. However, further studies are needed to clarify the relationship between the attenuating effect of chronic salbutamol treatment and the motor and neurochemical damage associated with the progressive reserpine-induced parkinsonism model.

Keywords: Parkinson's disease, noradrenaline, salbutamol, β 2 noradrenergic receptors.

RESUMO PARA A SOCIEDADE

Muitas pessoas fazem tratamento crônico para doenças respiratórias, como asma, com medicamentos como o salbutamol, que estimulam um receptor celular chamado β_2 noradrenérgico, ele tem esse nome porque pode ser ativado pela noradrenalina, molécula que atua em diversas sinalizações. Esse receptor está presente nas células do pulmão, mas também nas células do cérebro e do sistema imunológico. O tratamento com esse medicamento foi relacionado a uma diminuição no risco de desenvolver a doença de Parkinson, mas ainda não se sabe ao certo como esse fármaco pode atuar de forma preventiva para a doença. Então é importante continuar estudando a relação desse tratamento com a doença. Nesse estudo, nós tratamos os animais com salbutamol, por 75 dias, para oferecer um tratamento crônico, como acontece com a população. Após 45 dias os animais passaram a receber também a reserpina, medicamento que utilizamos para induzir o parkinsonismo, para poder avaliar se realmente o tratamento com salbutamol oferece alguma melhora na doença. Fizemos testes comportamentais nos animais para verificar os sintomas motores, como a lentidão em começar o movimento, o tremor de repouso e os movimentos involuntários no rosto, que são sintomas motores típicos da doença de Parkinson. Também avaliamos se houve uma piora na memória dos animais e no comportamento tipo ansioso, que são sintomas não motores da doença. Vimos que o tratamento com salbutamol ajudou a diminuir a lentidão nos movimentos, ajudou a diminuir o comportamento tipo ansioso, mas não conseguiu reduzir o tremor nem melhorar a memória dos animais. Outra característica da doença é a perda de peso, na nossa avaliação os animais que receberam reserpina e salbutamol juntos, também perderam peso, então nesse aspecto o salbutamol não foi preventivo. A nível celular, a doença é caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos, responsáveis por liberar dopamina, que atua numa região cerebral relacionada ao controle dos movimentos. Um dos fatores que causa a morte desses neurônios é o acúmulo da proteína α -sinucleína. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com salbutamol ajudou a prevenir a diminuição da dopamina, mas não conseguiu prevenir o acúmulo da proteína α -sinucleína. Nesse sentido, o salbutamol parece ser um medicamento promissor a ser utilizado para prevenir e tratar alguns dos sintomas da doença de Parkinson. Entretanto, novos estudos devem ser realizados para compreender melhor os mecanismos envolvidos e os possíveis riscos associados ao uso desse medicamento. Só depois dessa fase, profissionais da saúde poderão avaliar a possibilidade de uso desse medicamento no tratamento da doença de Parkinson.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquematização da circuitaria do controle motor em condições fisiológicas normais e na doença de Parkinson.	21
Figura 2: Desenho representativo da instabilidade na postura dos pacientes com a doença de Parkinson.	23
Figura 3: Representação dos estágios da doença de Parkinson apontados por Braak (2002).	26
Figura 4: Representação esquemática do delineamento experimental.	33
Figura 5: Aparato de Catalepsia.	34
Figura 6: Teste de movimentos orais.	35
Figura 7: Teste de campo aberto.	36
Figura 8: Ilustração representativa do aparato do labirinto em cruz elevado para realização do teste de alternância espontânea.	37
Figura 9: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o comportamento de catalepsia do modelo experimental de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg)....	41
Figura 10: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o comportamento de movimentos orais do modelo experimental de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	43
Figura 11 : Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o comportamento exploratória do modelo experimental de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	45
Figura 12: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) no teste de alternâncias espontâneas, no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	46
Figura 13: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre a massa corporal no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	48
Figura 14: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o número de células TH ⁺ , na substância negra parte compacta (SNpc) e área tegumentar ventral, e DOR no estriado dorsal no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	50
Figura 15: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH).	51
Figura 16: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre DOR para α -sin ⁺ na substância negra parte reticulada (SNr), estriado dorsal e córtex pré-frontal medial (CPFm) no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg).	52
Figura 17: Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -sin).	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Complexo avidina biotina
AE	Alterações espontâneas
ALS	Sistema de autofagia lisossomal
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Molécula de trifosfato adenosina
CA	Teste de campo aberto
Ca²⁺	Íon de Calcio
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais
CPFm	Córtex pré-frontal medial
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
CTR	Controle
D1	Receptor D1 de dopamina
D2	Receptor D2 de dopamina
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DOR	Densidade óptica relativa
DP	Doença de Parkinson
GPCR	Família de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase
LaNCE	Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva
LC	Locus coeruleus
LTP	Pontencial de longa duração (<i>Long Term Potentiation</i>)
M	Variação da massa corporal

M1	Fenótipo microglial pró-inflamatório
MAO	Enzima monoaminas oxidase
Mi	Massa inicial
Mf	Massa final
MO	Movimentos orais
NFκB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NST	Núcleo subtalâmico
PFA	Paraformaldeído
RAβ	Receptores β noradrenérgicos
RAβ2	Receptores β2 noradrenérgicos
REM	Movimento rápido dos olhos
RES	Reserpina
RES-SALB	Reserpina salbutamol
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Subcutânea
SALB	Salbutamol
SNARE	Complexo formado entre α-sinucleína e VMAT
SNC	Sistema nervoso central
SNCA	Gene da α-sinucleína
SN	Substância negra
SNpc	Substância negra parte compacta
SNr	Substância negra reticulada
SOD	Enzima superóxido dismutase
TF	Tampão fosfato
TFS	Tampão fosfato de sódio
TH	Tirosina hidroxilase
TNFα	Fator de necrose tumoral α
UPS	Sistema ubiquitina proteassoma
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas (<i>Vesicular monoamine transporter</i>)
VTA	Área tegumentar ventral
α-sin	α-sinucleína

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. Doença de Parkinson	17
2.2. Mecanismos fisiopatológicos relacionados à doença de Parkinson	18
2.3. Disfunção nigroestriatal e os sintomas motores na doença de Parkinson	20
2.4. Sintomas não motores na doença de Parkinson	23
2.5. Modelo de parkinsonismo induzido pela reserpina	26
2.6. Influência da via noradrenérgica na Doença de Parkinson	27
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS	30
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. MATERIAL E MÉTODO	31
5.1. Animais	31
5.2. Drogas	31
5.3. Procedimentos gerais	31
5.4. Delineamento experimental	32
5.5. Testes comportamentais	34
5.5.1. Catalepsia	34
5.5.2. Avaliação dos movimentos orais (MO)	34
5.5.3. Teste de campo aberto	35
5.5.5. Teste de Alternação espontânea	36
5.6. Avaliação da massa corporal	37
5.7. Perfusão e processamento do encéfalo	37
5.8. Análise histológica do tecido	38
5.8.1. Imuno-histoquímica:	38
5.8.2. Aquisição de imagens:	39
5.8.3. Contagem de células	39
5.8.4. Avaliação da densitometria óptica absoluta (DOR):	39
5.9. Análise estatística	40
6. RESULTADOS	41

6.1. Teste de catalepsia.....	41
6.2. Avaliação dos movimentos orais	42
6.3. Teste de campo aberto.....	44
6.4. Alteração espontânea	46
6.5. Variação da massa corporal.....	46
6.6. Imuno-histoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH⁺)	49
6.7. Imuno-histoquímica para α-sinucleína (α-sin⁺).....	51
7. DISCUSSÃO.....	54
8. CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO - Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais	81

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente (ELBAZ *et al.*, 2016) e a desordem motora mais comum em idosos (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020), caracterizada principalmente por sintomas motores, como tremor de repouso, prejuízo da marcha (PERUMAL; SANKAR, 2016), rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural (TYSNES; STORSTEIN, 2017; POEWE *et al.*, 2017; BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020). Esses sintomas são causados pela morte seletiva de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo cerebral, principalmente na substância negra parte compacta (SNpc), provocando a depleção de dopamina (DA) no estriado dorsal, via nigroestriatal, que atua no controle motor (GALVAN; WICHMANN, 2008).

Entretanto, apesar dos sintomas motores serem as principais características fenotípicas da DP, são observados apenas após o comprometimento de 60 a 80% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (LANGSTON, 2006). Além disso, em estágios iniciais da doença, precedendo os sintomas motores, podem ser observados sintomas não motores (COVA *et al.*, 2017), como depressão, ansiedade (CHEN; MARSH, 2014), déficit de atenção (WOOD *et al.*, 2012), distúrbio do sono (TROEUNG *et al.*, 2013) e disfunção gastrointestinal (PELLEGRINI *et al.*, 2015), que não respondem ao tratamento para DP com agonistas dopaminérgicos (CHAUDHURI *et al.*, 2006), sugerindo o envolvimento de outras vias neuronais em estágios iniciais e na progressão da DP, como a via noradrenérgica e a serotoninérgica (GIZA *et al.*, 2012; LEAL *et al.*, 2019a; LEAL *et al.*, 2019b).

A manipulação de receptores noradrenérgicos no sistema nervoso periférico é comum para o tratamento prolongado de doenças respiratórias e cardiovasculares (BILLINGTON *et al.*, 2017; IPPOLITO; BENOVIC, 2021). No entanto, estudos recentes têm sugerido uma relação entre o uso de fármacos agonistas seletivos e antagonistas não seletivos, dos receptores β -noradrenérgicos ($RA\beta$) com uma redução ou aumento, respectivamente, do risco para o desenvolvimento da DP (GRONICH *et al.*, 2018; MITTAL *et al.*, 2017; SEARLES; NIELSEN, 2018; HOPFNER *et al.*, 2019; DE GERMAY *et al.*, 2020; HOPFNER *et al.*, 2020; MAGISTRELLI; COMI, 2020; CHEN *et al.*, 2021; SAENGPATRACHAI *et al.*, 2021).

Além disso, a disfunção da via noradrenérgica pode atuar influenciando à progressão da neurodegeneração dopaminérgica (ARCHER; FREDRIKSSON, 2006), uma vez que, a estimulação, via de receptores noradrenérgicos β_2 ($RA\beta_2$) pode levar a um aumento na

liberação da dopamina e reduzir a expressão do mRNA do gene *SNCA*, responsável pela síntese da alfa-sinucleína, proteína relacionada à morte dos neurônios dopaminérgicos (MITTAL *et al.*, 2017; O'NEILL; HARKIN 2018; HOPFNER *et al.*, 2019; HOPFNER *et al.*, 2020). A estimulação dos RA β 2 também pode atuar reduzindo a liberação de fatores anti-inflamatórios, pelo antagonismo e estimulação, enquanto que seu antagonismo pode aumentar a liberação de fatores pró-inflamatórios, relacionados a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (BUTKOVICH *et al.*, 2018; MAGISTRELLI; COMI, 2020; O'NEILL *et al.*, 2019; RYAN *et al.*, 2013).

Baseado nesse contexto, as evidências mostram uma relação entre uso prolongado de fármacos β -noradrenérgicos e o risco para o desenvolvimento da DP. Entretanto, não está clara a relação da modulação da via noradrenérgica, através dos receptores β 2-noradrenérgicos, com os mecanismos neuroprotetores e neurotóxicos associados à DP. Dessa forma, estudar a relação da administração prévia e crônica do salbutamol, avaliando aspectos relacionados aos sintomas motores e não motores, e os aspectos neuroquímicos associados a fisiopatologia da doença, num modelo de parkinsonismo, pode ser um caminho para preencher essas lacunas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Doença de Parkinson

Em 1817, James Parkinson, médico inglês, relatou pela primeira vez as características clínicas da DP (GOEDERT; COMPSTON, 2018). Ele acompanhou o caso de cinco homens com idades entre 50 e 70 anos, com sintomas motores, e recebeu dados de mais um caso acompanhado por um colega; o que lhe permitiu caracterizá-los e descrevê-los em seu ensaio da doença chamada por ele de paralisia agitante (do inglês *An essay on the shaking palsy*). Descreveu que os indivíduos apresentavam tremor involuntário (iniciando em apenas um lado e posteriormente se tornando bilateral), fraqueza muscular, inclinação do tronco para frente, marcha com passos apressados e curtos (PARKINSON, 1817; GOEDERT; COMPSTON, 2018; OBESO *et al.*, 2017; LEES, 2017).

Embora J. Parkinson seja lembrado por caracterizar o dano motor da doença, em seu ensaio, ele também aborda alguns danos não motores, como os distúrbios do sono (despertares relacionados aos tremores de repouso), constipação, dificuldade na fala e deglutição, além do excesso de salivação, relacionados a estágios mais avançados da doença (PARKINSON, 1817; SINGARAM *et al.*, 1995; HURWITZ, 2017). No entanto, ele acreditava que os sentidos e o intelecto não eram afetados e que os sintomas motores observados nos membros estavam associados, inicialmente, a medula espinhal e se espalhava pela medula oblonga (PARKINSON, 1817; GOEDERT; COMPSTON, 2018).

Após as observações de Willian Rutherford Sanders, em 1865, ele nomeou a chamada paralisia agitante de “doença de Parkinson” (GOEDERT; COMPSTON, 2018; EADIE, 2020; LEWIS, 2020). No entanto, o termo só se tornou usual a partir de 1875, quando Jean-Martin Charcot o utilizou em uma palestra (OBESO *et al.*, 2017). Os estudos realizados por Charcot e Vulpian permitiram determinar os sintomas cardinais da doença, identificados por bradicinesia, tremor, rigidez muscular e instabilidade postural (OBESO *et al.*, 2017; LEES, 2017; GOEDERT; COMPSTON, 2018). Eles ainda propuseram que as causas da doença poderiam estar associadas à umidade, ao frio, choques ou danos emocionais do sistema nervoso (GOEDERT; COMPSTON, 2018).

Após os estudos de Charcot, outros pesquisadores contribuíram para uma melhor compreensão das características clínicas e patológica doença. Em 1894, Edourad Brissaud propôs que a substância negra, área mesoencéfalica, atuava regulando o tônus muscular, e que lesões nessa área poderiam provocar a doença (PARENT; PARENT, 2010; MARQUES, 2018;

FÉNELON *et al.*, 2021). Em 1919, Constantin Tretiakoff descreveu a presença de inclusões patológicas, corpos de Lewy, em neurônios da substância negra de encéfalos pós-mortem de pacientes com a DP, confirmando os achados de Fritz J. H. Lewy, que além de observar a perda de pigmentação dessa região, sugeriu que a degeneração dos neurônios nessa região estava relacionada ao dano motor observados nos pacientes (PARENT; PARENT, 2010; GOEDERT; COMPSTON, 2018).

Já são mais de 200 anos desde a descrição da DP por J. Parkinson e apesar da descoberta de vários mecanismos patológicos envolvidos, ainda não se sabe a causa definida, da doença. No entanto, ao longo desse tempo, todos esses estudos foram fundamentais para uma melhor compreensão das características sintomatológica e fisiopatológica da doença.

2.2. Mecanismos fisiopatológicos relacionados à doença de Parkinson

Apesar de ainda ser considerada uma doença sem etiologia definida, muito já se sabe acerca de mecanismos fisiopatológicos da DP e que os sintomas motores característicos da doença são decorrentes da depleção dopaminérgica na via nigroestriatal, derivada da morte seletiva de neurônios dopaminérgicos na SNpc (POEWE *et al.*, 2017; LIU; CHEUNG, 2020; HUR; LEE, 2021; CONTE, 2021; LEGARDA *et al.*, 2022). Embora os mecanismos que causam a morte dos neurônios dopaminérgicos ainda não estejam bem esclarecidos, fatores tem sido associados à disfunção dopaminérgica, como o acúmulo da proteína α -sinucleína e da formação de corpos de Lewy (RODRÍGUEZ-VIOLANTE *et al.*, 2017; MALPARTIDA *et al.*, 2021; PICCA *et al.*, 2021; DABRAVOLSKI *et al.*, 2022), o estresse oxidativo em conjunto com a disfunção mitocondrial, associados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), déficit bioenergético celular derivado dos danos mitocondriais, disfunções no sistema ubiquitina proteassoma e na via de autofagia lisossomal, que atuam no controle de proteínas e organelas disfuncionais (REEVE *et al.*, 2014; SURMEIER, 2017; TRIST *et al.*, 2019; HUR; LEE, 2021) e a neuroinflamação (LEÃO *et al.*, 2015; AHMED-FARID *et al.*, 2021; CUNHA *et al.*, 2022).

Em condições fisiológicas a proteína α -sinucleína (α -sin) é extremamente importante nas sinapses, tendo em vista que estabelece conexões com o transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), formando o complexo SNARE permitindo o envesiculamento da dopamina (DA) e a liberação desta na fenda sináptica (ROCHA *et al.*, 2018; MOR *et al.*, 2017; DU *et al.*, 2020). Na DP familiar, mutações no gene *SNCA*, duplicações ou triplicações, estão associadas a super-expressão dessa proteína, que se torna disfuncional e mal dobradas,

formando oligômeros tóxicos e corpos de Lewy (BLAUWENDRAAT *et al.*, 2020; JIA *et al.*, 2022). Apesar de ter relação com as mutações genéticas, e a forma familiar da DO, os agregados de α -sin também estão presentes nas formas idiopáticas da doença, decorrentes de mutações causadas por mecanismos que afetam a forma e função dessa proteína, como o estresse oxidativo e a disfunção nos sistemas de degradação. O acúmulo de α -sin é implicado em todos os outros fatores fisiopatológicos da doença, agravando o dano aos neurônios dopaminérgicos nigrais (TRIST *et al.*, 2019; HUR; LEE, 2021; PICCIRILLO *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo deriva do desbalanço entre acúmulo de ROS no meio intra e extracelular, e a depuração dessas moléculas (SURMEIER, 2017; TRIST *et al.*, 2019). As ROS são o produto de diversas reações importantes, como na produção de ATP via cadeia transportadoras de elétrons (CTE) na mitocôndria (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013; TRIST *et al.*, 2019; HUR; LEE, 2021) e na degradação de monoaminas (TRIST *et al.*, 2019; HUR; LEE, 2021; PICCIRILLO *et al.*, 2022). Para evitar que essas moléculas se acumulem existem mecanismos de controle, como as enzimas antioxidantes endógenas (AASETH *et al.*, 2018), a produção de neuromelanina e o envesiculamento da dopamina. As células gliais também atuam na proteção à medida em que possuem enzimas antioxidantes, reguladas por PARKIN e DJ-1 (eliminação de ROS e ativação de genes antioxidantes) (JOE *et al.*, 2018). No entanto, os mecanismos antioxidantes são prejudicados na DP (TRIST *et al.*, 2019).

Os neurônios dopaminérgicos na SNpc são mais vulneráveis aos danos causados pelo estresse oxidativo porque, além de possuírem axônios longos e bem arborizados (MATSUDA *et al.*, 2009), são autoexcitáveis para manter os níveis de dopamina no estriado dorsal, um mecanismo de marcapasso controlado por canais de Ca^{2+} com alta demanda energética, de tal modo que essa demanda pode estar associada a disfunção mitocondrial (TRIST *et al.*, 2019; HUR; LEE, 2021; LEGARDA *et al.*, 2022).

A disfunção mitocondrial é caracterizada pela deficiência respiratória, reduzindo a capacidade de produção de ATP (REEVE *et al.*, 2014), causando um déficit bioenergético no sistema, o que é extremamente nocivo aos neurônios dopaminérgicos (TRIST *et al.*, 2019; HUR; LEE, 2021; LEGARDA *et al.*, 2022). Além disso, têm sido demonstrado que o bloqueio do complexo 1, por toxinas ambientais, causa a disfunção mitocondrial, desregulando a produção de EROs, (tendo em vista que essas moléculas são produto da reação de síntese de ATP) (TRIST *et al.*, 2019), associado à disfunção dopaminérgica (SUBRAMANIAM; CHESSELET, 2013).

Outro fator associado à DP é a falha nos sistemas de degradação proteica o ubiquitina proteassoma (UPS) e a autofagia lisossomal (ALS), que atuam na degradação de proteínas

disfuncionais, organelas e macromoléculas (MATTAM *et al.*, 2021). A falha desses sistemas pode provocar o acúmulo de agregados de α -sin e favorecer a formação dos corpos de Lewy (REEVE *et al.*, 2014; JANKOVIC; TAN, 2020; PICCA *et al.*, 2021). Esses sistemas são afetados pelo envelhecimento (POPPEK; GRUNE, 2006; LI; LI, 2011) através redução da atividade (TSAKIRI; TROUGAKOS, 2014), e da saturação, devido ao aumento de estresse oxidativo e acúmulo de proteínas danificadas (LI; LI, 2011; MATTAM *et al.*, 2021; DABRAVOLSKI *et al.*, 2022) e redução na síntese de ATP para degradação proteica (REEVE *et al.*, 2014) e são agravados por fatores associados à DP (WATANABE *et al.*, 2020; TIWARI; SINGH, 2021; PARK *et al.*, 2021; BUNEEVA *et al.*, 2022).

Além disso, nos últimos anos a neuroinflamação tem se destacado como um dos principais mecanismos fisiopatológicos associado à DP, afetando as células gliais. A microglia é considerada a célula representante da imunidade inata no sistema nervoso central (SNC), e juntamente com os astrócitos (células de suporte e plasticidade neuronal (GELDERS *et al.*, 2018) pode ser ativada por fatores estressores, tais como as ROS, padrões moleculares associados ao dano (DAMPS) (liberados pelas mitocôndrias em situação de estresse) e pelos oligômeros tóxicos de α -sin (YSSEL *et al.*, 2018; GELDERS *et al.*, 2018; PICCA *et al.*, 2021; BADANJAK *et al.*, 2021; GUNDERSEN, 2021) assumindo fenótipos pró-inflamatórios, liberando citocinas inflamatórias e iniciando a cascata da inflamação, que pode culminar em apoptose e neurodegeneração (BADANJAK *et al.*, 2021).

A hiperativação microglial e astrocitária, via α -sin, aumenta a liberação de fatores inflamatórios neurotóxicos, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, óxido nítrico (NO), a enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e ROS causando um loop de ativação que pode estar associado à degeneração dos neurônios dopaminérgicos (GELDERS *et al.*, 2018; EARLS; LEE, 2020; RASHEED *et al.*, 2021; PICCA *et al.*, 2021). Além disso, alguns estudos mostram que a neuroinflamação periférica pode influenciar os danos observados no SNC (KIM *et al.*, 2018), à medida que alteram a permeabilidade da barreira hematoencefálica e permitem a migração de moléculas pró-inflamatórias para a região central (BRUDEK, 2019; LIN *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2022).

2.3. Disfunção nigroestriatal e os sintomas motores na doença de Parkinson

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada clinicamente pelo surgimento de sintomas motores, como o tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular e

instabilidade postural (ARMSTRONG; OKUN, 2020; DI BIASE *et al.*, 2020). Apesar de serem os principais sintomas para o diagnóstico da doença, evidências sugerem que estes sintomas só são bem evidentes em estágio avançado, com o comprometimento de 60 a 80% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, que enviam suas projeções para os núcleos estriatais, via nigroestriatal, envolvidos no controle do movimento (KRAVITZ *et al.*, 2010; TAGUCHI *et al.*, 2020).

