



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO
CIENTÍFICA - PIBIC

**EFEITO DA MODULAÇÃO DA VIA NORADRENÉRGICA E A
INFLUÊNCIA DOS RECEPTORES NICOTÍNICOS SOBRE
ALTERAÇÕES NEUROINFLAMATÓRIAS, NEUROQUÍMICAS E
COMPORTAMENTAIS EM UM MODELO DE PARKINSONISMO
INDUZIDO POR RESERPINA**

*EFEITO DA MODULAÇÃO NORADRENÉRGICA SOBRE
ALTERAÇÕES NEUROQUÍMICAS EM UM MODELO DE
PARKINSONISMO*

Área do conhecimento: Ciências Biológicas
Subárea do conhecimento: Ciências Fisiológicas
Especialidade do conhecimento: Neurociências

Relatório Final
Período da bolsa: de 09/2023 a 08/2024
Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/COPES

Orientador: Prof. Dr. Auderlan Mendonça de Gois
Autor: Caroline Izidro Andrade



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

SUMÁRIO

1.	Introdução	2
2.	Revisão Bibliográfica	3
3.	Objetivos.....	7
3.1.	Objetivo Geral:	7
3.2.	Objetivos Específicos:	7
4.	Metodologia.....	7
4.1.	Animais.....	7
4.2.	Drogas.....	8
4.3.	Delineamento Experimental	8
4.4.	Perfusão e processamento dos encéfalos	9
4.5.	Análise histológica do tecido.....	10
4.6.	Análise estatística	12
5.	Resultados e Discussões	12
5.1.	Imuno-histoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH)	12
5.2.	Imuno-histoquímica para GFAP.....	15
6.	Conclusões.....	17
7.	Perspectivas	18
	Referências bibliográficas.....	18
8.	Outras atividades	23



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

1. Introdução

A doença de Parkinson (DP) é a desordem motora mais comum no mundo (Chia; Tan; Chao, 2020) e é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum entre os idosos depois do Alzheimer (Reich; Savitt, 2019). A DP não tem causa definida (Beitz, 2014), e é considerada uma doença multifatorial, levando ao comprometimento progressivo do controle motor (Lotankar; Prabhavalkar, Bhatt, 2017).

Por ser uma doença multifatorial, vários fatores de risco estão associados a DP, como a idade avançada, histórico familiar da doença, exposição a pesticidas, neurotoxinas e a outros fatores ambientais (Beitz, 2014), os quais estão associados às variações na prevalência da doença em diferentes regiões do planeta (Ole-Björn; Stortein, 2017). Outro fator de risco associado a DP é a diferença de sexo, uma vez que há uma prevalência da doença em homens em comparação as mulheres, devido a um efeito neuroprotetor dos hormônios sexuais femininos (Lima et al., 2021), no entanto, ainda não são claros os mecanismos envolvidos.

Normalmente a DP tem uma progressão silenciosa e o diagnóstico é feito pela observação dos sintomas motores cardinais, o tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural, e embora a DP seja predominantemente definida pelos sintomas motores, alguns sintomas não motores são observados em estágios iniciais da doença, como disfunção autonômica e intestinal, déficit cognitivo, alterações psiquiátricas, disfunção sensorial e perturbações do sono (Chia; Tan; Chao, 2020; Samii, Nutt; Ransom, 2004). Os sintomas motores são resultado da morte progressiva de neurônios dopaminérgicos na substância negra parte compacta (SNpc), levando a uma deficiência de dopamina no estriado (Dauer; Przedborski, 2003; De Virgilio et al., 2016), morte a qual, está associada a formação de corpos de Lewy, com agregados da proteína alfa-sinucleína, que prejudicam o funcionamento dos neurônios dopaminérgicos (Beitz, 2014). Enquanto isso, os sintomas não motores da doença de Parkinson provavelmente estão relacionados à disfunção específica das vias noradrenérgica e serotoninérgica no cérebro (Leal et al., 2019a; Leal et al., 2019b). Além disso, há um estudo que sugere que o sistema GABAérgico pode desempenhar um papel nas manifestações não motoras nos estágios iniciais da doença, especialmente em pacientes com distúrbio do comportamento do sono REM isolado ou aqueles com navegação medicamentosa (Titova & Chaudhuri,



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

2018; Murueta-Goyena et al., 2019). Também, a DP é considerada uma doença multissistêmica, uma vez que além do encéfalo, pode afetar outros órgãos, como o cólon, as glândulas salivares e a pele. No entanto, os maiores desafios da doença estão relacionados aos danos motores (Bloem; Okun; Klain, 2021).

