



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

EDSON DE REZENDE SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTOFÁGICA NOS
PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS DA VIA
NIGROESTRIATAL EM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON**

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2022

EDSON DE REZENDE SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTOFÁGICA NOS
PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS DA VIA
NIGROESTRIATAL EM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON**

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

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2022

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

S237a Santos, Edson de Rezende
Avaliação da atividade autofágica nos processos neurodegenerativos da via nigroestriatal em modelo experimental da doença de Parkinson / Edson de Rezende Santos ; orientador José Ronaldo dos Santos. – São Cristóvão, SE, 2022.
80 f. : il.

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

1. Parkinson, Doença de. 2. Sistema nervoso - Degeneração.
3. Autofagia. 4. Stress oxidativo. I. Santos, José Ronaldo dos, orient.
II. Título.

CDU 616.858

EDSON DE REZENDE SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTOFÁGICA NOS
PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS DA VIA
NIGROESTRIATAL EM MODELO EXPERIMENTAL DA
DOENÇA DE PARKINSON**

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

Orientador: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

Presidente da Banca: Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos

1º Examinador: Prof. Dr. Luis Felipe Souza da Silva

2º Examinador: Prof^{fa}. Dr^a. Daniela Droppa Almeida

3º Examinador: Prof. Dr. José Rodolfo Lopes de Paiva Cavalcanti

4º Examinador: Prof. Dr. Marco Aurélio de Moura Freire

SÃO CRISTÓVÃO/SE

2022

AGRADECIMENTOS

Chegou ao fim mais uma etapa de minha vida! Neste momento tão importante, quero agradecer a todos que, direta ou indiretamente contribuíram e/ou foram essenciais para a concretização dessa trajetória árdua e ao mesmo tempo tão gratificante.

Antes de qualquer agradecimento, deixo aqui registrado minha eterna afetuosidade, sensibilidade e respeito a todos os animais utilizados em pesquisas científicas, sem os quais eu não teria conseguido idealizar e muito menos concretizar este trabalho.

Agradeço a minha família (Rezende's – nome do nosso grupo no WhatsApp), especialmente a minha mãe, Maria Apolonia de Rezende, pelo carinho, amor, exemplo de pessoa e pelos seus ensinamentos para a vida. Te amo, coroa! Agradeço aos meus irmãos, pelo amor, carinho e admiração que, implícita ou explicitamente demonstraram e demonstram por mim e pela minha profissão.

Aos meus professores, do fundamental à pós-graduação, agradeço por todo conhecimento compartilhado para a vida e para a profissão. Dizem que somos moldados pelas pessoas que nos cercam e, sem dúvidas, meus sonhos, comportamentos, quem eu sou hoje, é resultado de todas as pessoas que busquei me cercar ao longo dos anos. Por este motivo, meus agradecimentos aos meus amigos de coração desde a graduação (Leila Menezes, Myrela, Edson Lima, Ingrid). A vocês, meu muito obrigado pelo compartilhamento de tristezas, alegrias, conversas aleatórias, enfim, pela amizade de vocês. Amo vocês!

Agradeço a Andréa e Tatiana, que além de colegas de profissão docente tornaram-se amigas de coração. A vocês duas, meu agradecimento e carinho sinceros por serem essas profissionais exemplares e pela amizade real que construímos nesses quase 4 anos, tornando a docência mais leve e tranquila. Amo muito a nossa amizade!

Por trás deste trabalho, houve a participação de uma grande equipe que constitui o LaNCE (Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva). Aos colegas/amigos do LaNCE (Katty, Marina, Lívia, Thiago (agregado rsrs), Heitor, Camila, Micaelle, Abraão) agradeço pelo companheirismo nos trabalhos, pelas proveitosas discussões nas reuniões do laboratório e também pelos momentos pessoais dentro e fora do ambiente laboratorial. Agradeço mais que especialmente a

Marcos, João, Heitor, Thassya, Auderlan, Pollyana, Mylaine, Carlos e Tamiris pela ajuda direta na construção deste trabalho e a Ana e Léo pela amizade e companheirismo construídos nos últimos 2 anos. Sou muito grato e tenho orgulho de ser do time LaNCE!

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos (vulgo “chefe”), meu eterno agradecimento por toda orientação, confiança e amizade durante toda a pós-graduação. És um exemplo de pessoa e profissional em quem me espelho todos os dias. Parafraseando a frase célebre do grande Isaac Newton: “se hoje sou a pessoa e profissional que sou, foi porque tive o apoio e confiança de um gigante”, neste caso, você, chefe!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Fisiológicas (PROCFIS), agradeço por todo o apoio financeiro e instrumental para a minha formação profissional. Agradeço especialmente ao corpo docente do PROCFIS, pelo comprometimento e profissionalismo na formação de recursos humanos em Ciência básica.

À CAPES, e FAPITEC e CNPq, agradeço pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo e/ou outras formas de custeio envolvido na execução do projeto. Por fim, agradeço à Universidade Federal de Sergipe (UFS), por todo o apoio estrutural e financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, agradeço a todas às pessoas que me ajudaram não só direta, quanto indiretamente também, seja com palavras de carinho, apoio moral etc.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”

John F. Kennedy

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTOFÁGICA NOS PROCESSOS NEURODEGENERATIVOS DA VIA NIGROESTRIAL EM MODELO EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é o distúrbio neurodegenerativo do movimento mais prevalente. Caracteriza-se pela neurodegeneração na via nigroestriatal (via NGE – substância negra (parte compacta – SNpc e parte reticulada – SNpr) e estriado) e presença de α -sinucleína (α -syn) agregada, que resulta em sintomas motores e não motores. Distúrbios na autofagia, processo natural de limpeza e reciclagem de material intracelular parece ter papel relevante no desenvolvimento e/ou progressão da doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da autofagia na neurodegeneração da via NGE de animais experimentais da DP. Foram utilizados 64 ratos Wistar, distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos, $n = 16$, cada: (1) controle (CTRL); (2) RES 0,1; (3) RES 0,2; (4) RES 0,5 – solução de RES nas doses de 0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg, respectivamente. Foram administradas 15 injeções de RES, uma a cada 48h, por via subcutânea. Durante todo o experimento, foram realizados testes comportamentais para avaliações motoras voluntária (catalepsia – a cada 48h) e involuntária (movimentos orais (MO) – dias 10, 20 e 30, 48h após 5^a, 10^a e 15^a injeções, respectivamente) e avaliação não motora (massa corporal – MC, a cada 4 dias). Quarenta e oito horas após a 15^a injeção, vinte e quatro animais, 6 de cada grupo, foram perfundidos e os encéfalos submetidos à imuno-histoquímica para tirosina e hidroxilase (TH – SNpc/estriado) e α -syn (SNpr/estriado). Os outros 40 animais, 10 de cada grupo, foram decapitados, os encéfalos removidos e dissecados para obtenção da região do estriado e da substância negra (SN). As estruturas foram processadas e submetidas à técnica de western blot (WB) para os marcadores LC3-II, P62/SQTSM1, PARK7/DJ-1 e caspase-3. Na catalepsia, os SM foram dose-dependentes, isto é, quanto maior a dose da RES, mais cedo iniciaram-se os déficits motores. O grupo RES 0,5 ficou cataleptico após a 3^a injeção ($p=0,02$), enquanto que no grupo RES 0,2 e RES 0,1 a catatonia teve início 48h após a 5^a e 6^a injeções ($p<0,0001$), respectivamente. No MO, foram avaliados os parâmetros movimento de mastigação no vácuo (MMV) e tempo de tremor em repouso (TTR). De modo geral, houve aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) tanto no MMV e TTR dos grupos RES, em todos os dias de avaliação. Foi observado redução de células TH imunorreativas na substância negra (SNpc) dos grupos RES (RES 0,1 – $p=0,019$; RES 0,2 – $p=0,006$; RES 0,5 – $p=0,0006$). O mesmo ocorreu no estriado (RES 0,1 – $p=0,001$; RES 0,2 – $p=0,004$; RES 0,5 – $p=0,007$). Na SNpr e no estriado, houve aumento de neurônios imunorreativos à α -syn nos grupos em todos os grupos RES ($p>0,05$). Na SN foram observados aumentos nos níveis de: P62 em todos os grupos RES ($p=0,001$ – nos 3 grupos) e PARK7 apenas no grupo RES 0,5 ($p<0,0001$). No estriado, houve aumento de: LC3-II nos grupos RES 0,2 ($p=0,010$) e RES 0,5 ($p=0,043$), PARK7 e caspase no grupo RES 0,5 ($p=0,038$; $p=0,016$, respectivamente). Esses dados sugerem que o comprometimento da via autofágica pode contribuir de forma direta para a neurodegeneração no modelo animal da DP em estágios prodrômicos.

Palavras-chave: Parkinsonismo; autofagia; neurodegeneração; estresse oxidativo.

ABSTRACT

EVALUATION OF AUTOPHAGIC ACTIVITY IN NEURODEGENERATIVE PROCESSES OF THE NIGROSTRIATAL PATHWAY IN EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE

Parkinson's disease (PD) is the most prevalent neurodegenerative movement disorder. It is characterized by neurodegeneration in the nigrostriatal pathway [substantia nigra (pars compacta – SNpc – and pars reticulata – SNpr) and striatum] and the presence of aggregated α -synuclein (α -syn), which results in motor and non-motor symptoms. Disturbances in autophagy, a natural process of cleaning and recycling intracellular material, seem to play a relevant role in the development or progression of the disease or both. This work assessed the participation of autophagy in the nigrostriatal pathway of parkinsonian animals. Sixty-four Wistar rats were used and randomly divided into four groups (n = 16): 1) control (CTRL); 2) RES 0.1; 3) RES 0.2, and 4) RES 0.5. The RES groups were separated using the following doses: 0.1, 0.2, and 0.5 mg/kg, respectively. Fifteen injections of RES were administered, one every 48 hours, subcutaneously. During the entire experiment, behavioral tests were performed for voluntary motor assessment (catalepsy, every 48h); and involuntary (oral movements (OM) on the days 10, 20, and 30; 48h after 5th, 10th, and 15th injections, respectively) and non-motor (body weight assessment, every four days). Forty-eight hours after the 15th injection, twenty-four animals (six from each group) were perfused, and the brains were submitted to immunohistochemistry for tyrosine hydroxylase (TH – SNpc/striatum) and α -syn (SNpr/striatum). Forty animals (ten from each group) were decapitated, and the brains were removed and dissected to obtain the striatum and substantia nigra (SN). These structures were processed and submitted to the western blot technique for LC3-II, P62/SQSTM1, PARK7/DJ-1, and caspase-3. In catalepsy, the motor symptoms were dose-dependent; the higher the dose of RES, the earlier the motor deficits started. The RES 0.5 group became cataleptic after the 3rd injection ($p = 0.02$), while in the RES 0.2 and RES 0.1 groups, catatonia started 48h after the 5th and 6th injections ($p < 0.0001$), respectively. The OM test evaluated the following parameters: chewing movement and resting tremor time. In general, there was a statistically significant increase ($p < 0.05$) of these parameters in the RES groups on all evaluation days. A reduction in immunoreactive TH cells was observed in the SN (RES 0.1, $p = 0.019$; RES 0.2, $p = 0.006$; RES 0.5, $p = 0.0006$) and striatum (RES 0.1, $p = 0.001$; RES 0.2, $p = 0.004$; RES 0.5, $p = 0.007$). In SNpr and striatum, there was an increase in α -syn immunoreactive neurons in all RES groups ($p > 0.05$). In SN, an increase in P62 levels was observed in all RES groups ($p = 0.001$) and PARK7 only in the RES 0.5 group ($p < 0.0001$). In the striatum, there was an increase in LC3-II in the RES 0.2 ($p = 0.010$) and RES 0.5 ($p = 0.043$), PARK7 and caspase-3 in the RES 0.5 group ($p = 0.038$; $p = 0.016$, respectively). These data suggest that the impairment of the autophagic pathway may directly contribute to neurodegeneration in the animal model of PD in the prodromal stages.

Keywords: Parkinsonism, autophagy, neurodegeneration, oxidative stress.

RESUMO PARA A SOCIEDADE

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa que mais afeta a população mundial. É caracterizada, principalmente, pela morte de neurônios em áreas específicas do encéfalo responsáveis por controlar os nossos movimentos voluntários, a via nigroestriatal (via NGE). Nos neurônios que sobrevivem, é comum encontrar proteínas defeituosas (α -sinucleína – α -syn) que se aglomeram no citoplasma, formando estruturas chamadas de corpos de Lewy (CL). Em situações saudáveis, os neurônios possuem um sistema de limpeza das impurezas internas de seu citoplasma, processo que se chama autofagia. No envelhecimento e nos casos de doenças, a autofagia pode estar prejudicada e esse fator pode induzir ou até mesmo se somar a outros fatores que contribuem para a neurodegeneração. Assim, esse trabalho avaliou o papel da autofagia na neurodegeneração da via NGE de animais experimentais da DP. Foram usados 64 ratos de laboratório. Cabe ressaltar que o uso desses animais é permitido por lei e que todos os procedimentos aos quais são submetidos passa antes por órgãos de controle da pesquisa animal no país. Em nossa pesquisa, os animais foram induzidos ao parkinsonismo por meio da administração de um fármaco, a reserpina (RES), em 3 diferentes doses. Assim, nosso trabalho contou com 4 grupos, três experimentais (RES 0,1; RES 0,2; RES 0,5) e um controle (que recebe uma solução sem a droga). O experimento teve duração de 30 dias e todos os animais passaram por testes de avaliação comportamental motora voluntária (catalepsia) e involuntária (movimentos orais), bem como análise de sua massa corporal (MC). No fim do experimento, os animais foram mortos, sem qualquer sofrimento, e seus encéfalos foram retirados para avaliação molecular de proteínas envolvidas: (1) na produção do neurotransmissor dopamina (tirosina hidroxilase – TH) na autofagia; (2) na formação dos CL (α -syn); (3) na autofagia (LC3-II e P62/SQTSM1); (4) nos mecanismos de defesas antioxidantes (PARK7-DJ-1); (5) na ativação de morte celular (caspase-3). Nossos dados comportamentais motores voluntários e involuntários mostraram danos nas funções motoras de forma dose-dependente, isto é, quanto maior a dose da RES, mais cedo iniciaram-se os problemas de movimentos. De forma equivalente, também foi observada redução de MC de modo dose-dependente, ou seja, os animais dos grupos RES com as maiores doses perderam MC mais cedo e mais intensamente. A análise molecular mostrou que os danos motores e as alterações na MC observados se relacionaram diretamente com a redução da TH e aumento da α -syn na via NGE. Foi observado também que, possivelmente, o aumento da α -syn ocorreu devido à redução do fluxo autofágico na via NGE pois, observamos aumento da LC3-II e P62/SQTSM1, indicativos de interrupção do processo de limpeza citoplasmática neuronal. De modo bastante interessante, também foi observado aumento da proteína PARK7-DJ-1, sugerindo que a interrupção do fluxo autofágico e acúmulo de α -syn elevaram as concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), logo, como mecanismo neuroprotetor, a expressão dessa proteína foi ativada para minimizar os danos neuronais. No caso do estriado, uma das áreas que compõem a via NGE, os danos parecem ter ocorrido de forma mais intensa, o que levou a um aumento da proteína caspase-3, indicando uma possível ativação da cascata de morte celular programada. Em síntese, nossos dados mostram que a interrupção do fluxo autofágico parece contribuir diretamente para o

processo de neurodegeneração na via NGE, promovendo uma degeneração axonal retrógrada, isto é, com início no terminal axonal em direção ao corpo celular.

SUMMARY FOR THE SOCIETY

Parkinson's disease (PD) is the second neurodegenerative disease most affecting the world's population. It is mainly characterized by the death of neurons in specific brain areas responsible for controlling our voluntary movements, such as the nigrostriatal pathway. In surviving neurons, it is common to find defective proteins (α -synuclein or α -syn) that cluster in the cytoplasm, forming structures called Lewy bodies. In healthy situations, neurons have a system for cleaning internal impurities from the cytoplasm called autophagy. Autophagy may be impaired in aging and cases of the disease, and this factor may induce or even add to other factors that contribute to neurodegeneration. Thus, this work evaluated the role of autophagy in the nigrostriatal pathway neurodegeneration in experimental PD animals. Sixty-four laboratory rats were used. It should be noted that the use of these animals is permitted by law and all procedures to which they are submitted go through animal research control committees in the country. In our research, the animals were induced to parkinsonism by administering a drug, reserpine (RES), in 3 different doses. Thus, our work had four groups: three experimental (RES 0.1, RES 0.2, RES 0.5) and control (receiving a solution without the drug). The experiment lasted 30 days, and all animals underwent voluntary motor behavioral assessment tests (catalepsy) and involuntary (oral movements), as well as analysis of body mass (BM). At the end of the experiment, the animals were killed without any suffering. Their brains were removed for molecular evaluation of proteins involved in (1) the production of the neurotransmitter dopamine (tyrosine hydroxylase - TH) in autophagy, (2) the formation of Lewy bodies (α -syn), (3) in autophagy (LC3-II and P62/SQTSM1), (4) on antioxidant defense mechanisms (PARK7/DJ-1), and (5) cell death activation (caspase-3). Our voluntary and involuntary motor behavioral data showed damage in motor functions in a dose-dependent manner; the higher the RES dose, the earlier the movement problems started. A dose-dependent reduction in BM was also observed; animals in the RES groups with the highest doses lost BM earlier and more intensely. Molecular analysis showed that motor damage and alterations in BM were directly related to the reduction of TH and increase of α -syn in the nigrostriatal pathway. It was also observed that, possibly, the increase in α -syn occurred due to a reduction of autophagic flow in the nigrostriatal pathway, as we observed an increase in LC3-II and P62/SQTSM1, indicative of interruption of the neuronal cytoplasmic cleaning process. Interestingly, an increase in PARK7/DJ-1 protein was also observed, suggesting the interruption of autophagic flux and α -syn accumulation increased the concentrations of reactive oxygen species. Thus, as a neuroprotective mechanism, the expression of this protein was activated to minimize neuronal damage. In the case of the striatum, one of the areas of the nigrostriatal pathway, the damage seems to have occurred more intensely, with an increase in the caspase-3 protein, which indicates a possible activation of the cascade of programmed cell death. In summary, our data show that the interruption of autophagic flow seems to contribute directly to the neurodegeneration process in the nigrostriatal pathway, promoting retrograde axonal degeneration, starting at the axonal terminal towards the cell body.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Projeção de crescimento população mundial e número estimado de indivíduos com DP entre 1990-2040.	6
Figura 2: Processo de síntese da dopamina e mecanismos de controle do movimento voluntário pelos núcleos da base (NB) em condições fisiológicas e na DP.	10
Figura 3: Mecanismo gerais envolvidos nos 3 tipos de processos autofágicos.	12
Figura 4: Etapas gerais envolvidas na autofagia.	13
Figura 5: Visão geral simplificada do processo molecular da autofagia.	14
Figura 6: Modelo esquemático do curso temporal da gravidade dos déficits motores e alterações neuroquímicas na DP e em diferentes modelos animais.	18
Figura 7: Delineamento Experimental.	22
Figura 8: Imagem representativa do teste de catalepsia.	25
Figura 9: Imagem representativa do teste de MO.	26
Figura 10: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na massa corpórea dos animais.	32
Figura 11: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES no teste de catalepsia.	34
Figura 12: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES no teste de MO.	36
Figura 13: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na imunorreatividade para célula TH ⁺ na região do estriado e da SNpc.	37
Figura 14: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na imunorreatividade para célula α -syn na região do estriado e da SNpr.	39
Figura 15: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na concentração de LC3-II na região da SN e estriado.	40
Figura 16: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na concentração de P62/SQTSM1 na região da SN e estriado.	41
Figura 17: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES nos níveis de PARK7/DJ-1 na região da SN e estriado.	42
Figura 18: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES nos níveis de caspase na região da SN e estriado.	43

Figura 19: Resumo dos parâmetros neuroquímicos avaliados.44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

AADC – Aminoácido aromático descarboxilase

ANOVA – Análise de variância

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

CEPA – Comitê de ética em pesquisas com animais

CTRL – Grupo controle

DA – Doença de Alzheimer

DAB – Diaminobenzidina

DAT – Transportador de dopamina

DH – Doença de Huntington

DNs – Doenças neurodegenerativas

DO – Densidade óptica

DOP – Dopamina

DOPAC – Ácido 3,4-diidroxifenilacético

DP – Doença de Parkinson

E.P.M. – Erro padrão da média

ELA – Esclerose lateral amiotrófica

GDNF – Fator neurotrófico derivado da glia

GFP – Proteína fluorescente verde

GPe – Globo pálido externo

GPi – Globo pálido interno

IHQ – Imuno-histoquímica

LC3 – Proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos

LC3-II – Proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos fosfatidiletanolamina

L-DOPA – 1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa

MAO – Monoamina oxidase

MC – Massa corpórea/corporal

MMV – Movimentos de mastigação no vácuo/vazio

MO – Movimentos orais

NB – Núcleos da base

NEM – Neurônios espinhosos médios

NST – Núcleo subtalâmico

PB – Tampão fosfato

PBS – Tampão fosfato salina

PF – Peso final

PFA – Paraformaldeído

PI – Peso inicial

RES – Reserpina

S.C – Subcutânea

SM – Sinais motores (quando se referir a animal não humano); sintomas motores (quando se referir a humanos)

SN – Substância negra

SNC – Sistema nervoso central

SNM – Sinais não motores (quando se referir a animal não humano); sintomas não motores (quando se referir a humanos)

SNpc/SNc – Substância negra parte compacta

SNpr/SNr – Substância negra parte reticulada

SQSTM1 – Sequestossomo 1

SV – Solução veículo

TH – Tirosina hidroxilase

TRAP – Tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural

TTR – Tempo de tremor em repouso

UFS – Universidade Federal de Sergipe

Via NGE – Via nigroestriatal

VMAT2 – Transportador vesicular de monoaminas 2

α -syn – Alfa-sinucleína

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. CARACTERIZAÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON (DP)	4
2.2. AUTOFAGIA E DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS	11
2.3. MODELOS ANIMAIS DA DOENÇA DE PARKINSON	16
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. OBJETIVO GERAL	19
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. ANIMAIS.....	20
4.2. DROGAS E REAGENTES.....	20
4.3. PROCEDIMENTOS GERAIS	20
4.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
4.5. AVALIAÇÃO DA MASSA CORPÓREA E TESTES COMPORTAMENTAIS	24
4.5.1. <i>Avaliação da massa corporal (MC)</i>	24
4.5.2. <i>Teste de catalepsia</i>	24
4.6. PERFUSÃO DOS ANIMAIS.....	26
4.7. OBTENÇÃO DAS ÁREAS DE INTERESSE.....	26
4.8. IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA TIROSINA HIDROXILASE (TH) E A-SYN.....	27
4.9. AQUISIÇÃO DE IMAGENS E CONTAGEM DE CÉLULAS.....	27
4.10. AVALIAÇÃO POR DENSITOMETRIA ÓPTICA (DO)	28
4.11. DISSECAÇÃO DAS ÁREAS CEREBRAIS	28
4.12. WESTERN BLOT (WB)	29
4.13. ANÁLISE DOS GÉIS.....	30
4.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
5. RESULTADOS.....	31
5.1. ALTERAÇÕES NA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS.....	31

5.2.	ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS MOTORAS	32
5.2.1.	<i>Comportamento motor no teste de catalepsia</i>	32
5.2.2.	<i>Comportamento motor no teste de movimentos orais (MO)</i> :.....	34
5.3.	ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS NA VIA NIGROESTRIATAL:.....	36
5.3.1.	<i>Alterações na proteína tirosina hidroxilase (TH)</i>	36
5.3.2.	<i>Alterações na proteína α-sinucleína (α-syn)</i>	38
5.3.3.	<i>Alterações na proteína LC3-II</i> :	40
5.3.4.	<i>Alterações na proteína P62/SQTSM1</i> :	41
5.3.5.	<i>Alterações na proteína PARK7/DJ-1</i> :	42
5.3.6.	<i>Alterações na Proteína Caspase-3</i> :	43
6.	DISCUSSÃO	45
7.	CONCLUSÃO	52
8.	REFERÊNCIAS	53
ANEXO – DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)		66

1. INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas (DNs) são desordens crônicas progressivas e incapacitantes que afetam o sistema nervoso (SN) de forma severa, prejudicando a qualidade de vida do paciente. Dentre essas patologias, destaca-se a doença de Parkinson (DP), segundo distúrbio neurológico mais prevalente e incidente na população idosa (HAYES, 2019; LEE; GILBERT, 2016). No que tange às desordens do movimento, a DP é a mais comum e suas características marcantes são distúrbios na motricidade (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Apesar de ficar atrás da doença de Alzheimer (DA) no ranking das principais DNs, a incidência e a prevalência da DP aumentaram mundialmente, de tal maneira que pode tornar-se o distúrbio neurodegenerativo com a taxa de crescimento mais acelerada (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021).