A via nigroestriatal, formada pela substância negra e os núcleos da base (núcleos caudado, putâmen, globos pálidos e núcleo subtalâmico), modulam o movimento através da liberação de dopamina atuando em receptores dopaminérgicos (D1 e D2) presentes no estriado (núcleos: caudado e putâmen). A partir do estriado partem projeções gabaérgicas, moduladas pelos receptores D1 e D2, que favorecem (via direta – excitatória), e inibem (via indireta – inibitória) os movimentos, para outros núcleos envolvidos no controle do movimento (figura 1 A) (OBESO *et al.*, 2008; KREITZER *et al.*, 2008; FREEZE *et al.*, 2013).

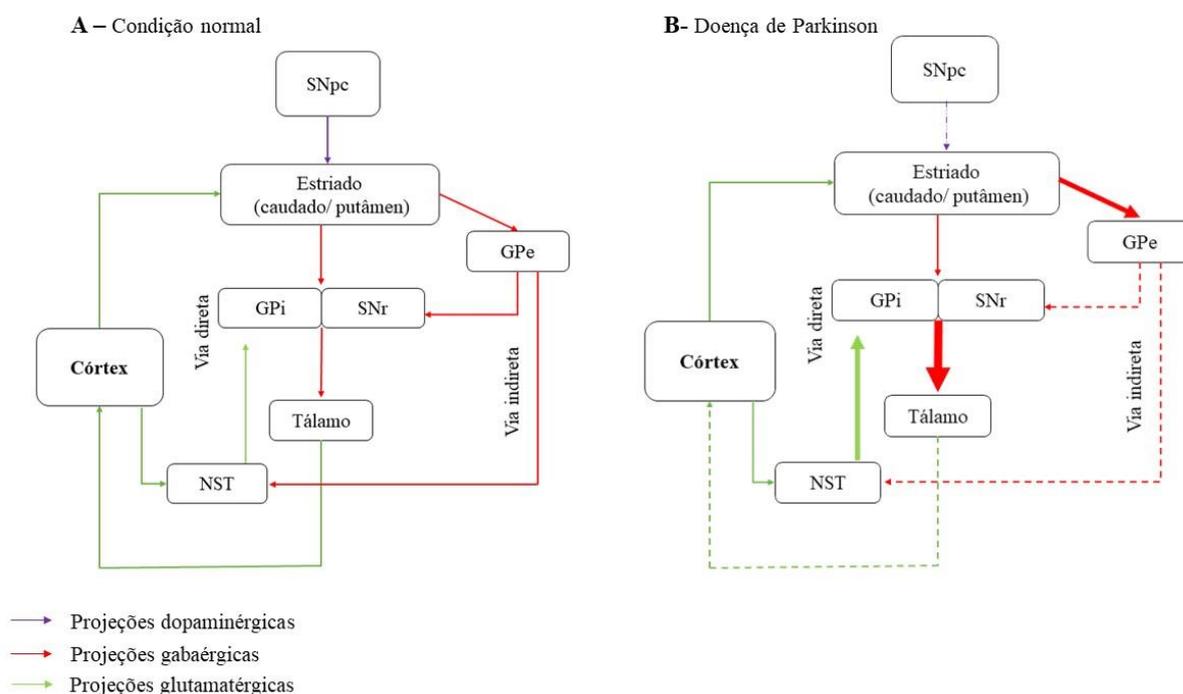


Figura 1: Esquematização da circuitaria do controle motor em condições fisiológicas normais e na doença de Parkinson. (A) Em condições fisiológicas normais, as vias direta e indireta, através da estimulação dos receptores D1 e D2, pela dopamina, atuam em conjunto para modulação do controle movimento. (B) Condição patológica na doença de Parkinson. SNpc – substância negra parte compacta, GPi – globo pálido interno, SNr – substância negra parte reticulada, GPe – globo pálido externo e NST – núcleo subtalâmico.

Na DP, devido a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc e a depleção de dopamina nos núcleos do estriado, há uma desregulação do circuito da via nigroestriatal que

controla o movimento. Na condição patológica, a ausência ou diminuição da estimulação dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 nos neurônios gabaérgicos estriatais pela dopamina, provoca uma diminuição da inibição do globo pálido interno (via direta) e um aumento da inibição do globo pálido externo (via indireta) levando a uma redução de movimentos voluntários e proporcionando o surgimento dos sintomas motores característicos da doença (figura 1 B) (OBESO *et al.*, 2008; KREITZER *et al.*, 2008; FREEZE *et al.*, 2013).

Os sintomas motores mais comuns associados à disfunção da via nigroestriatal em pacientes da DP, são o tremor em repouso, bradicinesia, rigidez muscular, instabilidade postural e a alteração da marcha. Os quais são considerados os sinais cardinais para diagnóstico da doença (OPARA, *et al.*, 2017; ARMSTRONG; OKUN, 2020; DI BIASE *et al.*, 2020). O tremor de repouso, normalmente inicia unilateral e se torna bilateral com a progressão da doença (JANKOVIC, 2008). Geralmente o tremor tem frequência de 4 a 6 hz e afeta as regiões distais, mãos e pernas, e a região oral, lábios, queixo e mandíbula (OPARA *et al.*, 2017; REICH; SAVITT, 2018;).

A bradicinesia, ou acinesia, é caracterizada pela lentidão do movimento e está associada à dificuldade no planejamento, execução do movimento e principalmente na realização de movimentos simultâneos (ALI; MORRIS, 2014; OPARA *et al.*, 2017; REICH; SAVITT, 2018). Esse sintoma cardinal pode ser observado durante a realização de tarefas cotidianas que exigem controle motor fino, como escrever e abotoar. Também inclui a perda de movimentos espontâneos e gesticulação, como expressões faciais, havendo uma diminuição na frequência do piscar dos olhos, dificuldade de deglutição, gerando um aumento do acúmulo de saliva, dificuldade na pronúncia das palavras (disartria) (DASHTIPOUR *et al.*, 2018; MUÑOZ-VIGUERAS *et al.*, 2021) e redução do movimento de oscilação dos braços ao caminhar (JANKOVIC, 2008).

A rigidez muscular é caracterizada por um aumento da resistência dos músculos, dificultando o alcance dos movimentos articulares dos membros, e pode gerar dor e incômodo ao paciente, sendo mais proeminente no sexo feminino (CERRI, *et al.*, 2019). A instabilidade postural (figura 2), normalmente o sintoma cardinal mais tardio, é caracterizada pela perda de reflexos posturais e é considerado um dos maiores risco para queda em pacientes da DP. Apesar da instabilidade postural pode estar associada a outros sintomas da doença, além de que, também é influenciada por fatores inerentes ao envelhecimento, como hipotensão ortostática, redução da capacidade visual, vestibular e sensorial (JANKOVIC, 2008; OPARA *et al.*, 2017).



Figura 2: Desenho representativo da instabilidade na postura dos pacientes com a doença de Parkinson. Paciente com postura de camptocormia, tronco inclinado para frente, devido instabilidade postural e a perda do centro de massa corporal, de William Gowers (1880). Figura adaptada de Lewis *et al.*, 2020.

Além dos sintomas cardinais, outros sintomas motores são observados na DP, como o distúrbio da marcha em festinação, caracterizado por passos apressados e curtos, sem a movimentação dos braços, os quais estão relacionados a rigidez muscular dos membros e a instabilidade postural (REICH; SAVITT, 2018; MIRELMAN *et al.*, 2019; NONNEKES *et al.*, 2019; DI BIASE *et al.*, 2020).

Os sintomas motores costumam ser mais brandos e unilaterais em estágios iniciais do comprometimento motor (MIRELMAN *et al.*, 2019), progredindo para uma disfunção motora bilateral em estágios intermediários (GAO *et al.*, 2020; RAHIMPOUR *et al.*, 2021) e um comprometimento motor grave em estágios avançados (MIRELMAN *et al.*, 2019; OPARA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017). Apesar da intervenção farmacológica com agonistas dopaminérgicos diminuir os sintomas motores, o tratamento com esses fármacos não é suficiente para impedir a progressão da doença e não tem efeito sobre os sintomas não motores (LANE, 2019).

2.4. Sintomas não motores na doença de Parkinson

Embora a DP seja caracterizada clinicamente pelos sintomas motores, alguns sintomas não motores podem surgir muitos anos antes dos sintomas motores (SCHAPIRA *et al.*, 2017), uma vez que, o acúmulo de α -sin pode ser observado no locus coeruleus e no núcleo da rafe, núcleos noradrenérgico e serotoninérgico, respectivamente, suportando a ideia de que o

surgimento de sintomas não motores está associado a disfunção de outras vias neuronais, antes da via nigroestriatal ser afetada (BRAAK *et al.*, 2002). De modo geral, os sintomas não motores estão associados às disfunções neuropsiquiátricas, autonômicas, sensoriais e do sono, os quais podem surgir, variavelmente, ao longo do estágio inicial e também após os sintomas motores, implicando em um declínio acentuado na qualidade de vida do indivíduo (REICH; SAVITT, 2018).

Alguns dos sintomas neuropsiquiátricos que podem ser observados na DP, normalmente em estágios iniciais, mas também em estágios avançados, são a depressão, apatia, ansiedade, anedonia, déficit de atenção e de memória, alucinações, demência, comportamento obsessivo, confusão, delírios, ataques de pânico e psicose (CHAUDHURI *et al.*, 2006). No geral, a depressão afeta de 30 a 50% dos pacientes provocando grande impacto na qualidade de vida (CHAUDHURI *et al.*, 2006; IRANZO, 2013), pode acometer o paciente de modo anterior aos sintomas motores ou na fase avançada da doença, além de que já foi demonstrado que a depressão pode intensificar os sintomas motores (PFEIFER *et al.*, 2013; JANAKIRAMAN *et al.*, 2017).

A ansiedade também pode ser considerada como um sintoma não motor da DP, sendo manifestada de modo generalizado, havendo a possibilidade de ataques de pânico (CHAUDHURI *et al.*, 2006; ALI; MORRIS, 2014; TAGUCHI *et al.*, 2020), pode acometer até 40% dos pacientes (PFEIFER *et al.*, 2013). A apatia e a anedonia, são caracterizadas pela redução do estado motivado do paciente, e tem como causa a desregulação dopaminérgica (KONDO, 2008), que afeta o sistema de recompensas do cérebro. Além disso, exames de imagem mostram que pacientes com DP, têm uma menor ativação do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, relacionado a recompensas (KÜNIG *et al.*, 2000). Também já foram relatados sintomas de psicose e alucinações, tanto visuais quanto auditivas (CHAUDHURI *et al.*, 2006; IRANZO, 2013). Tais sintomas têm relação com a interrupção do sono e com a possível degeneração neuronal do núcleo pedunculopontino, locus coeruleos e núcleo da rafe (BRAAK *et al.*, 2002; CHAUDHURI *et al.*, 2006). O déficit cognitivo, principalmente os prejuízos da memória, ocorrem em até 80% dos pacientes em estágios avançados da DP (PFEIFER *et al.*, 2013), sendo considerado um dano progressivo (CHAUDHURI *et al.*, 2006; ALI; MORRIS, 2014; REICH; SAVITT, 2018).

As disfunções autonômicas incluem os distúrbios gastrointestinais, perturbações na bexiga (incontinência urinária e noctúria), sudorese excessiva, hipotensão ortostática, disfunção sexual (hipersexualidade, hipossexualidade e disfunção erétil) e xerostomia. Derivadas de alterações no sistema nervoso autônomo, sendo degenerações e ou disfunções nos núcleos

cerebrais que controlam as funções autônomas, e nos centros modulatórios, como medula (rostral, ventrolateral, ventromedial, caudal) e núcleo da rafe, que controlam os neurônios simpáticos pré-ganglionares. (CHAUDHURI *et al.*, 2006; ALI; MORRIS, 2014).

Dentre os distúrbios gastrointestinais, a constipação é um sintoma inicial bem característico da DP, acometendo os pacientes até décadas antes do início dos sintomas motores, embora não seja um sintoma ideal para um diagnóstico mais cedo, tendo em vista que também pode acometer boa parte da população (IRANZO, 2013; TAGUCHI *et al.*, 2020). Estudos trazem a relação desse sintoma com a perda acentuada de neurônios dopaminérgicos centrais e na região do colo intestinal (CHAUDHURI *et al.*, 2006), bem como agregação de alfa-sinucleína nessa região (SHANNON *et al.*, 2012), que iniciam antes dos danos motores e perduram por todos os estágios da doença (JOST; REICHMANN, 2017).

As disfunções sensoriais abrangem a hiposmia, dor e parestesia (sensação de formigamento), além de prejuízos na visão (CHAUDHURI *et al.*, 2006). A hiposmia, perda olfativa, atinge até 90% dos pacientes (JOST; REICHMANN, 2017) e pode surgir até décadas antes dos sintomas motores (ALI; MORRIS, 2014), é a característica não motora mais prevalente, além de não ser frequente na população (TAGUCHI *et al.*, 2020), podendo auxiliar em um diagnóstico precoce (JOST; REICHMANN, 2017).

A sensação de dor acomete cerca 70% dos pacientes da doença e pode ser derivada de das discinesias do período “off” do tratamento dopaminérgico, ou relacionadas a dor musculoesquelética, orofacial ou abdominal (PFEIFER *et al.*, 2013; BUHMANN *et al.*, 2020). Os distúrbios do sono são marcados por sonolência diurna, insônia, respiração desordenada durante o sono REM e a desordem comportamental do sono (TAGUCHI *et al.*, 2020). Esses sintomas estão associados a comportamentos agressivos durante o sono (JOST; REICHMANN, 2017), sonhos vívidos (que posteriormente podem gerar as alucinações diurnas) (ALI; MORRIS, 2014), e possíveis vocalizações desagradáveis (CHAUDHURI *et al.*, 2006).

Apesar de a maioria dos sintomas não motores terem sido associados um estado prodrômico da DP, pouco que se sabe sobre a relação desses sintomas e a progressão da doença. Além disso, a baixa eficácia do tratamento dopaminérgico, sugere uma associação dos sintomas não motores a outras vias de neurotransmissores (TAGUCHI *et al.*, 2020) como sugerido por Braak *et al.*, que em 2002 publicaram um estudo que buscava traçar o curso da patologia na DP relacionado a ocorrência progressiva das lesões decorrentes dos corpos de Lewy em diferentes núcleos encefálicos, na tentativa de entender o estado prodrômico da doença, caracterizando-a seis estágios de progressão.

O primeiro e segundo estágio da hipótese de Braak demonstram inclusões de corpos de Lewy no bulbo olfatório e no núcleo motor dorsal do nervo vago, que envia projeções parassimpáticas ao trato gastrointestinal. Sugerindo uma relação com os sintomas de hiposmia e as disfunções autonômicas observadas nos pacientes da DP (BRAAK *et al.*, 2002). No terceiro e quarto estágio, observa-se uma progressão na formação de corpos de Lewy em áreas relacionadas aos distúrbios do sono, disfunção erétil (MURILLO-RODRIGUEZ, *et al.*, 2012; ALI; MORRIS, 2014), disfunção emocional (KONDO, 2008; COCCURELLO, 2019) e disfunção motora (WINN, 2006; VITALE *et al.*, 2019). No quinto e sexto estágio, além do aumento da formação de corpos de Lewy nas áreas anteriores, tem-se predomínio de danos em áreas motoras, emocionais e cognitivas (XU *et al.*, 2022; ALI; MORRIS, 2014; ZINGG *et al.*, 2018; ARMSTRONG; OKUN, 2020) (figura 3).

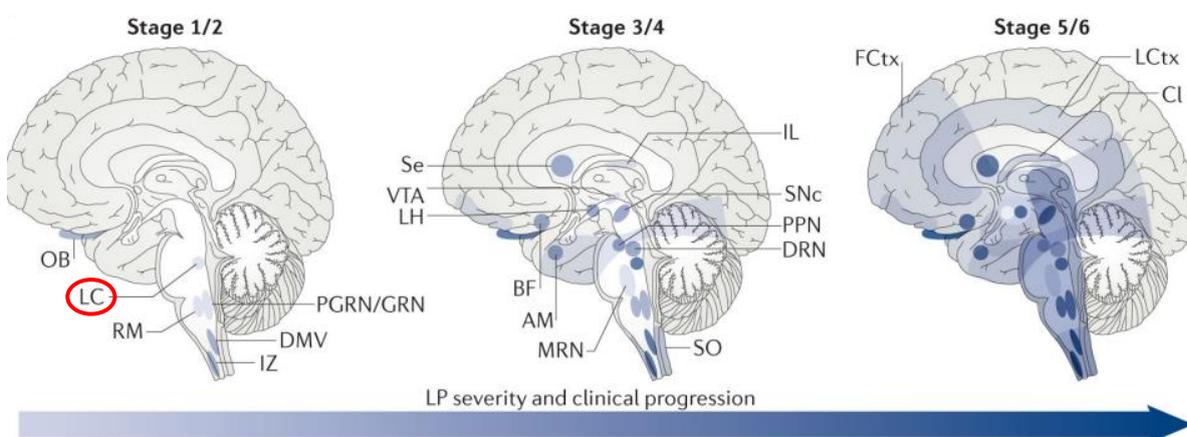


Figura 3: Representação dos estágios da doença de Parkinson apontados por Braak (2002). Nos estágios 1 e 2, os corpos de Lewy atingem o bulbo olfatório (BO), o locus coeruleus (LC), o núcleo magnus da rafe (MR), a zona incerta (ZI), o núcleo motor do nervo vago (MDV) e os núcleos paraventricular (NRPG) e gigantocelular (NRG). Já no terceiro e quarto estágio, a topografia das lesões é apontada nas regiões do septo (Se), na área tegumentar ventral (VTA), no hipotálamo lateral (HL), no prosencéfalo basal (PB), na amígdala (AM), nos núcleos médio (NMR) e dorsal da rafe (NDR), no núcleo trato solitário (NSO), no núcleo pedunculopontino (NPP), na substância negra parte compacta (SNpC) e nos núcleos intralaminares (NIL); nos últimos estágios (5 e 6) as lesões são encontradas no córtex frontal (CF), córtex límbico (CL) e no cláustro (CI). Figura adaptada de do artigo de Surmeier *et al.*, 2017.

2.5. Modelo de parkinsonismo induzido pela reserpina

A reserpina é uma droga derivada dos alcaloides da planta *Rauwolfia serpentina* (LOBAY, 2015; LEAL *et al.*, 2016), a qual inicialmente foi utilizada para o tratamento de hipertensão, embora naquela época, ainda não se entendia bem o mecanismo relacionado uso crônico da droga (CHAKRAVARTY; RAI, 1951). No final da década de 50, foi demonstrado os efeitos da reserpina no esgotamento das monoaminas (CARLSSON *et al.*, 1957; WEIL-MALHERBE; BONE, 1958), quando Carlsson *et al.* (1957) perceberam que a L-dopa

restaurava os níveis de dopamina, e melhorava o comportamento de animais tratados com a reserpina. Em 1996, Salamone e Baskin, definiram a reserpina como um possível modelo de tremor parkinsoniano a partir de observações de mastigações no vácuo em animais tratados com reserpina e apomorfina (SALAMONE; BASKIN, 1996).

Atualmente a administração de reserpina têm sido utilizada para induzir parkinsonismo em estudos com animais, tendo em vista que bloqueia irreversivelmente o receptor VMAT2 impedindo o envesiculamento monoaminas (DE FREITAS *et al.*, 2016; LEÃO *et al.*, 2015), provocando a depleção monoaminérgica gradual e o surgimento de vários danos motores e não motores (PATIL *et al.*, 2012, LIMA *et al.*, 2021; LEAL *et al.*, 2016; LINS *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2020; AHMED-FARID *et al.*, 2021) permitindo a avaliação de diferentes estágios do parkinsonismo.

O bloqueio do VMAT 1 e 2 pela reserpina provoca o acúmulo de monoaminas no terminal axonal sobrecarregando as vias de degradação das monoaminas oxidases (MAOs) e aumentando os níveis de estresse oxidativo, proliferação glial, α -sin, redução de tirosina hidroxilase entre outros mecanismos observados no modelo (LEÃO *et al.*, 2015; STAHL *et al.*, 2018; GOIS *et al.* 2020; AHMED-FARID *et al.*, 2021; CUNHA *et al.*, 2022; VAN ONSELEN; DOWNING, 2021).

2.6. Influência da via noradrenérgica na Doença de Parkinson

Embora a DP ainda seja considerada uma doença neurodegenerativa dopaminérgica, a participação de outras vias monoaminérgicas, noradrenérgica e serotoninérgica, tem sido relacionada aos sintomas não motores observados em estágios iniciais da doença (REICH; SAVITT, 2018).

Estudos recentes têm sugerido que o uso de fármacos noradrenérgicos, agonistas e antagonistas dos RA β , para o tratamento de doenças cardiovasculares e respiratórios, tem relação positiva com a redução e o aumento do risco para a DP, respectivamente (HOPFNER *et al.*, 2019; DE GERMA Y *et al.*, 2020; HOPFNER *et al.*, 2020; MAGISTRELLI; COMI, 2020; CHEN *et al.*, 2021; SAENGPATRACHAI *et al.*, 2021). Além disso, com o envelhecimento da população, um dos fatores de risco para a DP, há também um aumento de casos de doenças cardiovasculares (COSTANTINO *et al.*, 2016) e respiratórias (CHO; STOUT-DELGADO, 2019), e conseqüentemente uma maior exposição a esses fármacos. Logo, estudar a participação

da via noradrenérgica e seus receptores em estágios iniciais, podem ajudar a entender a relação de riscos com a DP.

No SNC, os RA β 2 são expressos nos neurônios e nas células gliais, tanto na microglia que atua como representantes da imunidade inata nessa região, quanto nos astrócitos, e a modulação desses receptores pode influenciar diretamente os mecanismos neuroinflamatórios associados a DP (TANAKA *et al.*, 2002; MAGISTRELLI; COMI, 2020). De acordo com O'Neill e Harkin (2018) a estimulação desses receptores pode prevenir a mecanismos fisiopatológicos associados à DP por inibir a ativação microglial, a liberação de fatores pró-inflamatórios, e por estimular a produção de fatores neurotróficos em astrócitos. Além disso, agonistas RA β 2 seletivos ou inibidores de recaptção de noradrenalina pode inibir a ativação do fator nuclear kappa B (NF κ B) (RYAN *et al.*, 2013; O'NEILL; HARKIN 2018).

O estudo de Griffin, *et al.*, 2018, demonstrou uma redução dos parâmetros inflamatórios induzidos pela administração intra-estriatal da IL-1 β , relacionada a estimulação dos RA β 2 por clenbuterol (GRIFFIN *et al.*, 2018). Além disso, já foi comprovado que o estímulo desse receptor pode atuar na regulando a expressão do gene *SNCA* e α -sin (MITTAL *et al.*, 2017; O'NEILL; HARKIN 2018) e reduzindo o déficit motor característico da DP (O'NEILL, *et al.*, 2019; KREINER *et al.*, 2019).