Passaram-se mais de 200 anos das primeiras descrições médicas do Parkinson e ainda não há cura para a doença, apenas tratamentos para melhorar a qualidade de vida do paciente (OBESO et al., 2017). A dificuldade para uma cura reside no fato de a DP ser uma desordem neurológica com etiopatogênese heterogênea ou multifatorial, ou seja, as causas são múltiplas, desconhecendo-se até então os fatores exatos que dão início e/ou atuam na progressão da doença (LEE; GILBERT, 2016). Além disso, a DP tem caráter multissistêmico, isto é, além da via nigroestriatal, várias outras áreas encefálicas e sistemas de neurotransmissão são afetados, como as vias serotoninérgicas e noradrenérgicas, o que explica sua multiplicidade sintomatológica (FACTOR; MCDONALD; GOLDSTEIN, 2017; MAILLET et al., 2016; MORRIS et al., 2019; PASQUINI et al., 2018; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

A literatura aponta diversos fatores, tanto ambientais quanto genéticos, como causas prováveis para o desenvolvimento da DP. Em relação aos primeiros, destacam-se a exposição a pesticidas e outros contaminantes ambientais (GOLDMAN, 2014; REHMAN et al., 2021; TANNER et al., 2014). No contexto genético, sabe-se hoje que mutações em vários genes estão diretamente envolvidas com formas familiares da DP, a exemplo dos alelos *LRRK2*, *DJ-1* (*PARK7*), *SNCA*, *PINK1*, *VPS35*, *PARKIN* (BALESTRINO; SCHAPIRA, 2020; LILL, 2016a). Independentemente de quais fatores atuem para o início e progressão da doença, é muito clara a participação de proteínas alteradas e disfuncionais que se agregam e

desencadeiam danos celulares (BOLAND et al., 2019; BOURDENX et al., 2017; LUHESHI; CROWTHER; DOBSON, 2008; SCHMIDT; GAN; KOMANDER, 2021).

Em condições fisiológicas, as células possuem uma maquinaria molecular de autolimpeza, degradação e reciclagem de macromoléculas e organelas disfuncionais, a autofagia, processo que mantém a homeostase da célula (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; SABLI; SANCHO-SHIMIZU, 2021). Em algumas situações, como mutações em genes reguladores do processo autofágico, o controle de qualidade das estruturas intracelulares pode não funcionar corretamente, a célula entra em colapso e o processo de neurodegeneração é desencadeado (CIECHANOVER; KWON, 2015; ROSS; POIRIER, 2004; SABLI; SANCHO-SHIMIZU, 2021). Além disso, um dos fatores que leva à formação de agregados proteicos é o envelhecimento natural do indivíduo. Com o avanço da idade e a senescência celular, ocorre disfunção mitocondrial, aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo, o que leva à oxidação proteica, desencadeando a agregação e formação de placas polipeptídicas intraneuronais (BLASCO et al., 2013).

Patologicamente, a DP é caracterizada de forma clássica pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos nas regiões encefálicas que compreendem a via nigroestriatal (substância negra parte compacta – SNpc e estriado), além da presença de inclusões proteicas citoplasmáticas, os corpos de Lewy (agregados polipeptídicos cujo principal componente é a proteína α -sinucleína (α -syn)), nas células neuronais remanescentes (OSTERHAUS et al., 1997; WAKABAYASHI et al., 2013; YUKO et al., 2003). Clinicamente, uma vez que as áreas afetadas controlam a motricidade, a perda neuronal resulta em sintomas motores (SM) como bradicinesia, tremor de repouso, rigidez muscular e instabilidade postural (ARMSTRONG; OKUN, 2020; HAYES, 2019). Além disso, sintomas não motores (SNM) também são evidentes, tais como alucinações, demência, ansiedade, depressão, comprometimento cognitivo (HAYES, 2019).

Uma vez que aumento e o envelhecimento populacional trazem consigo o crescimento exponencial de DNs como o Parkinson, compreender como se dá o início e a progressão da doença em humanos é uma urgência global. Diante disso, as pesquisas com modelos animais da DP são extremamente relevantes, pois permitem compreender com maior clareza os estágios iniciais, intermediários e tardios do distúrbio do movimento mais prevalente na população idosa.

Diante dos fatos expostos até aqui, uma das principais questões atuais acerca dos mecanismos envolvidos na etiopatogênese da DP é o seu ponto de início, com destaque para o terminal axonal. A função sináptica neuronal se utiliza de uma vasta maquinaria de proteínas para sintetizar, armazenar e liberar neurotransmissores, bem como para o correto tráfego de vesículas anterógrada ou retrogradamente, utilizando-se dos trilhos proteicos do citoesqueleto. Manter essas atividades requer um controle e coordenação equilibrada de múltiplas vias inter cruzadas, que pode falhar e promover a aglomeração de peptídeos defeituosos, culminando em perda da proteostase sináptica. Dessa forma, o resultado é uma possível neurodegeneração retrógrada iniciada pela ruptura da homeostase celular como consequência de um catabolismo proteico defeituoso.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Caracterização, epidemiologia e fisiopatologia da doença de Parkinson (DP)

A DP, inicialmente chamada Mal de Parkinson, foi descrita pela primeira vez por James Parkinson (1755-1824), no ano de 1817, um médico inglês que definiu e descreveu a doença em um trabalho chamado *“Um ensaio sobre a paralisia agitante”*. Neste documento, constituído por 5 capítulos e 66 páginas, Parkinson analisou 6 casos clínicos de indivíduos masculinos com idades entre 50 e 72 anos e observou sintomas como movimentos trêmulos involuntários, redução na potência muscular e forte tendência para curvar o corpo à frente, sem, no entanto, ocorrer alterações nos sentidos e na capacidade intelectual do paciente. Todavia, relatou outras alterações não motoras, como distúrbios entéricos e do sono (BERRIOS, 2016; DONALDSON, 2015; GOEDERT; COMPSTON, 2018; OBESO et al., 2017).

Posteriormente, na década de 1880, Jean-Martin Charcot contribuiu com a caracterização do quadro clínico, o diagnóstico diferencial e o tratamento da doença. Em homenagem às descrições iniciais da doença por James Parkinson, Charcot sugeriu que o distúrbio fosse chamado de Mal de Parkinson, hoje designada doença de Parkinson (BERRIOS, 2016; GOEDERT; COMPSTON, 2018; OBESO et al., 2017). Após a caracterização/descrição inicial dos sinais e sintomas, a DP ficou conhecida por muito tempo pelas suas alterações motoras cardinais: tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural, abreviadamente TRAP (sigla no inglês) (ARMSTRONG; OKUN, 2020; HAYES, 2019; JANKOVIC, 2008).

Apesar de ser conhecida pelas suas manifestações motoras clássicas, a DP na verdade apresenta um amplo espectro sintomatológico que vai além do TRAP. Esses distúrbios não motores são múltiplos e variáveis e caracterizam o que se conhece como fase prodrômica da doença (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). Pesquisas mostram que os SNM surgem anos antes do desenvolvimento da fase motora, a exemplo da hiposmia/anosmia (redução olfativa), constipação, distúrbios gastrointestinais e do sono, além de disfunção autonômica, alterações neuropsiquiátricas e sensoriais (GOLDMAN; GUERRA, 2020; JANKOVIC, 2008; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017).

Epidemiologicamente, a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum na população (HAYES, 2019; LEE; GILBERT, 2016), mas o principal distúrbio do

movimento (ARMSTRONG; OKUN, 2020). A idade é o seu principal fator de risco (REEVE; SIMCOX; TURNBULL, 2014), isto é, com a senescência, a incidência e a prevalência da DP aumentam, sendo, portanto, caracterizada como uma doença do envelhecimento, assim como outras DNs (esclerose lateral amiotrófica – ELA; doença de Huntington – DH e DA) (BLASCO et al., 2013; HOU et al., 2019; REEVE; SIMCOX; TURNBULL, 2014; WYSS-CORAY, 2016). Nesse contexto, segundo dados da Organização das Nações Unidas (ONU), a população mundial mais do que triplicou nos últimos 70 anos (1950–2020). Esse crescimento populacional vertiginoso é, em parte, determinado pela queda na taxa de mortalidade que reflete, consequentemente, em aumento na expectativa de vida (longevidade populacional). Ainda de acordo com o relatório apresentado pela ONU (*World Population Prospects 2022: Summary of Results*), a população mundial atingiu a marca de 8 bilhões em 15 de novembro de 2022 e a projeção é que atinja 9,7 bilhões em 2050 (**figura 1A**).

No que diz respeito ao envelhecimento, a parcela da população global com 65 anos ou mais passará de 10%, em 2022, para 16%, em 2050 (ONU, 2022). Esses dados demográficos são extremamente importantes não somente para o entendimento da composição populacional ao longo do tempo, mas também para compreender a prevalência e a incidência das DNs, como a DP (HOU et al., 2019; WYSS-CORAY, 2016). Pesquisas mostram que, dentre os distúrbios neurodegenerativos relacionado à idade, a DP está superando a DA (DORSEY; BLOEM, 2018; FEIGIN et al., 2019). Mundialmente, entre 1990 e 2015, a prevalência, a incapacidade e a taxa de mortalidade da doença DP mais do que dobraram no mundo (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; DORSEY; BLOEM, 2018). Estimativas apontam que em 2040, aproximadamente 13 milhões de pessoas no mundo sejam afetadas pelo Parkinson (**figura 1B**) (DORSEY; BLOEM, 2018).

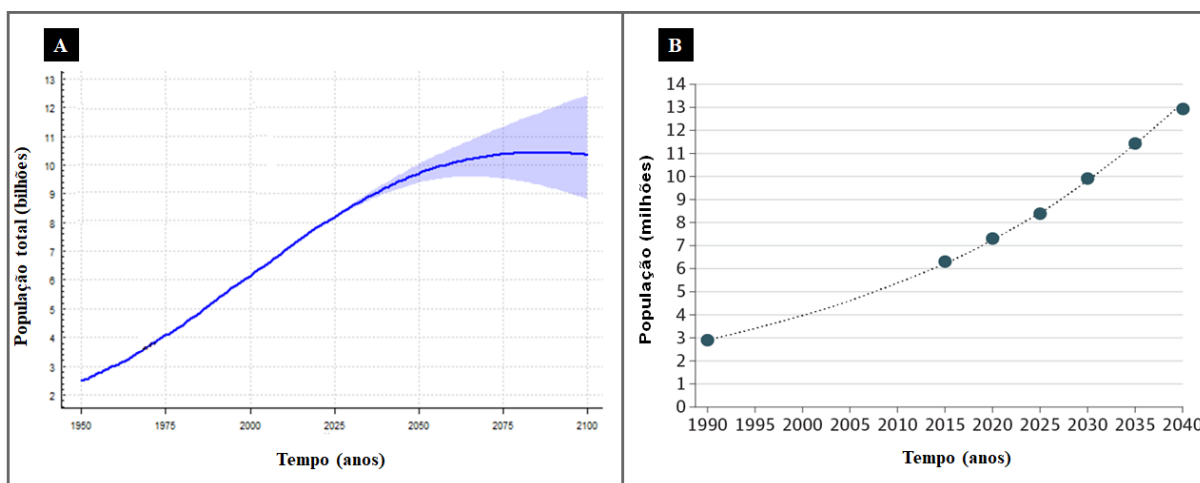


Figura 1: Projeção de crescimento população mundial e número estimado de indivíduos com DP entre 1990-2040. De acordo com o relatório “Perspectivas da População Mundial 2022: Resumo dos Resultados” (*World Population Prospects 2022: Summary of Results*), a população mundial atingiu o número expressivo de 8 bilhões em 2022, com projeção de quase 10 bilhões em 2050 (curva azul do **gráfico A**). Com o aumento populacional global, estima-se que ocorra, nos próximos anos, um crescimento exponencial (incidência) da DP. É estimado, por meio de taxas de crescimento populacional que, em 2040, o número de pessoas com a DP no mundo atinja a marca de 12,9 milhões (**gráfico B**). Figura adaptada de: **Gráfico A** - (ONU, 2022); **gráfico B** – de Dorsey e Bloem (2018).

Outra característica epidemiológica marcante é a diferença sexual na manifestação da doença, com maior incidência e prevalência em homens em relação ao sexo feminino (HIRSCH et al., 2016; TYSNES; STORSTEIN, 2017). A comparação entre os sexos mostra que a relação de homens com Parkinson é cerca de 1,5 vezes maior em relação às mulheres (MOISAN et al., 2016), o que parece ser explicado devido a possíveis efeitos neuroprotetores dos hormônios femininos (BISPO et al., 2019, 2022).

As principais marcas neuropatológicas da DP são: (1) morte neuronal dopaminérgica na via NE, reduzindo o aporte de DA no estriado; (2) acúmulo intraneuronal de múltiplas proteínas mal dobradas como agregados de ubiquitinados e, principalmente, a α -syn, formando os corpos ou inclusões de Lewy, essencialmente encontrados junto ao núcleo da célula, mas também nos axônios e dendritos (BRAAK et al., 2004; CARDOSO et al., 2005). Além desse fenótipo patológico clássico, resultantes na sintomatologia motora, diversas outras vias ou sistemas de neurotransmissão são afetados na DP (sistemas noradrenérgico, colinérgico e serotoninérgico), implicados principalmente nas complicações clínicas não motoras (MOGHADDAM et al., 2017; WILLIAMS-GRAY; WORTH, 2016).

O diagnóstico da DP não é tarefa simples. Regularmente, os critérios para esse e outros distúrbios neurodegenerativos são atualizados, a fim de se obter um diagnóstico diferencial mais preciso, uma vez que várias outras condições patológicas

apresentam um ou mais sintomas presentes na DP (RIZEK; KUMAR; JOG, 2016). No caso de idosos, o diagnóstico torna-se ainda mais desafiador, uma vez que com o envelhecimento surgem diversos distúrbios de ordem fisiológica, comportamental e cognitiva, muitos dos quais podem assemelhar-se ao Parkinson, como postura curvada, lentidão dos movimentos, rigidez na musculatura (CALABRESE et al., 2018). Nesse aspecto, técnicas de imageamento cerebral, por exemplo, são extremamente importantes no uso do diagnóstico diferencial da DP (ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018; MORELLI et al., 2014). Após o diagnóstico, o paciente com Parkinson é acompanhado por um especialista e submetido a tratamentos para melhoria de seu quadro sintomatológico motor e não motor. Existem tratamentos à base de drogas que atuam nos múltiplos sistemas de neurotransmissão afetados na doença, principalmente no sistema dopaminérgico, cujo objetivo é amenizar os déficits motores (GOLAN et al., 2009).

No que diz respeito aos aspectos fisiopatológicos, o Parkinson é uma desordem degenerativa cujas áreas cerebrais afetadas são os núcleos da base (NB), estruturas subcorticais localizadas na substância branca cerebral e funcionalmente envolvidos com o controle motor voluntário, além de comportamentos cognitivos e motivacionais (DELONG; WICHMANN, 2015; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). Do ponto de vista anatômico, os NB são constituídos, de maneira geral, por 4 grandes conjuntos de neurônios, a saber: (1) substância negra (parte compacta (SNpc) e parte reticulada (SNpr)); (2) núcleo subtalâmico (NST); (3) globo pálido interno (GPi) e globo pálido externo (GPe); (4) corpo estriado ou simplesmente estriado (caudado e putâmen). Os NB conectam-se ao córtex cerebral e ao tálamo, constituindo o circuito motor córtico-NB-tálamo-cortical. Assim, esse circuito é responsável pela execução da motricidade e, uma vez que é dos NB que se projetam as vias dopaminérgicas, esse circuito também regula e/ou modula as funções envolvidas com os estados motivados, recompensa e humor (DELONG; WICHMANN, 2015; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012; MALLET et al., 2019).

Nessa circuitaria neuronal que inicia-se no córtex cerebral, atravessa os NB, passa pelo tálamo e segue de volta ao córtex, há a participação de diversos tipos celulares e neurotransmissores, dentre eles, a dopamina (DOP) (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012; MALLET et al., 2019). A DOP é uma monoamina, especificamente, uma catecolamina, produzida e liberada pelo principal núcleo dopaminérgico do SNC, a SNpc (**figura 2A – processo de síntese da DOP**). Esse mensageiro químico exerce

seus efeitos por meio de sua ligação a duas classes ou famílias de receptores dopaminérgicos abundantemente expressos e distribuídos no estriado. A primeira classe compõe os receptores da família D1 (receptores D1 e D5), com efeito excitatório na atividade neuronal estriatal. A segunda, por sua vez, é formada pelos receptores da família D2 (receptores D2, D3 e D4), com efeito inibitório nos neurônios do estriado. Ambas as classes de receptores são proteínas transmembranares acopladas à proteína G. No caso dos receptores D1, seu efeito excitatório é decorrente de seu acoplamento a uma proteína G estimulatória (Gs), ativando uma cascata enzimática intracelular que gera excitação neuronal. Por outro lado, os receptores D2 têm acoplados a eles uma proteína G inibitória (Gi), com inibição enzimática que culmina em hiperpolarização neuronal e, por consequência, inibição da via (GOLAN et al., 2009).

Essas populações de receptores dopaminérgicos distribuem-se de forma bastante heterogênea por todo o encéfalo. Uma vez que a SNpc projeta seus axônios para a região do estriado, é relevante entender que neste núcleo ocorre a expressão dos receptores D1 e D2 (com ação excitatória e inibitória, respectivamente) com importância fundamental na fisiologia do controle motor e na DP. No circuito córtico-NB-tálamo-cortical, o estriado funciona como principal via de entrada de informações, pois recebe aferências glutamatérgicas e dopaminérgicas corticais e nigrais, respectivamente. Esses neurônios nigrais e corticais estabelecem conexões sinápticas com os neurônios espinhosos médios (NEM) GABAérgicos do estriado. Do estriado, esses neurônios enviam eferências para diferentes áreas, formando as vias direta e indireta para controle e modulação do movimento (GOLAN et al., 2009; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012; MALLET et al., 2019; MOGHADDAM et al., 2017).

Na via direta, a DA liberada pela SNpc atua em receptores D1 dos NEM estriatais, estimulando-os a liberar GABA no GPi (neurônios também GABAérgicos). GPi é um núcleo que se comunica com o tálamo e já estabelece com ele uma inibição tônica. Desta forma, os NEM estriatais inibem o GPi, que deixa de inibir o tálamo, o que resulta em excitação da via (ou seja, a desinibição converte-se em um estímulo). O tálamo, via glutamato (GLU), estimula o córtex motor que, por sua vez, envia projeções descendentes para os neurônios motores espinais colinérgicos que propiciam o movimento (**figura 2B** – sequência: SNc → putâmen → GPi → tálamo → córtex motor → neurônios motores espinais). Na via indireta, também chamada

inibitória, quando a DA proveniente da SNpc chega ao estriado, gera estimulação de receptores D2, que resulta em impulsos inibitórios no GPe (neurônios também GABAérgicos). GPe é um núcleo que exerce inibição tônica sobre o NST (neurônios glutamatérgicos – GLU). Assim, os NEM estriatais inibem GPe que, por sua vez, estimula o NST (desinibição gera estímulo). O NST, via GLU estimula o GPi, liberando GABA no tálamo. O GABA, ao ligar-se nos receptores GABAérgicos talâmicos, gera efeito inibitório, impedindo a liberação de GLU pelo tálamo nos neurônios motores corticais. Dessa forma, não há informação descendente para os neurônios motores espinais, logo, ocorre inibição do movimento (**figura 2B** – sequência: SNc → putâmen → GPe → NST → GPi → tálamo → córtex motor → neurônios motores espinais) (GOLAN et al., 2009; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012; MALLET et al., 2019; MOGHADDAM et al., 2017). Em síntese, a atividade equilibrada e sinérgica das vias direta e indireta, com influxos glutamatérgicos corticais e dopaminérgicos nigrais permitem a correta execução dos movimentos (**figura 2B1**).

Em situações fisiopatológicas que afetam os NB, como é o caso do Parkinson, o sinergismo entre as vias direta e indireta torna-se prejudicado e, por consequência, surgem os SM clássicos da doença. De forma objetiva, com a morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos da SNpc, vai ocorrer uma estimulação deficiente da via direta e inibição insuficiente da via indireta (**figura 2B2**). (GOLAN et al., 2009; LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012; MALLET et al., 2019; MOGHADDAM et al., 2017).

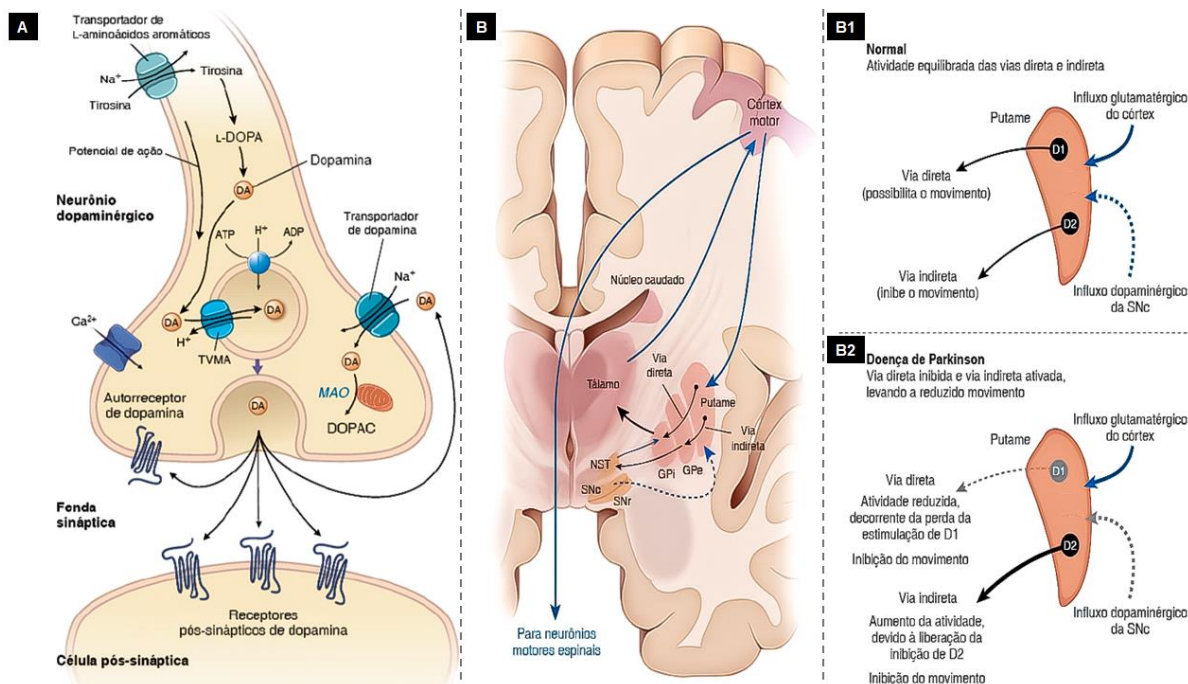


Figura 2: Processo de síntese da dopamina e mecanismos de controle do movimento voluntário pelos núcleos da base (NB) em condições fisiológicas e na DP. A figura **A** representa a síntese da DOP em neurônios dopaminérgicos da via NGE. O processo inicia-se com a captura do aminoácido (aa) tirosina por meio do transportador e L-aminoácidos aromáticos. No citoplasma, o aa tirosina é convertido em L-DOPA (1-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa), por ação catalítica da enzima tirosina hidroxilase (TH), não representada na figura. Esse processo de oxidação da tirosina a L-DOPA é uma etapa limitante na velocidade de síntese da DOP e das outras catecolaminas (noradrenalina e serotonina). A etapa final da cascata de síntese de DOP é a conversão de L-DOPA em DOP, reação catalisada pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC), também não representada na figura. Após sua síntese, a DOP é transportada para o interior de vesículas secretoras para armazenamento e posterior liberação. Nesse processo, uma ATPase de prótons concentra íons H⁺ no interior da vesícula. O VMAT (transportador vesicular de monoaminas), um antiportador, transloca prótons H⁺ a favor de seu gradiente para o citoplasma e, simultaneamente, lança a DOP para interior vesicular. Com o estímulo nervoso (potencial de ação), as vesículas contendo DOP deslocam-se pelo axoplasma, fundem-se à membrana do terminal axonal e libera seu conteúdo na fenda sináptica. Na fenda, a DOP pode ligar-se aos receptores da membrana pós-sináptica ou até mesmo em auto-receptores da membrana pré-sináptica. Quando em excesso, a DOP é captada pelo DAT (transportador de dopamina), sendo oxidada pela enzima MAO (monoamina-oxidase), que gera metabólitos (DOPAC – Ácido 3,4-diidroxifenilacético) que podem resultar em danos neuronais. A figura **B** representa o fluxo de informações que ocorre nos 4 NB e os circuito córtico-NB-tálamo-cortical para correta execução dos movimentos voluntários. As setas azuis indicam projeções excitatórias e as setas pretas indicam projeções inibitórias. As figuras **B1** e **B2** representam as situações fisiológicas e patológicas, respectivamente, do sinergismo entre as vias direta e indireta para a execução de movimentos voluntários D1: Receptor de dopamina tipo 1; D2: Receptor de dopamina tipo 2; GPi: Globo pálido interno; GPe: Globo pálido externo; NST: Núcleo subtalâmico; SNc: Substância negra parte compacta; SNr: Substância negra parte compacta. A Figura foi retirada e adaptada de (FREITAS, 2018).

Apesar de se conhecer os processos fisiopatológicos da doença e haver tratamentos para melhorar a qualidade de vida do paciente com Parkinson, ainda não está esclarecido qual(is) fatores são os agentes iniciadores da morte celular dopaminérgica na via NE. O Parkinson parece ocorrer por meio de vários mecanismos, compartilhados e únicos com outras DNs, que se somam e resultam em

alterações estruturais, funcionais e biomoleculares (RISACHER; SAYKIN, 2019). Apesar da dificuldade em compreender a origem etiopatogênica do Parkinson, fortes evidências apontam a disfunção mitocondrial e os danos oxidativos como processos bastante relevantes, que resultam em transporte axonal prejudicado, culminando no acúmulo anormal de polipeptídios mal dobrados (ESTEVEES et al., 2018).

2.2. Autofagia e doenças neurodegenerativas

O tecido nervoso é formado por neurônios e células gliais que se inter-relacionam para manutenção das atividades neurais de geração e propagação de impulsos nervosos. Neurônios são células altamente especializadas. Sua estrutura polarizada e viabilidade funcional dependem diretamente de neurotrofinas, como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e de transporte vesicular que permita uma comunicação bidirecional eficiente entre soma e axônio. Devido a esses fatores, comprimento e a sua natureza pós-mitótica, os neurônios são altamente sensíveis ao acúmulo de proteínas estruturalmente anormais com capacidade de agregação, o que os torna dependentes da atividade autofágica (TOOZE; SCHIAVO, 2008).

A autofagia é um processo natural de auto-renovação das células, cuja função é promover a degradação de macromoléculas e/ou organelas danificadas/disfuncionais (SUMITOMO; TOMODA, 2021). Os processos autofágicos podem ser desencadeados por diferentes fatores e/ou situações, como estresse nutricional/energético, processo infeccioso (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; YOSHII; MIZUSHIMA, 2017). No entanto, para as atividades celulares fisiológicas, a autofagia basal ou constitutiva é ativada independentemente destes fatores. Fisiologicamente, a autofagia está envolvida com a homeostase celular, regulando os níveis de substratos para manutenção da síntese de energia e componentes intracitoplasmáticos (DIKIC, 2017; MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011).

Existem 3 vias autofágicas em eucariontes, classificadas de acordo com o mecanismo de formação do vacúolo autofágico e com o caminho pelo qual o material citoplasmático é entregue ao lisossomo: (1) microautofagia; (2) autofagia mediada por chaperonas (AMC) e (3) macroautofagia (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011). A microautofagia (**figura 3C**) é caracterizada pela invaginação da membrana lisossomal, que incorpora e degrada diretamente os componentes citosólicos (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; SAHU et al., 2011). A autofagia mediada por chaperonas (AMC –

figura 3B) consiste na translocação de elementos citoplasmáticos para o lúmen do lisossomo por meio de proteínas específicas (chaperonas), que interagem com a proteína de membrana associada ao lisossomo 2 (receptor LAMP-2A), presente na membrana lisossomal (LI; YANG; MAO, 2011; MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011). A macroautofagia (**figura 3A**) é o processo mais bem estudado e compreendido dentre os 3 tipos e é conhecida simplesmente como autofagia. Baseia-se na formação de uma dupla membrana (fagóforo) em torno de proteínas mal dobradas e organelas defeituosas (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; XIE; KLIONSKY, 2007). Independentemente do tipo, observa-se que as três vias são morfologicamente distintas, todavia, todas resultam na degradação e reciclagem pela via lisossomal, com liberação de produtos para reutilização celular (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; MIZUSHIMA; YOSHIMORI; LEVINE, 2010).

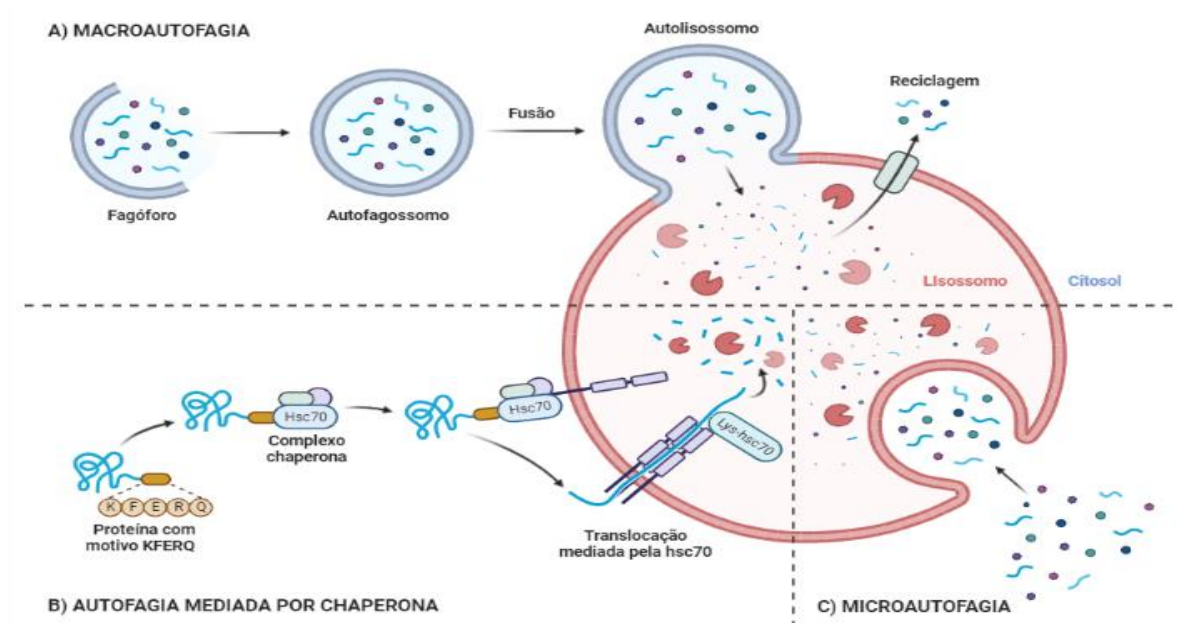


Figura 3: Mecanismo gerais envolvidos nos 3 tipos de processos autofágicos. Na macroautofagia (**A**) o processo começa com a formação do fagóforo e autofagossomo com a carga luminal a ser degradada. A etapa final é a formação do autolisossomo, onde se processará a degradação propriamente dita. A AMC (**B**) envolve o processo catabólico de polipeptídeos com um domínio KFERQ. Com a ajuda de complexos proteicos (chaperonas – cognato de choque térmico 70 (hsc70)), a proteína de interesse com o domínio KFERQ é transferida para o LAMP-2A, sendo internalizada e degradada juntamente com o complexo de chaperona. Na microautofagia (**C**), a carga a ser degradada (proteínas, membranas e organelas disfuncionais), por meio de invaginações da membrana lisossomal, é incorporada ao seu lúmen e as hidrolases lisossômicas realizam a degradação. A Figura foi traduzida do [BioRender.com](https://www.biorender.com).

A macroautofagia (simplesmente autofagia a partir de agora) é uma via catabólica envolvida com a eliminação de proteínas de vida longa e mal dobradas, inclusive de organelas inteiras, como as mitocôndrias (DIKIC, 2017). É um processo complexo e dinâmico, que envolve a formação de membrana dupla (fagóforo – **figura**

4 – etapa 1), seu fechamento, movimentação/deslocamento vesicular contendo material a ser degradado, fusão com lisossomo, degradação e reciclagem (YOSHII; MIZUSHIMA, 2017). Após a formação do autofagossomo (**figura 4 – etapa 2**), o material a ser degradado está preso em seu lúmen. A próxima etapa é entregar a carga/substrato sequestrada ao lisossomo. Assim, ocorre aproximação dessas duas bolsas vesiculares e a membrana externa do autofagossomo funde-se à membrana lisossomal (**figura 4 – etapa 3**), resultando no autofagolisossomo ou simplesmente autolisossomo (**figura 4 – etapa 4**). Os substratos e a membrana interna do autolisossomo são degradados pelas hidrolases lisossomais. Os produtos gerados por meio desse catabolismo são exportados, por meio de permeases lisossômicas (**figura 4 – etapa 5**), ao citoplasma da célula, onde servirão de substratos nas vias anabólicas (síntese) (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; LEVINE, 2010).

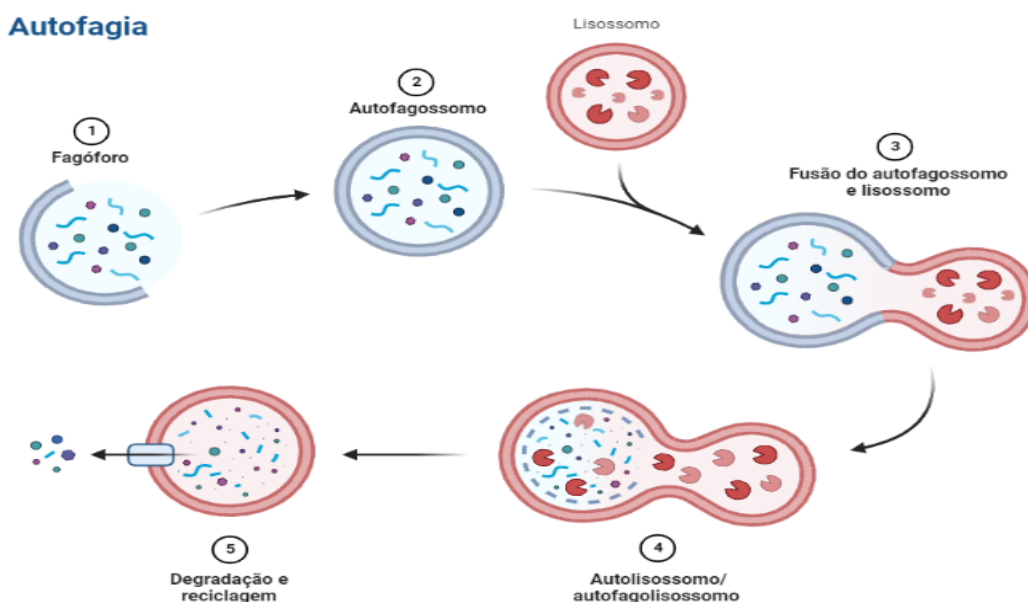


Figura 4: Etapas gerais envolvidas na autofagia. Assim que é ativada, a autofagia, de modo geral, ocorre em 5 etapas básicas: (1) sequestro do material a ser degradado e formação do fagóforo, membrana lipoproteica dupla; (2) formação completa do autofagossomo, envolvendo completamente o conteúdo a ser degradado; (3) aproximação e fusão do autofagossomo e autolisossomo, formando o autofagolisossomo (4); (5) degradação e reciclagem da carga proteica/membranar, liberando moléculas para as atividades biológicas. A Figura foi traduzida do [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Em 2016, Yoshinori Ohsumi, biólogo molecular, ganhou o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina por suas descobertas nos processos de degradação e reciclagem celular. Ohsumi, na década de 1990, ficou reconhecido pela identificação de genes que controlam/regulam os processos autofágicos, utilizando como modelo experimental as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) (GIBNEY; CASTELVECCHI, 2016). Atualmente, sabe-se que o processo autofágico é coordenado por um conjunto

de mais de 30 genes ATG (genes relacionados à autofagia). Esses genes codificam inúmeras proteínas indutoras e efetoras do fluxo autofágico, envolvidas com a agregação, sequestro e englobamento de proteínas mal dobradas e disfuncionais para que sejam degradadas no interior do autofagolisossomo. Dentre elas, existe a P62 (também chamada sequestrador 1 – SQSTM1), proteína de 440 aminoácidos e vários domínios de ligação. Um desses domínios interage com LC3-II, proteína envolvida no processo de formação do fagóforo e autofagossomo. A ligação de P62/SQSTM1 à LC3-II é essencial para o englobamento do conteúdo a ser degradado (MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011; MIZUSHIMA; YOSHIMORI; LEVINE, 2010; YOSHII; MIZUSHIMA, 2017). Nos processos autofágicos, durante a etapa de expansão do fagóforo e formação do autofagossomo, a proteína LC3-II é recrutada e a ela se liga a proteína P62/SQSTM1 (**figura 5**) com a carga de proteínas ubiquinadas do citoplasma. Após a formação do autolisossomo, a LC3-II e a P62/SQSTM1 são degradadas juntamente com o conteúdo internalizado no autofagossomo e sua membrana interna (KLIONSKY et al., 2021; PLAZA-ZABALA; SIERRA-TORRE; SIERRA, 2021).

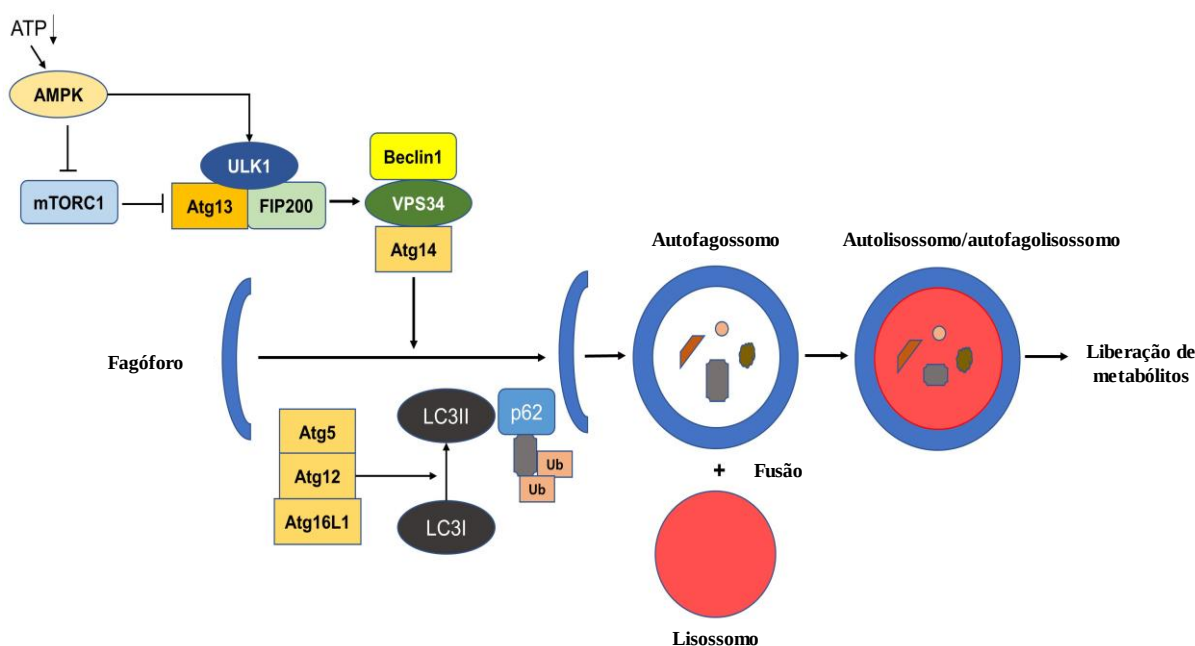


Figura 5: Visão geral simplificada do processo molecular da autofagia. Existem 2 principais complexos proteicos envolvidos com a regulação do fluxo autofágico: O complexo ULK1 e o complexo VPS34. Em situações de privação e/ou redução energética (ATP), a proteína AMPK é ativada e estimula o processo autofágico pela supressão de mTORC1 e fosforilação do complexo ULK1, ativando-o. ULK1 estimula o complexo VPS34 e dá início ao processo de formação do fagóforo, membrana dupla que engolfa organelas e proteínas disfuncionais. O complexo Atg5–Atg12–Atg16L1 promove a conversão de LC3-I em LC3-II, forma lipídica da LC3 cuja função é promover o crescimento e maturação do fagóforo. O material a ser degradado é ubiquinado (Ub) e reconhecido pela proteína

ubiquinante P62, que possui ponto de ligação a LC3-II. O autofagossomo completamente formado e com a carga ubiquinada para degradação funde-se com o lisossomo, formando o autolisossomo/autofagolisossomo. No autolisossomo, o meio ácido e as enzimas lisossomais degradam todo o conteúdo luminal, inclusive a LC3-II e P62. Após a finalização desse processo catabólico, os metabólitos são liberados no citoplasma celular para utilização em outras vias catabólicas e anabólicas. Figura retirada e traduzida de (SHIN, 2020).

A autofagia compreende um conjunto de processos altamente dinâmicos e coordenados. O monitoramento do fluxo autofágico pode ser avaliado, *in vitro*, por diversos métodos: (1) microscopia eletrônica, por meio da qual é possível analisar a presença de vacúolos citoplasmáticos, seu conteúdo e estágio de maturação; (2) microscopia de fluorescência por meio de GFP-LC3, para monitorar a localização dos vacúolos e lisossomos; (3) Western Blotting para LC3 e P62, para avaliação do fluxo autofágico; (4) citometria de fluxo, que permite a quantificação de autofagossomos por sondas fluorescentes; (5) silenciamento de genes relacionados à autofagia (Atg), o que permite compreender as proteínas envolvidas no processo (CONDELLO et al., 2019).

Sendo um processo natural e essencial para a vida e manutenção das células, a disfunção da autofagia está diretamente implicada com várias DNs como DA, ELA e DH, inclusive, na DP (MENZIES; FLEMING; RUBINSZTEIN, 2015). Essas doenças compartilham um mecanismo patogênético molecular e celular comum: apresentam agregação de proteínas mal dobradas/defeituosas que desencadeiam processos celulares múltiplos que resultam na degeneração neuronal progressiva (FRAKE et al., 2015; MENZIES; FLEMING; RUBINSZTEIN, 2015). A interrupção do fluxo autofágico em diferentes pontos ou estágios pode contribuir intensamente para a progressão de DNs. Nesse sentido, a busca por estratégias terapêuticas focadas no aumento da autofagia são bastante relevantes para o tratamento e/ou retardamento de distúrbios neurodegenerativos (FESTA et al., 2021; MAJUMDER et al., 2011; MICHIORRI et al., 2010; SARKAR et al., 2007).

2.3. Modelos animais da doença de Parkinson

Modelos animais são ferramentas importantes no estudo das DNs (BANERJEE et al., 2022). Em relação à DP, distúrbio neurodegenerativo crônico e incapacitante que tem se tornado cada vez mais prevalente na população (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021), esse tipo de pesquisa visa compreender quais são os fatores desencadeadores da doença. A maioria dos modelos replica pontos-chave na cascata neurodegenerativa, alguns com maior replicabilidade e especificidade do que outros, obviamente, mas todos com importantes contribuições na compreensão do funcionamento cerebral saudável e patológico (BANERJEE et al., 2022).

No caso específico da DP, a literatura científica apresenta modelos animais com diferentes perspectivas ou abordagens. Uma vez que a doença tem forte cunho genético, existem modelos baseados no silenciamento ou alterações de genes específicos responsáveis pelo desenvolvimento do Parkinson (LILL, 2016b; YAO et al., 2021). No contexto dos fatores ambientais, existem os modelos baseados na administração de neurotoxinas e/ou defensivos agrícolas (pesticidas) (REHMAN et al., 2021). Ainda no aspecto ambiental, há também os modelos farmacológicos, que se utilizam de drogas administradas central e/ou periféricamente para induzir características parkinsonianas (BANERJEE et al., 2022; DUTY; JENNER, 2011a). A escolha do modelo animal depende de qual(is) mecanismos pretende-se analisar, uma vez que a DP ter caráter multissistêmico com diversas vias bioquímicas envolvidas nos processos neurodegenerativos (IMBRIANI et al., 2018).

Um modelo bastante interessante para o estudo da DP é o da administração farmacológica da reserpina (RES), uma substância extraída de uma planta da espécie *Rauwolfia serpentina*. A RES é um alcaloide que foi utilizado por muito tempo para tratar quadros de hipertensão (MCQUEEN; DOYLE; SMIRK, 1954). Na última década, essa droga tem sido bastante utilizada como substância indutora de SM e SNM em animais, com o objetivo de mimetizar as características clínicas, histopatológicas e fisiológicas da DP (BISPO et al., 2019, 2022; DOS SANTOS et al., 2021; DRAOUI et al., 2019; FERNANDES et al., 2008, 2012; GOIS, 2020; IKRAM; HALEEM, 2019; LEAL et al., 2019b, 2019a; LEÃO et al., 2015, 2017; LINS et al., 2018; SANTOS, 2018; SANTOS et al., 2013).

De maneira geral, estudos com o referido modelo mostram que a reserpina induz comportamentos do tipo depressão (ANTKIEWICZ-MICHALUK et al., 2014;

ROJAS-CORRALES et al., 2004; RUIZ; CALLIARI; PAUTASSI, 2018; SKALISZ et al., 2002), alterações na memória de trabalho (DRAOUI et al., 2019), prejuízos cognitivos (IKRAM; HALEEM, 2019) e também induz alterações no comportamento motor (HAMADA; HONMA; HONMA, 2011; HAO et al., 2019; LEÃO et al., 2015). Histopatológica e neuroquimicamente, observa-se no modelo características clássicas da DP, como redução de neurônios dopaminérgicos na via NE, acúmulo de α -syn (GOIS, 2020; LEÃO et al., 2017; LEE et al., 2015; VAN ONSELEN; DOWNING, 2021).