O salbutamol é um agonista noradrenérgico β 2 seletivo de curta atividade, fármaco da classe de SABAs (do inglês *Short Acting β agonist*) (BILLINGTON *et al.*, 2017), é amplamente utilizado no tratamento de asma (STARKEY *et al.*, 2013; ZHENG; YADAV, 2021; COURLET *et al.*, 2022; MARQUES; VILA, 2022) e doença obstrutiva pulmonar crônica (COPD, do inglês *chronic obstructive pulmonary disease*) (PATEL; THOMSON, 2011), devido a sua ação broncodilatadora (STARKEY *et al.*, 2013; SOTTAS *et al.*, 2016; RITCHIE *et al.*, 2018).

O salbutamol pode ser administrado por diferentes vias de administração, como oral, inalatória e intravenosa (PATEL; THOMSON, 2011; STARKEY *et al.*, 2013; SOTTAS *et al.*, 2016). Embora o alvo desse fármaco seja as vias áreas, ele pode ultrapassar a barreira hematoencefálica (MITTAL *et al.*, 2017; O'NEILL; HARKIN 2018), e agir nos receptores RA β 2 expressos em células gliais e neurônios (MAGISTRELLI; COMI, 2020), e o seu uso crônico no tratamento de doenças respiratórias tem sido relacionado a um menor risco para desenvolver a DP (MITTAL *et al.*, 2017; DE GERMAY *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021; SAENGPATRACHAI *et al.*, 2021). Além dos estudos já citados anteriormente sobre o efeito de agonistas RA β 2, Uzkeser *et al.* (2012) mostraram que o tratamento com salbutamol aumentou a produção de enzimas antioxidantes (UZKESER *et al.*, 2012), controlando a inflamação no modelo induzido por carragenina. Também utilizando o modelo de inflamação

por carragenina, Eteraf-Oskouei *et al.* (2017) demonstraram que a administração de salbutamol reduziu o nível de IL-1 β , além de impedir o acúmulo de leucócitos e a formação de granuloma, e que esse efeito foi revertido pela administração de propranolol (ETERAF-OSKOU EI *et al.*, 2017), sugerindo que esse fármaco pode apresentar alguma relação neuroprotetora.

3. JUSTIFICATIVA

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva caracterizada pela morte de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal. No entanto, apesar da vulnerabilidade desses neurônios, as vias noradrenérgica e serotoninérgica têm sido associadas aos estágios iniciais e a progressão da doença. Estudos recentes têm sugerido uma relação entre o uso de fármacos agonistas, seletivos dos receptores β 2-noradrenérgicos ($RA\beta$ 2) com uma redução do risco para o desenvolvimento da DP, e antagonistas, não seletivos ao aumento do risco. Além disso, a estimulação noradrenérgica via receptores β 2 ($RA\beta$ 2) pode levar a um aumento na liberação da dopamina e redução na expressão do mRNA do gene *SNCA*, responsável pela síntese da α -sinucleína, proteína relacionada à morte dos neurônios dopaminérgicos. Dessa forma, compreender a relação entre uso prévio e prolongado, de fármacos β -noradrenérgicos e o risco para o desenvolvimento da DP pode ajudar no desenvolvimento de potenciais drogas que impeçam a progressão da DP.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito da administração prévia e crônica do salbutamol sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas de um modelo animal de parkinsonismo induzido por reserpina.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração crônica do salbutamol sobre alterações motoras induzidas por reserpina;
- Avaliar o efeito da administração crônica do salbutamol β 2 sobre alterações cognitivas induzidas por reserpina;
- Avaliar o efeito da administração crônica do salbutamol sobre alterações imunorreativas de tirosina hidroxilase e alfa-sinucleína induzidas por reserpina.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1. Animais

Foram utilizados 45 ratos jovens (4 meses), da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Os animais foram alojados em número de quatro, em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm), sob ventilação e temperatura controladas (22 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e comida. Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Lei Arouca e todos os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS), e aprovados sob número 4200070621.

5.2. Drogas

A reserpina (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 consistiu na mesma quantidade de ácido acético e água destilada usados na solução de reserpina. O Salbutamol (5 mg/kg) (Sigma-Aldrich Brasil Ltda), agonista seletivo β_2 -adrenérgico foi diluído em solução salina 0,9 mg/ml, a qual foi utilizada como solução veículo do salbutamol. Foram utilizados também, cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União) 100 mg/kg e Cloridrato de xilazina (Calmium®, Agener União) 10 mg/kg.

5.3. Procedimentos gerais

Antes do início dos experimentos, os animais foram submetidos a cinco minutos de manipulação diária, durante cinco dias, com a finalidade de habituá-los ao toque e à presença do experimentador. Todos os experimentos foram realizados, preferencialmente, no mesmo turno e horário (12:00 – 16:00 horas).

Entre as sessões de testes comportamentais, os aparatos comportamentais foram limpos com uma solução de etanol a 10% para evitar possíveis pistas de odores deixadas por outro animal. Os parâmetros comportamentais dos testes de campo aberto e alternância

espontânea, foram quantificados por um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, USA).

5.4. Delineamento experimental

Inicialmente os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos: (1) CTR, controle (n = 21) e (2) SALB, salbutamol (n= 24), os quais foram tratados diariamente, durante 75 dias, com veículo ou salbutamol (5 mg/kg), respectivamente, por via subcutânea (s.c.).

Após os 45 dias de tratamento salbutamol ou veículo, os animais do grupo CRT foram divididos, aleatoriamente, em (1) grupo CTR (n = 9) e (2) grupo RES, reserpina (n = 12), e os animais do grupo SALB foram divididos, aleatoriamente, em (3) grupo SALB (n = 10) e (4) grupo RES-SALB (n = 14), totalizando quatro grupos experimentais. A partir do dia 45 (figura 4), juntamente com tratamento diário de salbutamol 5 mg/kg e veículo (do salbutamol e da reserpina), os animais dos grupos RES e RES-SALB foram induzidos ao parkinsonismos por 15 injeções de reserpina 0,1 mg/kg, administrada uma a cada 48 horas, por via s.c., durante 30 dias.

Ao longo do experimento, os animais foram submetidos aos testes comportamentais de (1) Catalepsia, realizada diariamente, a partir do dia zero (anterior ao início da administração de RES) até o término do experimento; (2) Avaliação dos movimentos orais (MO), realizado no dia zero, 18 (efeito da nona injeção de reserpina) e no dia 30 (efeito da última injeção de reserpina); (3) Campo aberto, realizado no dia sete (efeito da quarta injeção de reserpina); e (4) Alternância espontânea, realizado no dia 10 (efeito da quinta injeção de reserpina). No 30 dia, 48 horas após a última injeção de reserpina, os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão transcardíaca para fixação e coleta dos encéfalos, processamento dos tecidos e posteriormente submetidos à imuno-histoquímica (figura 4).

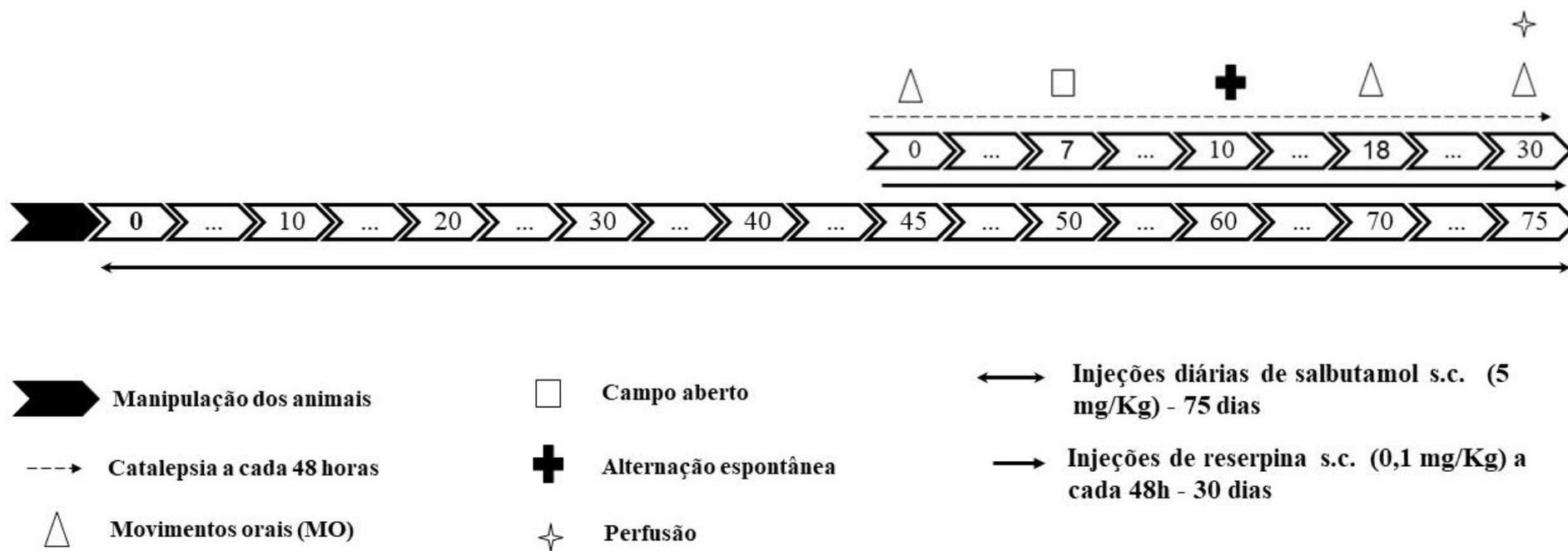


Figura 4: Representação esquemática do delineamento experimental.

5.5. Testes comportamentais

5.5.1. Catalepsia

O teste de catalepsia tem como objetivo avaliar o comportamento bradicinético do animal, ou seja, a latência em iniciar um movimento voluntário, sintoma característico da DP. O comportamento de catalepsia foi avaliado seguindo o protocolo de (BISPO *et al.*, 2019). O animal foi colocado com ambas as patas dianteiras sobre uma barra horizontal, elevada 9 cm da superfície de apoio das patas traseiras (figura 5). Foi medida a latência para o animal, realizar um movimento completo, 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.

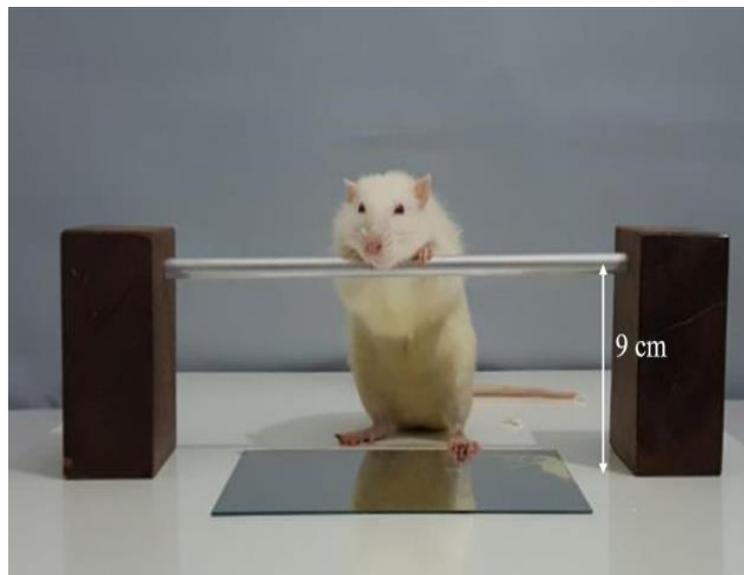


Figura 5: Aparato de Catalepsia. Animal posicionado com as patas dianteiras sobre a barra de catalepsia, elevada a 9 cm. Fonte: Laboratório de neurobiologia comportamental e evolutiva - LaNCE.

5.5.2. Avaliação dos movimentos orais (MO)

O teste de MO é utilizado para avaliar os movimentos involuntários na região oral de modelos experimentais de parkinsonismo. Os MO são relacionados aos movimentos involuntários observados em pacientes da DP. Os animais foram colocados, individualmente, 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 visualize o animal em qualquer posição (figura 6). Foi avaliado o número de movimentos de mastigação no vácuo, o número de movimentos de protrusão de língua e o tempo de tremor oral realizado por cada animal, durante 10 minutos de observação (LEÃO *et al.*, 2017; LINS *et al.*, 2018).



Figura 6: Teste de movimentos orais. Animal posicionado na gaiola gradeada cercada de espelhos para avaliação dos comportamentos de mastigação no vácuo, protrusão de língua e tremor oral. Fonte: Laboratório de neurobiologia comportamental e evolutiva - LaNCE.

5.5.3. *Teste de campo aberto*

O campo aberto é um teste utilizado para avaliar o comportamento locomotor e exploratório dos animais, podendo ainda ser utilizado para análises de comportamento do tipo ansiedade. O aparato do campo aberto é feito com uma caixa de água de acrílico, com dimensões de 80 cm de diâmetro e 40 cm de altura, com o interior pintado de preto, para aumentar o contraste e favorecer o reconhecimento do animal pelo programa de rastreamento (figura 7). Os animais foram colocados, individualmente, no centro do aparato para livre exploração durante cinco minutos (SANTOS *et al.*, 2013). Uma câmera, conectada a um computador, foi colocada sobre o aparato a uma altura de 230 cm e os parâmetros comportamentais foram registrados por um programa de rastreamento de animais (Anymaze, Stoelting, EUA).

Durante a livre exploração dos animais no aparato, foi avaliada a distância total percorrida, velocidade média e tempo gasto na zona central do aparato. Cada animal foi avaliado individualmente e o aparato limpo com uma solução de etanol a 10% entre os testes.

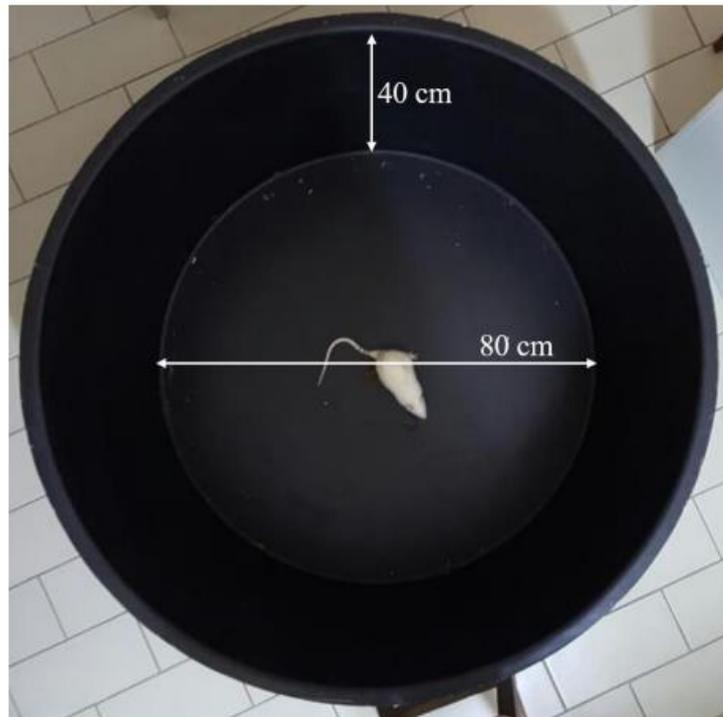


Figura 7: Teste de campo aberto. Aparato circular com o interior de cor preta para avaliar a livre exploração dos animais experimentais. *Fonte: Laboratório de neurobiologia comportamental e evolutiva – LaNCE.*

5.5.5. *Teste de Alternação espontânea*

Esse teste tem por objetivo avaliar a memória operacional de animais experimentais. O teste foi realizado em um aparato em formato de labirinto em cruz, constituído por quatro braços fechados de 50 x 18 x 34 cm com o teto aberto e um espaço central (plataforma central – 16 x 16 cm). O aparato é elevado a uma altura de 70 cm do solo. Cada braço foi nomeado com as letras A, B, C e D, respectivamente (figura 8). Os animais foram colocados, individualmente, no centro do labirinto, apontados para o lado A, para livre exploração, durante cinco minutos em que, eles alternavam espontaneamente entre os quatro braços. Durante o teste, foi registrada manualmente, a sequência de entrada nos braços (Exemplo: ABCBADC).

Para avaliação de desempenho, a sequência de entrada nos braços foi registrada manualmente (Exemplo: ABCBADC). Consideramos como número de sequências corretas, quando o animal, em uma sequência de quatro tentativas de entradas nos braços, não retornou a nenhum braço anteriormente visitado, demonstrando que ele recorda que já visitou aquele espaço, de acordo com o protocolo de CAMPÊLO, 2013.

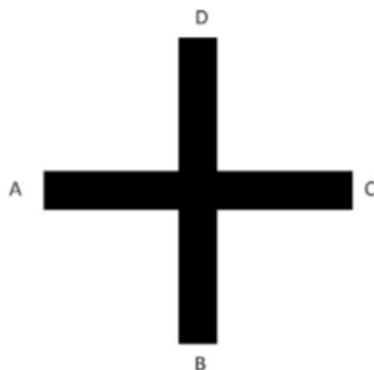


Figura 8: Ilustração representativa do aparato do labirinto em cruz elevado para realização do teste de alternância espontânea.

5.6. Avaliação da massa corporal

Para acompanhar a variação da massa corporal dos animais ao longo do experimento, a massa dos animais foi aferida a cada 4 dias. Foi utilizada uma balança portátil com cuba, onde os animais foram colocados, individualmente, e registrado a massa corporal em gramas (g). Para calcular a de variação da massa corporal, utilizamos a equação $M = [(Mi/ Mf) \times 100] - 100$, sendo M a variação do peso, Mf o peso final e Mi o peso inicial.

5.7. Perfusão e processamento do encéfalo

Após o período de realização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com 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 intracardiamente 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 encéfalos foram levados a um criostato de deslizamento (Leica, EUA) sendo congelados à -20°C para obtenção de secções coronais de $50\ \mu\text{m}$, que 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 $250\ \mu\text{m}$. 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.

5.8. Análise histológica do tecido

5.8.1. Imuno-histoquímica

Após a fase de processamento dos encéfalos dos animais, as secções dos tecidos foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica a temperatura ambiente ($22-25^{\circ}\text{C}$). Os tecidos foram submetidos a lavagem em TF $0,1\ \text{M}$ (4 vezes de 5 minutos, sob agitação automática), e em seguida pré-tratadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) $0,3\%$ e TF por 20 minutos, para inativação da peroxidase endógena.

Em seguida, 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, policlonais, anti- α -syn (cat # sc-7011-R, Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, EUA, 1:1000) anti-TH (#AB152 Millipore/Sigma, EUA, 1:3000), diluídos em TF contendo Triton-X 100 a $52\ 0,4\%$ (ICN Biomedicals), e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2% durante 24 horas ($22\ ^{\circ}\text{C}$).

Por fim, os tecidos foram encubados em anticorpo secundário biotilado anti-coelho (sc2004 Santa Cruz Biotechnology, EUA, 1:1000), diluído em TF contendo TritonX 100 a $0,4\%$, por 2 horas. Após o anticorpo secundário, os tecidos foram lavados em TF e encubação, 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, diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA), a $2,5\%$ diluída em TF ($0,1\ \text{M/pH}\ 7,4$) e $0,01\%$ de H_2O_2 .

5.8.2. Aquisição de imagens

Após a imuno-histoquímica as secções foram montadas em lâminas previamente gelatinizadas, e em seguida 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 câmara digital (Ds-fi1c, Nikon Corporatin inc., Japan) e programa específico para essa finalidade (Imaging Software NIS Elements, Nikon, versão 4.30), os quais estão acoplados ao microscópio; as áreas serão localizadas com auxílio do atlas Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2007).

5.8.3. Contagem de células

Para cada animal, foram feitas imagens dos cortes em aumento de 100x (objetiva de 10x), nas quais foram observadas a presença ou ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem das células foi realizada em quatro secções de cada animal (6 animais por grupo) e o número de células para cada animal corresponde à média entre as quatro secções analisadas. Dessa forma, foi quantificado o número células imunorreativas a TH+ na SNpc e na área tegumentar ventral (VTA), 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). A contagem foi realizada de forma “cega”, de modo que o experimentador não sabia 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.

5.8.4. Avaliação da densitometria óptica absoluta (DOR)

Para as áreas de projeções e não corpo celular, como a substância negra reticulada (SNr), o estriado dorsal e o córtex pré-frontal medial (CPFm), foi realizada uma 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 quatro imagens consecutivas para cada área, SNr, estriado dorsal e CPFm, 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 passaram por normalização pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle.

5.9. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os quais apresentaram distribuição normal para todas as variáveis, então foram aplicados testes paramétricos apropriados. Os dados comportamentais do teste de catalepsia, movimentos orais e a variação da massa corporal foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD. Os dados dos testes de exploração de campo aberto, alternância espontânea, contagem de células e a DOR foram submetidos à ANOVA de uma via, seguida pelo 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 8.0 (Graph Pad Prism Software Inc., San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

6.1. Teste de catalepsia

A ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo [F (15, 225) = 30.92; $p < 0,0001$], tratamento [F (3, 45) = 19.70; $p < 0,0001$] e interação tempo x tratamento [F (45, 479) = 12.04; $p < 0,0001$]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou um aumento significativo na latência do grupo RES, comparado aos grupos CTR, do dia 12 ao 30 (^{12,16,18,20,22,24,26,28 e 30} $p < 0,0001$, ¹⁴ $p = 0,0053$) e RES-SALB, do dia 16 ao 30, (¹⁶ $p = 0,0023$, ^{18,20,22,24,28 e 30} $p < 0,0001$). Além disso, revelou que o grupo RES-SALB apresentou um aumento significativo na latência para iniciar o movimento, comparado aos grupos SALB, do dia 14 ao 30 (¹⁴ $p = 0,0465$, ¹⁶ $p = 0,0018$, ¹⁸ $p = 0,0024$, ^{20,22} $p < 0,0001$, ^{24,26} $p = 0,0012$, ²⁸ $p = 0,0021$ e ³⁰ $p = 0,0005$) e CTR, do dia 16 ao 30 (¹⁶ $p = 0,0108$, ¹⁸ $p = 0,0050$, ^{20,22} $p < 0,0001$, ²⁴ $p = 0,0031$, ²⁶ $p = 0,0009$, ²⁸ $p = 0,0036$ e ³⁰ $p = 0,0013$) (figura 9).