Uma marca característica muito relevante do modelo da RES é a avaliação de SNM antes dos déficits motores. No Parkinson, os SNM surgem muitos anos antes dos SM (SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017), características relacionadas com vias não dopaminérgicas, especificamente os sistemas noradrenérgicos e serotoninérgicos (JELLINGER, 1991). Os estudos nesta fase sintomatológica não motora na DP (fase prodrômica) são de extrema relevância para se compreender as alterações iniciais que desencadeiam a doença e quais fatores são atuantes nos processos neurodegenerativos subsequentes.

O mecanismo de ação da RES baseia-se no bloqueio do transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2) em neurônios dopaminérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos, impedindo seu envesiculamento e, conseqüentemente, depletando a liberação desses mensageiros químicos nos terminais pré-sinápticos (CARLSSON, 1975; DUTY; JENNER, 2011a). Em contraste com outros modelos animais, a não seletividade neuronal da RES por neurônios dopaminérgicos é particularmente interessante, uma vez que a DP compreende um estágio prodrômico caracterizado por um fenótipo sintomatológico bastante heterogêneo e determinado por alterações nas vias serotoninérgicas (LEAL et al., 2019a, 2019b) e noradrenérgicas (GOIS, 2020).

Apesar de seu efeito não seletivo, a RES parece afetar de forma mais drástica os neurônios dopaminérgicos devido a sua maior taxa na renovação do conteúdo de dopamina (BERTLER, 1961; CARLSSON, 1975). O excesso de dopamina e seus metabólitos altamente tóxicos no meio intracelular dos neurônios nigrais causam alterações na maquinaria de funcionamento da célula por meio do processo de geração de EROs, que resulta em estresse oxidativo exacerbado e redução na liberação de dopamina no corpo estriado (LEÃO et al., 2015). Essas alterações na via nigroestriatal geradas pela administração de RES são a base para replicabilidade de SM e SNM da DP semelhantes à DP.

Trabalhos recentes com a RES têm mostrado que roedores com danos motores e cognitivos gerados pela droga apresentam boa resposta de recuperação/melhora frente à agentes químicos com potencial uso terapêutico (BESERRA-FILHO et al., 2019; PERES et al., 2016; SANTANA et al., 2021). Mais recentemente, foi mostrado que RES causa morte celular neuronal em decorrência da inibição do fluxo autofágico e acúmulo de α -syn em modelo animal de invertebrados (LEE et al., 2015).

Diante de todos os aspectos apresentados até o momento, a escolha do modelo da RES no presente estudo fundamenta-se no caráter progressivo (**figura 6**) gerado pela administração repetida em baixa dose da droga, replicando os déficits motores e não motores, bem como alterações neuroquímicas presentes no Parkinson.

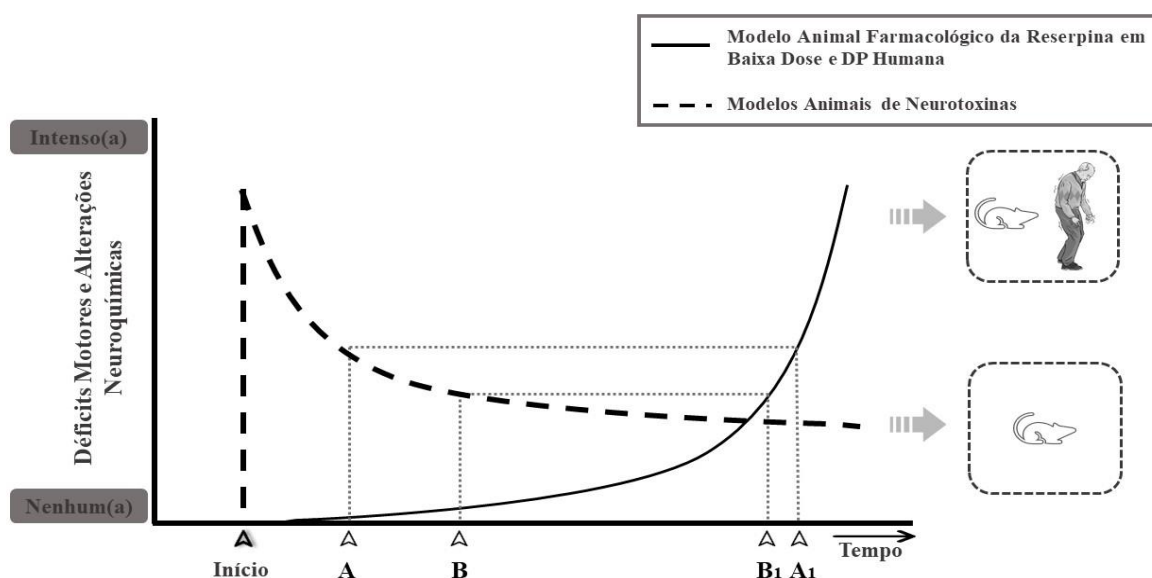


Figura 6: Modelo esquemático do curso temporal da gravidade dos déficits motores e alterações neuroquímicas na DP e em diferentes modelos animais. Modelos animais baseados na administração de neurotoxinas como 6 – hidroxidopamina (6-OHDA) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) geram déficits motores e alterações neuroquímicas rápidas e intensas (seta de início) que tendem a reduzir e estabilizar ao longo do tempo (seta A), em virtude dos mecanismos neuronais compensatórios. Em humanos e/ou no modelo animal da reserpina baseado na administração repetida em baixa dose, observa-se uma curva crescente e progressiva (começa entre a seta de início e a seta A do gráfico), o que permite melhor compreender os mecanismos fisiopatológicos que dão início e/ou atuam na progressão da doença. Com base nestes pressupostos, é importante destacar no gráfico que a seta A (ponto de queda dos déficits motores e alterações neuroquímicas no modelo animal da DP com base em neurotoxinas) equivale de forma contrária à seta A1 da DP humana/modelo animal farmacológico da reserpina (ponto de intensificação dos déficits motores e alterações neuroquímicas). De forma equivalente, a seta B dos modelos de neurotoxinas corresponde contrariamente à seta B1 na DP humana/modelo animal farmacológico da reserpina. Adaptado de (DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Avaliar as alterações neuroquímicas e comportamentais relacionadas a via nigroestriatal em modelo experimental de Parkinson induzido por reserpina.

3.2. *Objetivos específicos:*

1. Relacionar os déficits motores e não motores (alterações na massa corporal) às alterações neuroquímicas decorrentes da administração repetida e em diferentes doses de reserpina na via nigroestriatal de ratos.
2. Avaliar as alterações na tirosina hidroxilase e α -sinucleína na via nigroestriatal de ratos submetidos à administração repetida e em diferentes doses de reserpina.
3. Entender a relação da via autofágica mediada por LC3-II e P62/SQSTM1 no processo de neurodegeneração da via nigroestriatal de ratos submetidos à administração repetida e em diferentes doses de reserpina.
4. Compreender o papel da proteína DJ1/PARK7 nos processos neurodegenerativos e relacioná-lo aos processos de morte celular da via nigroestriatal de ratos submetidos à administração repetida e em diferentes doses de reserpina.
5. Avaliar processos de morte neuronal relacionados à proteína caspase-3 na via nigroestriatal de ratos submetidos à administração repetida e em diferentes doses de reserpina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Neste experimento, foram utilizados 64 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, obtidos do biotério setorial do Departamento de Fisiologia, da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Esses ratos tinham entre 6 e 7 meses de idade, pesando, em média, de 350 a 450 gramas. Os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Neurofisiologia (LNFS) sob condições de ventilação e temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) adequadas, com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e comida (*Ad libitum*). Eles ficaram alojados em gaiolas plásticas com dimensões de 33 x 40 x 17 cm (máximo de quatro animais por gaiola). Todos os procedimentos experimentais realizados nesta pesquisa foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA), da UFS (número do protocolo: **66/2018**). Além disso, os animais foram tratados de acordo com as orientações preconizadas nas leis, decretos, portarias e resoluções normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento e o número de animais utilizados no presente estudo.

4.2. Drogas e reagentes

As drogas utilizadas neste experimento foram: (1) Reserpina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO); (2) Cloridrato de Cetamina (Ketamina®, Agener União); (3) Cloridrato de Xilazina (Calmiun®, Agener União). O reagente foi o ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, BR), 99,7%.

4.3. Procedimentos gerais

Antes de iniciar os testes comportamentais e administração das injeções, os animais foram submetidos ao procedimento de manipulação, durante cinco minutos, por um período de cinco dias consecutivos, a fim de habituá-los à presença e manuseio dos experimentadores. Além disso, essa manipulação pré-experimentos objetivou diminuir comportamentos do tipo ansioso, principalmente, durante os testes comportamentais. Os experimentos foram realizados, preferencialmente, no mesmo horário, de 7h às 12h. Ao término das sessões experimentais de cada animal, os

aparatos foram limpos com solução de etanol a 10%, evitando assim vieses comportamentais devido a possíveis pistas odoríferas deixadas por outro animal.

Ao final dos testes comportamentais diários, os animais receberam uma injeção de RES ou de solução veículo (SV) da RES, por via subcutânea, a cada 48h. Foram preparadas 3 soluções de RES, a saber: **(1)** RES 0,1 (0,005 g – dissolvida em 50 µL de ácido acético glacial e esta solução foi diluída em 50 mL de água destilada); **(2)** RES 0,2 (0,01 g – dissolvida em 50 µL de ácido acético glacial e esta solução foi diluída em 50 mL de água destilada); **(3)** RES 0,5 (0,025 g – dissolvida em 50 µL de ácido acético glacial e esta solução foi diluída em 50 mL de água destilada). A SV da RES consistiu em 50 µL de ácido acético glacial diluídos em 50 mL de água destilada.

4.4. Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 4 grupos, com n = 16, cada um deles: (1) controle (CTRL) – animais tratados com SV; (2) RES 0,1; (3) RES 0,2; (4) RES 0,5 – animais tratados com uma solução de reserpina nas doses de 0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg, respectivamente. Foram administradas 15 injeções de RES, uma injeção a cada 48h, por via subcutânea (s.c.). Quarenta e oito horas após a 15ª injeção, 40 animais, 10 de cada grupo, foram decapitados, os encéfalos removidos e dissecados para obtenção da região do estriado e da substância negra (SN). As estruturas foram armazenadas em -80 °C para posterior processamento pela técnica de western blot (WB). Os outros 24 animais, 6 de cada grupo, foram perfundidos e os encéfalos armazenados em solução específica para posterior corte em criostato e preparados para realização de imuno-histoquímica para TH e α -sinucleína. Uma representação esquemática do delineamento experimental é apresentada na figura 1, logo abaixo.

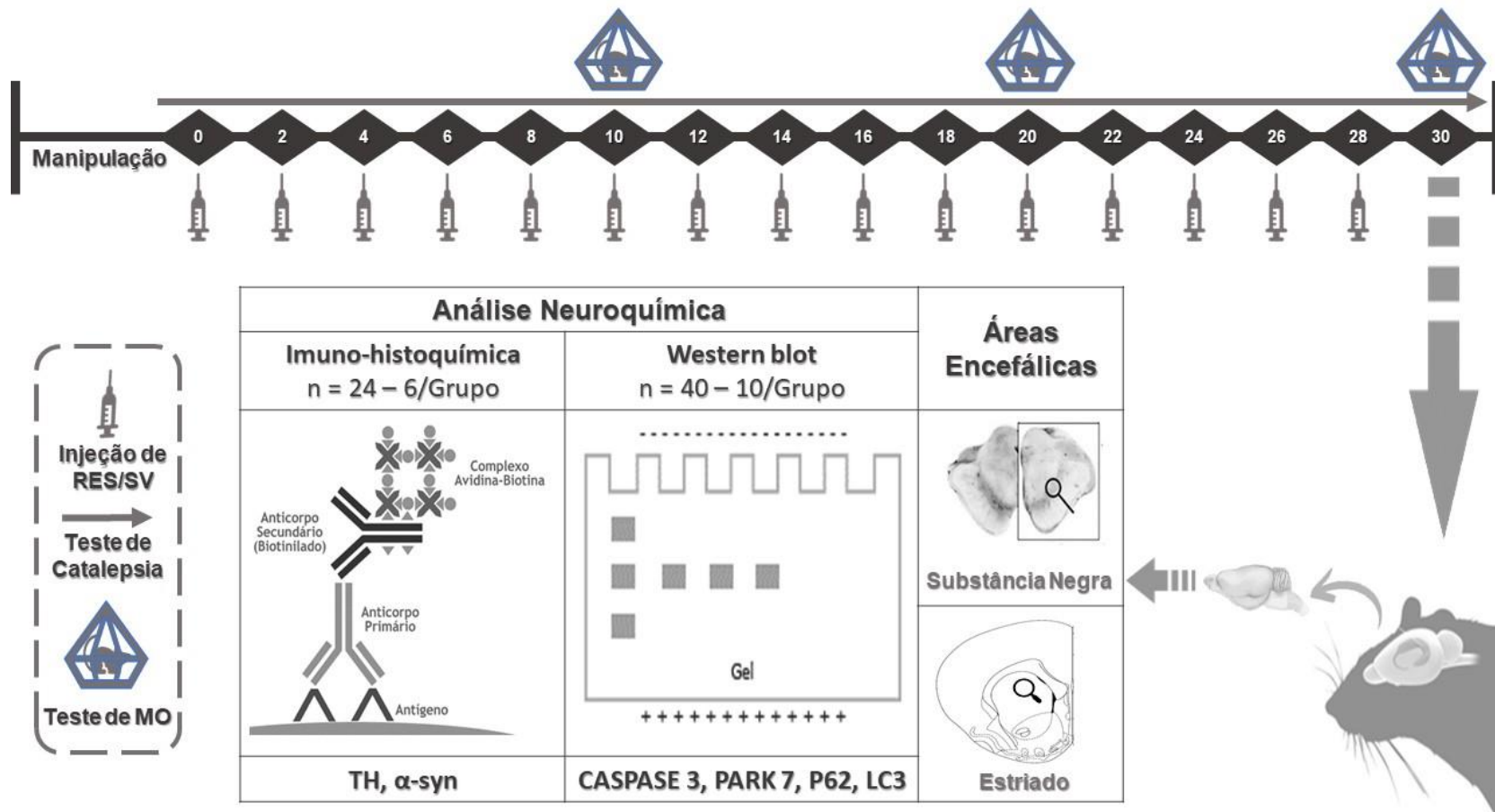


Figura 7: Delineamento Experimental. O experimento foi realizado em um período de tempo de 30 dias. As injeções de RES/SV foram administradas a cada 48h, assim como a realização do teste de catalepsia. O teste de movimento orais (MO) foi realizado nos dias 10, 20 e 30, 48h após 5ª, 10ª e 15ª injeções, respectivamente. Os encéfalos dos animais para análises neuroquímicas foram retirados no dia 30, 48h após a última injeção.

4.5. Avaliação da massa corpórea e testes comportamentais

Ao longo do experimento, para obter controle da progressão dos déficits motores, foram realizados dois testes para avaliação de parâmetros comportamentais similares aos encontrados em humanos com DP: os testes de catalepsia e de movimentos orais (MO). Para avaliação de SNM, foi realizada a avaliação da massa corpórea dos animais. Os testes comportamentais de avaliação motora voluntária e involuntária, bem como a análise da variação de massa entre os diferentes grupos são descritos com maiores detalhes nas subseções seguintes.

4.5.1. Avaliação da massa corporal (MC)

A pesagem dos animais foi realizada a cada 2 injeções, ou seja, de 4 em 4 dias. A medição da massa corpórea (MC) teve 2 objetivos: (1) Utilização da massa de cada animal para ajustar o volume de RES ou SV administrado; (2) Acompanhar as alterações ocorridas na massa como consequência da administração de RES. O peso bruto (em gramas) de cada animal foi coletado e, ao longo do experimento, foi feita a análise para observação constante das alterações. O resultado final é apresentado em porcentagem (%) e para isso foi utilizada a fórmula a seguir: % de massa perdida = $PF/PB \times 100$ (PF = Peso final; PI = Peso inicial, ambos em grama).

4.5.2. Teste de catalepsia

O teste de catalepsia avalia a latência para o rato iniciar um movimento voluntário e corrigir sua postura, a partir de uma posição inicial imposta pelo experimentador (SANBERG et al., 1988). Diante disso, o teste foi realizado colocando-se as duas patas dianteiras do animal sobre uma barra horizontal posicionada a nove centímetros (9,0 cm) de altura da plataforma de apoio das patas traseiras (figura 7). Com a ajuda de um cronômetro, foi contabilizado o tempo de permanência do animal na posição inicial. A contagem foi interrompida no momento de alteração dessa posição (realização de movimentos voluntários com uma ou ambas as patas dianteiras para correção da postura imposta inicialmente pelo experimentador). O teste foi realizado a cada 48h, com três tentativas consecutivas, cada uma com tempo limite de 180 segundos. O resultado do teste, a cada 48h, foi a média das três tentativas.

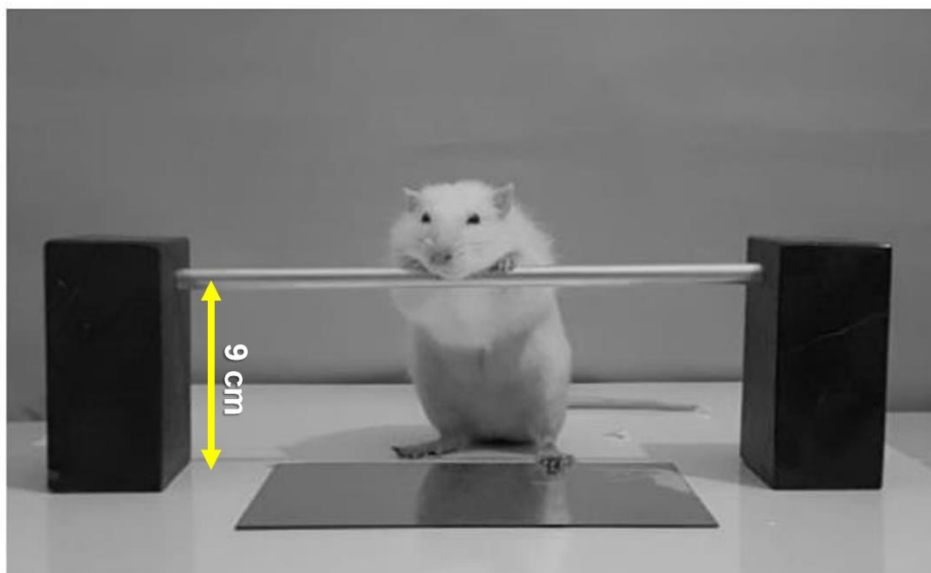


Figura 8: Imagem representativa do teste de catalepsia. *FONTE:* Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).

O teste de MO é utilizado para avaliar movimentos involuntários e estereotipados na região oral do animal. Consistiu em colocá-lo em uma gaiola (40 cm × 40,5 cm × 20 cm), com espelhos na base e atrás, o que possibilitou ao pesquisador a visualização dos movimentos do rato em vários ângulos (**figura 8**). Os animais foram avaliados de forma individual, por 10 minutos e, nesse teste, foram observados 2 parâmetros: (1) O movimento de mastigação no vácuo/vazio (MMV), caracterizado pela movimentação da mandíbula no plano vertical, não direcionada a qualquer estímulo e/ou material físico; (2) O tempo de tremor em repouso (TTR), relacionado aos tremores da região oral do animal, principalmente a mandíbula. Uma vez que o teste se baseia na avaliação de SM, ele foi realizado nos 10º, 20º e 30º dias, 48h após a 5ª, 10ª e 15ª injeções, respectivamente. A contagem dos parâmetros supracitados foi interrompida durante o *grooming* de cada animal.



Figura 9: Imagem representativa do teste de MO. *FONTE: Laboratório de Neurobiologia Comportamental e Evolutiva (LaNCE).*

4.6. Perfusão dos animais

Os animais foram perfundidos no dia 30, 48h após a última injeção de RES ou SV. Para isso, foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (150 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), por via intraperitoneal. Completamente anestesiados, de modo geral, foi realizada uma incisão no músculo diafragma para expor o coração. Foi feita a perfusão transcardíaca com tampão fosfato salina (PBS, pH 7,2 – 7,4) para a lavagem dos vasos, por 10 minutos, e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (PB, pH 7,4, 100 mmol/L), por 15 minutos, para fixação dos tecidos. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e mergulhados em PFA a 4%, a 4°C, por 24h. Sequencialmente, os encéfalos foram acondicionados em solução de sacarose a 30% e crioprotetidos à temperatura de 4°C.

4.7. Obtenção das áreas de interesse

Para a realização da imuno-histoquímica, os encéfalos foram seccionados, na sua totalidade, em criostato a 50 μ m, a temperatura de -20°C, para obter as áreas de

interesse do estudo (estriado e substância negra). As secções foram distribuídas, sequencialmente, em 4 compartimentos contendo solução anticongelante à base de PB e etilenoglicol. Por fim, o material foi armazenado à 4°C até a realização da bateria de imuno-histoquímica.

4.8. Imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH) e α -syn

A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido em nosso laboratório e consistiu nos seguintes passos: (1) lavagem dos tecidos em tampão fosfato (PB) 0,1 mol/L, pH 7,4, quatro vezes, por 5 min cada; (2) lavagem dos tecidos em PB + água oxigenada (H_2O_2), para bloqueio da peroxidase endógena, por 20 min; (3) repetição do procedimento 1; (4) lavagem do material em leite desnatado, para bloqueio de ligações inespecíficas, durante 15 min; (5) encubação dos tecidos no anticorpo primário monoclonal anti-proteína de interesse (TH (produzido em coelho, AB152 Chemicon, USA, concentração de 1:3.000); diluído em Triton-X 100 e mantidos overnight (de 12h a 18h) em agitador automático; (6) repetição do procedimento 1; (7) encubação dos tecidos no anticorpo secundário biotiniliado anti-anticorpo primário para TH (anti-coelho produzido em cabra, Sigma Chemical Company, concentração de 1:1.500), diluídos em Triton-X 100 (0,4%) e mantidos sob agitação automática por 2h; (8) repetição do procedimento 1; (9) encubação do material no ABC (Complexo Avidina-Biotina, ABC Elite kit, Vector Labs, Burlingame, USA concentração de 1:1000), diluído em Triton-X 100 (0,4%) + NaCl 0,9%, e mantido no agitador por duas horas; (10) repetição do procedimento 1; (11) revelação do material por meio de lavagens dos tecidos em uma solução de Diaminobenzidina (DAB) + H_2O_2 ; (12); repetição do procedimento 1; (13) montagem do tecido em lâminas gelatinizadas. Após a montagem, o material foi reidratado, intensificado em tetróxido de ósmio 0,1% e submetido a uma bateria de desidratação em álcool e xilol. As lâminas foram cobertas com meio de montagem e fixação de uma lamínula.

4.9. Aquisição de imagens e contagem de células

As imagens das lâminas foram obtidas com uma câmera fotográfica digital modelo monocromático (Ds-Fi1c, Nikon Corporation inc., Japan) acoplada a um microscópio óptico (Nikon Eclipse Ci-S, Nikon Corporation inc., Japan), e programa de computador específico para essa finalidade (Ds-U3, Labconco Corporation inc., USA). Para

obtenção das áreas corretas para análise, foi utilizado como referência o atlas do encéfalo de ratos (*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*) (PAXINOS; WATSON, 2005). Feito isso, para cada animal analisado, foram tiradas imagens dos cortes no aumento de 10X, no qual foi possível obter toda a extensão da área pretendida, além da presença ou ausência de células imunorreativas na região.

Para cada área, de cada animal, foram tiradas 4 imagens (de quatro secções distintas). A contagem de células correspondeu à média entre as quatro secções das respectivas áreas. Para esta análise quantitativa, foram utilizadas imagens do estriado e da substância negra (TH – estriado e SNpc; α -syn – estriado e SNpr). Todas as células imunorreativas à TH da SNpc foram contadas utilizando o software ImageJ (versão 4.8). As contagens foram realizadas de forma “cega”, sem que o experimentador soubesse a que grupo pertencia cada imagem analisada. Os dados foram normalizados pela média dos valores obtidos nos animais pertencentes ao grupo controle.