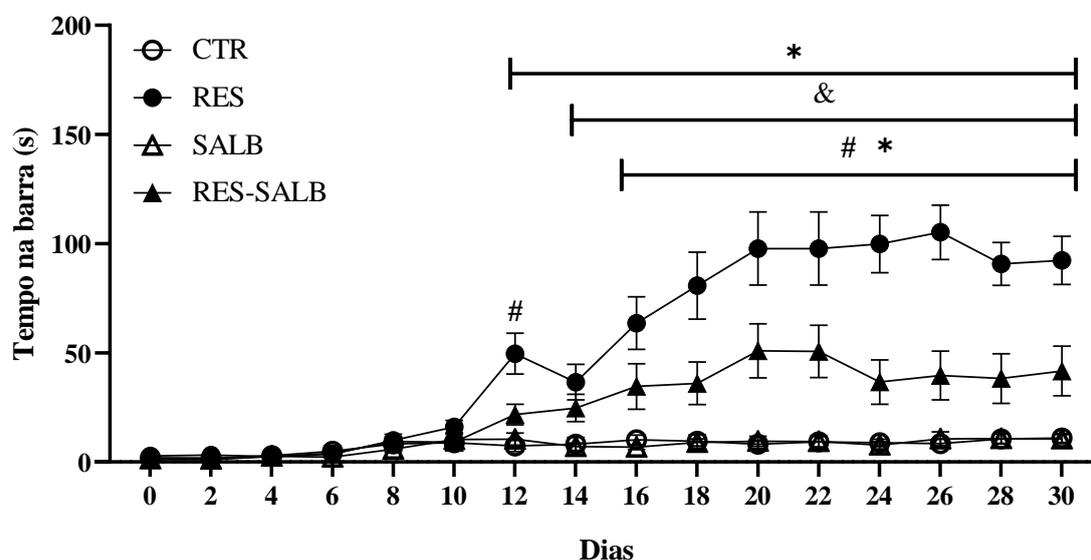


Figura 9: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o comportamento de catalepsia do modelo experimental de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). O grupo RES apresentou uma maior latência para iniciar o movimento comparado ao grupo CTR, do dia 12 ao 30, e ao grupo RES-SALB, do dia 16 a 30. O grupo RES-SALB apresentou uma maior latência para iniciar o movimento comparado ao do grupo SALB, do dia 14 ao 30, e ao grupo CTR, do dia 16 ao 30. Os valores foram expressos como média \pm E. P. M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparando os grupos RES x RES-SALB; & $p < 0,05$ comparando os grupos SALB x RES-SALB. (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.

6.2. Avaliação dos movimentos orais

O teste de MO foi realizado nos dias zero (antes da primeira injeção de reserpina), 18 (após a 9 injeções de reserpina) e 30 (48 horas após a última injeção de reserpina).

Para a mastigação no vácuo, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo [F (2, 30) = 16,24; $p < 0,0001$], efeito de tratamento [F (3, 45) = 5,820; $p = 0,0019$] e interação tempo x tratamento [F (6,59) = 2,808; $p = 0,0180$]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou um aumento, significativo, no número de mastigações no vácuo nos grupos RES e RES-SALB, quando comparados aos CTR ($^{18}p=0,0008$ e $^{30}p=0,0005$) e SALB ($^{18}p=0,0127$ e $^{30}p=0,0216$), respectivamente, nos dias 18 e 30 (figura 10 A). A comparação entre os grupos RES e RES-SALB não foi significativa.

Para o número de protrusões de língua, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo [F (2, 30) = 14,24; $p < 0,0001$], tratamento [F (3, 45) = 9,237; $p < 0,0001$] e interação tempo x tratamento [F (6, 65) = 3,901; $p = 0,0022$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento, significativo, no número de protrusões de língua nos grupos RES e RES-SALB, quando comparados aos CTR ($^{18}p=0,0044$ e $^{30}p=0,0005$) e SALB ($^{18}p=0,0002$ e $^{30}p < 0,0001$), respectivamente, nos dias 18 e 30 (figura 10 B). Não foram encontradas diferenças significativas, quando comparados os grupos RES e RES-SALB.

Para o tremor oral, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo [F (2, 30) = 4,937; $p = 0,0140$], tratamento [F (3, 45) = 7,579; $p = 0,0003$] e interação tempo x tratamento [F (6, 60) = 4,378; $p = 0,0010$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento, significativo, no tremor oral nos grupos RES e RES-SALB, quando comparados aos CTR ($^{18}p < 0,0001$ e $^{30}p=0,0066$) e SALB ($^{18}p=0,0210$ e $^{30}p < 0,0001$), respectivamente, nos dias 18 e 30 (figura 10 C). Assim como na análise de mastigações no vácuo e protrusões de língua, não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os grupos RES e RES-SALB.

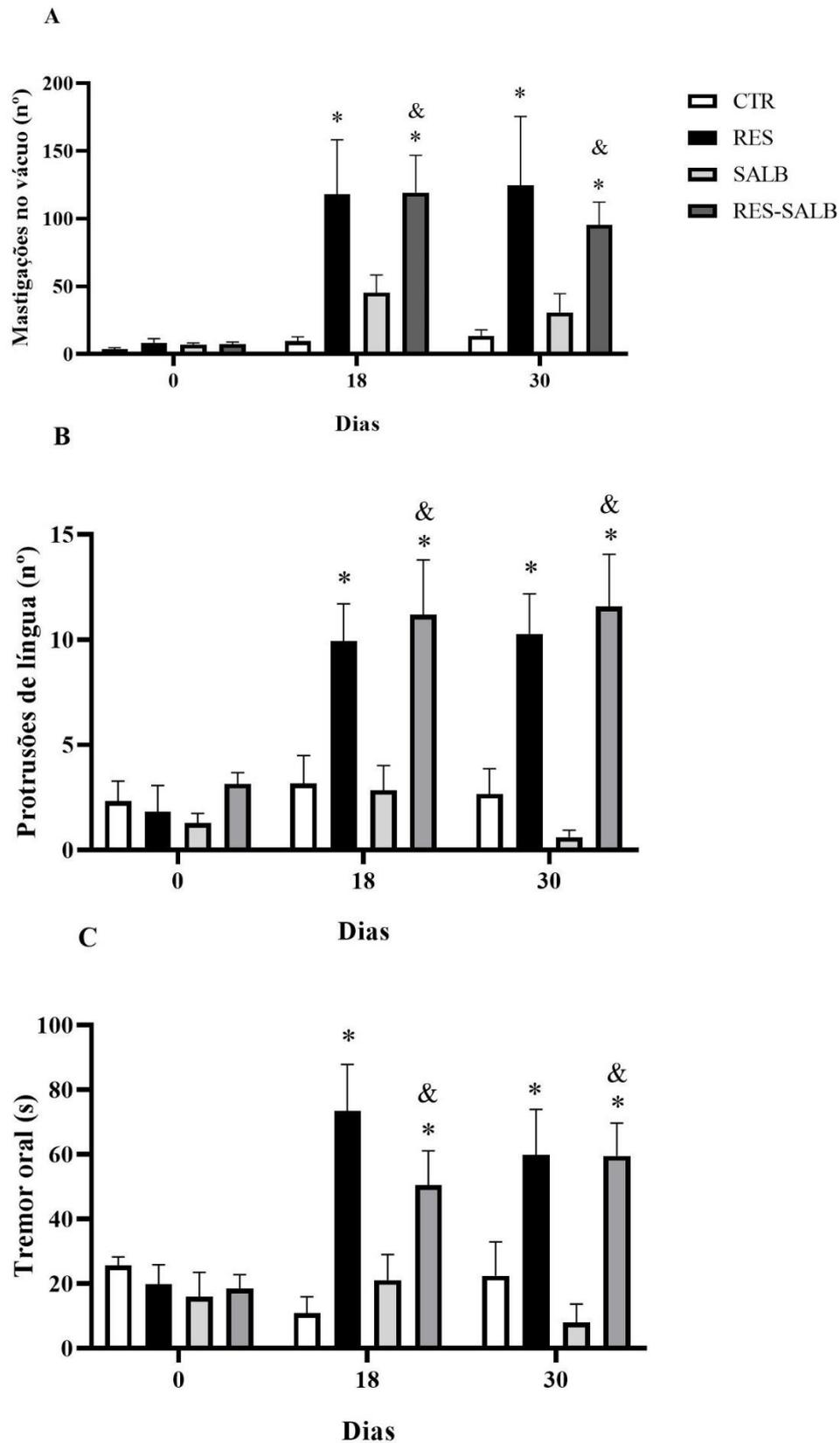


Figura 10: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o comportamento de movimentos orais do modelo experimental de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Os grupos RES e RES-

SALB apresentaram um aumento significativo de (A) mastigação no vácuo, (B) protrusão de língua e (C) tremor oral, nos dias 18 e 30, comparados aos grupos CTR e SALB, respectivamente. Os valores foram expressos como média \pm E. P. M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # $p < 0,05$ comparando os grupos RES x RES-SALB; & $p < 0,05$ comparando os grupos SALB x RES-SALB. (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.

6.3. Teste de campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado após a quarta injeção de reserpina e foram quantificados os parâmetros de distância percorrida, velocidade média e o tempo de permanência no centro.

A ANOVA de uma via não mostrou efeito do tratamento na distância percorrida [$F(3, 25) = 0,632$; $p = 0,6007$] (figura 11 A) e na velocidade média [$F(3, 24) = 1,945$; $p = 0,1493$] (figura 11 B). Para o tempo de permanência no centro, a ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento [$F(3, 25) = 5,686$; $p = 0,0041$]. Já o pós-teste de Fisher's LSD, revelou um aumento significativo no tempo de permanência no centro RES-SALB comparado aos grupos CTR ($p = 0,0017$), RES ($p = 0,0019$) e SALB ($p = 0,0296$) (figura 11 C).

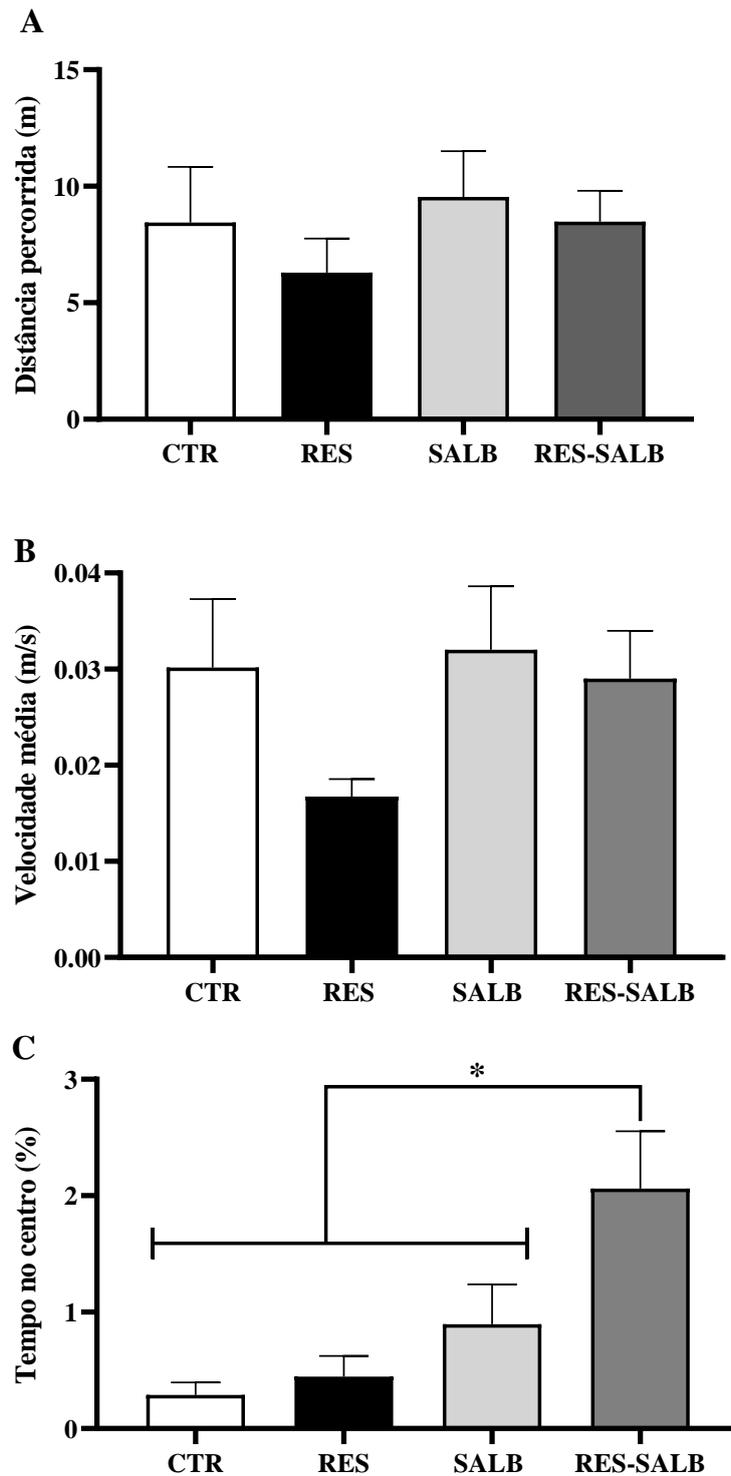


Figura 11 : Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o comportamento exploratório do modelo experimental de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados na (A) distância percorrida e na (B) velocidade média. (C) O grupo RES-SALB apresentou um aumento, significativo, no tempo de permanência do centro comparado aos grupos SALB, RES e CTR. Os valores foram expressos como média \pm E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado RES-SALB x SALB, RES e CTR. (ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol.

6.4. Alternação espontânea

O teste de alternação espontânea foi realizado no dia 10, após a quinta injeção de reserpina. A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento [F (3, 479), $p = 0,0308$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa no número de acertos de alterações corretas dos grupos RES e RES-SALB comparado ao grupo CTR ($p = 0,0062$ e $p = 0,0121$, respectivamente), não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre os grupos CTR e SALB ($p = 0,1058$) (figura 12).

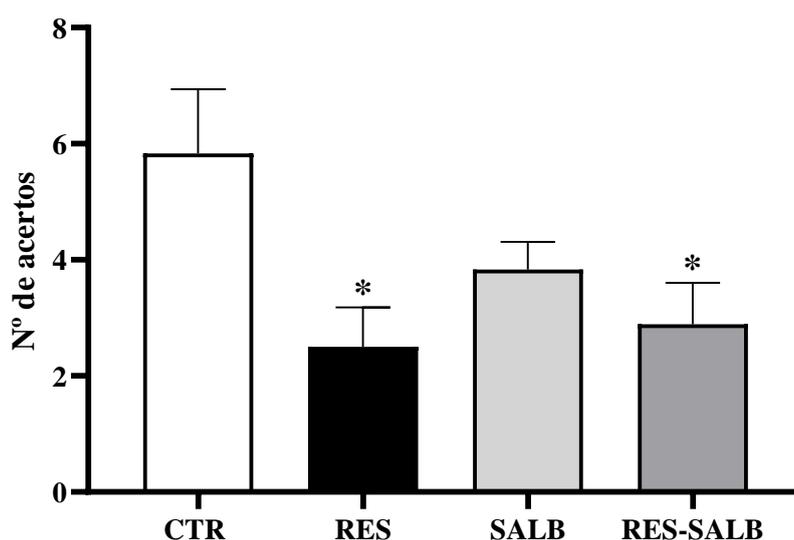


Figura 12: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) no teste de alterações espontâneas, no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Os grupos RES e RES-SALB, apresentaram redução significativa no número de alterações corretas, comparados ao grupo CTR. Os valores foram expressos como média ± E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparado RES e RES-SALB x CTR. (ANOVA de uma via, seguidas pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol.

6.5. Variação da massa corporal

A variação da massa corporal foi analisada antes e depois da indução do modelo da reserpina. Na fase inicial do tratamento, antes do começo da administração de reserpina, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo [F (11, 583) = 106,6; $p < 0,0001$], tratamento [F (1,53) = 13,58; $p = 0,0005$] e interação tempo x tratamento [F (11,583) = 6,430; $p < 0,0001$]. O pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento significativo da massa corporal do grupo SALB comparado aos grupos CTR, da 4ª à última pesagem a última pesagem

anterior a reserpina (do dia 11 ao dia 43) ($^{11}p = 0,0017$, $^{15, 19, 27, 31 \text{ e } 35}p < 0,0001$, $^{23}p = 0,0003$ e $^{39 \text{ e } 43}p = 0,0002$) (figura 13 A).

A partir do dia 45, início da indução ao modelo de parkinsonismo, a ANOVA de duas vias com medidas repetidas mostrou efeito de tempo [$F(8,402) = 9,699$; $p < 0,0001$], tratamento [$F(3,51) = 27,71$; $p < 0,0001$] e interação tempo x tratamento [$F(24,402) = 9,524$; $p < 0,0001$]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou uma redução significativa da massa corporal no grupo RES quando comparado ao CTR, a partir do dia 59, efeito da oitava injeção de reserpina ($^{59}p = 0,0188$, $^{63}p = 0,0015$, $^{67, 71 \text{ e } 75}p < 0,0001$), e no grupo RES-SALB quando comparado ao grupo CTR, a partir do dia 51, efeito da terceira injeção de reserpina ($^{51}p = 0,0240$ e $^{55, 59, 63, 67, 71 \text{ e } 75}p < 0,0001$) e ao grupo SALB ($^{51}p = 0,0097$ e $^{55, 59, 63, 67, 71 \text{ e } 75}p < 0,0001$). Além disso, o pós-teste de Fisher's LSD revelou uma redução significativa da massa corporal do grupo RES-SALB quando comparado ao grupo RES, a partir do dia 55, efeito da sexta injeção de reserpina ($^{55 \text{ e } 59}p < 0,0001$, $^{63}p = 0,0003$, $^{67}p = 0,0015$, $^{71}p = 0,0004$ e $^{75}p = 0,0005$) (Figura 13 B).

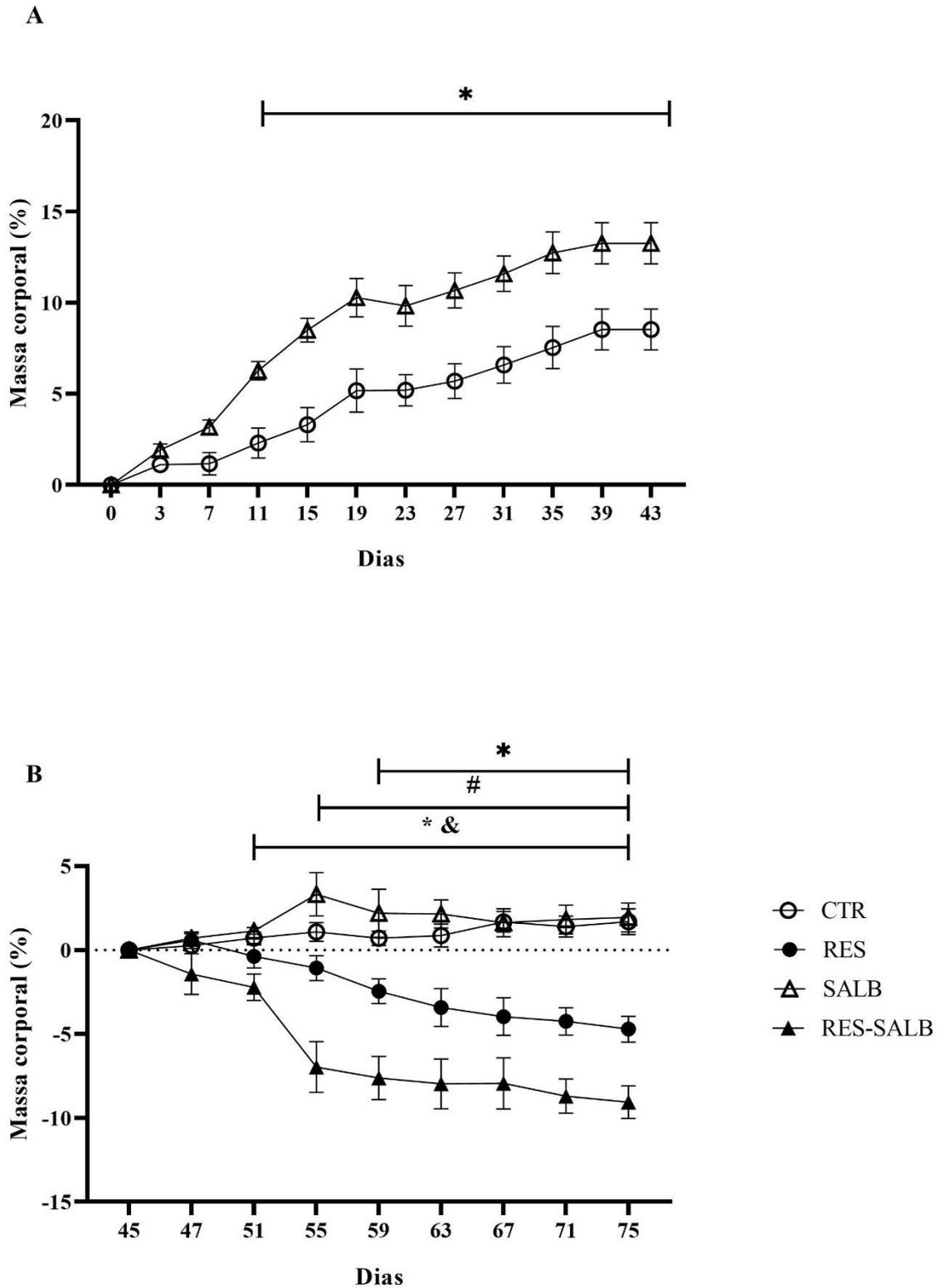


Figura 13: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre a massa corporal no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). (A) O grupo SALB apresentou um aumento significativo da massa corporal comparado aos grupos CTR do dia 11 ao 43. (B) O grupo RES apresentou uma redução significativa da massa corporal comparado ao grupo CTR, do dia 59 ao 75, enquanto o grupo RES-SALB apresentou uma redução significativa da massa corporal comparado aos grupos CTR e SALB, do dia 51 ao 75, e comparado ao grupo RES, do dia 55 ao 75. Os valores foram expressos como média \pm E. P. M. * $p < 0,05$ quando comparados ao CTR; # $p < 0,05$ comparado os grupos RES x RES-SALB; & $p < 0,05$ comparado os grupos SALB x RES-SALB. (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguidas pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol.

6.6. Imuno-histoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH⁺)

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa para o número de células TH⁺ na SNpc [F (3,20) = 4,154; p=0,0193] e [F (3,11) = 7,069; p=0,0065] na VTA, entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD, revelou uma redução significativa no número de células TH⁺ na SNpc e VTA no grupo RES quando comparado ao grupo CTR (p = 0,0027 e p = 0,0008, respectivamente) e ao grupo RES-SALB (p = 0,0443 e p = 0,0151, respectivamente) (figuras 14 A e B).

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa na DOR para TH⁺ no estriado dorsal [F (3,14) = 5,383; p = 0,0113]. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou uma redução significativa na DOR para TH⁺ no grupo RES quando comparado ao grupo CTR (p = 0,0240) e ao grupo RES-SALB (p = 0,0015) (figura 14 C).

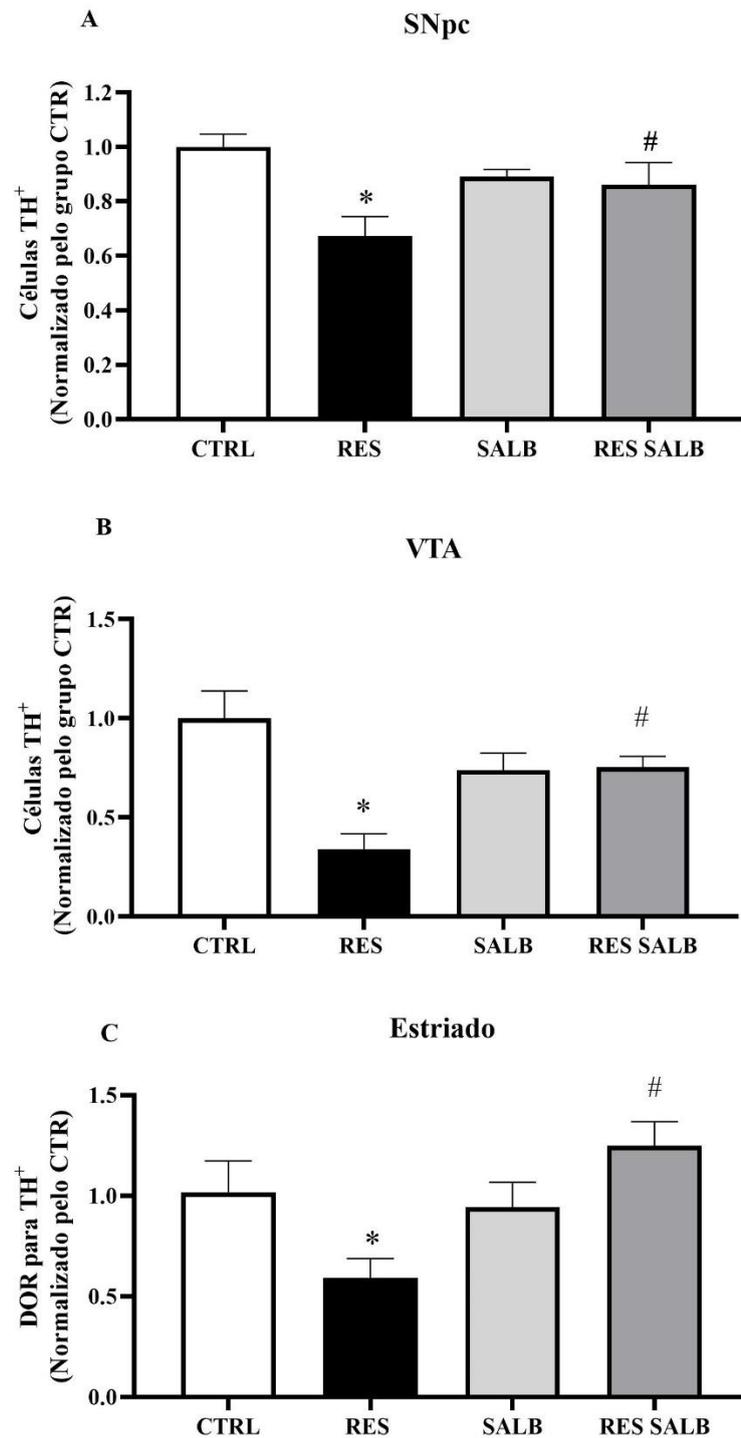


Figura 14: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre o número de células TH⁺, na substância negra parte compacta (SNpc) e área tegumentar ventral, e DOR no estriado dorsal no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). (A e B) O grupo RES apresentou uma redução significativa no número de células TH⁺ na SNpc e VTA comparado aos grupos CTRL e RES-SALB. (C) O grupo RES apresentou uma redução significativa na DOR para TH⁺ no estriado comparado aos grupos CTRL e RES-SALB. Os valores foram expressos como média ± E. P. M., e normalizados pela média geral do grupo CTRL. *p<0,05 quando comparado CTRL x RES e #p<0,05 quando comparados os grupos RES x RES-SALB. (ANOVA de uma via seguidas pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTRL = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol.

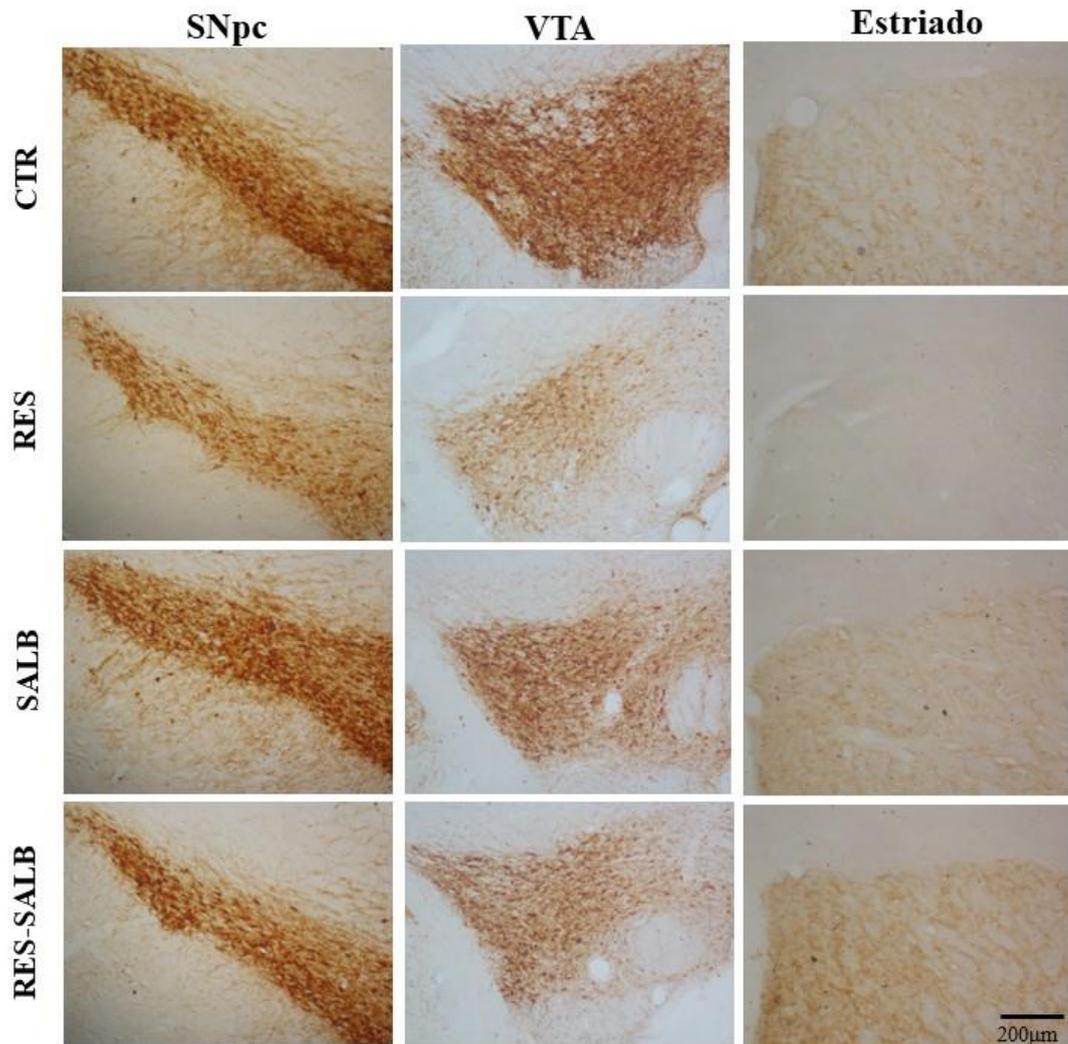


Figura 15: Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH). Imagem representativa da marcação para TH na substância negra parte compacta (SNpc), área tegumentar ventral (VTA) e estriado dorsal. CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina salbutamol. Barra de escala: 200 µm.

6.7. Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -sin⁺)

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa para a DOR para α -sin⁺ na SNr [F (3,14) = 3,451; p = 0,0459], estriado dorsal [F (3,13) = 33,20; p<0,0001] e CPFm [F (3,12) = 5,252; p = 0,0152] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher's LSD, revelou um aumento significativo da DOR para α -sin⁺ nos grupos RES e RES-SALB quando comparados ao grupo CTR na SNr (p = 0,0433 e p = 0,0100, respectivamente) (figura 16 A), estriado dorsal

($p < 0,0001$) (figura 16 B) e CPFm ($p = 0,0023$ e $p = 0,0182$, respectivamente) (figura 16 C). Além disso, o pós-teste de Fisher's LSD revelou um aumento significativo da DOR para α -syn⁺ no estriado dorsal do grupo RES-SALB comparado ao grupo SALB ($p < 0,0001$) (figura 16 B).

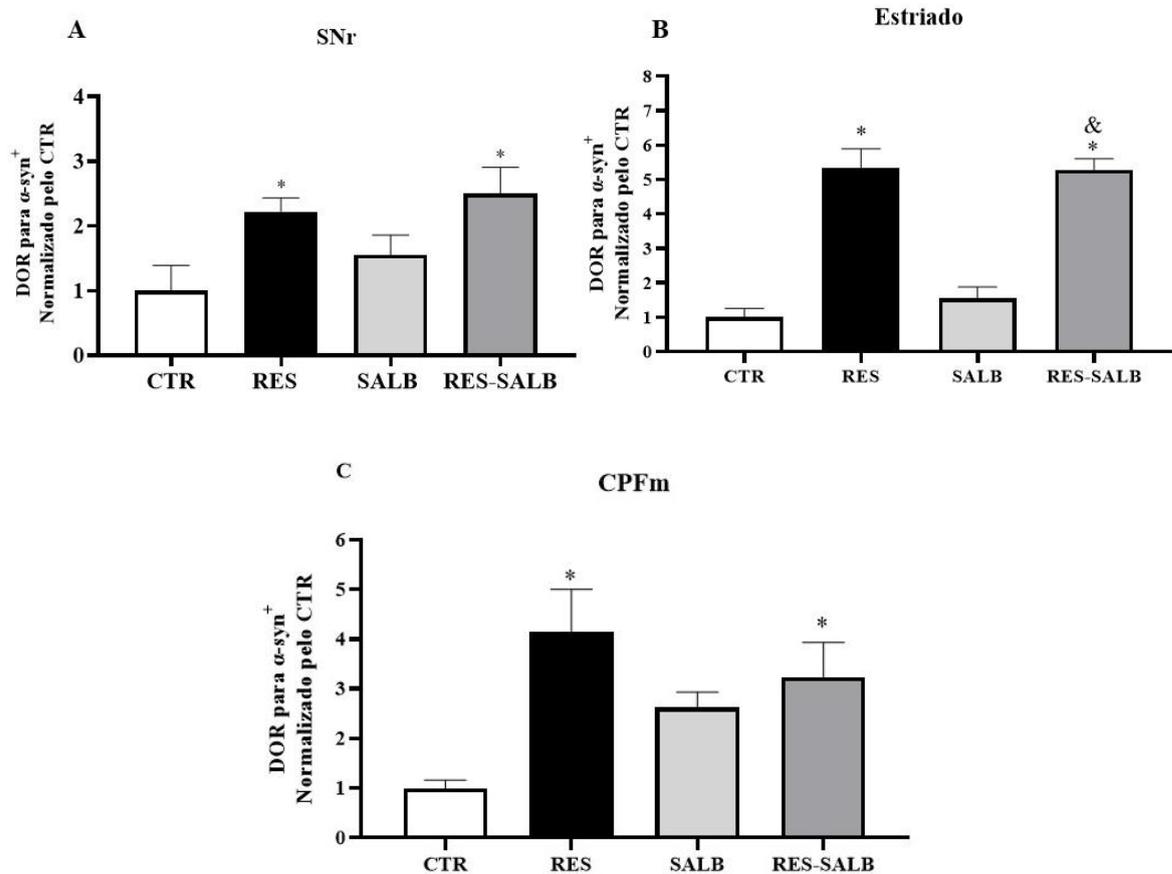


Figura 16: Efeito da administração crônica de salbutamol (5 mg/kg) sobre DOR para α -syn⁺ na substância negra parte reticulada (SNr), estriado dorsal e córtex pré-frontal medial (CPFm) no modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Os grupos RES e RES-SALB apresentaram um aumento significativo na DOR para α -syn⁺ comparado ao grupo CTR, nas áreas (A) SNr, (B) estriado dorsal e (C) CPFm, onde também foi observado um aumento significativo da DOR do grupo RES-SALB comparado ao grupo SALB. Os valores foram expressos como média \pm E. P. M., e normalizados pela média geral do grupo CTR. * $p < 0,05$ quando comparado CTR x RES e & $p < 0,05$ quando comparados os grupos SALB x RES-SALB. (ANOVA de uma via seguidas pelo pós-teste de Fisher's LSD). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina-salbutamol.

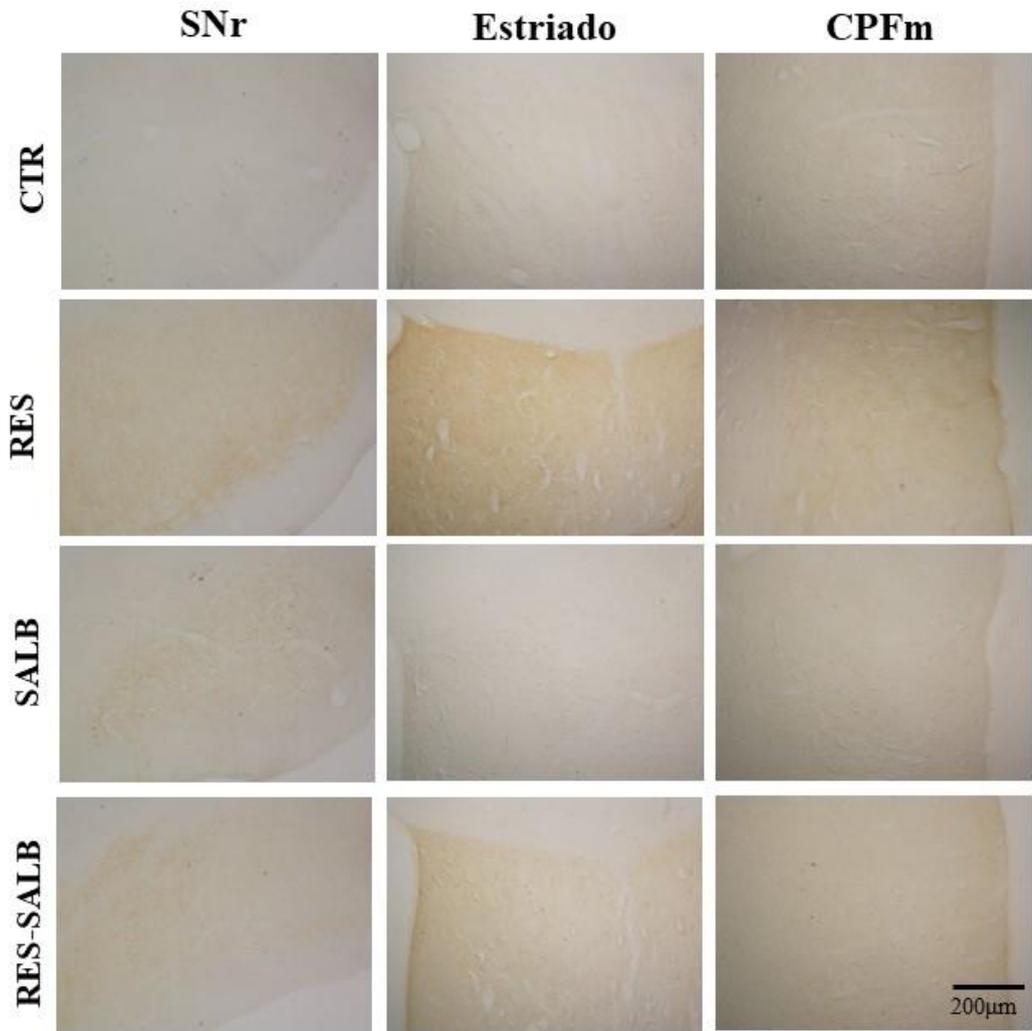


Figura 17: Imuno-histoquímica para α -sinucleína (α -sin). Imagem representativa da marcação para α -sin na substância negra reticulada (SNr), no estriado dorsal e no córtex pré-frontal medial (CPFm). CTR = controle; RES = reserpina; SALB = salbutamol; RES-SALB = reserpina salbutamol. Barra de escala: 200 μ m.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos o efeito da administração crônica do salbutamol (5 mg/kg), agonista seletivo β_2 noradrenérgico, no modelo de parkinsonismo induzido por baixas doses de reserpina (0,1 mg/kg). Os resultados demonstram que a administração crônica de salbutamol reduziu o déficit motor na catalepsia e provocou um efeito ansiolítico no campo aberto, porém não preveniu o déficit motor e cognitivo na avaliação de movimentos orais e alternância espontânea, respectivamente. Além disso, aumentou a perda de massa induzida pela reserpina. Também observamos que o salbutamol foi preventivo na redução da marcação para TH na SNpc, no estriado dorsal e na VTA, induzida por reserpina. Embora, a administração crônica do salbutamol não preveniu o aumento da marcação para α -sin na SNr, estriado dorsal e no CPFm induzida por reserpina.

Estudos têm mostrado que pacientes com comorbidades respiratórias tratados cronicamente com fármacos agonistas dos RA β_2 podem apresentar um menor risco de desenvolver a DP (DE GERMAI *et al.*, 2020; HOPFNER *et al.*, 2020; MAGISTRELLI; COMI, 2020; CHEN *et al.*, 2021; SAENGPATRACHAI *et al.*, 2021). No entanto ainda não é clara a relação entre a estimulação desses receptores e os mecanismos neuroprotetores associados a doença. Dessa forma, utilizamos o modelo progressivo de parkinsonismo induzido por baixas doses reserpina, associado ao tratamento crônico de salbutamol, para tentar mimetizar o que acontece na clínica e avaliar o efeito desse fármaco na progressão do parkinsonismo, uma vez que esse modelo é amplamente utilizado para induzir sintomas motores, como comportamento cataléptico, discinesias orais e redução na atividade locomotora (FERNANDES *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2013; LINS *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2021; CUNHA *et al.*, 2022), bem como sintomas não motores, como comportamento tipo ansioso e déficits cognitivos, que são característicos da doença (SANTOS *et al.*, 2013; PERES *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2019b).

Avaliamos o comportamento motor dos animais e os aspectos cognitivos, relacionados aos sintomas característicos da doença. O dano motor foi avaliado pelos testes de catalepsia, movimentos orais e campo abeto. O teste de catalepsia é considerado uma ferramenta útil para investigar a progressão do parkinsonismo e tem como objetivo avaliar a latência para a realização do primeiro movimento, mimetizando o comportamento de bradicinesia observado em pacientes da DP (ALI; MORRIS, 2014; OPARA, *et al.*, 2017; REICH; SAVITT, 2018). Os sintomas motores estão associados a depleção dopaminérgica nas vias direta e indireta dos núcleos da base. Em condições fisiológicas, as vias interagem inibindo o GPi e SNr, deixando

o tálamo livre para emitir suas projeções ao córtex e produzir o movimento (OBESO *et al.*, 2008). Já os sintomas não motores parecem estar associados a disfunção das vias noradrenérgicas e serotoninérgicas (RODRÍGUEZ-VIOLANTE *et al.*, 2017; REICHMANN *et al.*, 2017; BUTKOVICH *et al.*, 2018; LEAL *et al.*, 2019a).

Nossos resultados mostram que a administração repetida de reserpina aumentou progressivamente o tempo de catalepsia do grupo RES, corroborando estudos anteriores que utilizaram o modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg) (SANTOS *et al.*, 2013; BISPO *et al.*, 2019; GOIS, 2020, LIMA *et al.*, 2021; MELO *et al.*, 2022; BISPO *et al.*, 2022). No entanto, o tratamento crônico com salbutamol retardou o início do déficit motor e reduziu o tempo de catalepsia induzido pela reserpina no grupo RES-SALB, corroborando estudos que mostram que a estimulação da via noradrenérgica através dos receptores β_2 atenua o dano motor associado ao parkinsonismo (O'NIELL, *et al.*, 2019; GOIS, 2020) (figura 9).

A estimulação dos RA β_2 vem sendo relacionada à atenuação dos danos motores e neuroquímicos, associados à DP, através da regulação do gene *SNCA*, da proteína α -sin e do fenótipo neuroinflamatório (MITTAL *et al.*, 2017; O'NEILL; HARKIN 2018; RYAN *et al.*, 2013), sugerindo os agonistas desses receptores podem ser úteis contra mecanismos neurodegenerativos que estejam envolvidos com a progressão da doença.

Os movimentos orais são distúrbios motores caracterizados por movimentos involuntários na região oral do rato, característico do modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina (SILVA *et al.*, 2002; ABÍLIO, *et al.*, 2004; PEIXOTO *et al.*, 2004; FERNADES *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2016; LINS *et al.*, 2018; GOIS, 2020;), os quais são relacionados ao tremor em repouso e discinesias orais observados em pacientes da DP, devido a disfunção nos circuitos dos núcleos da base (DASHTIPOUR, *et al.*, 2018).

Neste estudo, avaliamos os três parâmetros correspondentes aos movimentos orais, mastigação no vácuo, protrusão de língua e tremor oral, em três momentos distintos ao longo da indução ao parkinsonismo induzido por reserpina (antes da 1ª e após a 9ª e 15ª injeção de reserpina). Nós observamos que a administração repetida de reserpina provocou um aumento dos três parâmetros de movimentos orais, como já mostrado em outros estudos (ABÍLIO, *et al.*, 2004; PEIXOTO *et al.*, 2004; FERNADES *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2016; LINS *et al.*; 2018; GOIS, 2020; LIMA *et al.*, 2021). Em contraste, o tratamento crônico com salbutamol não preveniu o aumento dos movimentos orais induzido por reserpina no grupo RES-SALB (figura 10 A, B e C). Nossos resultados corroboram o estudo de Gois (2020), que mostra que o tratamento com salbutamol após o início do dano motor não previne contra a progressão do

déficit motor associado aos movimentos orais. A discinesia oral induzida pela reserpina está associada à disfunção GABAérgica nos núcleos da base (PEIXOTO *et al.*, 2004). De tal modo, que a ineficácia do pré-tratamento com salbutamol para os movimentos orais, pode estar relacionada a uma menor densidade ou ausência dos RA β 2 nos neurônios GABAérgicos dos núcleos da base, uma vez que são ausentes projeções do LC para o corpo do estriado e globo pálido (SCHAWRTZ; LUO, 2015).

O resultado do MO, foi diferente do que vimos na catalepsia em que o pré-tratamento com o salbutamol foi preventivo para o comportamento cataléptico do animal, demonstrando que os comportamentos tem relação com vias de controle motor distintas. A catalepsia tem relação com o sintoma de bradicinesia, caracterizado pela dificuldade e lentidão em iniciar o movimento, associado ao déficit na via direta que atua induzido o movimento voluntário (ALI; MORRIS, 2014; OPARA, *et al.*, 2017; REICH; SAVITT, 2018). Já as discinesias e o tremor de repouso, que avaliamos no teste de MO, tem relação com a via indireta, responsável por frear o movimento involuntário (OBESO *et al.*, 2008).

Também avaliamos a atividade exploratória e locomotora dos animais no campo aberto, teste que avalia tanto aspectos motores quanto não motores, como o comportamento tipo ansioso, os quais estão associados ao parkinsonismo (CHAUDHURI *et al.*, 2006; ALI; MORRIS, 2014; TAGUCHI *et al.*, 2020). O comportamento tipo ansioso é avaliado, considerando o tempo que o animal passa no centro do aparato, levando em conta que o animal tende a preferir a periferia ao centro do aparato (comportamento chamado de tigmotaxis), aspecto verificado em arenas quadradas ou circulares (KUNIISHI *et al.*, 2017; LEAL *et al.*, 2019a), em que mesmo na ausência de cantos o animal tende a se locomover próximo a parede do aparato. Assim, aumento da exploração do centro do aparato são indicativos de menos comportamento do tipo ansioso (KULESSKAYA; VOIKAR, 2014; KUNIISHI *et al.*, 2017; LEAL *et al.*, 2019a).