4.10. Avaliação por densitometria óptica (DO)

As etapas para a análise de DO foram similares aos descritos para a contagem de células no que tange à referência utilizada para obtenção da área de interesse (PAXINOS; WATSON, 2005), quantidade de fotos por animal e normalização dos resultados obtidos pela média do grupo controle. Para garantir resultados fidedignos, as imagens foram submetidas a mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho ou contraste. A DO relacionada à imunomarcção para TH foi realizada na região do estriado. Para a imunomarcção para α -syn, a DO foi feita no estriado e na SNpr. Os procedimentos da DO foram: (1) transformar as imagens em preto e branco; (2) inversão das cores da imagem (o que era preto ficou branco e vice-versa); (3) delineamento e mensuração da área de interesse, mantendo-se um padrão de tamanho do quadrante. Os dados apresentados corresponderam à média entre as quatro secções das respectivas áreas de cada animal.

4.11. Dissecção das áreas cerebrais

No dia 30, 48h após a 15ª injeção, 40 animais, 10 de cada de cada grupo, foram mortos por decapitação. Os encéfalos foram removidos imediatamente e colocados

em uma placa de Petri forrada com papel alumínio para dissecação da substância negra e estriado. Como referência para a dissecação correta das áreas mencionadas, foi utilizado como referência o atlas do encéfalo de ratos (*The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*) (PAXINOS; WATSON, 2005). Todo o procedimento de dissecação foi realizado com a placa e as amostras mantidas em gelo. As áreas retiradas foram pesadas e imediatamente armazenadas a -80 °C para posterior análise proteica pela técnica de Western Blot (WB).

4.12. Western blot (WB)

As estruturas foram maceradas e homogeneizadas em solução de lise. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado para análise proteica. Foi feita a eletroforese e posterior imunodeteção para as proteínas LC3-II, P62/SQSTM1, PARK7/DJ-1 e caspase-3. As estruturas (substância negra – SN e estriado) foram homogeneizados em tampão de lise (Tris 100 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; EDTA 10 mM; Triton X-100 1%; desoxicolato de sódio 0,5%; coquetéis inibidores de protease e de fosfatase). As amostras foram maceradas e homogeneizadas na solução, sempre mantidas em gelo para evitar a degradação proteica. O lisado foi centrifugado por cinco minutos a 7.000g, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado em freezer a -80°C.

O fracionamento das proteínas do lisado foi realizado por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio). Foram utilizados géis de poliacrilamida 12% ou 15%. As proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Fluoreto de Polivinilideno). A membrana foi incubada, por 1h, com TBS-T ((Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,4) contendo BSA a 5%. Sequencialmente, a membrana foi incubada no anticorpo primário (produzido em coelho – diluição de 1:1000), por 1h, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 3x com TBS-T, durante cinco minutos cada lavagem. A membrana foi incubada no anticorpo secundário conjugado com peroxidase (produzido em coelho – diluição de 1:10.000), também por 1h. Por fim, a membrana foi lavada cinco vezes, por 5 minutos, com TBS-T.

4.13. Análise dos Géis

As imagens dos géis foram analisadas por meio do programa ImageJ. O controle de normalização das amostras foi realizado por meio do Ponceou S, isto é, os dados foram normalizados pela quantidade de proteína total (SANDER et al., 2019).

4.14. Análise estatística

Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e apresentaram distribuição normal, assim, foram aplicados testes paramétricos apropriados. Para análise das diferenças nos testes comportamentais de catalepsia e de MO, bem como para as alterações na MC, foi utilizada a ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguida do pós-teste de Fisher's. A análise de células imunorreativas para TH e α -syn (DO no estriado e contagem na SN foi feita por meio da ANOVA de uma via, também seguida do pós-teste de Fisher's. Os dados apresentados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média ($\pm$ E.P.M) com nível de significância de $p < 0,05$ considerado para diferenças estatisticamente significativas. Estas análises foram realizadas com a utilização do software *Graphpad Prism* 8.0.

5. RESULTADOS

Inicialmente, são apresentados os resultados das alterações na MC, seguidas das avaliações motoras voluntária (teste de catalepsia) e involuntária (MO). Sequencialmente, são relatados os dados neuroquímicos para os diferentes marcadores moleculares supracitados nos materiais e métodos (TH, α -syn, LC3-II, P62/SQTM1, PARK7/DJ-1 e caspase-3, nesta ordem).

5.1. Alterações na massa corporal dos animais

Ao longo de todo o experimento, o peso corporal dos animais foi acompanhado a cada duas injeções. A ANOVA de duas vias de medidas repetidas evidenciou efeito do tratamento (CTRL X RES – [F (3, 60) = 104,9; $p < 0,0001$]), do tempo (dias de tratamento – [F (8, 480) = 104,6; $p < 0,0001$]) e interação tempo X tratamento ([F (24, 480) = 44,69; $p < 0,0001$]). O pós-teste de múltiplas comparações de Fisher's LSD revelou redução de MC dos animais tratados com RES nas diferentes doses quando comparados ao grupo CTRL. Houve redução na MC dos grupos RES 0,5 em relação aos grupos CTRL, RES 0,1 e RES 0,2, respectivamente, do dia 8 (48h após a 4ª injeção) até o último do experimento, no dia 30 (48h após a 15ª injeção – [RES 0,5 X CTRL: p^8 ; p^{12} ; p^{16} ; p^{20} ; p^{24} ; p^{28} ; $p^{30} < 0,0001$; RES 0,5 X RES 0,1: p^8 ; p^{12} ; p^{16} ; p^{20} ; p^{24} ; p^{28} ; $p^{30} < 0,0001$; RES 0,5 X RES 0,2: p^8 ; p^{12} ; p^{16} ; p^{20} ; p^{24} ; p^{28} ; $p^{30} < 0,0001$] – **figura 10 – barra a**).

O grupo RES 0,2, em relação ao grupo CTRL e o RES 0,1, também apresentou redução significativa da MC. O grupo RES 0,2, em relação ao CTRL, apresentou redução da MC no 8º dia (48h após a 4ª injeção) e continuou a reduzir até o fim do experimento, no dia 30 (48h após a 15ª injeção – [RES 0,2 X CTRL: $p^8 = 0,0229$; p^{12} ; p^{16} ; p^{20} ; p^{24} ; p^{28} ; $p^{30} < 0,0001$] – **figura 10 – barra b**). O grupo RES 0,2, em relação ao RES 0,1, teve redução da MC no 12º dia (48h após a 6ª injeção) e as diferenças seguiram até o último do experimento, no dia 30 (48h após a 15ª injeção – [RES 0,2 X RES 0,1: p^{12} ; p^{16} ; p^{20} ; p^{24} ; p^{28} ; $p^{30} < 0,0001$] – **figura 10 – barra c**). O grupo RES 0,1, em relação ao CTRL, apresentou redução da MC do dia 16 (48h após a 8ª injeção) ao até o final do experimento (48h após a 15ª injeção – [$p^{16} = 0,0209$; $p^{20} = 0,0075$; $p^{24} = 0,0045$; p^{28} ; $p^{30} < 0,0001$] – **figura 10 – barra d**).

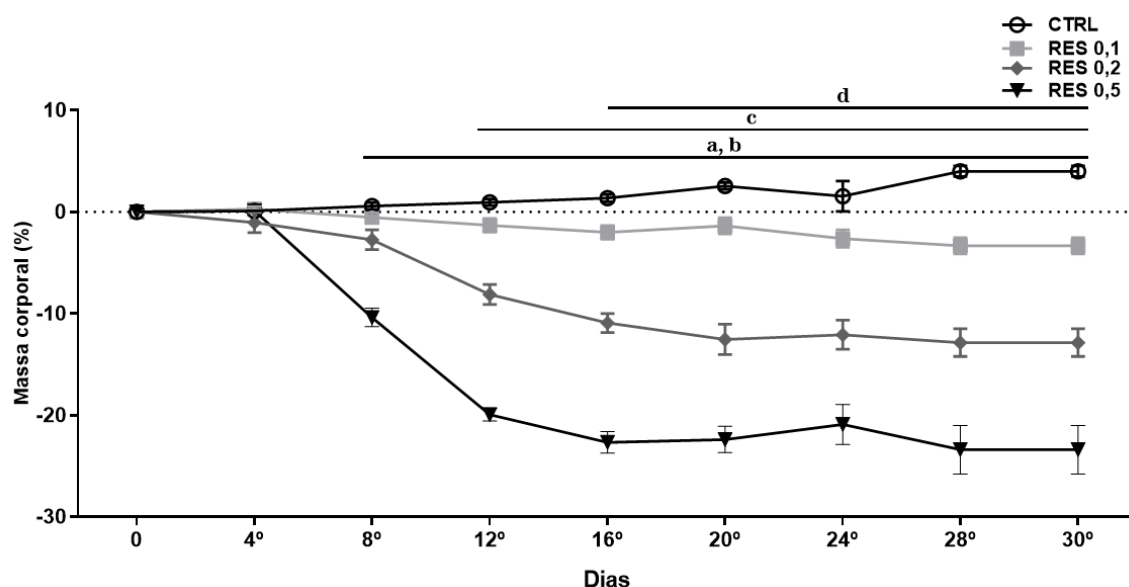


Figura 10: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na massa corpórea dos animais. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, levou a uma redução gradativa da MC dos animais tratados com RES, principalmente nos grupos RES 0,5 e RES 0,2, respectivamente. O grupo RES 0,5 apresentou redução da MC em relação ao CTRL, RES 0,1 e 0,2 do 8º ao 30º dia (**barra a**). O grupo RES 0,2 apresentou redução da MC em relação ao CTRL do 8º ao 30º dia (**barra b**). Em relação ao grupo RES 0,1, o grupo RES 0,2 apresentou redução da MC do 12º ao 30º dia (**barra c**). O grupo RES 0,1 apresentou redução da MC em relação ao CTRL do 16º ao 30º dia (**barra d**). Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.2. Alterações comportamentais motoras

5.2.1. Comportamento motor no teste de catalepsia

Na catalepsia, foi observado, por meio da ANOVA de duas vias de medidas repetidas, efeito do tratamento (CTRL X RES – [F (3, 60) = 49,22; $p < 0,0001$]), do tempo (dias de tratamento – [F (15, 900) = 140,7; $p < 0,0001$]) e interação tempo X tratamento ([F (45, 900) = 23,17; $p < 0,0001$]). O pós-teste de múltiplas comparações de Fisher's LSD revelou diferenças significativas na latência para a realização de movimentos nos grupos RES quando comparados ao CTRL, além de diferenças entre os grupos RES. O grupo RES 0,5 apresentou maior tempo para sair da posição inicial em relação ao CTRL e os grupos RES 0,1 e RES 0,2 a partir do dia 6 (48h após a 3ª injeção). As diferenças entre RES 0,5 e CTRL se mantiveram até o fim do experimento (RES 0,5 X CTRL – [$p^6 = 0,0206$; p^8 ; p^{10} ; p^{12} ; p^{14} ; p^{16} ; p^{18} ; p^{20} ; p^{22} ; p^{24} ; p^{26} ; p^{28} e $p^{30} < 0,0001$] – **figura 11 – barra a**).

As diferenças entre RES 0,5 e RES 0,1 seguiram do dia 6 ao dia 18 (48h após a 9ª injeção – [$p^6 = 0,0084$; p^8 ; p^{10} ; p^{12} ; p^{14} ; $p^{16} < 0,0001$; $p^{18} = 0,0066$] – **figura 11 – barra b**). Nos dias 22 e 26 (48h após a 11ª e a 13ª injeções, respectivamente) também foram observadas diferenças entre RES 0,5 e RES 0,1, porém, contrariamente ao observado inicialmente, isto é, RES 0,1 apresentou maior latência para realização de movimentos quando comparado ao grupo RES 0,5 (RES 0,1 X RES 0,5 – [$p^{22} = 0,0040$; $p^{26} = 0,0002$] – **figura 11 – b**). As diferenças entre RES 0,5 e RES 0,2 seguiram do dia 6 ao dia 12 (48h após a 6ª injeção – [$p^6 = 0,0172$; p^8 ; p^{10} ; $p^{12} = 0,0017$] – **figura 11 – barra c**). Nos dias 22, 24, 26 e 28 (48h após a 11ª, 12ª, 13ª e 14ª injeções, respectivamente) também foram observadas diferenças entre RES 0,5 e RES 0,2, entretanto, contrariamente ao observado inicialmente, ou seja, RES 0,2 apresentou maior latência para realização de movimentos quando comparado ao grupo RES 0,5 (RES 0,2 X RES 0,5 – [$p^{22} = 0,0014$; $p^{24} = 0,0008$; $p^{26} = 0,0001$; $p^{28} = 0,0307$] – **figura 11 – c**).

Também foram observadas diferenças entre o grupo RES 0,2 e os grupos CTRL e RES 0,1. O grupo RES 0,2, em relação ao CTRL, apresentou maior tempo de permanência na barra a partir do dia 10 (48h após a 5ª injeção) e essas diferenças seguiram até o final do experimento ([p^{10} ; p^{12} ; p^{14} ; p^{16} ; p^{18} ; p^{20} ; p^{22} ; p^{24} ; p^{26} ; p^{28} e $p^{30} < 0,0001$] – **figura 11 – barra d**). O grupo RES 0,2, em relação ao RES 0,1, apresentou maior latência na execução de movimentos do dia 10 (48h após a 5ª injeção) ao dia 20 (48h após a 10ª injeção – [p^{10} ; p^{12} ; p^{14} ; $p^{16} < 0,0001$; $p^{18} = 0,0025$; $p^{20} = 0,0081$] – **figura 11 – barra e**). O grupo RES 0,1, em relação ao CTRL, apresentou maior tempo de latência do dia 12 (48h após a 6ª injeção) até o fim do experimento ([$p^{12} = 0,0189$; p^{14} ; p^{16} ; p^{18} ; p^{20} ; p^{22} ; p^{24} ; p^{26} ; p^{28} e $p^{30} < 0,0001$] – **figura 11 – barra f**).

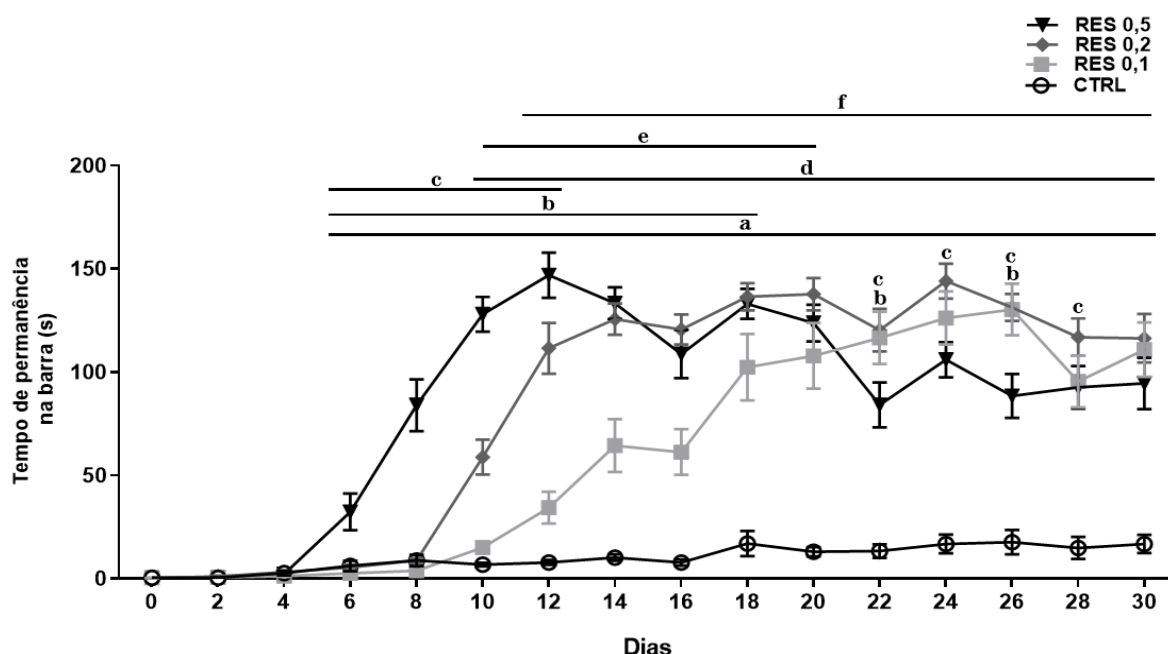


Figura 11: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES no teste de catalepsia. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, induziu aumento progressivo no tempo de permanência dos animais na barra. O grupo RES 0,5, em relação ao CTRL, apresentou danos motores do dia 6 ao dia 30 (**barra a**). O grupo RES 0,5, do dia 6 ao dia 18, permaneceu mais tempo na barra em relação ao RES 0,1 (**barra b**). A **barra c** indica o maior tempo na barra do grupo RES 0,5 em relação ao RES 0,2, com início no dia 6 e término no dia 12. Os símbolos **b** e **c** indicam diferenças pontuais entre RES 0,5 X RES 0,1 (**b**) e RES 0,5 X RES 0,2 (**c**), representando maior latência na execução de movimentos dos grupos RES 0,1 e 0,2 em relação ao RES 0,5. Do 10º ao 30º dia, o grupo RES 0,2 apresentou maior dificuldade para realização de movimentos voluntários em relação ao CTRL (**barra d**). Do 10º ao 20º dia, o grupo RES 0,2 apresentou maior dificuldade para realização de movimentos voluntários em relação ao grupo RES 0,1 (**barra e**). O grupo RES 0,1 apresentou maior dificuldade para realização de movimentos voluntários em relação ao CTRL do dia 12 até o fim do experimento (**barra f**). Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.2.2. Comportamento motor no teste de movimentos orais (MO):

Para o parâmetro motor de movimento de mastigação no vazio (MMV), a ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 60) = 37,68; $p < 0,0001$]), do tempo (dias de tratamento – [F (2, 120) = 39,56; $p < 0,0001$]) e também foi observada a interação tempo X tratamento ([F (6, 120) = 6,123; $p < 0,0001$]). O pós-teste de múltiplas comparações de Fisher's LSD revelou diferenças significativas entre o grupo RES 0,5 e os grupos CTRL, RES 0,1 e RES 0,2 no dia 10 (48h após a 5ª injeção), resultando em aumento significativo dos MMV ([RES 0,5 X CTRL; $p < 0,0001$; RES 0,5 X RES 0,1; $p < 0,0001$; RES 0,5 X RES 0,2; $p = 0,0398$] – **figura 12A (*) – 10º dia**). As mesmas diferenças foram observadas entre o grupo RES 0,2 e os grupos CTRL e RES 0,1, respectivamente ([RES 0,2 X CTRL; $p = 0,0002$; RES 0,2 X RES 0,1; $p = 0,0094$] – **figura 12A (#) – 10º dia**).

No dia 20 (48h após a 10^a injeção), foram observados aumentos no número de MMV entre o grupo RES 0,5 e os grupos CTRL e RES 0,1, respectivamente ([RES 0,5 X CTRL; $p < 0,0001$; RES 0,5 X RES 0,1; $p < 0,0001$]), assim como entre o grupo RES 0,2 e os grupos CTRL e RES 0,1, respectivamente ([RES 0,2 X CTRL; $p < 0,0001$; RES 0,2 X RES 0,1; $p < 0,0001$] – **figura 12A (*) – 20º dia**). O grupo RES 0,1, em relação ao CTRL, também apresentou aumento dos MMV ([RES 0,1 X CTRL; $p = 0,0027$] – **figura 12A (#) – 20º dia**). No dia 30, foi observado aumento do número de MMV entre todos os grupos RES e o CTRL ([RES 0,5 X CTRL; $p < 0,0001$; RES 0,2 X CTRL; $p < 0,0001$; RES 0,1 X CTRL; $p = 0,0002$] – **figura 12A (*) – 30º dia**).

Para o parâmetro motor de tempo de tremor em repouso (TTR), a ANOVA de duas vias de medidas repetidas revelou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 60) = 10,85; $p < 0,0001$]), não houve efeito do tempo (dias de tratamento – [F (2, 120) = 1,786; $p = 0,1721$]) e também não foi observada a interação tempo X tratamento ([F (6, 120) = 1,269; $p = 0,2766$]). O pós-teste de múltiplas comparações de Fisher's LSD revelou aumento do TTR do grupo RES 0,5 em relação ao CTRL, no dia 10 (48h após a 5^a injeção - [RES 0,5 X CTRL; $p = 0,0264$] – **figura 12B (#) – 10º dia**). Do mesmo modo, houve aumento significativo do TTR no grupo RES 0,2 quando comparado aos grupos CTRL e RES 0,1, respectivamente ([RES 0,2 X CTRL; $p = 0,0064$; RES 0,2 X RES 0,1; $p = 0,0457$] – **figura 12B (*) – 10º dia**). No dia 20 (48h após a 10^a injeção), foi observado aumento no TTR entre todos os grupos RES e o grupo CTRL ([RES 0,5 X CTRL; $p = 0,0135$; RES 0,2 X CTRL; $p = 0,0001$; RES 0,1 X CTRL; $p = 0,0338$] – **figura 12B – 20º dia**). No dia 30, foi observado aumento no TTR entre os grupos RES 0,5 e RES 0,2 em relação ao CTRL ([RES 0,5 X CTRL; $p < 0,0001$; RES 0,2 X CTRL; $p = 0,0022$] – **figura 12B (*) – 30º dia**). O grupo RES 0,5 também apresentou aumento do TTR em relação ao RES 0,1 ([RES 0,5 X RES 0,1; $p = 0,0029$] – **figura 12B (#) – 30º dia**).

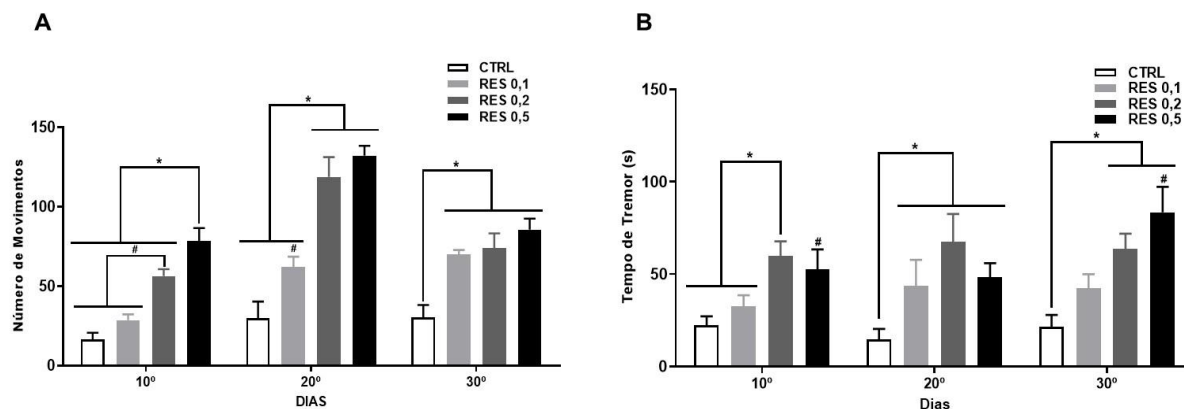


Figura 12: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES no teste de MO. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, nos 10°, 20° e 30° dias, induziu aumento no número de MMV (A) nos grupos RES em relação ao grupo CTRL, bem como entre eles. No dia 10, o grupo RES 0,5 apresentou aumento no número de MMV em relação ao CTRL, 0,1 e 0,2 (*). De forma equivalente, RES 0,2 apresentou aumento nos MMV quando comparado ao CTRL e RES 0,1 (#). No 20° dia, o aumento no número de MMV foi observado entre os grupos RES 0,2 e RES 0,5 em relação ao CTRL e RES 0,1 (*). Também ocorreu aumento no número de MMV no grupo RES 0,1 em relação ao CTRL (#). No 30° dia, os três grupos RES apresentaram aumento no número de MMV em relação ao controle, mas não entre si. De modo semelhante, a RES induziu aumento no TTR (B) nos grupos RES quando comparados ao grupo CTRL e também entre si. No dia 10, o grupo RES 0,5 mostrou aumento no TTR em relação ao CTRL (#). Já o RES 0,2 evidenciou aumento no TTR em relação ao CTRL e ao RES 0,1 (*). No 20° dia, todos os grupos RES mostraram aumento no TTR em relação ao CTRL. No 30° dia, os grupos RES 0,2 e 0,5 evidenciaram aumento do TTR quando comparados ao CTRL (*) e o RES 0,5 em relação ao RES 0,1 (#). Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.3. Alterações neuroquímicas na via nigroestriatal:

5.3.1. Alterações na proteína tirosina hidroxilase (TH)

A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento na imunorreatividade para TH tanto na região do estriado (RES X CTRL – [F (3, 20) = 5,621; p = 0,0058]) quanto na SNpc (RES X CTRL – [F (3, 20) = 5,929; p = 0,0046]) dos 3 grupos RES quando comparados ao grupo CTRL (para ambas as regiões). Todavia, não houve diferenças entre os grupos RES. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou redução na imunomarcagem de TH estriatal de aproximadamente de 62% (RES 0,1), 54% (RES 0,2) e 50% (RES 0,5) em relação ao CTRL (RES 0,1 X CTRL – p = 0,0014; RES 0,2 X CTRL – p = 0,0043; RES 0,5 X CTRL – p = 0,0072 – **figura 13A – representação gráfica; figuras 13 C, D, E e F – figuras representativas**). Na região da SNpc, o pós-teste de Fisher's LSD mostrou redução de células TH⁺ de aproximadamente 19% (RES 0,1), 22% (RES 0,2) e 29% (RES 0,5) em relação ao CTRL (RES 0,1 X CTRL – p = 0,0196; RES 0,2 X CTRL – p = 0,0067; RES 0,5 X CTRL – p = 0,0006 – **figura 13B – representação gráfica; figuras 13 C', D', E' e F' – figuras representativas**).