No presente estudo, não observamos alteração na atividade exploratória e locomotora (distância percorrida e velocidade média) entre os grupos avaliados, após a 4ª injeção de reserpina, assim como relatado por Lima *et al.*, (2021), Leal *et al.*, (2019a) e Santos *et al.*, (2013) (figura 11 A e B). Para o tempo total de permanência no centro (figura 11 C), observamos que houve um aumento de tempo de permanência na área central do aparato do grupo RES-SALB em contraste com o grupo RES, que tende a diminuir o tempo no centro do aparato (SANTOS *et al.*, 2013; LEÃO *et al.*, 2015; LEAL *et al.*, 2019a). No entanto, o aumento de tempo no centro do aparato observado no grupo RES-SALB corrobora os resultados de Gois (2020), sugerindo que o salbutamol associado à reserpina possa ter provocado efeito ansiolítico

ou provocado depressão dos sistemas periféricos, já que são droga com efeito broncodilatador (STARKEY *et al.*, 2013; SOTTAS *et al.*, 2016; RITCHIE *et al.*, 2018) e hipotensivo (SHAMON; PEREZ, 2016; SIDDIQUI *et al.*, 2020), respectivamente. Além disso, um estudo realizado para avaliar a interação entre morfina (6 mg/kg via intraperitoneal) e salbutamol (4 µg/rato na amígdala basolateral) no labirinto em cruz elevado observou uma redução no comportamento do tipo ansioso (VALIZADEGAN *et al.*, 2013), sugerindo que o tratamento crônico com salbutamol pode ter provocado um efeito ansiolítico.

Além de aspectos emocionais, também avaliamos o efeito da administração crônica do salbutamol no prejuízo cognitivo induzido por reserpina através do teste de alternância espontânea, o qual avalia a memória operacional dos animais (CAMPÊLO, 2013). Nossos resultados mostram que o tratamento crônico com salbutamol não preveniu o prejuízo na memória operacional induzido por reserpina (figura 12). Na literatura, já é claro que o modelo de parkinsonismo induzido por reserpina apresenta déficits cognitivos em diversos testes de memória (LEAL *et al.*, 2019a; PERES *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2020) e mesmo após a suspensão da administração da reserpina (SANTOS *et al.*, 2013).

Além disso, estudos mostram que o salbutamol sozinho não tem efeito em memórias emocionais, no entanto quando associado ao etanol melhora a recuperação da memória (ZARRINDAST *et al.*, 2013), bem como na memória de discriminação de sons após infusão de agonistas dos RA β 2 (SCHICKNICK *et al.*, 2019). Mas por outro lado, estudos têm mostrado que a modulação noradrenérgica via estímulo dos RA β tem influência na formação de LTPs e na memória de longa prazo (GAO *et al.*, 2016; UL HAQ *et al.*, 2016; NGUYEN; CONNOR, 2019), bem como um aumento na neurogênese hipocampal e respostas cognitivas após a administração de clenbuterol (2 mg/kg), demonstrando uma melhora na memória dos animais submetidos ao teste de labirinto aquático de Morris, além de um aumento de espinhas dendríticas e de proteínas sinápticas (CHAI *et al.*, 2016).

Receptores β 1, β 2 e β 3 são expressos no hipocampo e participam do processo de consolidação de memórias episódicas, os RA β 1 são mais expressos em neurônios e terminais sinápticos, enquanto que os RA β 2 são expressos também em astrócitos e microglia, sua ativação via noradrenalina ativa o metabolismo astrocitário facilitando a formação das LTPs, além disso, participam da formação de memórias relacionadas a situações de estresse pela relação de dependência dessas memórias com a ativação da amígdala (GAO *et al.*, 2016). Todavia, são necessários mais estudos para entender a relação entre os agonistas dos RA β 2 e os diferentes tipos de memórias, como a memória operacional, avaliada neste estudo pelo teste de alternâncias espontâneas.

Também avaliamos variação da massa corporal dos animais ao longo de todo o experimento. A perda de massa corporal é uma característica do modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina (GOIS, 2020; BISPO, *et al.*, 2022; MELO *et al.*, 2022), bem como dos pacientes da DP (LOREFÄLT *et al.*, 2009; CERSOSIMO *et al.*, 2018; DE RUI *et al.*, 2020).

Nossos resultados mostram que o tratamento prévio com salbutamol provocou um aumento significativo da massa corporal dos animais do grupo SALB, mas após o início da indução ao parkinsonismo por reserpina, o salbutamol acentuou a perda de massa no grupo RES-SALB (figura 13 A e B). A literatura demonstra que os agonistas β_2 efeito anabólico (EMERY *et al.*, 1984; UC *et al.*, 2003; CANFORA *et al.*, 2022) e pode aumentar ganho de massa muscular (HEMMINGS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; SCHOLPA *et al.*, 2019), sugerindo que o aumento da massa corporal no grupo SALB esteja relacionado ao efeito anabólico do fármaco. Por outro lado, a grande redução na perda de massa do grupo RES-SALB pode estar relacionada a uma possível interação entre essas drogas que potencializem a perda de massa, e à progressão do dano motor provocado pela reserpina (SANTOS *et al.*, 2013; PERES *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2020; DE FREITAS *et al.*, 2016).

Em pacientes da DP, a perda de massa corporal pode estar relacionada às disfunções gastrointestinais, como a disfagia e as gastroperases que dificultam a absorção dos nutrientes, além da perda de habilidades funcionais, e ao aumento do gasto energético causados pelo tremor de repouso e a rigidez muscular (MA *et al.*, 2018; YONG *et al.*, 2020). Dessa forma, são necessários mais estudos para compreender os processos envolvidos na perda de massa corporal induzida pela interação entre reserpina e salbutamol.

Na literatura, já é bem esclarecido que a fisiopatologia da DP está relacionada a morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos na SNpc, com conseqüente depleção de dopamina no estriado dorsal, provocando o surgimento dos sintomas motores (BRAAK; DEL TREDICI, 2017; SURMEIER, 2018; SINGH *et al.*, 2019; LIU; CHEUNG, 2020; HUR; LEE, 2021; CONTE, 2021; LEGARDA *et al.*, 2022). Assim como nos pacientes da DP, o modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina mimetiza um dano motor progressivo associado a uma redução na imunorreatividade da enzima envolvida na síntese de dopamina (SANTOS *et al.*, 2013; LINS *et al.*, 2018; BISPO *et al.*, 2019; GOIS, 2020; LIMA *et al.*, 2021, BISPO *et al.*, 2022; MELO *et al.*, 2022; CUNHA *et al.*, 2022), serotonina e noradrenalina (LEAL *et al.*, 2019a, LEAL *et al.*, 2019b; GOIS, 2020).

No presente estudo, observamos a redução no número de células TH⁺ na SNpc e VTA, e na DOR no estriado induzida pela administração repetida de reserpina, como relatado em

outros estudos, citados acima, foi prevenida pelo tratamento crônico com salbutamol no grupo RES-SALB (figura 14 A, B e C), corroborando o estudo de Gois (2020). Como o mecanismo fisiopatológico da reserpina está associado a um aumento do estresse oxidativo, pela degradação da dopamina, (LEÃO *et al.*, 2015; LEÃO *et al.*, 2017) e a um fenótipo neuroinflamatório (LIMA *et al.*, 2021), acreditamos que o efeito neuroprotetor do salbutamol esteja associada a um aumento da atividade antioxidante, fatores anti-inflamatórios e a uma redução da reatividade microglial (UZKSER *et al.*, 2012; RYAN *et al.*, 2013; O'NEILL; HARKIN 2018; BILLINGTON *et al.*, 2017; MAGISTRELLI; COMI, 2020).

O potencial anti-inflamatório do salbutamol pode ser explicado pela expressão dos RA β 2 também em células periféricas do sistema imune (ETERAF-OSKOU EI *et al.*, 2017). Esses receptores fazem parte da família de receptores metabotrópicos GPCR, e tem em sua via de sinalização o AMPc e a PKA (BILLINGTON *et al.*, 2017; MAGISTRELLI; COMI, 2020; O'NEILL *et al.*, 2019), que podem atuar tanto fosforilando proteínas citoplasmáticas, quanto fatores de transcrição (BILLINGTON *et al.*, 2017). Já foi demonstrado, por exemplo que a ativação dos RA β 2, via salbutamol, pode controlar a produção de ROS, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona (GSH) (UZKSER *et al.*, 2012), reduzir o nível de IL-1 β , impedir o acúmulo de leucócitos e a formação de granuloma, avaliados no modelo de inflamação induzido por carragenina (ETERAF-OSKOU EI *et al.*, 2017).

Apesar da morte desses neurônios estar relacionada a vários mecanismos fisiopatológicos como o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e dos sistemas de degradação, além da neuroinflamação, o acúmulo citoplasmático da proteína α -sin, e sua associação aos corpos de Lewy, tem sido um dos principais fatores envolvidos na degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (TRIST *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2019; HUR; LEE, 2021; PICCIRILLO *et al.*, 2022; BRAAK *et al.*, 2002; SURMEIER *et al.*, 2017). Além disso, o estudo de Li *et al.*, 2022, demonstrou que a reserpina está associada à regulação positiva da expressão do gene *SNCA*, *in vitro* (LI *et al.*, 2022) e ao aumento da imunorreatividade da proteína α -sin (LEÃO *et al.*, 2017; GOIS, 2020; VAN ONSELEN; DOWNING, 2021).

Dessa forma, avaliamos a imunorreatividade para α -sin em diferentes áreas cerebrais e observamos que o tratamento crônico com salbutamol não impediu o aumento da imunorreatividade induzida por reserpina na SNr, estriado dorsal e CPFm (figura 16 A, B e C). Nossos resultados diferem de trabalho anteriores que mostram que a administração de salbutamol, após o início do dano motor, impede o aumento da imunorreatividade para α -sin

(GOIS, 2020), e que administração aguda de clenbuterol, agonista β_2 noradrérgico de longa ativação, atua na redução na expressão do mRNA do gene *SNCA* (MITTAL *et al.*, 2017).

Tal resultado pode ter relação com a perda de função relacionada ao uso prolongado do salbutamol. Estudos demonstram que o crônico do salbutamol, no tratamento de doenças respiratórias pode levar a uma diminuição da resposta (redução do efeito broncodilatador), podendo causar hiper-responsividade das vias aéreas, além da possível redução na expressão do receptor (ROSETHORNE *et al.*, 2015; BILLINGTON *et al.*, 2017; IPPOLITO *et al.*, 2021, MARQUES *et al.*, 2022). Sugerindo que o tratamento crônico com salbutamol pode provocar uma perda de função na regulação do gene *SNCA*, tendo em vista que a imunohistoquímica foi avaliada apenas ao final do tratamento, após 75 dias de exposição diária ao salbutamol.

De modo geral, observamos que o tratamento crônico com salbutamol reduz alguns danos motores, associados à bradicinesia, e pode prevenir a redução de TH em áreas dopaminérgicas. Por outro lado, esse tratamento parece não ser eficiente contra algumas alterações motoras, como movimentos involuntários, cognitivas e na expressão de α -sin induzidas por reserpina. Acreditamos que os agonistas β_2 adrenérgicos estejam envolvidos de modo variado em diferentes componentes motores, cognitivos e neuroprotetores a partir da modulação de fatores pró e anti-inflamatórios. Dessa forma, são necessários novos estudos para compreender a atuação agonistas β_2 adrenérgicos e da via noradrenérgica nos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na DP.

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o tratamento prévio e crônico com salbutamol promove uma redução de alguns danos motores e neuroproteção dopaminérgica em áreas da via nigroestriatal, avaliadas no modelo progressivo de parkinsonismo induzido por reserpina. No entanto, são necessário novos estudos para compreender a relação do tratamento com salbutamol e outros agonistas β_2 noradrenérgicos com os mecanismos neuroprotetores associados aos neurônios dopaminérgicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASETH, J., DUSEK, P., ROOS, P.M. Prevention of progression in Parkinson's disease. **Biometals**. v. 31, n. 5, p. 737-47. 2018. doi: 10.1007/s10534-018-0131-5. Epub 2018 Jul 20. PMID: 30030679; PMCID: PMC6133181.
- ABÍLIO, V.C., SILVA, R.H., CARVALHO, R.C., GRASSL, C., CALZAVARA, M.B., REGISTRO, S., *et al.* Important role of striatal catalase in aging- and reserpine-induced oral dyskinesia. **Neuropharmacology**. v. 47, n. 2, p. 263-72. 2004. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.04.003. PMID: 15223305.
- AHMED-FARID, O.A., TAHA M., BAKEER, R.M., RADWAN, O.K., HENDAWY, H.A.M., SOLIMAN, A.S., *et al.* Effects of bee venom and dopamine-loaded nanoparticles on reserpine-induced Parkinson's disease rat model. **Sci Rep**. 2021 Oct 27;11(1):21141. doi: 10.1038/s41598-021-00764-y.
- ALI, K., MORRIS, H.R. Parkinson's disease: chameleons and mimics. **Pract Neurol**. v. 15, n. 1, p. 14-25. 2015. doi: 10.1136/practneurol-2014-000849. Epub 2014 Sep 24. PMID: 25253895.
- ARCHER T, FREDRIKSSON A. Influence of noradrenaline denervation on MPTP-induced deficits in mice. **Journal of Neural Transmission**. 2006 Sep;113(9):1119-1129. DOI: 10.1007/s00702-005-0402-5.
- ARMSTRONG, M.J., OKUN, M.S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA**. v. 323, n. 6, p. 548-60. 2020. doi: 10.1001/jama.2019.22360. PMID: 32044947.
- BADANJAK, K., FIXEMER, S., SMAJIC, S., SKUPIN, A., GRÜNEWALD, A. The Contribution of Microglia to Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci**. 2021 Apr 28;22(9):4676. doi: 10.3390/ijms22094676. PMID: 33925154; PMCID: PMC8125756.
- BALESTRINO, R., SCHAPIRA, A.H.V. Parkinson disease. **Eur J Neurol**. v. 1, p. 27-42. 2020. doi: 10.1111/ene.14108. Epub 2019 Nov 27. PMID: 31631455.
- BILLINGTON, C.K., PENN, R.B., HALL, I.P. β_2 Agonists. **Handb Exp Pharmacol**. v. 237, p. 23-40. 2017. doi: 10.1007/164_2016_64. PMID: 27878470; PMCID: PMC5480238.
- BISPO, J.M.M., MELO, J.E.C., GOIS, A.M., LEAL, P.C., LINS, L.C.R.F., *et al.* Sex differences in the progressive model of parkinsonism induced by reserpine in rats. **Behav Brain Res**. v. 2, n. 363, p. 23-29. 2019 doi: 10.1016/j.bbr.2019.01.041. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30690108.

BISPO, J.M.M., MELO, J.E.C., GOIS, A.M., MEDEIROS, K.A.A.L., SILVA, R.S., LEAL, P.C., *et al.* Testosterone propionate improves motor alterations and dopaminergic damage in the reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease. **Brain Res Bull.** 2022 Sep;187:162-168. doi: 10.1016/j.brainresbull.2022.06.018. Epub 2022 Jun 30. PMID: 35781030.

BLAUWENDRAAT, C., NALLS, M.A., SINGLETON, A.B. The genetic architecture of Parkinson's disease. **Lancet Neurol.** v. 19, n. 2, p. 170-78. 2020. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30287-X. Epub 2019 Sep 11. PMID: 31521533; PMCID: PMC8972299.

BRAAK, H., DEL TREDICI, K. Neuropathological Staging of Brain Pathology in Sporadic Parkinson's disease: Separating the Wheat from the Chaff. **J Parkinsons Dis.** 2017;7(s1):S71-S85. doi: 10.3233/JPD-179001. PMID: 28282810; PMCID: PMC5345633.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging.** v. 24, n. 2, p. 197–211, 2002.

BRUDEK, T. Inflammatory Bowel Diseases and Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis.** 2019; 9(s2): S331-S344. doi: 10.3233/JPD-191729. PMID: 31609699; PMCID: PMC6839501.

BUHMANN, C., KASSUBEK, J., JOST, W.H. Management of Pain in Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis.** v. 10, n. 1, p. 37-48. 2020. doi: 10.3233/JPD-202069. PMID: 32568113; PMCID: PMC7592654.

BUNEEVA, O., MEDVEDEV, A. Atypical Ubiquitination and Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci.** 2022 Mar 28;23(7):3705. doi: 10.3390/ijms23073705. PMID: 35409068; PMCID: PMC8998352

BUTKOVICH, L.M., HOUSER, M.C., TANSEY, M.G. α -Synuclein and Noradrenergic Modulation of Immune Cells in Parkinson's Disease Pathogenesis. **Front Neurosci.** 2018 Sep 11;12:626. doi: 10.3389/fnins.2018.00626. PMID: 30258347; PMCID: PMC6143806.

CAMPÊLO, C.L.C. Efeitos da estimulação ambiental sobre os aspectos motores, cognitivos e neuronais em um modelo farmacológico progressivo da doença de Parkinson. (**Dissertação de mestrado**), Departamento de Fisiologia PPG Psicobiologia, UFRN, 2013.

CANFORA, I., TARANTINO, N., PIERNO, S. Metabolic Pathways and Ion Channels Involved in Skeletal Muscle Atrophy: A Starting Point for Potential Therapeutic Strategies. **Cells.** 2022 Aug 18;11(16):2566. doi: 10.3390/cells11162566. PMID: 36010642; PMCID: PMC9406740.

CARLSSON, A., LINDQVIST, M., MAGNUSSON, T. 3,4- Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. **Nature** 180:1200. 1957. doi: 10.1038/1801200a0

CERSOSIMO, M.G., RAINA, G.B., PELLENE, L.A., MICHELI, F.E., CALANDRA, C.R., MAIOLA, R. Weight loss in parkinson's disease: the relationship with motor symptoms and disease progression. **Biomed res int.** 2018 jul 9;2018:9642524. Doi: 10.1155/2018/9642524. Pmid: 30105269; pmcid: pmc6076942.

CERRI, S., MUS, L., BLANDINI, F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? **J Parkinsons Dis.** v. 9, n. 3, p. 501-15. 2019. doi: 10.3233/JPD-191683. PMID: 31282427; PMCID: PMC6700650.

CHAI, G.S., WANG, Y.Y., YASHENG, A., ZHAO, P. Beta 2-adrenergic receptor activation enhances neurogenesis in Alzheimer's disease mice. **Neural Regen Res.** v. 11, n. 10, p. 1617-1624. 2016. doi: 10.4103/1673-5374.193241. PMID: 27904493; PMCID: PMC5116841.

CHAKRAVARTY, N.K., R.M.N. Rauwolfia serpentina in essential hypertension. **Ind Med Gaz.** v. 86, n. 8, p. 348-54.1951. PMID: 14888291; PMCID: PMC5189354.

CHAUDHURI, K.R., HEALY, D.G., SCHAPIRA, A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. **Lancet Neurol.** v. 5, n. 3, p. 235-45. 2006. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70373-8. PMID: 16488379.

CHEN, C.L., WANG, S.Y., CHEN, T.C., CHUANG, C.S. Association between β 2-Adrenoreceptor Medications and Risk of Parkinson's Disease: A Meta-Analysis. **Medicina (Kaunas).** 2021 Sep 24;57(10):1006. doi: 10.3390/medicina57101006. PMID: 34684044; PMCID: PMC8541298.

CHEN, J. J., MARSH, L. Anxiety in Parkinson's disease: identification and management. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 52–59, 2014.

CHO, S.J., STOUT-DELGADO, H.W. Aging and Lung Disease. **Annu Rev Physiol.** v. 82, p. 433-59. 2020. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034610. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31730381; PMCID: PMC7998901.

COCCURELLO, R. Anhedonia in depression symptomatology: Appetite dysregulation and defective brain reward processing. **Behav Brain Res.** 2019 Oct 17;372:112041. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112041. Epub 2019 Jun 17. PMID: 31220485.

CONTE, C. Possible Link between SARS-CoV-2 Infection and Parkinson's Disease: The Role of Toll-Like Receptor 4. **Int J Mol Sci.** 2021 Jul 1;22(13):7135. doi: 10.3390/ijms22137135. PMID: 34281186; PMCID: PMC8269350.

COSTANTINO, S., PANENI, F., CONSENTINO, F. Ageing, metabolism and cardiovascular disease. **J Physiol.** v. 594, n. 8, p. 2061-73. 2016. doi: 10.1113/JP270538. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26391109; PMCID: PMC4933114.

COURLET, P., BUCLIN, T., BIOLLAZ, J., MAZZONI, I., RABIN, O., GUIDI, M. Model-based meta-analysis of salbutamol pharmacokinetics and practical implications for doping control. **CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.** v. 11, n. 4, p. 469-81. 2022. doi: 10.1002/psp4.12773. Epub 2022 Mar 22. PMID: 35315251; PMCID: PMC9007606.

COVA, I., Di BATTISTA, M.E., VANACORE, N., PAPI, C.P., ALAMPI, G., RUBINO, A., et al. Validation of the Italian version of the Non Motor Symptoms Scale for Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.** v. 34, p. 38-42. 2017. doi: 10.1016/j.parkreldis.2016.10.020. Epub 2016 Oct 24. PMID: 28029554.

CUNHA, A.S., MATHEUS, F.C., MORETTI, M., SAMPAIO, T.B., POLI, A., SANTOS, D.B., et al. Agmatine attenuates reserpine-induced oral dyskinesia in mice: Role of oxidative stress, nitric oxide and glutamate NMDA receptors. **Behav Brain Res.** v. 1, n. 312, p. 64-76. 2016. doi: 10.1016/j.bbr.2016.06.014. Epub 2016 Jun 13. PMID: 27306571.

CUNHA, D.M.G., BECEGATO, M., MEURER, Y.S.R., LIMA, A.C., GONÇALVEZ, N., BIONI, V.S, et al. Neuroinflammation in early, late and recovery stages in a progressive parkinsonism model in rats. **Front Neurosci.** 2022 Aug 26;16:923957. doi: 10.3389/fnins.2022.923957. PMID: 36090265; PMCID: PMC9459164.

DABRAVOLSKI, S.A., NIKIFOROV, N.G., ZHURAVLEV, A.D, OREKHOV, N.A., GRECKO, A.V., OREKHOV, A.N. Role of the mtDNA Mutations and Mitophagy in Inflammaging. **Int J Mol Sci.** v. 23, n. 3, p. 1323. 2022. doi: 10.3390/ijms23031323. PMID: 35163247; PMCID: PMC8836173.

DASHTIPOUR, K., TAFRESHI, A., LEE, J., CRAWLEY, B. Speech disorders in Parkinson's disease: pathophysiology, medical management and surgical approaches. **Neurodegener Dis Manag.** v. 8, n. 5, p. 337-48. 2018. doi: 10.2217/nmt-2018-0021. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30223711.

DE FREITAS, C.M., BUSANELLO, A., SCHAFFER, L.F., PEROZA, L.R., KRUM, B.N., LEAL C.Q., et al. Behavioral and neurochemical effects induced by reserpine in mice. **Psychopharmacology (Berl).** v. 233, n. 3, p. 457-67. 2016. doi: 10.1007/s00213-015-4118-4. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26514557.

DE GERMAY, S., CONTE, C., RASCOL, O., MONTASTRUC., LAPEYRE-MESTRE, M. β -Adrenoceptor Drugs and Parkinson's Disease: A Nationwide Nested Case-Control Study. **CNS Drugs.** v. 34, n. 7, p. 763-72. 2020. doi: 10.1007/s40263-020-00736-2. PMID: 32500347.

DE RUI, M., INELMEN, E.M., TREVISAN, C., PIGOZZO, S., MANZATO, E., SERGI, G. Parkinson's disease and the non-motor symptoms: hyposmia, weight loss, osteosarcopenia. **Aging Clin Exp Res.** v. 32, n. 7, p. 1211- 18. 2020. doi: 10.1007/s40520-020-01470-x. Epub 2020 Jan 27. PMID: 31989535.

DI BIASE, L., DI SANTO, A., CAMINITI, M.L., DE LISO, A., SHAH, S.A., RICCI, L., DI LAAZZARO, V. Gait Analysis in Parkinson's Disease: An Overview of the Most Accurate Markers for Diagnosis and Symptoms Monitoring. **Sensors (Basel)**. v. 20, n. 12, p. 3529. 2020. doi: 10.3390/s20123529. PMID: 32580330; PMCID: PMC7349580.

DU, X.Y., XIE, X.X., LIU, R.T. The Role of α -Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci**. 2020 Nov 17;21(22):8645. doi: 10.3390/ijms21228645. PMID: 33212758; PMCID: PMC7697105.

EADIE, M. William Rutherford Sanders (1828-1881) and his neurologically fertile years (1865-1868). **J Hist Neurosci**. v. 29, n. 4, p. 418-427. 2020. doi: 10.1080/0964704X.2020.1749370. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32329662.

EARLS, R.H., LEE, J.K. The role of natural killer cells in Parkinson's disease. **Exp Mol Med**. v. 52, n. 9, p. 1517-25. 2020. doi: 10.1038/s12276-020-00505-7. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32973221; PMCID: PMC8080760.

ELBAZ, A., CARCAILLON, L., KAB, S., MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **Rev Neurol (Paris)**. v. 172, n. 1, p. 14-26. 2016. doi: 10.1016/j.neurol.2015.09.012. Epub 2015 Dec 21. PMID: 26718594.

EMERY, P.W., ROTHWELL, N.J., STOCK, M.J., WINTER, P.D. Chronic effects of beta 2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. **Biosci Rep**. v. 4, n. 1, p. 83-91. 1984. doi: 10.1007/BF01120827. PMID: 6141823.

ETERAF-OSKOEI, T., AKBARZADEH-ATASHKHOSROW, A., MAGHSUDI, M., NAJAFI, M. Effects of salbutamol on the inflammatory parameters and angiogenesis in the rat air pouch model of inflammation. **Res Pharm Sci**. v. 12, n. 5, p. 364-72. 2017. doi: 10.4103/1735-5362.213981. PMID: 28974974; PMCID: PMC5615866.

FÉNELON, G., WALUSINSKI, O. The landmark contributions of Paul Blocq, Georges Marinesco, and Édouard Brissaud in Parkinson's disease. **Rev Neurol (Paris)**. v. 177, n. 10, p. 1214-20. 2021. doi: 10.1016/j.neurol.2021.02.386. Epub 2021 Jun 27. PMID: 34187692.

FERNANDES, V.S., SANTOS, J.R., LEÃO, A.H., MEDEIROS, A.M., MELO, T.G., IZÍDIO, G.S., *et al*. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a progressive model of Parkinson's disease. **Behav Brain Res**. v. 231, n. 1, p. 154-63. 2012. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.008. Epub 2012 Mar 16. PMID: 22446059.

FREEZE, B.S., KRAVITZ, A.V., HAMMACK, N., BERKE, J.D., KREITZER, A.C. Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. **J Neurosci**. 2013 Nov 20;33(47):18531-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1278-13.2013. PMID: 24259575; PMCID: PMC3834057.

GALVAN, A., WICHMANN, T. Pathophysiology of parkinsonism. **Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, [s. l.], v. 119, n. 7, p. 1459–1474, 2008.

GAO, C., LIU, J., TAN, Y., CHEN, S. Freezing of gait in Parkinson's disease: pathophysiology, risk factors and treatments. **Transl Neurodegener.** 2020 Apr 15; 9:12. doi: 10.1186/s40035-020-00191-5. PMID: 32322387; PMCID: PMC7161193.

GAO, V., SUZUKI, A., MAGISTRETTI, P.J., LENGACHER, S., POLLONI, G., STEINMAN, M.Q., *et al.* Astrocytic β 2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 113, n. 30, p. 8526-31. 2016. doi: 10.1073/pnas.1605063113. Epub 2016 Jul 8. PMID: 27402767; PMCID: PMC4968707.

GELDERS, G., BAEKELANDT, V., VAN DER PERREN, A. Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **J Immunol Res.** 2018 Apr 16;2018:4784268. doi: 10.1155/2018/4784268. PMID: 29850629; PMCID: PMC5926497.

GIZA, E., GOTZAMANI-PSARRAKOU, A., BOSTANTJOPOULOU, S. Imaging beyond the striatonigral dopaminergic system in Parkinson's disease. **Hell J Nucl Med.**, 15 (3): 224-32, 2012.

GOEDERT, M., COMPSTON, A. Parkinson's disease - the story of an eponym. **Nat Rev Neurol.** v. 14, n. 1, p. 57-62. 2018. doi: 10.1038/nrneuro.2017.165. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29217826.

GOIS, Auderlan Mendonça de. **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES NORADRENÉRGICOS SOBRE AS ALTERAÇÕES MOTORAS E NEUROQUÍMICAS EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE PARKINSONISMO.** 116 f. 2020. Tese de doutorado - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2020.

GRIFFIN, É.W., YSSEL, J.D., O'NEILL, E., RYAN, K.J., BOYLE, N., HARPER, P., HARKIN, A., *et al.* The β 2-adrenoceptor agonist clenbuterol reduces the neuroinflammatory response, neutrophil infiltration and apoptosis following intra-striatal IL-1 β administration to rats. **Immunopharmacol Immunotoxicol.** v. 40, n. 2, p. 99-106. 2018. doi: 10.1080/08923973.2017.1418882. Epub 2018 Jan 5. PMID: 29303018.

GRONICH, N., ABERNETHY, D.R., AURIEL, E., LAVI, I., RENNERT, G., SALIBA, W. β 2-adrenoceptor agonists and antagonists and risk of Parkinson's disease. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 33, n. 9, p. 1465–1471, 2018.

GUNDERSEN, V. Parkinson's Disease: Can Targeting Inflammation Be an Effective Neuroprotective Strategy? **Front Neurosci.** 2021 Feb 25;14:580311. doi: 10.3389/fnins.2020.580311. PMID: 33716638; PMCID: PMC7946840.

HEMMINGS, K.M., DANIEL, Z.C., BUTTERY, P.J., PARR, T., BRAMELD, J.M. Differential effects of short-term β agonist and growth hormone treatments on expression of myosin heavy chain IIB and associated metabolic genes in sheep muscle. **Animal**. V. 9, n. 2, p. 285-94. 2015. doi: 10.1017/S175173111400233X. Epub 2014 Sep 12. PMID: 25213627; PMCID: PMC4299534.

HOPFNER, F., HÖGLINGER, G.U., KUHLENBÄUMER, G., POTTEGARD, A., WOD, M., CHRISTENSEN K., *et al.* β -adrenoreceptors and the risk of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**. v. 19, n. 3, p. 247-54. 2020. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30400-4. Epub 2020 Jan 27. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2020 Mar;19(3):e3. Erratum in: *Lancet Neurol*. 2020 Apr;19(4):e4. PMID: 31999942.

HOPFNER, F., WOD, F., HÖGLINGER, G.U., BLAABJERG, M., RÖSLER, T.W., KUHLENBÄUMER, G., *et al.* Use of β 2-adrenoreceptor agonist and antagonist drugs and risk of Parkinson disease. **Neurology**. v. 93, n. 2, p. 135-42. 2019. doi: 10.1212/WNL.00000000000007694. Epub 2019 May 24. PMID: 31127070.

HUR, E.M., LEE, B.D. LRRK2 at the Crossroad of Aging and Parkinson's Disease. **Genes (Basel)**. v. 12, n. 4, p. 505. 2021. Mar 29;12(4):505. doi: 10.3390/genes12040505. PMID: 33805527; PMCID: PMC8066012.

HURWITZ, B. The Status of "Nonmotor" Features of the Malady in an Essay on the Shaking Palsy (1817). **Int Rev Neurobiol**. v. 133, p. 3-12. 2017. doi: 10.1016/bs.irn.2017.04.008. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28802924.

IPPOLITO, M., BENOVIC, J.L. Biased agonism at β -adrenergic receptors. **Cell Signal**. 2021 Apr;80:109905. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109905. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33385503; PMCID: PMC7878421

IRANZO, A. Parkinson disease and sleep: sleep-wake changes in the premotor stage of Parkinson disease; impaired olfaction and other prodromal features. **Curr Neurol Neurosci Rep**. v. 13, n. 9, p. 373. 2013. doi: 10.1007/s11910-013-0373-0. PMID: 23881622.

JANAKIRAMAN, U., MANIVASAGAM, T., JUSTIN, T.A., DHANALAKSHMI, C., ESSA, M.M., SONG, B.J., *et al.* Chronic mild stress augments MPTP induced neurotoxicity in a murine model of Parkinson's disease. **Physiol Behav**. v. 171, p. 132-143. 2017. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.01.046. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28185878.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v. 79, n. 4, p. 368-76. 2008. doi: 10.1136/jnnp.2007.131045. PMID: 18344392.

JANKOVIC, J., TAN, E.K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. v. 91, n. 8, p. 795-808. 2020. doi: 10.1136/jnnp-2019-322338. Epub 2020 Jun 23. PMID: 32576618.

JIA, F., FELLNER, A., KUMAR, K.R. Monogenic Parkinson's Disease: Genotype, Phenotype, Pathophysiology, and Genetic Testing. **Genes (Basel)**. 2022 Mar 7;13(3):471. doi: 10.3390/genes13030471. PMID: 35328025; PMCID: PMC8950888.

JOE, E.H., CHOI, D.J., AN, J., EUN, J.H., JOU, I., PARK, S. Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. **Exp Neurobiol**. v. 27, n. 2, p. 77-87. 2018. doi: 10.5607/en.2018.27.2.77. Epub 2018 Apr 24. PMID: 29731673; PMCID: PMC5934545.

JOST, W.H., REICHMANN, H. "An essay on the shaking palsy" 200 years old. **J Neural Transm (Vienna)**. v. 124, n. 8, p. 899-900. 2017 Aug;124(8):899-900. doi: 10.1007/s00702-017-1684-0. PMID: 28155132.

KIM, R., KIM, H.J., KIM, A., JANG, M., KIM, A., KIM, Y., *et al*. Peripheral blood inflammatory markers in early Parkinson's disease. **J Clin Neurosci**. 2018 Dec;58:30-33. doi: 10.1016/j.jocn.2018.10.079. Epub 2018 Oct 24. PMID: 30454693.

KONDO, T. Dopamine dysregulation syndrome. Hypothetical application of reward system stimulation for the treatment of anhedonia in Parkinson's disease patients. **J Neurol**. v. 4, p. 14-18. 2008. doi: 10.1007/s00415-008-4003-8. PMID: 18821081.

KRAVITZ, A.V., FREEZE, B.S., PARKER, P.R., KAY, K., THWIN, M.T., DEISSEROTH, K., KREITZER, A.C. Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. **Nature**. v. 466, n. 7306, p. 622-6. 2010. doi: 10.1038/nature09159. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20613723; PMCID: PMC3552484.

KREINER, G., RAFA-ZABŁOCKA, K., BARUT, J., CHMIELARZ, P., KOT, M., BAGIŃSKA, M., *et al*. Stimulation of noradrenergic transmission by reboxetine is beneficial for a mouse model of progressive parkinsonism. **Scientific Reports**, v. 9, n. 5262, 2019.

KREITZER, A.C., MALENKA, R.C. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. **Neuron**. v. 60, n. 4, p. 543-54. 2008. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005. PMID: 19038213; PMCID: PMC2724179.

KULESSKAYA, N., VOIKAR, V. Assessment of mouse anxiety-like behavior in the light-dark box and open-field arena: role of equipment and procedure. **Physiol Behav**. v. 22, n. 133, p. 30-38. 2014. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.05.006. Epub 2014 May 14. PMID: 24832050.

KUNIISHI, H., ICHISAKA, S., YAMAMOTO, M, IKUBO, N., MATSUDA, S., FUTORA, E., *et al*. Early deprivation increases high-leaning behavior, a novel anxiety-like behavior, in

the open field test in rats. **Neurosci Res.** v. 123, p.27-35. 2017. doi: 10.1016/j.neures.2017.04.012. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28450152.

KÜNIG G., LEENDERS, K.L., MARTIN-SÖLCH, C., MISSIMER, J., MAGYAR, S., SCHULTZ, W. Reduced reward processing in the brains of Parkinsonian patients. **Neuroreport.** v. 11, n. 17, p. 3681-7. 2000. doi: 10.1097/00001756-200011270-00019. PMID: 11117472.

LANE, E.L. L-DOPA for Parkinson's disease-a bittersweet pill. **Eur J Neurosci.** v. 49, n.3, p.384-98. 2019. doi: 10.1111/ejn.14119. Epub 2018 Sep 16. PMID: 30118169.

LANGSTON, J. W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 591–596, 2006.

LEAL, P.C., BISPO, J.M.M., ENGELBERTH, R.C.G.J., DE A SILVA, K.D., MEURER, Y.R., RIBEIRO, A.M., *et al.* Serotonergic dysfunction in a model of parkinsonism induced by reserpine. **J Chem Neuroanat.** v. 96, p. 73-78. 2019a. doi: 10.1016/j.jchemneu.2018.12.011. Epub 2018 Dec 28. PMID: 30597197.

LEAL, P.C., BISPO, J.M.M., LINS, L.C.R.F., SOUZA, M.F., GOIS, A.M., MOORE, C., *et al.* Cognitive and anxiety-like impairments accompanied by serotonergic ultrastructural and immunohistochemical alterations in early stages of parkinsonism. **Brain Res Bull.** 2019b Mar;146:213-223. doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.01.009. Epub 2019b Jan 11. PMID: 30641120.

LEAL, P.C., GOIS, A.M., MARCHIORO, M., SANTOS, J.R. Commentary: Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 1–4. 2016. doi: 10.3389/fnins.2016.00283. PMID: 27444376; PMCID: PMC4914559.

LEÃO, A. H., MEURER, Y.S., da SILVA, A.F., MEDEIROS, A.M., CAMPÊLO, C.L., ABÍLIO, V.C., *et al.* Spontaneously hypertensive rats (SHR) are resistant to a reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease: Differences in motor behavior, tyrosine hydroxylase and α -synuclein expression. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, p. 1–13, 2017.

LEÃO, A.H., SARMENTO-SILVA, A.J., SANTOS, J.R., RIBEIRO, A.M., SILVA, R.H. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain Pathol.** v. 25, n. 4, p. 377-90. 2015. doi: 10.1111/bpa.12253. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25726735; PMCID: PMC8029054.

LEES, A. An essay on the shaking palsy. **Brain.** v. 140, n. 3, p. 843-48. 2017. doi: 10.1093/brain/awx035. PMID: 28364557.

LEGARDA, S.B., MICHAS-MARTIN, P.A., MCDERMOTT, D. Managing Intractable Symptoms of Parkinson's Disease: A Nonsurgical Approach Employing Infralow Frequency

Neuromodulation. **Front Hum Neurosci.** 2022 Jul 8;16:894781. doi: 10.3389/fnhum.2022.894781. PMID: 35880105; PMCID: PMC9308006.

LEWIS, P.A., PLUN-FAVREAU, H., ROWLEY, M., SPILLANE, J. Pierre D. and the first photographs of Parkinson's disease. **Mov Disord.** v. 35, n. 3, p. 389-91. 2020. doi: 10.1002/mds.27965. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31975439; PMCID: PMC7155099.

LI, X.J., LI, S. Proteasomal dysfunction in aging and Huntington disease. **Neurobiol Dis.** v. 43, n. 1, p. 4-8. 2011. doi: 10.1016/j.nbd.2010.11.018. Epub 2010 Dec 8. PMID: 21145396; PMCID: PMC3090713.

LI, X., DONG, C., HOFFMANN, M., GAREN, C.R., CORTEZ, L.M., PETERSEN, N.O., *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., YIN, Q., WANG, B., SHEN, T., LUO, W., LIU, T. Preclinical reserpine models recapitulating motor and non-motor features of parkinson's disease: roles of epigenetic upregulation of alpha-synuclein and autophagy impairment. **Front pharmacol.** 2022 oct 12;13:944376. Doi: 10.3389/fphar.2022.944376. Pmid: 36313295; pmcid: pmc9597253.

LIMA, A.C., MEURER, Y.S.R., BIONI, V.S., CUNHA, D.M.G., GONÇALVES, N., LOPES-SILVA, L.B., *et al.* Female Rats Are Resistant to Cognitive, Motor and Dopaminergic Deficits in the Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease. **Front Aging Neurosci.** 2021 Oct 25;13:757714. doi: 10.3389/fnagi.2021.757714. PMID: 34759815; PMCID: PMC8573221.

LIN, C.H., CHEN, C.C., CHIANG, H.L., LIOU, J.M., CHANG, C.M., LU, T.P., *et al.* Altered gut microbiota and inflammatory cytokine responses in patients with Parkinson's disease. **J Neuroinflammation.** 2019 Jun 27;16(1):129. doi: 10.1186/s12974-019-1528-y. PMID: 31248424; PMCID: PMC6598278.

LIN, C.H., LAI, H.C., WU, M.S. Gut-oriented disease modifying therapy for Parkinson's disease. **J Formos Med Assoc.** 2022 Sep 28:S0929-6646(22)00360-6. doi: 10.1016/j.jfma.2022.09.010. Epub ahead of print. PMID: 36182642.

LINS, L.C.R.F., SOUZA, M.F., BISPO, J.M.M., GOIS, A.M., MELO, T.C.S., ANDRADE, R.A.S., *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., ARCENEUX, K.P., CHU, J.T., JACOB, G.JR., SCHREIBER, A.L., TIPTON, R.C., *et al.* The effect of caffeine and albuterol on body composition and metabolic rate. **Obesity.** v. 23, n. 9, p. 1830–1835. 2015. doi: 10.1002/oby.21163. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26239482; PMCID: PMC4551658.

LIU, Z., CHEUNG, H.H. Stem Cell-Based Therapies for Parkinson Disease. **Int J Mol Sci.** 2020 Oct 29;21(21):8060. doi: 10.3390/ijms21218060. PMID: 33137927; PMCID: PMC7663462.

LOBAY, D. Rauwolfia in the Treatment of Hypertension. **Integr Med (Encinitas).**v. 14, n. 3, p. 40-6. 2015. PMID: 26770146; PMCID: PMC4566472.

LOREFÄLT, B., TOSS, G., GRANÉRUS, A.K. Weight loss, body fat mass, and leptin in Parkinson's disease. **Mov Disord.** v. 24, n. 6, p. 885-90. doi: 10.1002/mds.22466. PMID: 19199361.

MA, K., XIONG, N., SHEN, Y., HAN, C., LIU, L., ZHANG, G., *et al.* Weight Loss and Malnutrition in Patients with Parkinson's Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Front Aging Neurosci.* 2018 Jan 19;10:1. doi: 10.3389/fnagi.2018.00001. PMID: 29403371; PMCID: PMC5780404.

MAGISTRELLI, L., COMI, C. Beta2-Adrenoceptor Agonists in Parkinson's Disease and Other Synucleinopathies. **J Neuroimmune Pharmacol.** v. 15, n. 1, p. 74-81. 2020. doi: 10.1007/s11481-018-09831-0. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30617750.

MALPARTIDA, A.B., WILLIAMSON, M., NARENDRA, D.P., WADE-MARTINS, R., RYAN, B.J. Mitochondrial Dysfunction and Mitophagy in Parkinson's Disease: From Mechanism to Therapy. **Trends Biochem Sci.** v. 46, n. 4, p. 329-43. 2021. doi: 10.1016/j.tibs.2020.11.007. Epub 2020 Dec 13. PMID: 33323315.

MATTAM, U., TALARI, N.K., PARIPATI, AA.K., KRISHNAMOORTHY, T., SEPURI, N.B.V. Kisspeptin Preserves Mitochondrial Function by Inducing Mitophagy and Autophagy in Aging Rat Brain Hippocampus and Human Neuronal Cell Line. **Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Mol. Cell Res.** 1868(1):118852. doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118852. Epub 2020 Sep 11. PMID: 32926943.

MATSUDA, W., FURUTA, T., NAKAMURA, K. C., HIOKI, H., FUJIYAMA, F., ARAI, R., *et al.* Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 444-453. 2009. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4029-08.2009>

MARQUES, L., VALE, N. Salbutamol in the Management of Asthma: A Review. **Int J Mol Sci.** 2022 Nov 17;23(22):14207. doi: 10.3390/ijms232214207. PMID: 36430683; PMCID: PMC9696300.

MARQUES, P.T., GERMINIANI, F.M.B., CAMARGO, C.H.F., MUNHOZ, R.P., TEIVE, H.A.G. Édouard Brissaud: distinguished neurologist and Charcot's pupil. **Arq Neuropsiquiatr.** v. 76, n. 7, p. 490-93. 2018. doi: 10.1590/0004-282X20180063. PMID: 30066801.

MELO, J.E.C., SANTOS, T.F.O., SANTOS, R.S., FRANCO, H.S., MONTEIRO, M.C.N., BISPO, J.M.M., *et al.* Aging accentuates decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity associated with the increase in the motor impairment in a model of reserpine-induced parkinsonism. **J Chem Neuroanat.** 2022 Nov; 125:102162. doi: 10.1016/j.jchemneu.2022.102162. Epub 2022 Sep 14. PMID: 36115503.

MITTAL, S., BJØRNEVIK, K., IM, D.S., FLIERL, A., DONG, X., LOCASCIO, J.J., *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.

MIRELMAN, A., BONATO, P., CAMICIOLI, R., ELLIS, T.D., GILADI, N., HAMILTON, J.L., *et al.* Gait impairments in Parkinson's disease. **Lancet Neurol.** v. 18, n. 7, p. 697-708. 2019. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30044-4. Epub 2019 Apr 8. PMID: 30975519.

MOR, D.E., TSIKA, E., MAZZULI, J.R., GOULD, N.S., KIM, H., DANIELS, M.J., *et al.* Dopamine induces soluble α -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. **Nat Neurosci.** v. 20, n. 11, p. 1560-68. 2017. doi: 10.1038/nn.4641. Epub 2017 Sep 18. PMID: 28920936; PMCID: PMC5893155.