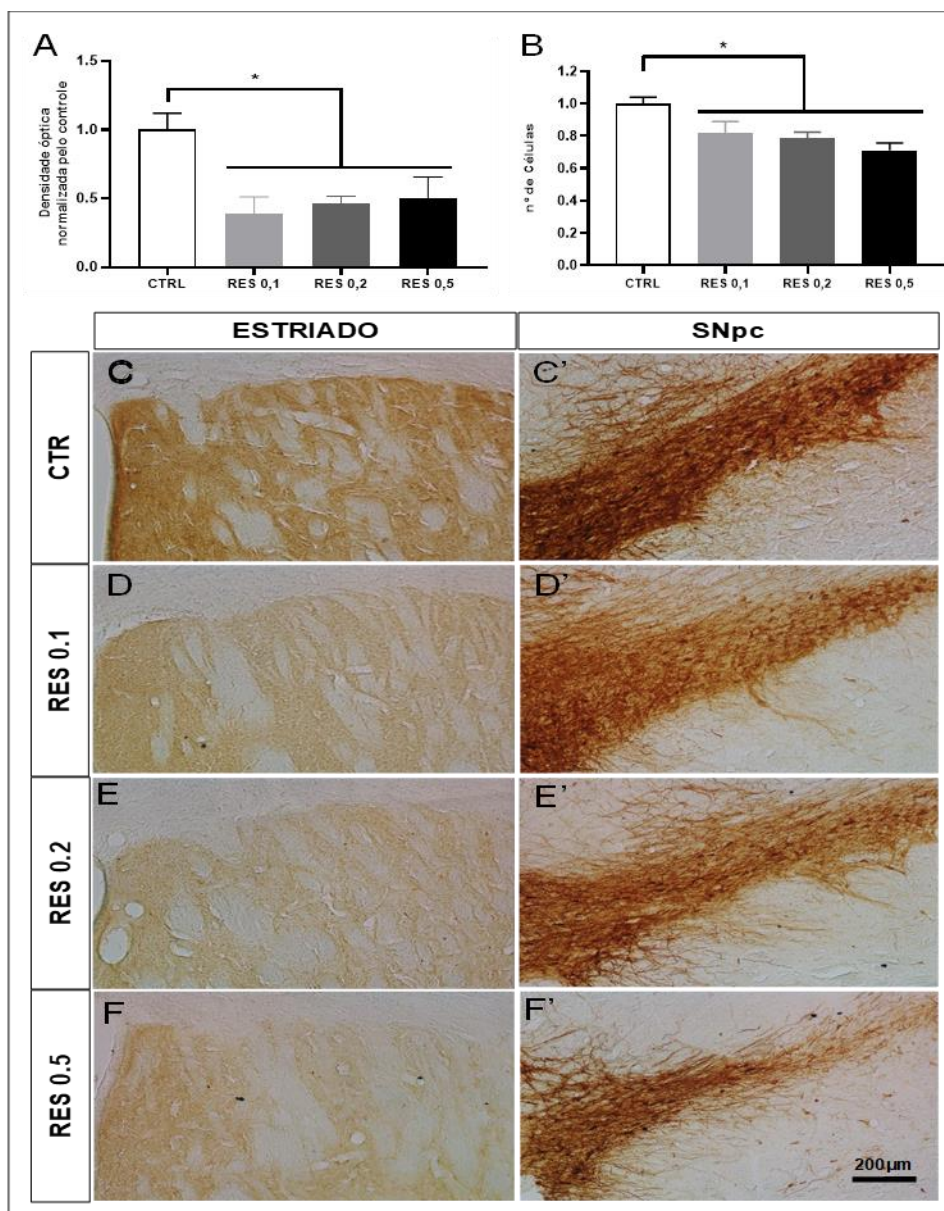


Figura 13: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na imunorreatividade para célula TH⁺ na região do estriado e da SNpc. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, levou a uma expressiva redução na densidade de terminais dopaminérgicos no corpo estriado (A – gráfico; C, D, E, F – figuras representativas) e queda significativa no número de células TH⁺ na SNpc (B – gráfico; C', D', E', F' – figuras representativas) de todos os grupos RES em relação ao grupo CTRL. Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.3.2. Alterações na proteína α -sinucleína (α -syn)

A ANOVA de uma via mostrou efeito do tratamento na imunorreatividade para α -syn tanto na região do estriado (RES X CTRL – [F(3, 24) = 4,896, p = 0,0085]) quanto na SNpr (RES X CTRL – [F(3, 20) = 6,867, p = 0,0017]) dos 3 grupos RES quando comparados ao grupo CTRL (para ambas as regiões). Não houve diferenças entre os grupos RES no estriado, no entanto, foram observadas diferenças entre os grupos RES 0,5 e RES 0,1 e 0,2 na SNpr. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou aumento na imunomarcacão de α -syn estriatal de aproximadamente de 19% (RES 0,1), 26% (RES 0,2) e 21% (RES 0,5) em relação ao CTRL (RES 0,1 X CTRL – p = 0,015; RES 0,2 X CTRL – p = 0,001; RES 0,5 X CTRL – p = 0,007 – **figura 14A – representação gráfica; figuras 14C, D, E e F – figuras representativas**). Na região da SNpc, o pós-teste de Fisher's LSD mostrou aumento de células TH⁺ de aproximadamente 18% (RES 0,1), 19% (RES 0,2) e 39% (RES 0,5) em relação ao CTRL (RES 0,1 X CTRL – p = 0,048; RES 0,2 X CTRL – p = 0,032; RES 0,5 X CTRL – p < 0,001). Além disso, o grupo RES 0,5 apresentou maior reatividade quando comparado aos grupos RES 0,1 e RES 0,2 (aproximadamente 20% e 21%, respectivamente – RES 0,5 X RES 0,1 - p = 0,021 RES 0,5 X RES 0,2 - p = 0,032 – **figura 14B – representação gráfica; figuras 14C', D', E' e F' – figuras representativas**).

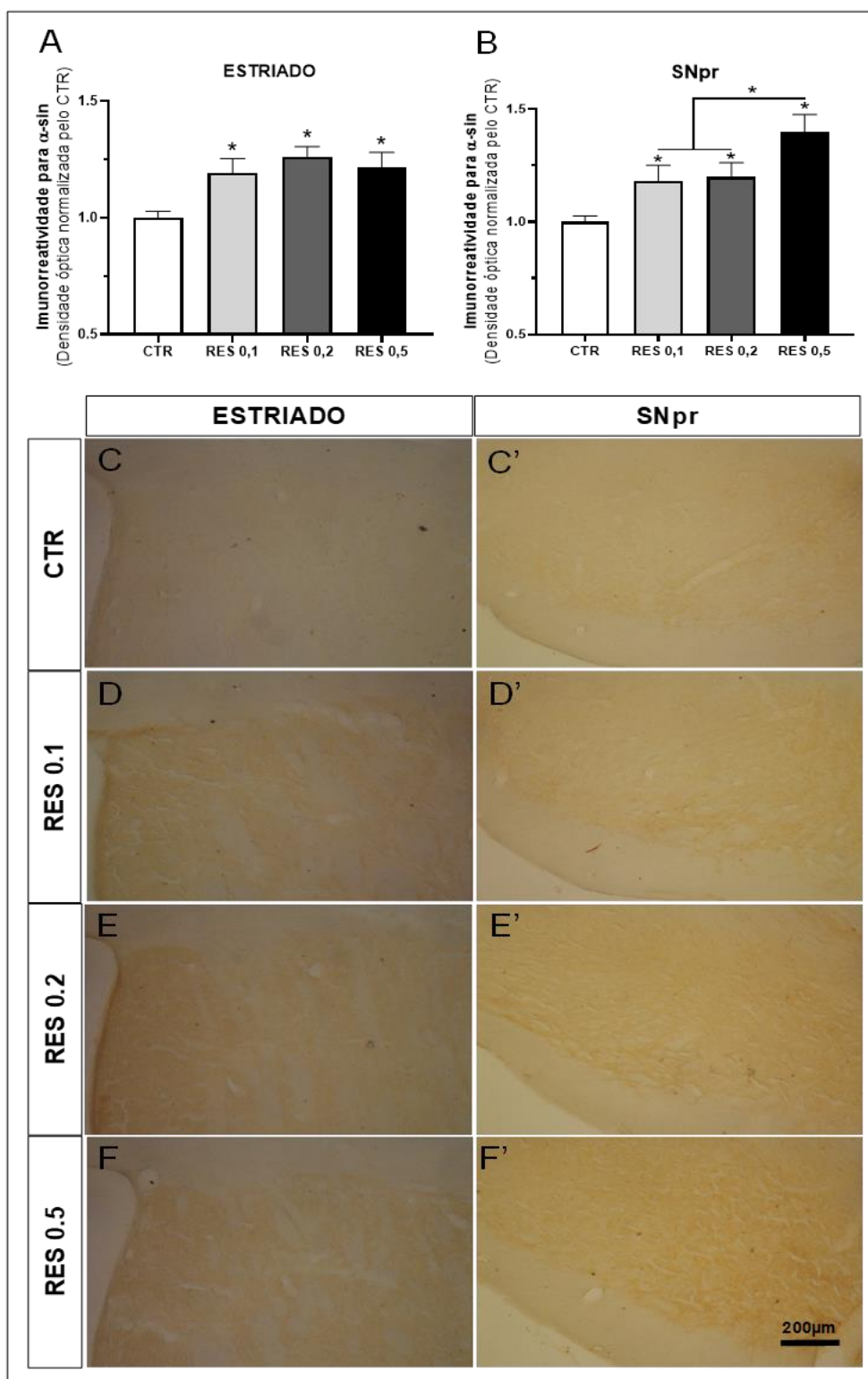


Figura 14: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na imunorreatividade para célula α -syn na região do estriado e da SNpr. A RES administrada repetidamente, e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, levou a um aumento de células imunorreativas para α -syn no estriado de todos os grupos RES em relação ao grupo CTRL (A – gráfico; C, D, E, F – figuras representativas). O mesmo resultado foi observado na SNpr, com o diferencial de que também houve aumento de células imunorreativas para α -syn do grupo RES 0,5 em relação aos grupos RES 0,1 e 0,2 (B – gráfico; C', D', E', F' – figuras representativas). Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.3.3. Alterações na proteína LC3-II:

Na região da SN, a ANOVA de uma via não mostrou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 36) = 0,5536; p = 0,6491]) na concentração da proteína LC3-II (**figura 15A/A1**). Por outro lado, a ANOVA revelou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 36) = 3,001; p = 0,0431]) na concentração deste marcador na região do estriado. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou aumento da LC-II no estriado de animais tratados com RES 0,2 (P = 0,0312) e RES 0,5 (P = 0,0105) em relação ao grupo CTRL. O aumento na concentração da LC-II correspondeu à aproximadamente 50% e 60% para os grupos RES 0,2 e RES, 0,5, respectivamente, em relação ao grupo CTRL (**figura 15B/B1**).

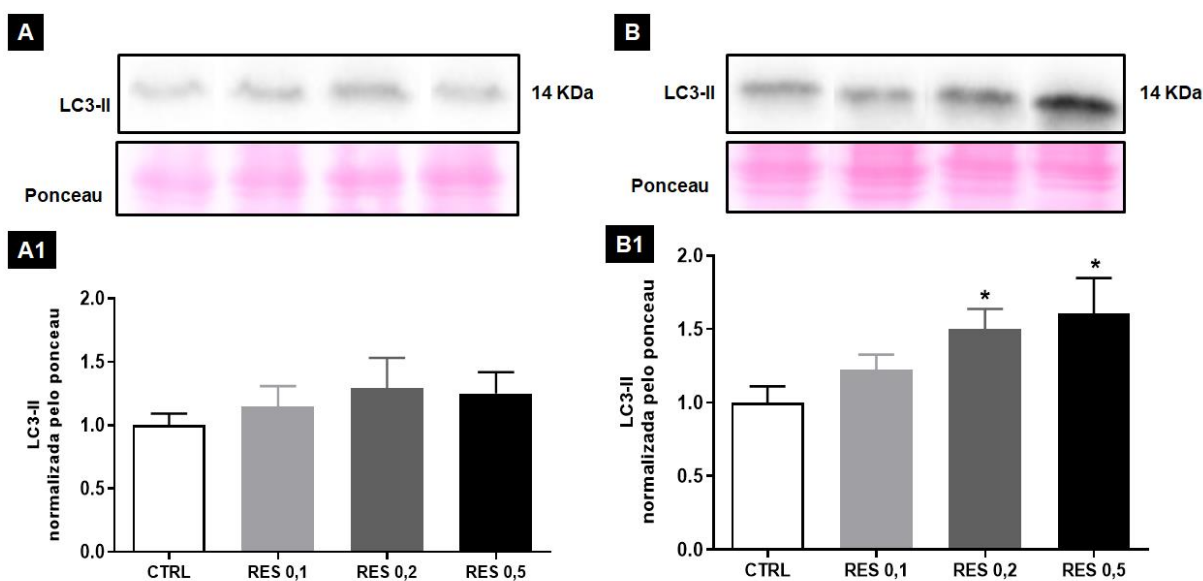


Figura 15: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na concentração de LC3-II na região da SN e estriado. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, não alterou de forma significativa a concentração da LC3-II na SN de todos os grupos RES (0,5, 0,2 e 0,1) em relação ao grupo CTRL (**A1**). Em contrapartida, observamos aumento de LC-II no estriado dos grupos RES 0,2 e RES 0,5 em relação ao CTRL (**B1**). **A** (SN) e **B** (estriado) são imagens representativas dos géis normalizados pelo ponceau. Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.3.4. Alterações na proteína P62/SQTSM1:

A ANOVA de uma via, na região da SN, evidenciou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 36) = 15,01; $p < 0,0001$]) na concentração da proteína P62/SQTSM1 (**figura 16A/A1**). O pós-teste de Fisher's LSD mostrou aumento na concentração de P62/SQTSM1 na SN do grupo RES 0,5 de aproximadamente 203% em relação ao grupo controle (RES 0,5 X CTRL – $p < 0,0001$); de aproximadamente 140% em relação ao grupo RES 0,1 (RES 0,5 X RES 0,1 – $p = 0,0003$) e de aproximadamente 150% em relação ao grupo RES 0,2 (RES 0,5 X RES 0,2 – $p = 0,0001$). O mesmo pós-teste evidenciou concentração aumentada de P62/SQTSM1 de aproximadamente 90% na SN do grupo RES 0,1 em relação ao CTRL (RES 0,1 X CTRL – $p = 0,0142$) e de aproximadamente 80% quando comparados os grupos RES 0,2 e CTRL (RES 0,2 X CTRL – $p = 0,0279$). Na região do estriado, a ANOVA de uma via não mostrou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 36) = 0,02462; $p = 0,9947$]) na concentração da proteína P62/SQTSM1 (**figura 16B/B1**).

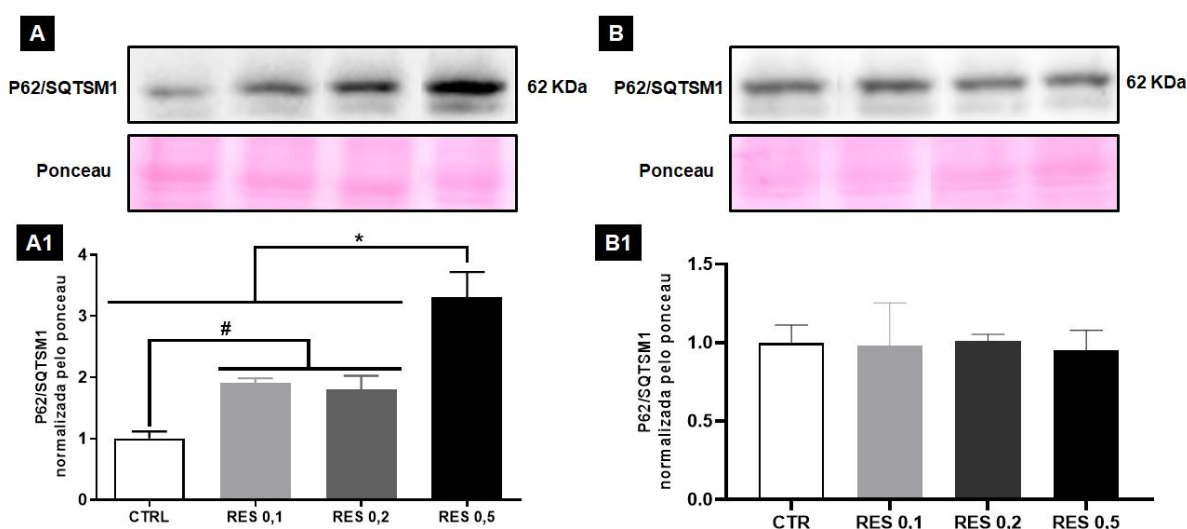


Figura 16: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES na concentração de P62/SQTSM1 na região da SN e estriado. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, aumentou de forma significativa a concentração da P62/SQTSM1 na SN de todos os grupos RES (0,5, 0,2 e 0,1) em relação ao grupo CTRL (**A1**). O grupo RES 0,5 apresentou aumento na concentração da P62/SQTSM1 em relação a todos os outros grupos (CTRL, RES 0,1 e 0,2) (*). Nos grupos RES 0,1 e RES 0,2 também foi observado aumento na concentração deste marcador em relação ao CTRL (#). Em contrapartida, não foi observado aumento na concentração da P62/SQTSM1 na região dos estriado dos animais tratados com RES (**B1**). **A** (SN) e **B** (estriado) são imagens representativas dos géis normalizados pelo ponceau. Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.3.5. Alterações na proteína PARK7/DJ-1:

A ANOVA de uma via evidenciou efeito do tratamento na concentração da proteína PARK7/DJ-1 na região da SN (RES X CTRL – [F (3, 36) = 15,45; $p < 0,0001$]) e também no estriado (RES X CTRL – [F (3, 36) = 3,117; $p = 0,0380$]). Na SN, o pós-teste de Fisher's LSD mostrou aumento na concentração de PARK7/DJ-1 no grupo RES 0,5 de aproximadamente 138% em relação ao grupo controle (RES 0,5 X CTRL – $p < 0,0001$) e de aproximadamente 116% em relação aos grupos RES 0,1 e 0,2 (RES 0,5 X RES 0,1 e RES 0,2 – $p < 0,0001$ – **figura 17A/A1**). Na região do estriado, o pós-teste de Fisher's LSD mostrou aumento na concentração de PARK7/DJ-1 de aproximadamente 51% em relação ao grupo CTRL (RES 0,5 X CTRL – $p = 0,0364$ – **figura 17B/B1**).

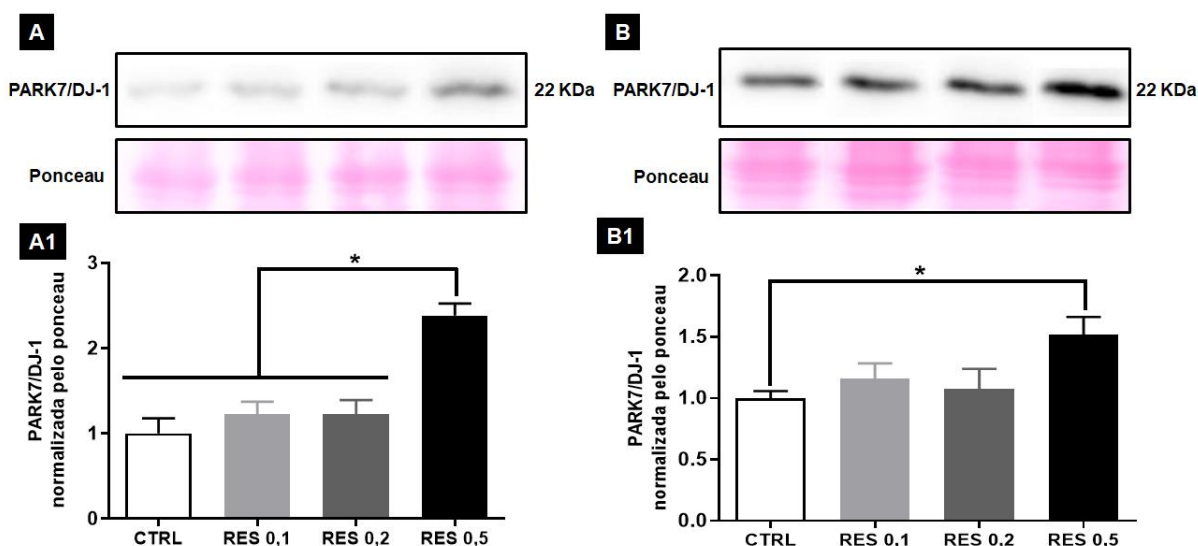


Figura 17: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES nos níveis de PARK7/DJ-1 na região da SN e estriado. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, aumentou de forma significativa a concentração da PARK7/DJ-1 na SN do grupo RES 0,5 em relação aos demais grupos (CTRL, RES 0,1 e 0,2) (**A1**). No estriado, foi observado aumento na concentração da PARK7/DJ-1 dos animais tratados com RES 0,5 em relação ao CTRL (**B1**). **A** (SN) e **B** (estriado) são imagens representativas dos géis normalizados pelo ponceau. Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

5.3.6. Alterações na Proteína Caspase-3:

Na região da SN, a ANOVA de uma via não mostrou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 36) = 0,8173; p = 0,4928]) na concentração da proteína Caspase-3 (**figura 18A/A1**). Por outro lado, a ANOVA revelou efeito do tratamento (RES X CTRL – [F (3, 36) = 3,900; p = 0,0164]) na concentração deste marcador na região do estriado. O pós-teste de Fisher's LSD mostrou aumento da caspase-3 no estriado do grupo RES 0,5 em relação ao CTRL e RES 0,1 de aproximadamente 71% (RES 0,5 X CTRL – p = 0,0071; RES 0,5 X RES 0,1 – p = 0,0074 – **figura 18B/B1**).