MUÑOZ-VIGUERAS, N., PRADOS-ROMÁN, E., VALENZA, M.C., GRANADOS-SANTIAGO, M., CABRERA-MARTOS, I., RODRÍGUEZ-TORRES, J., *et al.* Speech and language therapy treatment on hypokinetic dysarthria in Parkinson disease: Systematic review and meta-analysis. **Clin Rehabil.** v. 35, n. 5, p. 639-55. 2021. doi: 10.1177/0269215520976267. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33233932.

MURILLO-RODRIGUEZ, E., ARIAS-CARRION, O., ZAVALA-GARCIA, A., SARRO-RAMIREZ, A., HUITRON-RESENDIZ, S., ARANKOWSKY-SANDOVAL, G. Basic sleep mechanisms: an integrative review. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem.** v. 12, n. 1, p. 38-54. 2012. doi: 10.2174/187152412800229107. PMID: 22524274.

NGUYEN, P.V., CONNOR, S.A. guyen PV, Connor SA. Noradrenergic Regulation of Hippocampus-Dependent Memory. **Cent Nerv Syst Agents Med Chem.** v. 19, n. 3, p. 187-96. 2019. doi: 10.2174/1871524919666190719163632. PMID: 31749419.

NONNEKES, J., GILADI, N., GUHA, A., FIETZEK, U.M., BLOEM, B.R., *et al.* Gait festination in parkinsonism: introduction of two phenotypes. **J Neurol.** v. 266, n. 2, p. 426-30. 2019. doi: 10.1007/s00415-018-9146-7. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30536108; PMCID: PMC6373367.

OBESO, J.A., RODRÍGUEZ-OROZ, M.C., BENITEZ-TEMINO, B., BLESÁ, F.J., GURIDI, J., MARIN, C., *et al.* Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Mov Disord.** 2008, a. 23 Suppl 3:S548-59. doi: 10.1002/mds.22062. PMID: 18781672.

OBESO, J.A., STAMELOU, M., GOETZ, C.G., POEWE, W., LANG, A.E., WEINTRAUB, D., *et al.* Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Mov Disord.** v. 32, n. 9, p. 1264-1310. 2017. doi: 10.1002/mds.27115. PMID: 28887905; PMCID: PMC5685546.

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, 2018.

O'NEILL, E., YSSEL, J.D., MCNAMARA, C., HARKIN, A. Pharmacological targeting of 2-adrenoceptors is neuroprotective in the LPS inflammatory rat model of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 2, 2019. doi: 10.1111/bph.14862.

OPARA, J., MALECKI, A., MALECKA, A., SOCHA, T. Motor assessment in Parkinson's disease. **Ann Agric Environ Med.** v. 24, n. 3, p. 411-15. 2017. doi: 10.5604/12321966.1232774. Epub 2017 May 11. PMID: 28954481.

PARENT, M., PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. **Can J Neurol Sci.** v. 37, n. 3, p. 313-19. 2010. doi: 10.1017/s0317167100010209. PMID: 20481265.

PARK, G.G., PARK, J.H., CHUNG, K.C. Precise control of mitophagy through ubiquitin proteasome system and deubiquitin proteases and their dysfunction in Parkinson's disease. **BMB Rep.** v. 51, n. 12, p. 592-600. 2021. doi: 10.5483/BMBRep.2021.54.12.107. PMID: 34674795; PMCID: PMC8728543.

PARKINSON, J. An essay on the shaking palsy. 1817. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci.** v. 14, n. 2, p. 223-36. 2002. doi: 10.1176/jnp.14.2.223. PMID: 11983801.

PATEL, M., THOMSON, N.C. (R)-salbutamol in the treatment of asthma and chronic obstructive airways disease. **Expert Opin Pharmacother.** v. 12, n. 7, p. 1133-41. 2011. doi: 10.1517/14656566.2011.571210. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21453221.

PATIL, R.A., HIRAY, Y.A., KASTURE, S.B. Reversal of reserpine-induced orofacial dyskinesia and catalepsy by *Nardostachys jatamansi*. **Indian J Pharmacol.** v. 44, n. 3, p. 340-4. 2012. doi: 10.4103/0253-7613.96307. PMID: 22701243; PMCID: PMC3371456.

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

PEIXOTO, M.F., ARAUJO, N.P., SILVA, R.H., CASTRO, J.P., FUKUSHIRO, D.F., FARIA, R.R., *et al.* Effects of gabaergic drugs on reserpine-induced oral dyskinesia. **Behav Brain Res.** v. 160, n. 1, p. 51-9. doi: 10.1016/j.bbr.2004.11.014. Epub 2004 Dec 29. PMID: 15836900.

PELLEGRINI, C., ANTONIOLI, L., COLUCCI, R., BALLABENI, V., BAROCELLI, E., BERNARDINI, N., *et al.* Gastric motor dysfunctions in Parkinson's disease: Current pre-clinical evidence. **Parkinsonism & Related Disorders**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1407–1414, 2015.

PEREIRA A.G., POLI, A., MATHEUS, F.C., DE BORTOLI, S.L., FADANNI, G.P., IZÍDIO, G.S., *et al.* Temporal development of neurochemical and cognitive impairments following reserpine administration in rats. **Behav Brain Res.** 2020 Apr 6;383:112517. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112517. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32006562.

PERES, F.F., SUIAMA, M.A., DIANA, M.C., GOUVÊA, D.A., ALMEIDA, V., SANTOS, C.M., *et al.* Cannabidiol Prevents Motor and Cognitive Impairments Induced by Reserpine in Rats. **Front Pharmacol.** 2016 Sep 28;7:343. doi: 10.3389/fphar.2016.00343. PMID: 27733830; PMCID: PMC5040118.

PERUMAL, S.V., SANKAR, R. Gait and tremor assessment for patients with Parkinson's disease using wearable sensors. **ICT Express**, [s. l.], v. 2, 2016.

PFEIFFER, R.F. Non-motor Features of PD. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(SUPPL. 1), 3. (2013). Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed14&NEWS=N&AN=71248322>

PICCA, A., GUERRA, F., CALVANI, R., ROMANO, R., COELHO-JÚNIOR, H.J., BUCCI, C., *et al.* Mitochondrial Dysfunction, Protein Misfolding and Neuroinflammation in Parkinson's Disease: Roads to Biomarker Discovery. **Biomolecules.** 2021 Oct 13;11(10):1508. doi: 10.3390/biom11101508. PMID: 34680141; PMCID: PMC8534011.

PICCIRILLO, S., MAGI, S., PREZIUSO, A., SERFILIPPI, T., CERQUENI, G., ORCIANI, M., *et al.* The Hidden Notes of Redox Balance in Neurodegenerative Diseases. **Antioxidants (Basel).** 2022 Jul 26;11(8):1456. doi: 10.3390/antiox11081456. PMID: 35892658; PMCID: PMC9331713.

POEWE, W., SEPPI, K., TANNER, C.M., HALLIDAY, G., BRUNDIN, P., VOLKMANN, J., *et al.* Parkinson disease. **Nat Rev Dis Primers.** 2017 Mar 23;3:17013. doi: 10.1038/nrdp.2017.13. PMID: 28332488.

POPPEK, D., GRUNE, T. Proteasomal defense of oxidative protein modifications. **Antioxid Redox Signal.** v. 8, n. 1-2, p. 173-84. 2006. doi: 10.1089/ars.2006.8.173. PMID: 16487051.

RAHIMPOUR, S., GAZTANAGA, W., YADAV, A.P., CHANG, S.J., KRUCOFF, M.O., CAJIGAS, I., *et al.* Freezing of Gait in Parkinson's Disease: Invasive and Noninvasive Neuromodulation. **Neuromodulation.** v. 24, n. 5, p. 829-42. 2021. doi: 10.1111/ner.13347. Epub 2020 Dec 26. PMID: 33368872; PMCID: PMC8233405.

RASHEED, M., LIANG, J., WANG, C., DENG, Y., CHEN, Z. Epigenetic Regulation of Neuroinflammation in Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci.** 2021 May 7;22(9):4956. doi: 10.3390/ijms22094956. PMID: 34066949; PMCID: PMC8125491.

REEVE, A., SIMCOX, E., TURNBULL, D. Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? **Ageing Res Rev.** v. 14, n. 100, p. 19-30. 2014. doi: 10.1016/j.arr.2014.01.004. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24503004; PMCID: PMC3989046.

REICH, S.G., SAVITTI, J.M. Parkinson's Disease. **Med Clin North Am.** v. 103, n.2, p. 337-50. 2019. doi: 10.1016/j.mcna.2018.10.014. Epub 2018 Dec 3. P

RITCHIE, A.I., SINGANAYAGAM, A., WIATER, E., EDWARDS, M.R., MONTMINY, M., JOHNSTON, S.L. β_2 -Agonists Enhance Asthma-Relevant Inflammatory Mediators in Human Airway Epithelial Cells. **Am J Respir Cell Mol Biol.** v. 58, n. 1, p. 128-132. 2018. doi: 10.1165/rcmb.2017-0315LE. PMID: 29286858.

ROCHA, E.M., DE MIRANDA, B., SANDERS, L.H. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.** 2018 Jan;109(Pt B):249-257. doi: 10.1016/j.nbd.2017.04.004. Epub 2017 Apr 8. PMID: 28400134.

RODRÍGUEZ-VIOLANTE, M., ZERÓN-MARTÍNEZ, R., CERVANTES-ARRIAGA, A., CORONA, T. Who Can Diagnose Parkinson's Disease First? Role of Pre-motor Symptoms. **Arch Med Res.** v. 48, n. 3, p. 221-27. 2017. doi: 10.1016/j.arcmed.2017.08.005. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28882322.

ROSETHORNE, E.M., BRADLEY, M.E., KENT, T.C., CHARLTON, S.J. Functional desensitization of the β_2 adrenoceptor is not dependent on agonist efficacy. **Pharmacol Res Perspect.** 2015 Feb;3(1):e00101. doi: 10.1002/prp2.101. Epub 2015 Jan 5. PMID: 25692019; PMCID: PMC4317232.

RYAN, K.J., GRIFFIN, É., YSSEL, J.D., RYAN, K.M., MCNAMEE, E.N., HARKIN, A., *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. DOI: 10.1016/j.neuint.2013.07.006

SAENGPATRACHAI, W., PRADITUKRIT, K., OWATTANAPANICH, W., PITAKPATAPEE, Y., SRIVANITCHAPOOM, P. The association between developing Parkinson's disease and β -Adrenoceptor acting agents use: A systematic review and meta-analysis. **J Neurol Sci.** 2021 Nov 15;430:120009. doi: 10.1016/j.jns.2021.120009. Epub 2021 Sep 27. PMID: 34598055.

SALAMONE, J., BASKIN, P. Vacuous jaw movements induced by acute reserpine and low-dose apomorphine: possible model of parkinsonian tremor. **Pharmacol Biochem Behav.** 1996 Jan;53(1):179-83. doi: 10.1016/0091-3057(95)00164-6. PMID: 8848448.

SANTOS, J.R., CUNHA, J.A., DIERSCHNABEL, A.L., CAMPÊLO, C.L., LEÃO, A.H., SILVA, A.F., *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.

SCHAPIRA, A.H.V, CHAUDHURI, K.R, JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nat Rev Neurosci**. v. 18, n.7, p. 435-50. 2017. doi: 10.1038/nrn.2017.62. Epub 2017 Jun 8. Erratum in: Nat Rev Neurosci. 2017 Aug;18(8):509. PMID: 28592904.

SCHICKNICK, K., HENSCHKE, J.U., BUDINGER, E., OHL, F.W., GUNDELFINGER, E.D., TISCHMEYER, W. β -adrenergic modulation of discrimination learning and memory in the auditory cortex. **Eur J Neurosci**. v. 50, n. 7, p. 3141-63. 2019. doi: 10.1111/ejn.14480. Epub 2019 Jul 1. PMID: 31162753; PMCID: PMC6900137.

SCHOLPA, N.E., SIMMONS, E.C., TILLEY, D.G., SCHNELLMANN, R.G. β_2 -adrenergic receptor-mediated mitochondrial biogenesis improves skeletal muscle recovery following spinal cord injury. **Exp Neurol**. 2019 Dec;322:113064. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113064. Epub 2019 Sep 13. PMID: 31525347; PMCID: PMC7751764.

SCHWARZ, L.A., LUO, L. Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. **Curr Biol**. 2015 Nov 2;25(21):R1051-R1056. doi: 10.1016/j.cub.2015.09.039. PMID: 26528750.

SEARLES NIELSEN, S., GROSS, A., CAMACHO-SOTO, A., WILLIS, A.W., RACETTE, B.A. β_2 -adrenoreceptor medications and risk of Parkinson disease. **Annals of Neurology**, v. 84, n. 5, p. 683–693, 2018.

SHANNON, K.M., KESHAVARZIAN, A., DODIYA, H.B., JAKATE, S., KORDOWER, J.H. Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's disease? Evidence from 3 cases. **Mov Disord**. v. 27, n. 6, p. 716-19. 2012. doi: 10.1002/mds.25020. Epub 2012 May 1. PMID: 22550057.

SHAMON SD, PEREZ MI. Blood pressure-lowering efficacy of reserpine for primary hypertension. **Cochrane Database Syst Rev**. 2016 Dec 21;12(12):CD007655. doi: 10.1002/14651858.CD007655.pub3. PMID: 27997978; PMCID: PMC6464022.

SIDDIQUI M, BHATT H, JUDD EK, OPARIL S, CALHOUN DA. Reserpine Substantially Lowers Blood Pressure in Patients With Refractory Hypertension: A Proof-of-Concept Study. **Am J Hypertens**. v. 33, n. 8, p. 741-47. 2020. doi: 10.1093/ajh/hpaa042. PMID: 32179903; PMCID: PMC7402229.

SILVA, R.H., ABÍLIO, V.C., TORRES-LEITE, D., BERGAMO, M., CHINEN, C.C., CLARO, F.T., *et al.* Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. **Behav Brain Res**. v. 132, n. 2, p. 171-7. 2002. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00409-0. PMID: 11997147.

SINGARAM, C., ASHRAF, W., GAUMNITZ, E.A., TORBEY, C., SENGUPTA, A., PFEIFFER, R., *et al.* Dopaminergic defect of enteric nervous system in Parkinson's disease patients with chronic constipation. **Lancet**. v. 346, p. 861-4. 1995. doi: 10.1016/s0140-6736(95)92707-7. PMID: 7564669.

SINGH, B., COVELO, A., MARTELL-MARTÍNEZ, H., NANCLARES, C., SHERMAN, M.A., OKEMATTI, E., *et al.* Tau is required for progressive synaptic and memory deficits in a transgenic mouse model of α -synucleinopathy. **Acta Neuropathol**. v. 138, n. 4, p. 551-574. 2019. doi: 10.1007/s00401-019-02032-w. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31168644; PMCID: PMC6778173.

SOTTAS, C.E., ANDERSON, B.J., HOLFORD, N.H. Salbutamol has rapid onset pharmacodynamics as a bronchodilator. **Acta Anaesthesiol Scand**. v. 60, n. 9, p. 1328-31. 2016. doi: 10.1111/aas.12769. Epub 2016 Jul 21. PMID: 27439596.

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.

STARKEY, E.S., MULLA, H., SAMMONS, H.M., PANDYA, H.C. Intravenous salbutamol for childhood asthma: evidence-based medicine? **Arch Dis Child**. v. 99, n. 9, p. 873-77. 2014. doi: 10.1136/archdischild-2013-304467. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24938536.

SUBRAMANIAM, S.R., CHESSELET, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**. 2013 Jul-Aug;106-107:17-32. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.004. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23643800; PMCID: PMC3742021.

SURMEIER, D.J. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. **FEBS J**. v. 285, n. 19, p. 3657-668. 2018. doi: 10.1111/febs.14607. Epub 2018 Aug 14. PMID: 30028088; PMCID: PMC6546423.

SURMEIER, D.J., OBESO, J.A., HALLIDAY, G.M. Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. **Nat Rev Neurosci**. v. 18, n. 2, p. 101-113. 2017 Jan 20. doi: 10.1038/nrn.2016.178. PMID: 28104909; PMCID: PMC5564322.

TAGUCHI, T., IKUNO, M., YAMAKADO, H., TAKAHASHI, R. Animal Model for Prodromal Parkinson's Disease. **Int J Mol Sci**. v. 21, n. 6, p. 1961. 2020. doi: 10.3390/ijms21061961. PMID: 32183024; PMCID: PMC7139491.

TANAKA, K.F., KASHIMA, H., SUZUKI, H., ONO, K., SAWADA, M. Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. **J Neurosci Res**, v.70, n.2, p. 232-7, 2002. doi: 10.1002/jnr.10399. PMID: 12271472.

TIWARI, S., SINGH, S. Reciprocal Upshot of Nitric Oxide, Endoplasmic Reticulum Stress, and Ubiquitin Proteasome System in Parkinson's Disease Pathology. **Neuroscientist**. v. 27, n. 4, p. 340-54. 2021. doi: 10.1177/1073858420942211. Epub 2020 Jul 25. PMID: 32713286.

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**. 2019 Dec;18(6):e13031. doi: 10.1111/ace1.13031. Epub 2019 Aug 20. PMID: 31432604; PMCID: PMC6826160.

TROEUNG, L., EGAN, S. J., GASSON, N. A Meta-Analysis of Randomised PlaceboControlled Treatment Trials for Depression and Anxiety in Parkinson's Disease. **PLoS ONE**, v.8, n. 11, e79510, 2013.

TSAKIRI, E.N., TROUGAKOS, I.P. The amazing ubiquitin-proteasome system: structural components and implication in aging. **Int Rev Cell Mol Biol**. 2015; 314:171-237. doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.09.002. Epub 2014 Nov 18. PMID: 25619718.

TYSNES, O.B., STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**. v. 124, n.8, p. 901-05. 2017. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28150045.

VALIZADEGAN, F., ORYAN, S., NASEHI, M., ZARRINDAST, M.R. Interaction between morphine and noradrenergic system of basolateral amygdala on anxiety and memory in the elevated plus-maze test based on a test-retest paradigm. **Arch Iran Med**. v. 16, n. 5, p. 281-7. 2013. PMID: 23641742.

VAN ONSELEN, R., DOWNING T.G. Neonatal Reserpine Administration Produces Widespread Neuronal Losses and α -Synuclein Inclusions in a Rat Model. **Neurotox Res**. v. 39, n. 6, p. 1762-70. 2021. doi: 10.1007/s12640-021-00434-x. Epub 2021 Nov 2. PMID: 34727322.

VITALE, F., CAPOZZO, A., MAZZONE, P., SCARNATI, E. Neurophysiology of the pedunculopontine tegmental nucleus. **Neurobiol Dis**. v. 128, p. 19-30. doi: 10.1016/j.nbd.2018.03.004. Epub 2018 Mar 7. PMID: 29524600.

UC, E.Y., LAMBERT, C.P, HARIK, S.I., RODNITZKY, R.L., EVANS, W.J. Albuterol improves response to levodopa and increases skeletal muscle mass in patients with fluctuating Parkinson disease. **Clin Neuropharmacol**. v. 26, n. 4, p. 207-12. 2003. doi: 10.1097/00002826-200307000-00011. PMID: 12897642.

UL HAQ, R., ANDERSON, M., LIOTTA, A., SHAFIQ, M., SHERKHELI, M.A., HEINEMANN, U. Pretreatment with β -adrenergic receptor agonists facilitates induction of LTP and sharp wave ripple complexes in rodent hippocampus. **Hippocampus**. v. 26, n. 12, p. 1486-92. 2016. doi: 10.1002/hipo.22665. Epub 2016 Oct 18. PMID: 27699900.

UZKESER, H., CADIRCI, E., HALICI, Z., ODABASOGLU, F., POLAT, B., YUKSEL, T.N., *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.

XU, Y.X., WANG, C., LI, X.D., GUO, W.L., LIU, G.Y., ZHANG, H.B., *et al.* Activation of cholinergic basal forebrain neurons improved cognitive functions in adult-onset hypothyroid mice. **Biomed Pharmacother.** 2022 Sep;153:113495. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113495. Epub 2022 Jul 30. PMID: 36076509.

WATANABE, Y., TAGUCHI, K., TANAKA, M. Ubiquitin, Autophagy and Neurodegenerative Diseases. **Cells.** 2020 Sep 2;9(9):2022. doi: 10.3390/cells9092022. PMID: 32887381; PMCID: PMC7563958.

WEIL-MALHERBE, H., BONE, A.D. Effect of reserpine on the intracellular distribution of catecholamines in the brain stem of the rabbit. **Nature.** v. 181, n. 4621, p. 1474-5. 1958. doi: 10.1038/1811474a0. PMID: 13552704.

WINN, P. How best to consider the structure and function of the pedunculopontine tegmental nucleus: evidence from animal studies. **J Neurol Sci.** v. 248, n. 1-2, p. 234-50. 2006. doi: 10.1016/j.jns.2006.05.036. Epub 2006 Jun 9. PMID: 16765383.

WOOD, H. Parkinson disease: Proteomic tools identify dementia biomarkers in PD. **Nat Rev Neurol**, v.8, n. 4, p. 180, 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, 2018.

YONG, V.W., TAN, Y.J., NG, Y.D., CHOO, X.Y., SUGUMARAN, K., CHINNA, K., *et al.* Progressive and accelerated weight and body fat loss in Parkinson's disease: A three-year prospective longitudinal study. **Parkinsonism Relat Disord.** v. 77, p. 28-35. 2020. doi: 10.1016/j.parkreldis.2020.06.015. Epub 2020 Jun 20. PMID: 32615497.

ZARRINDAST, M.R., MASHAYEKHI, M., REZAYOF, A., AHMADI, S. β -Adrenoceptors in the dorsal hippocampus are involved in ethanol-induced state-dependent retrieval in mice. **Neurobiol Learn Mem.** v. 100, p. 12-17. 2013. doi: 10.1016/j.nlm.2012.11.004. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23219971.

ZINGG, B., DONG, H.W., TAO, H.W., ZHANG, L.I. Input-output organization of the mouse claustrum. **J Comp Neurol.** v. 526, n. 15, p. 2428-2443. 2018 Oct 15. doi: 10.1002/cne.24502. Epub 2018 Sep 25. PMID: 30252130; PMCID: PMC6196111.

ZHENG, B., YADAV, K. Acute salbutamol toxicity in the emergency department: A case report. **World J Emerg Med.** v. 12, n. 1, p. 73-75. 2021. doi: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2021.01.012. PMID: 33505554; PMCID: PMC7790705.

ANEXO - Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito da Modulação Farmacológica dos Receptores Noradrenérgicos-Beta2 sobre as Alterações Comportamentais e Neuroquímicas de um Modelo Experimental de Parkinsonismo.**" registrada no sistema CEUA com o nº **4200070621**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Ronaldo Dos Santos** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 30/08/2021.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 10/2021 a Término: 06/2022
Espécie/linhagem/raca	Ratos heterogênicos
Nº de animais	48
Peso/Idade	250 a 450 g/4 a 5 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal de Sergipe

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

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