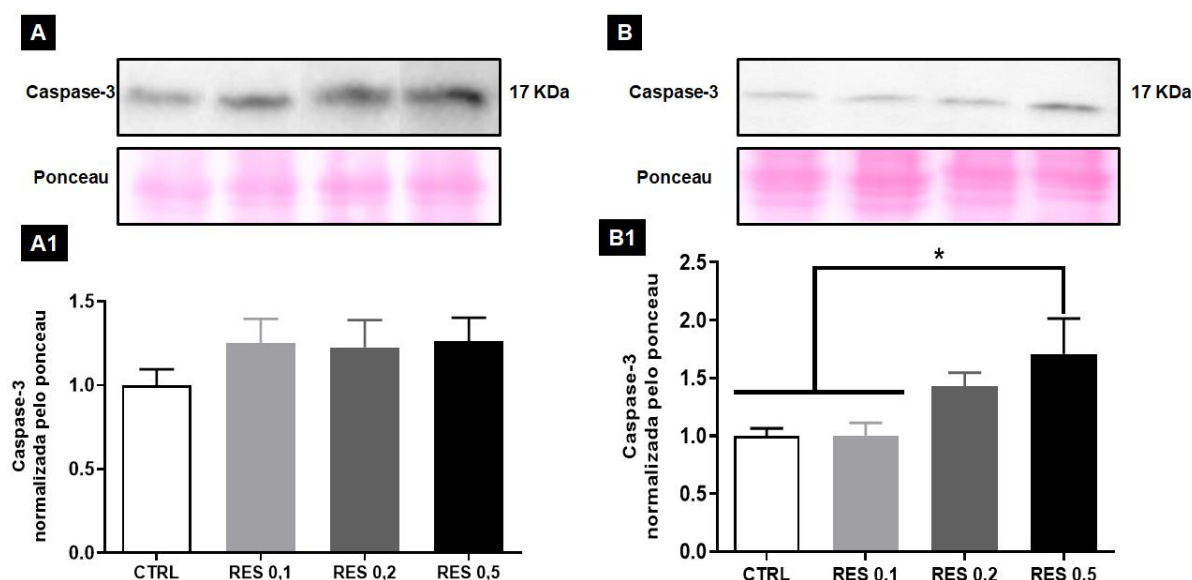
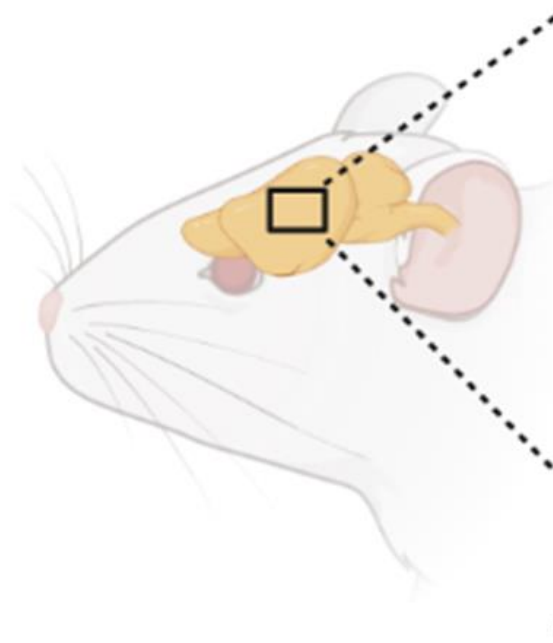


Figura 18: Efeito da administração repetida e em diferentes doses de RES nos níveis de caspase na região da SN e estriado. A RES administrada repetidamente e em baixas doses (0,1, 0,2 e 0,5 mg/kg), a cada 48h, não alterou de forma significativa os níveis da caspase-3 na SN de todos os grupos RES (0,5, 0,2 e 0,1) em relação ao grupo CTRL (**A1**). No estriado, foi observado aumento da caspase-3 no grupo RES 0,5 quando comparado aos grupos CTRL e RES 0,1 (**B1**). **A** (SN) e **B** (estriado) são imagens representativas dos géis normalizados pelo ponceau. Os valores descritos estão expressos como média e erro padrão da média (E.P.M).

Resumo dos resultados neuroquímicos na via nigroestriatal:



		VIA NIGROESTRITAL						
		SN			Estriado			
		Tratamento	RES 0,1	RES 0,2	RES 0,5	RES 0,1	RES 0,2	RES 0,5
M A R C A D O R E S	TH	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	α-syn	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
	LC3-II	-	-	-	-	↑	↑	↑
	P62/SQTSM1	↑	↑	↑	-	-	-	-
	PARK7/DJ-1	-	-	↑	-	-	↑	↑
	CASPASE 3	-	-	-	-	-	↑	↑

Figura 19: Resumo dos parâmetros neuroquímicos avaliados. As setas para cima e para baixo indicam aumento ou redução, respectivamente, na imunomarcagem (TH e α-syn) ou na concentração (LC3-II, P62/SQTSM1, PARK7/DJ-1 e caspase-3) dos marcadores avaliados. O hífen (-) indica que não houve quaisquer alterações (aumento/redução) na imunoreatividade ou imunodeteção dos marcadores analisados.

6. DISCUSSÃO

Nosso estudo buscou aprofundar a caracterização do modelo animal farmacológico da DP baseado na administração da RES. Para isso, avaliamos alguns parâmetros motores/não motores e neuroquímicos característicos da doença na via NGE. Nós observamos que os déficits motores e não motores, avaliados por meio dos testes de catalepsia, MO (SM) e avaliação da MC (SNM), respectivamente, foram acompanhados de alterações neuroquímicas (**figura 19 – resumo das alterações neuroquímicas**). Neuroquimicamente: (1) por meio de imuno-histoquímica, avaliamos as alterações moleculares para TH e α -syn e observamos redução de neurônios imunorreativos à TH, enzima essencial na biossíntese de dopamina na via NGE, acompanhada de aumento de células neuronais imunorreativas à α -syn, principal proteína dos corpos de Lewy; (2) por meio de WB, analisamos os níveis de LC3-II, P62/SQSTM1, PARK7/DJ-1, caspase 3 e foi observado que o fluxo autofágico está reduzido na via NGE, afetando a depuração/degradação de α -syn, que tende a acumular-se, gerando EROs e aumento do estresse oxidativo. Nesse sentido, ainda observamos que os neurônios tentaram compensar esses efeitos deletérios da RES aumentando os níveis de PARK7/DJ-1, proteína com papel antioxidante e com capacidade de eliminar a α -syn. Possivelmente, os mecanismos neuroprotetores desencadeados por esta proteína não foram tão eficientes e os neurônios estriatais começaram a degenerar por meio da ativação da via de morte celular, processo que foi avaliado pelo aumento de caspase 3 no estriado.

O fenótipo clínico marcante na DP são os distúrbios na motricidade, como a bradicinesia/hipocinesia (lentidão e/ou dificuldade para realizar movimentos voluntários) e o tremor em repouso (ARMSTRONG; OKUN, 2020; HAYES, 2019; JANKOVIC, 2008). Em modelos animais da DP, danos motores podem ser avaliados por diferentes testes comportamentais (ASAKAWA et al., 2016). Nossa pesquisa avaliou os SM voluntários por meio do teste de catalepsia (**figura 11**). Em roedores, o estado cataléptico pode ser observado por meio da avaliação do tempo que o rato leva para mudar a posição na qual foi posto inicialmente. Ratos sem alterações motoras corrigem a posição em questão de segundos e começam a explorar o ambiente ao seu redor, entretanto, aqueles animais com déficits motores mantêm-se na posição inicialmente imposta por um período de tempo mais longo (BANASIKOWSKI; BENINGER, 2012; SANBERG et al., 1988). Nossos dados estão

de acordo com a literatura, uma vez que, nos grupos RES, o estado cataléptico foi dose-dependente, ou seja, quanto maior a dose, mais cedo iniciaram-se os danos motores e os ratos passaram mais tempo na barra (**figura 11**).

Além dos sintomas motores clássicos, a DP também é caracterizada pela presença dos SNM (GOLDMAN; GUERRA, 2020; JANKOVIC, 2008; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017). Na literatura, um dos SNM relatados em pacientes parkinsonianos é a alteração da sua MC. Pacientes com Parkinson podem apresentar tanto ganho quanto perda de peso, fator determinado pelo estágio clínico e progressão da doença (BARICHELLA et al., 2003; BARICHELLA; CEREDA; PEZZOLI, 2009; KISTNER; LHOMMÉE; KRACK, 2014; SHARMA; LEWIS, 2017). No presente estudo, foi observada uma redução significativa na MC dos animais submetidos ao tratamento com RES, com destaque para os grupos RES 0,5 e RES 0,2, cuja redução teve início 48h após a 4ª e 6ª injeções, respectivamente, seguindo até o fim do experimento (**figura 10**). Apesar da ocorrência de ambos os fenótipos (ganho ou perda de MC), nossos dados estão de acordo com a literatura científica, que observa prevalência da redução da massa corpórea em pacientes com Parkinson (CERSOSIMO et al., 2018; CHEN et al., 2003; CUMMING et al., 2017; LOREFÄLT; TOSS; GRANÉRUS, 2009)

A literatura científica, apesar de algumas divergências em termos numéricos, mostra redução de neurônios dopaminérgicos na SN e no estriado de pacientes com Parkinson. Em estágios iniciais da doença, há uma redução em torno de 30% dos neurônios dopaminérgicos nigrais, com redução axonal estriatal entre 50% a 60% (CHENG; ULANE; BURKE, 2010). Outros autores, porém, relatam que os primeiros sintomas motores surgem quando há uma redução neuronal nigral de 60%, resultando em aproximadamente 85% de redução do conteúdo de dopamina no estriado (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; DUTY; JENNER, 2011b; WIRDEFELDT et al., 2011).

Nosso trabalho mostrou redução de neurônios TH⁺ na SNpc (**figura 13B**) de 19%, 22% e 29%, seguida de uma intensa diminuição na densidade de terminais axonais estriatais (**figura 13A**) de 62%, 54% e 50% (RES 0,1, 0,2 e 0,5, respectivamente). Em nosso grupo de pesquisa, trabalhos anteriores encontraram resultados similares, com base no mesmo modelo e número de administração da RES na dose de 0,1 mg/Kg (BISPO et al., 2019, 2022; LINS et al., 2018; SANTOS, 2018). O mesmo grupo, com variação apenas no número de injeções de RES, também evidenciou redução neuronal na SNpc, assim como diminuição na densidade neuronal

no estriado dorsal (DOS SANTOS et al., 2021; GOIS, 2020; SANTOS, 2018; SANTOS et al., 2013) (12, 10, 10 e 10 injeções de RES, respectivamente).

Nossa pesquisa também avaliou alterações neuroquímicas acerca da principal marca histopatológica da DP na via nigroestriatal, a α -syn. Na região do estriado, observamos um aumento de mais de 20% nos neurônios imunorreativos à α -syn nos grupos RES (0,1, 0,2 e 0,5 – **figura 14A**). Na SNpr, o aumento foi de aproximadamente 18% (RES 0,1), 19% (RES 0,2) e 39% (RES 0,5). O grupo RES 0,5 teve aumento aproximado de 20% na imunorreatividade em relação aos outros 2 grupos RES (**figura 14B**). Os resultados encontrados corroboram e são consistentes com trabalhos anteriores do nosso grupo e de membros colaboradores, no mesmo modelo animal, nos quais foram observados aumentos na imunorreatividade para α -syn na SNpr e no estriado de animais tratados com RES na dose de 0,1 (GOIS, 2020; LEÃO et al., 2017). Recentemente, um estudo com o modelo da RES em ratos neonatos também demonstrou a presença de α -syn no estriado e SNpc, além de perda neuronal generalizada em diversas outras áreas cerebrais (VAN ONSELEN; DOWNING, 2021).

As funções exatas da α -syn ainda não estão bem estabelecidas na literatura científica. Sabe-se que é uma proteína que se localiza majoritariamente nos terminais pré-sinápticos e ela é apontada como um polipeptídeo multifacetado, ou seja, está relacionada a múltiplas funções, como liberação de neurotransmissores, regulação do pool vesicular (mobilização e liberação de vesículas), função e plasticidade sináptica (CHENG; VIVACQUA; YU, 2011; LASHUEL et al., 2013). Histopatologicamente, além da morte neuronal na SNpc e no estriado, o acúmulo de α -syn é a principal característica observada nos neurônios remanescentes, sendo o principal componente dos corpos de Lewy (BABA et al., 1998; OSTERHAUS et al., 1997; WAKABAYASHI et al., 2013; YUKO et al., 2003). Esses agregados proteicos filamentosos são encontrados no soma e também nos terminais axonais de neurônios dopaminérgicos e não dopaminérgicos, bem como em células gliais (UVERSKY, 2007).

O que explica essa difusão é a hipótese priônica, pois, a α -syn agregada, quando não degradada pelo sistema lisossomal neuronal, difunde-se pelo parênquima encefálico e é captada de diferentes maneiras pelas células circunvizinhas, inclusive pela glia (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013; KOVACS et al., 2014; VISANJI et al., 2013). Nesse contexto, a captação de α -syn pela astroglia pode se aglomerar no seu

citoplasma, uma vez que sua atividade autofágica também pode estar prejudicada (KOVACS; LEE; TROJANOWSKI, 2017). Os astrócitos então atrofiam-se, tornam-se disfuncionais, com consequente perda de sua capacidade de neuroproteção no tecido nervoso (GU et al., 2010; KOVACS; LEE; TROJANOWSKI, 2017; TONG et al., 2015).

O aumento na imunorreatividade para α -syn pode ter ocorrido como consequência de uma desregulação da via autofágica-lisossomal. Pesquisas evidenciam que o comprometimento da atividade autofágica está diretamente envolvido com o aumento na agregação da α -syn na DP (SATO et al., 2018; TANJI et al., 2015; WILLS et al., 2010). Nossos resultados são consistentes com a literatura, pois observamos indícios de uma redução da autofagia na via NE. A autofagia é um processo altamente dinâmico e quantificar/medi-lo requer a avaliação do fluxo autofágico, processo que compreende a geração de autofagossomos, seu processo de fusão como os lisossomos e, por fim, a degradação dos substratos nos autolisossomos (MIZUSHIMA; YOSHIMORI; LEVINE, 2010). O fluxo autofágico pode ser avaliado pela detecção dos níveis da proteína ubiquinante P62/SQSM1 e pela proteína de cadeia leve 3 associada a microtúbulos (LC3) (ZHANG et al., 2012).

Diante dessa perspectiva, avaliamos as concentrações da LC3-II, com a qual a P62/SQSM1 interage diretamente para promover a adequada degradação de produtos intracitoplasmáticos ubiquitinados (PANKIV et al., 2007). Em nossa pesquisa, observamos aumento de LC3-II na região do estriado (**figura 15**) nos grupos reserpinados com as maiores doses (0,2 e 0,5 – *figura X*), mas não na região da SN. A LC3 é uma proteína marcadora de autofagossomos, logo, é um indicador direto da quantidade de membranas autofágicas. Entretanto, a detecção isolada do aumento nos níveis desta proteína implica 2 possíveis interpretações: indução autofágica ou bloqueio da via de autofagia. Na primeira situação, pode ser que a célula tenha aumentado a atividade autofágica devido ao aumento de autofagossomos. Por outro lado, o aumento na detecção de LC3 pode indicar que a autofagia está diminuída na célula, uma vez que algum fator pode estar inibindo a degradação dos autofagossomos (SABLI; SANCHO-SHIMIZU, 2021). Diante disso, a avaliação isolada desse marcador não é suficiente para estabelecer a desregulação da via autofágica. Assim, nós também avaliamos os níveis da P62/SQSM1, proteína degradada no final do processo autofágico (KOMATSU et al., 2007).

A análise neuroquímica deste marcador de autofagia correlaciona-se de forma inversamente proporcional à atividade autofágica da célula, isto é, quanto maior a

expressão e/ou os níveis de P62/SQSMT1, menor será o fluxo autofágico celular (BJØRKØY et al., 2005; SHIBATA et al., 2006; WANG et al., 2006). No presente estudo, na região da SN, mas não no estriado foi observado aumento expressivo da P62/SQSMT1 nos grupos RES (**figura 16**). De forma equivalente, o grupo RES 0,5 apresentou aumento desta proteína em relação aos grupos RES 0,1 e 0,2. Este aumento nos níveis da P62/SQSMT1 sugere bloqueio/inibição do fluxo autofágico que, na DP, resulta na redução da depuração da α -syn e outras proteínas patogênicas que se acumulam no citoplasma neuronal, elevando os níveis de estresse oxidativo que culmina em degeneração neuronal (ZHANG; DUAN; YANG, 2015).

Nossos dados estão de acordo com outras pesquisas. Em modelo animal de camundongos, por exemplo, observou-se que os neurônios hipotalâmicos apresentam comprometimento da via autofágica (KAUSHIK et al., 2012a, 2012b). Na espécie humana, a análise do encéfalo saudável de indivíduos idosos evidenciou redução nos níveis de mRNA de múltiplos genes Atg (genes relacionados à autofagia) (LIPINSKI et al., 2010; SHIBATA et al., 2006). Em modelos de células knockdown para Beclin1, importante gene regulador da autofagia, observou-se redução da atividade autofágica com diminuição da capacidade de renovação de macromoléculas e consequente acúmulo de proteínas mal dobradas (MICHIORRI et al., 2010; SHIBATA et al., 2006).

De forma resumida, nossos dados de LC3-II e P62/SQSMT1 se correlacionam diretamente com a imunorreatividade para α -syn na SNpr e no estriado, isto é, quanto menor o fluxo autofágico, maior a agregação de α -syn (WILLS et al., 2010). De modo equivalente, o acúmulo de α -syn pode ter interferido de forma recíproca na função autofágica celular (XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2013). Nossos achados são consistentes com um trabalho em modelo animal da DP com invertebrados, a *Drosophila melanogaster* (mosca-da-fruta). Nesse estudo, por meio da técnica de western blot, os pesquisadores também observaram que a RES gera inibição do fluxo autofágico pelo aumento da LC3-II e P62/SQSMT1, concomitantemente ao aumento de α -syn (LEE et al., 2015). Em modelo de roedores baseado na administração do pesticida rotenona também foi verificada essa interrupção autofágica (MADER et al., 2012; WU et al., 2015). Nossos resultados e os trabalhos citados até aqui enfatizam o papel importante da maquinaria intracelular de degradação proteica mediada pelos processos autofágicos, suprimindo desta forma o acúmulo de proteínas mutantes e/ou disfuncionais, como é o caso da α -syn na DP (VOGIATZI et al., 2008).

No modelo animal prodrômico da RES com a dose 0,1 mg/kg, já foi observada a ocorrência de estresse oxidativo (FERNANDES et al., 2012) bem como lipoperoxidação (LEÃO et al., 2017) na via NE. Para compreendermos como as células nervosas responderiam aos insultos oxidativos gerados pela RES (LEÃO et al., 2015) nas diferentes doses do nosso estudo (0,1, 0,2 e 0,5), avaliamos as concentrações da proteína PARK7/DJ-1 e observamos aumento expressivo tanto na SN quanto no estriado dos animais reserpinados (RES 0,5) (**figura 17**). A PARK7/DJ-1 é um polipeptídeo composto por 189 aminoácidos e se localiza essencialmente no citoplasma celular, sendo diretamente relacionado à DP de início precoce (BONIFATI et al., 2003; TAO; TONG, 2003). Essa proteína atua como um sensor de estresse oxidativo e antioxidante, portanto, sua expressão está diretamente relacionada com uma neuroproteção (INDEN et al., 2011; MITSUMOTO; NAKAGAWA, 2001; TAIRA et al., 2004).

Em situações de intenso estresse oxidativo, PARK7/DJ-1 pode ser translocada para a membrana mitocondrial externa, onde atua na remoção da proteína α -syn desse organelo (BONIFATI et al., 2003). Apesar das evidências acerca dessas funções, por ser uma proteína multifuncional, os mecanismos exatos de como PARK7/DJ-1 protege os neurônios contra o estresse oxidativo ainda não são claros, mas a perda da função ou a sua ativação excessiva está diretamente envolvida com a patogênese da DP (ARIGA et al., 2013; BONIFATI et al., 2003; DOLGACHEVA et al., 2019). Em nossa pesquisa, observamos que o aumento de PARK7/DJ-1 na via NE pode ter ocorrido como um mecanismo compensatório celular (neuronal e glial) devido à perda da atividade autofágica com consequente redução na depuração da α -syn.

Além das proteções antioxidantes exercidas por PARK7/DJ-1 e outras biomoléculas, o tecido nervoso conta com defesas celulares, dentre elas, os astrócitos, as células gliais mais numerosas que fornecem suporte metabólico, estrutural e trófico (este último, por meio da síntese do GDNF – fator neurotrófico derivado da glia), modulação da transmissão sináptica, dentre outras (VILA et al., 2001). Astrócitos knockout para PARK7/DJ-1 evidenciam perda da proteção astrocitária no modelo animal da DP induzido pelo pesticida rotenona (MULLETT; HINKLE, 2009). No modelo animal de 6-hidroxidopamina (6-OHDA), camundongos knockout para PARK7/DJ-1 são mais susceptíveis aos efeitos neurotóxicos desta neurotoxina (LEV et al., 2013). Santos (2018), avaliou a participação astrocitária no modelo prodrômico da DP com administração de RES 0,1 mg/kg em diferentes

condições de tratamento (4, 10 e 15 injeções) e mostrou que estas células apresentam plasticidade fenotípica dependente do insulto. Ele observou proliferação astrogliar nas fases iniciais com concomitante atrofia dessas células nas 10^a e 15^a injeções, exatamente quando ocorreu redução de células imunorreativas à TH na SNpc e no estriado dorsal (SANTOS, 2018).

Uma vez que os mecanismos de morte celular programada (MCP) ou apoptose e os processos autofágicos estão intimamente relacionados (BERGMANN, 2007; FITZWALTER; THORBURN, 2015), nosso estudo avaliou também a concentração da caspase-3 no estriado e na SN, uma protease envolvida diretamente com os mecanismos apoptóticos (D'AMELIO; CAVALLUCCI; CECCONI, 2010). A caspase-3 é uma proteína efetora da cascata de morte celular fisiológica e em situações patológicas neurodegenerativas, como no caso da DP e sua concentração aumentada é um indicativo de ativação desta via, resultando em degeneração dopaminérgica (D'AMELIO; CAVALLUCCI; CECCONI, 2010; TATTON, 2000; VENDEROVA; PARK, 2012). Em nosso estudo, observamos aumento da concentração de caspase-3 somente na maior dose da região do estriado (**figura 18**), um indicativo de que nos terminais axonais os danos celulares parecem ser mais intensos. Neste contexto de comunicação cruzada entre autofagia e apoptose, nossos resultados para casapase-3 parecem corroborar dados da literatura. Estudo realizado em camundongo com inativação de genes ATGs mostrou a ocorrência de acúmulo de agregados polipeptídicos com eventual degeneração neuronal (KOMATSU et al., 2006).

7. CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que a desregulação da via autofágica pode atuar como fator importante no desenvolvimento dos déficits neuroquímicos e motores no modelo prodrômico da DP. Além disso, nossos dados parecem corroborar estudos na literatura que apontam desregulação na homeostase estriatal com degeneração retrógrada. Entretanto, mais trabalhos são necessários para compreender melhor como a cascata autofágica atua nos processos iniciais de neurodegeneração e como essa via conversa com os mecanismos de morte celular.

8. REFERÊNCIAS

- ANTKIEWICZ-MICHALUK, L. et al. Antidepressant-like Effect of Tetrahydroisoquinoline Amines in the Animal Model of Depressive Disorder Induced by Repeated Administration of a Low Dose of Reserpine: Behavioral and Neurochemical Studies in the Rat. **Neurotoxicity Research**, v. 26, n. 1, p. 85–98, 10 jul. 2014.
- ARIGA, H. et al. Neuroprotective function of dj-1 in Parkinson's disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 2020.
- ASAKAWA, T. et al. Animal behavioral assessments in current research of Parkinson's disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 65, p. 63–94, 2016.
- BABA, M. et al. Aggregation of α -synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 4, p. 879–884, 1998.
- BALESTRINO, R.; SCHAPIRA, A. H. V. Parkinson disease. **European Journal of Neurology**, v. 27, n. 1, p. 27–42, 2020.
- BANASIKOWSKI, T. J.; BENINGER, R. J. Haloperidol conditioned catalepsy in rats: A possible role for D 1-like receptors. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, n. 10, p. 1525–1534, 2012.
- BANERJEE, R. et al. Animal models in the study of Alzheimer's disease and Parkinson's disease: A historical perspective. **Animal Models and Experimental Medicine**, v. 5, n. 1, p. 27–37, 2022.
- BARICHELLA, M. et al. Body weight gain rate in patients with Parkinson's disease and deep brain stimulation. **Movement Disorders**, v. 18, n. 11, p. 1337–1340, 2003.
- BARICHELLA, M.; CEREDA, E.; PEZZOLI, G. Major nutritional issues in the management of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 24, n. 13, p. 1881–1892, 2009.
- BENDOR, J. T.; LOGAN, T. P.; EDWARDS, R. H. The function of α -synuclein. **Neuron**, v. 79, n. 6, p. 1044–1066, 2013.
- BERGMANN, A. Autophagy and Cell Death: No Longer at Odds. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1032–1034, 2007.

- BERRIOS, G. E. Introdução à “Paralisia agitante”, de James Parkinson (1817). **Rev. Latinoam. Psicopatol. Fund.**, n. 1884, p. 114–121, 2016.
- BERTLER, ÅK. Effect of Reserpine on the Storage of Catechol Amines in Brain and Other Tissues. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 51, n. 1, p. 75–83, 1961.
- BESERRA-FILHO, J. I. A. et al. Eplingiella fruticosa leaf essential oil complexed with β -cyclodextrin produces a superior neuroprotective and behavioral profile in a mice model of Parkinson's disease. **Food and Chemical Toxicology**, v. 124, n. July 2018, p. 17–29, 2019.
- BISPO, J. M. M. et al. Sex differences in the progressive model of parkinsonism induced by reserpine in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 363, p. 23–29, 2019.
- BISPO, J. M. M. et al. Testosterone propionate improves motor alterations and dopaminergic damage in the reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 187, n. June, p. 162–168, 2022.
- BJØRKØY, G. et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. **Journal of Cell Biology**, v. 171, n. 4, p. 603–614, 2005.
- BLASCO, M. A. et al. Review The Hallmarks of Aging. **Cell**, v. 153, 2013.
- BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10291, p. 2284–2303, 2021.
- BOLAND, B. et al. HHS Public Access. v. 17, n. 9, p. 660–688, 2019.
- BONIFATI, V. et al. Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. **Science**, v. 299, n. 5604, p. 256–259, 2003.
- BOURDENX, M. et al. Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. **Progress in Neurobiology**, v. 155, p. 171–193, 2017.
- BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, 2004.
- CALABRESE, V. et al. Aging and Parkinson ' s Disease : In fl ammaging , neuroin fl ammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. **Free Radical Biology and Medicine journal**, v. 115, n. 2017, p. 80–91, 2018.
- CARDOSO, S. M. et al. Neurodegenerative Strategies Pathways in Parkinson ' s Disease : Therapeutic. p. 405–419, 2005.
- CARLSSON, A. Monoamine-depleting drugs. **Pharmacology And Therapeutics: Part B: General And Systematic**, v. 1, n. 3, p. 393–400, 1975.

- CERSOSIMO, M. G. et al. Weight Loss in Parkinson's Disease: The Relationship with Motor Symptoms and Disease Progression. **BioMed Research International**, v. 2018, n. iii, p. 1–6, 2018.
- CHEN, H. et al. Weight loss in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 53, n. 5, p. 676–679, 2003.
- CHENG, F.; VIVACQUA, G.; YU, S. The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 42, n. 4, p. 242–248, 2011.
- CHENG, H. C.; ULANE, C. M.; BURKE, R. E. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons. **Annals of Neurology**, v. 67, n. 6, p. 715–725, 2010.
- CIECHANOVER, A.; KWON, Y. T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. **Experimental & Molecular Medicine**, n. November 2014, 2015.
- CONDELLO, M. et al. Targeting autophagy to overcome human diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 1–27, 2019.
- CUMMING, K. et al. Early weight loss in parkinsonism predicts poor outcomes. **Neurology**, v. 89, n. 22, p. 2254–2261, 2017.
- D'AMELIO, M.; CAVALLUCCI, V.; CECCONI, F. Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 7, p. 1104–1114, 2010.
- DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. In: **Neuron**. [s.l.] Cambridge University Press, 2003. v. 39p. 889–909.
- DELONG, M. R.; WICHMANN, T. Basal ganglia circuits as targets for neuromodulation in Parkinson disease. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 11, p. 1354–1360, 2015.
- DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: An evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Experimental Neurology**, v. 175, n. 2, p. 303–317, 2002.
- DIKIC, I. Proteasomal and autophagic degradation systems. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. April, p. 193–224, 2017.
- DOLGACHEVA, L. P. et al. Role of DJ-1 in the mechanism of pathogenesis of Parkinson's disease. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 51, n. 3, p. 175–188, 2019.
- DONALDSON, I. James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. **The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 45, n. 1, p. 84–86, 2015.
- DORSEY, E. R.; BLOEM, B. R. The Parkinson pandemic - A call to action. **JAMA**

Neurology, v. 75, n. 1, p. 9–10, 2018.

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

DRAOUI, A. et al. Differential impairment of short working and spatial memories in a rat model of progressive Parkinson's disease onset: A focus on the prodromal stage. **Brain Research Bulletin**, v. 150, n. April, p. 307–316, 2019.

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

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

ERKKINEN, M. G.; KIM, M.; GESCHWIND, M. D. Major Neurodegenerative Diseases. p. 1–44, 2018.

ESTEVEZ, A. R. et al. Mitochondrial Metabolism Regulates Microtubule Acetylation and Autophagy Through Sirtuin-2: Impact for Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 1440–1462, 2018.

FACTOR, S. A.; MCDONALD, W. M.; GOLDSTEIN, F. C. The role of neurotransmitters in the development of Parkinson's disease-related psychosis. **European Journal of Neurology**, v. 24, n. 10, p. 1244–1254, 2017.

FEIGIN, V. L. et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 5, p. 459–480, 2019.

FERNANDES, V. S. et al. Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: Possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1479–1483, 2008.

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

FESTA, B. P. et al. The pleiotropic roles of autophagy in Alzheimer's disease: From pathophysiology to therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 60, p. 149–157, 2021.

- FITZWALTER, B. E.; THORBURN, A. Recent insights into cell death and autophagy. **FEBS Journal**, v. 282, n. 22, p. 4279–4288, 2015.
- FRAKE, R. A. et al. Autophagy and neurodegeneration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 65–74, 2015.
- FREITAS, C. M. DE. **EFEITO DA SILIMARINA E SILIBININA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS POR 6-HIDROXIDOPAMINA EM CAMUNDONGOS**. [s.l: s.n.].
- GIBNEY, E.; CASTELVECCHI, D. Nobel for 2D exotic matter Physics award goes to theorists who used topology to explain strange phenomena. **Nature**, v. 538, p. 18, 2016.
- GOEDERT, M.; COMPSTON, A. Parkinson's disease - The story of an eponym. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2018.
- GOIS, A. M. **ATUAÇÃO DA VIA NORADRENÉRGICA SOBRE AS ALTERAÇÕES MOTORAS E NEUROQUÍMICAS DE UM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA**. [s.l: s.n.].
- GOLAN, D. et al. **Princípios de Farmacologia**. [s.l: s.n.].
- GOLDMAN, J. G.; GUERRA, C. M. Treatment of Nonmotor Symptoms Associated with Parkinson Disease. **Neurologic Clinics**, v. 38, n. 2, p. 269–292, 2020.
- GOLDMAN, S. M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, p. 141–164, 2014.
- GU, X. L. et al. Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T -synuclein causes neurodegeneration in mice. **Molecular Brain**, v. 3, n. 1, p. 1–16, 2010.
- HAMADA, T.; HONMA, S.; HONMA, K. ICHI. Light responsiveness of clock genes, *Per1* and *Per2*, in the olfactory bulb of mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 409, n. 4, p. 727–731, 17 jun. 2011.
- HAO, Y. et al. Selecting an appropriate animal model of depression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, p. 1–16, 2019.
- HAYES, M. T. Parkinson's Disease and Parkinsonism. **American Journal of Medicine**, v. 132, n. 7, p. 802–807, 2019.
- HIRSCH, L. et al. The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Neuroepidemiology**, v. 46, n. 4, p. 292–300, 2016.
- HOU, Y. et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 10, p. 565–581, 2019.
- IKRAM, H.; HALEEM, D. J. Repeated treatment with a low dose of reserpine as a

progressive model of Parkinson's dementia. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, n. 2, p. 555–562, 2019.

IMBRIANI, P. et al. Promising rodent models in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 46, p. S10–S14, 2018.

INDEN, M. et al. Protection against dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease-model animals by a modulator of the oxidized form of DJ-1, a wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 117, n. 3, p. 189–203, 2011.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368–376, 2008.

JELLINGER, K. A. Pathology of Parkinson's disease - Changes other than the nigrostriatal pathway. **Molecular and Chemical Neuropathology**, v. 14, n. 3, p. 153–197, 1991.

KAUSHIK, S. et al. Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. **EMBO Reports**, v. 13, n. 3, p. 258–265, 2012a.

KAUSHIK, S. et al. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. **Cell Metab.**, v. 14, n. 2, p. 173–183, 2012b.

KISTNER, A.; LHOMMÉE, E.; KRACK, P. Mechanisms of body weight fluctuations in Parkinson's disease. **Frontiers in Neurology**, v. 5, p. 1–15, 2014.

KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. **Autophagy**, v. 17, n. 1, p. 1–382, 2021.

KOMATSU, M. et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. **Nature**, v. 441, n. 7095, p. 880–884, 2006.

KOMATSU, M. et al. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1149–1163, 2007.

KOVACS, G. G. et al. Neurobiology of Disease Intracellular processing of disease-associated α -synuclein in the human brain suggests prion-like cell-to-cell spread. v. 69, p. 76–92, 2014.

KOVACS, G. G.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI, J. Q. Protein astroglialopathies in human neurodegenerative diseases and aging. **Brain Pathology**, v. 27, n. 5, p. 675–690, 2017.

LANCIEGO, J. L.; LUQUIN, N.; OBESO, J. A. Functional neuroanatomy of the Basal Ganglia. v. 2, 2012.

LASHUEL, H. A. et al. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to

therapeutic target. v. 14, n. 1, p. 38–48, 2013.

LEAL, P. C. et al. Commentary: Evaluation of models of Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. JUN, p. 1–4, 2016.

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

LEAL, P. C. et al. Serotonergic dysfunction in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 96, n. December 2018, p. 73–78, 2019b.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain Pathology**, v. 25, p. 377–390, 2015.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Spontaneously hypertensive rats (SHR) are resistant to a reserpine-induced progressive model of Parkinson's disease: Differences in motor behavior, tyrosine hydroxylase and α -synuclein expression. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. MAR, p. 1–13, 2017.

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

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

LEV, N. et al. Knocking out DJ-1 attenuates astrocytes neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 50, n. 3, p. 542–550, 2013.

LI, W.; YANG, Q.; MAO, Z. Chaperone-mediated autophagy: Machinery, regulation and biological consequences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 5, p. 749–763, 2011.

LILL, C. M. Genetics of Parkinson ' s disease *. **Molecular and Cellular Probes**, v. 30, n. 6, p. 386–396, 2016a.

LILL, C. M. Genetics of Parkinson's disease. **Molecular and Cellular Probes**, 2016b.

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

LIPINSKI, M. M. et al. Genome-wide analysis reveals mechanisms modulating

autophagy in normal brain aging and in Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14164–14169, 2010.

LOREFÄLT, B.; TOSS, G.; GRANÉRUS, A. K. Weight loss, body fat mass, and Leptin in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 24, n. 6, p. 885–890, 2009.

LUHESHI, L. M.; CROWTHER, D. C.; DOBSON, C. M. Protein misfolding and disease : from the test tube to the organism. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, p. 25–31, 2008.

MADAY, S.; HOLZBAUR, E. L. F. Compartment-specific regulation of autophagy in primary neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 22, p. 5933–5945, 2016.

MADER, B. J. et al. Rotenone inhibits autophagic flux prior to inducing cell death. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 1063–1072, 2012.

MAILLET, A. et al. The prominent role of serotonergic degeneration in apathy, anxiety and depression in de novo Parkinson's disease. **Brain**, v. 139, n. 9, p. 2486–2502, 2016.

MAJUMDER, S. et al. Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, 2011.

MALLET, N. et al. Cellular and synaptic dysfunctions in Parkinson's disease: Stepping out of the striatum. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 1–29, 2019.

MCQUEEN, E. G.; DOYLE, A. E.; SMIRK, F. H. Mechanism of Hypotensive Action of Reserpine, an Alkaloid of *Rauwolfia serpentina*. **Nature**, n. 4439, 1954.

MENZIES, F. M.; FLEMING, A.; RUBINSZTEIN, D. C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 345–357, 2015.

MICHIORRI, S. et al. The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 6, p. 962–974, 2010.

MITSUMOTO, A.; NAKAGAWA, Y. DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. **Free Radical Research**, v. 35, n. 6, p. 885–893, 2001.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728–741, 11 nov. 2011.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; LEVINE, B. Methods in Mammalian Autophagy

Research. **Cell**, v. 140, n. 3, p. 313–326, 2010.

MOGHADDAM, H. S. et al. Neurotransmission systems in Parkinson ' s disease
Neurotransmission systems Dopaminergic system. v. 28, n. 5, p. 509–536, 2017.

MOISAN, F. et al. Parkinson disease male-to-female ratios increase with age : French
nationwide study and meta- analysis. p. 952–957, 2016.

MORELLI, M. et al. Effect of Aging on Magnetic Resonance Measures Differentiating
Progressive Supranuclear Palsy From Parkinson ' s Disease. v. 29, n. 4, p. 488–495,
2014.

MORRIS, R. et al. Overview of the cholinergic contribution to gait, balance and falls in
Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 63, n. January, p. 20–
30, 2019.

MULLETT, S. J.; HINKLE, D. A. DJ-1 knock-down in astrocytes impairs astrocyte-
mediated neuroprotection against rotenone. **Neurobiology of Disease**, v. 33, n. 1, p.
28–36, jan. 2009.

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

ONU. World Population Prospects 2022 : Summary of Results. p. 1–2, 2022.

OSTERHAUS, A. et al. α -Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, p. 839–840, 1997.

PANKIV, S. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of
ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. **Journal of Biological Chemistry**,
v. 282, n. 33, p. 24131–24145, 2007.

PASQUINI, J. et al. Progression of tremor in early stages of Parkinson's disease: A
clinical and neuroimaging study. **Brain**, v. 141, n. 3, p. 811–821, 2018.

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

PERES, F. F. et al. Cannabidiol prevents motor and cognitive impairments induced by
reserpine in rats. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. SEP, p. 1–10, 2016.

PLAZA-ZABALA, A.; SIERRA-TORRE, V.; SIERRA, A. Assessing Autophagy in
Microglia: A Two-Step Model to Determine Autophagosome Formation, Degradation,
and Net Turnover. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. January, p. 1–11, 2021.

REEVE, A.; SIMCOX, E.; TURNBULL, D. Ageing and Parkinson's disease: Why is
advancing age the biggest risk factor? **Ageing Research Reviews**, v. 14, n. 1, p. 19–
30, 2014.

REHMAN, K. et al. Exposure of Environmental Contaminants and Development of

- Neurological Disorders. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 31, n. 2, p. 35–53, 2021.
- RISACHER, S. L.; SAYKIN, A. J. Neuroimaging in aging and neurologic diseases. **Handb Clin Neurol**, v. 167, p. 191–227, 2019.
- RIZEK, P.; KUMAR, N.; JOG, M. S. An update on the diagnosis and treatment of Parkinson disease. **Cmaj**, v. 188, n. 16, p. 1157–1165, 2016.
- ROJAS-CORRALES, M. O. et al. Antidepressant-like effect of tramadol and its enantiomers in reserpinized mice: Comparative study with desipramine, fluvoxamine, venlafaxine and opiates. **Journal of Psychopharmacology**, v. 18, n. 3, p. 404–411, 2004.
- ROSS, C. A.; POIRIER, M. A. Protein aggregation and neurodegenerative disease. n. July, p. 10–17, 2004.
- RUIZ, P.; CALLIARI, A.; PAUTASSI, R. M. Reserpine-induced depression is associated in female, but not in male, adolescent rats with heightened, fluoxetine-sensitive, ethanol consumption. **Behavioural Brain Research**, v. 348, p. 160–170, 1 ago. 2018.
- SABLI, I. K.; SANCHO-SHIMIZU, V. Inborn errors of autophagy and infectious diseases. **Current Opinion in Immunology**, v. 72, p. 272–276, 2021.
- SAHU, R. et al. Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. **Developmental Cell**, v. 20, n. 1, p. 131–139, 2011.
- SANBERG, P. R. et al. The Catalepsy Test: Its Ups and Downs. **Behavioral Neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748–759, 1988.
- SANDER, H. et al. Ponceau S Waste: Ponceau S Staining for Total Protein Normalization. **Anal Biochem.**, v. 575, p. 44–53, 2019.
- SANTANA, W. S. et al. Phytol, a Chlorophyll Component, Prevents Motor Impairments Induced by Reserpine in Rats. **Journal of Pharmacological, Chemistry and Biological Sciences**, v. 03, n. 01, p. 24–35, 2021.
- SANTOS, E. DE R. **ATIVAÇÃO ASTROCITÁRIA EM ESTÁGIOS INICIAIS DE UM MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO PROGRESSIVO INDUZIDO POR RESERPINA**. [s.l: s.n.].
- SANTOS, J. R. et al. Cognitive, motor and tyrosine hydroxylase temporal impairment in a model of parkinsonism induced by reserpine. **Behavioural Brain Research**, v. 253, p. 68–77, 2013.
- SARKAR, S. et al. Small molecules enhance autophagy and reduce toxicity in

- Huntington's disease models. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 6, p. 331–338, 2007.
- SATO, S. et al. Loss of autophagy in dopaminergic neurons causes Lewy pathology and motor dysfunction in aged mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- SCHAPIRA, A. H. V.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 2017.
- SCHMIDT, M. F.; GAN, Z. Y.; KOMANDER, D. Ubiquitin signalling in neurodegeneration: mechanisms and therapeutic opportunities. **Cell Death & Differentiation**, p. 570–590, 2021.
- SHARMA, J. C.; LEWIS, A. **Weight in Parkinson's Disease: Phenotypical Significance**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. v. 134
- SHIBATA, M. et al. Regulation of intracellular accumulation of mutant huntingtin by beclin 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14474–14485, 2006.
- SHIN, D. W. Dual roles of autophagy and their potential drugs for improving cancer therapeutics. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 28, n. 6, p. 503–511, 2020.
- SKALISZ, L. L. et al. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal model of depression-Parkinson's disease association. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 26, v. 26, p. 879–883, 2002.
- SUMITOMO, A.; TOMODA, T. Autophagy in neuronal physiology and disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 60, p. 133–140, 2021.
- TAIRA, T. et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. **EMBO Reports**, v. 5, n. 2, p. 213–218, 2004.
- TANJI, K. et al. P62 deficiency enhances α -synuclein pathology in mice. **Brain Pathology**, v. 25, n. 5, p. 552–564, 2015.
- TANNER, C. M. et al. The disease intersection of susceptibility and exposure: Chemical exposures and neurodegenerative disease risk. **Alzheimer's and Dementia**, v. 10, n. 3 SUPPL., p. S213–S225, 2014.
- TAO, X.; TONG, L. Crystal structure of human DJ-1, a protein associated with early onset Parkinson's disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 33, p. 31372–31379, 2003.
- TATTON, N. A. Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 166, n. 1, p. 29–43, 2000.
- TONG, J. et al. Low levels of astroglial markers in Parkinson's disease: Relationship to α -synuclein accumulation. **Neurobiology of Disease**, v. 82, p. 243–253, 2015.

- TOOZE, S. A.; SCHIAVO, G. Liaisons dangereuses : autophagy , neuronal survival and neurodegeneration. p. 504–515, 2008.
- TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017.
- UVERSKY, V. N. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 1, p. 17–37, 2007.
- VAN ONSELEN, R.; DOWNING, T. G. Neonatal Reserpine Administration Produces Widespread Neuronal Losses and α -Synuclein Inclusions in a Rat Model. **Neurotoxicity Research**, v. 39, n. 6, p. 1762–1770, 2021.
- VENDEROVA, K.; PARK, D. S. Programmed cell death in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. 1–23, 2012.
- VILA, M. et al. The role of glial cells in Parkinson's disease. **Current Opinion in Neurology**, v. 14, n. 4, p. 483–489, 2001.
- VISANJI, N. P. et al. The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2013.
- VOGIATZI, T. et al. Wild type α -synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 35, p. 23542–23556, 2008.
- WAKABAYASHI, K. et al. The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. **Molecular neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 495–508, 2013.
- WANG, Q. J. et al. Induction of Autophagy in Axonal Dystrophy and Degeneration. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 31, p. 8057–8068, 2006.
- WILLIAMS-GRAY, C. H.; WORTH, P. F. Parkinson's disease. **Medicine**, v. 44, n. 9, p. 542–546, 2016.
- WILLS, J. et al. Elevated tauopathy and alpha-synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia. **Experimental Neurology**, v. 225, n. 1, p. 210–218, 2010.
- WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: A review of the evidence. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. SUPPL. 1, 2011.
- WU, F. et al. Rotenone impairs autophagic flux and lysosomal functions in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 284, p. 900–911, 2015.
- WYSS-CORAY, T. Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation Tony. **Nature**, v. 539, n. 7628, p. 180–186, 2016.
- XIE, Z.; KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: Core machinery and

adaptations. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 10, p. 1102–1109, 2007.

XILOURI, M.; BREKK, O. R.; STEFANIS, L. α -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. **Molecular neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 537–551, 2013.

YAO, S. et al. A transcriptome-wide association study identifies susceptibility genes for Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2021.

YOSHII, S. R.; MIZUSHIMA, N. Monitoring and measuring autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1–13, 2017.

YUKO, S. et al. Accumulation of phosphorylated α -synuclein in aging human brain. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 62, n. 6, p. 644–654, 2003.

ZHANG, H.; DUAN, C.; YANG, H. Defective Autophagy in Parkinson's Disease: Lessons from Genetics. **Molecular Neurobiology**, v. 51, n. 1, p. 89–104, 2015.

ZHANG, L. et al. The role of autophagy in Parkinson's disease. **Neural Regeneration Research**, v. 7, n. 2, p. 141–145, 2012.

ANEXO – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA)

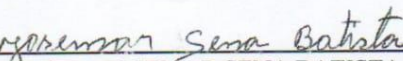


UNIVERSIDADE DE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM ANIMAIS (CEPA)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “ENVOLVIMENTO DAS PROTEÍNAS LIGANTES DE CÁLCIO, CASPASE 3 E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE NEURÔNIOS E CÉLULAS GLIAIS NO MODELO ANIMAL DE PARKINSONISMO INDUZIDO PELA RESERPINA.”, registrada com o nº 66/2018, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Ronaldo dos Santos que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de 09/10/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 26/11/2018, Término: 31/01/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico
Nº de animais	96
Peso/Idade	350-500g / 7-9 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS.


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

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