Além da disfunção dopaminérgica, estudos mostram que a via noradrenérgica desempenha um papel crucial na fisiopatologia da DP, incluindo a progressão dos danos à via dopaminérgica (Sampaio et al., 2020; Pozzi et al., 2023). Os estudos epidemiológicos surgem que o uso de fármacos agonistas dos receptores β 2-adrenérgicos (β 2AR) podem estar associados a um menor risco de desenvolver a DP e o mecanismo envolvido na modulação desses receptores está associado a resposta inflamatória pelas células gliais (Ryan et al., 2013; O'Neill; Harkin, 2018; Paredez-Rodriguez et al., 2020).

Nesse contexto, investigar o efeito neuroprotetor dos agonistas seletivos para os β 2AR, pode trazer grande contribuição para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DP. Dessa forma, neste estudo avaliamos o efeito da administração crônica de salbutamol sobre alterações neuroquímicas em um modelo de Parkinsonismo induzido por reserpina.

2. Revisão Bibliográfica

A DP é uma das doenças neurodegenerativas mais comum na população idosa, atrás apenas da doença de Alzheimer (Ole-Björn & Stortein, 2017). A DP foi descrita pela primeira vez em 1817, pelo médico britânico James Parkinson, em “Um Ensaio sobre a Paralisia Agitante”, entre os principais sintomas relatados por Parkinson estão o tremor, que era observado durante o repouso e descrito como um movimento tremulante involuntário. Ele também mencionou a lentidão de movimento, embora não tenha feito uma distinção clara entre fraqueza e lentidão, mas destacou a redução da potência muscular. Além disso, Parkinson notou que o sono dos pacientes se tornava perturbado e que havia a presença de intestinos lentos ou torpor dos intestinos. Importante destacar que, segundo Parkinson, os sentidos e o intelecto dos pacientes permaneciam inalterados. Esses sintomas formaram a base inicial para a compreensão da doença que hoje leva o nome de Parkinson. (Goedert; Compston, 2018; Parkinson, 2002).

Embora a DP possa ser considerada uma doença de forma genética, a maioria dos



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

pacientes são acometidos pela forma esporádica, na qual ainda não é possível afirmar com precisão quais os fatores ambientais podem desencadear a doença (Lees; Hardy; Revez, 2009). No entanto, o envelhecimento é um dos principais fatores de risco, uma vez que a incidência e prevalência da doença aumenta com o avanço da idade, principalmente em pessoas acima de 65 anos, com pico de incidência entre 70 e 79 anos (Ole-Björn; Stortein, 2017; Wickremaratchi et al., 2011). A DP é de ocorrência global, mas apresenta prevalência variável entre populações asiáticas, africanas, europeias e americanas, fortalecendo a influência da interação genética e ambiental (Ou et al., 2021). Dessa forma, projeções apontam que com aumento do envelhecimento da população mundial, o número de casos de DP deve aumentar consideravelmente nas próximas décadas, o que impactará significativamente as políticas públicas e a qualidade de vida dos pacientes e suas famílias (Ole-Björn; Stortein, 2017).

Fisiopatologicamente, a DP é caracterizada pela presença de inclusões citoplasmáticas proteicas, denominadas “Corpos de Lewy”, uma das principais causas da morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc, o que leva a depleção de dopamina no estriado e ao surgimento dos sintomas motores da característica da doença (Dauer; Przedborski, 2003; Braak et al., 2003). O estudo de Braak et al. (2003), mostrou que a progressão da DP esporádica segue um padrão estereotípico que pode ser dividido em seis estágios, dos quais afetam, progressivamente, diferentes regiões encefálicas. Segundo Braak, a doença começa em regiões periféricas até atingir o tronco cerebral inferior e áreas olfatórias, o que pode ser associado aos sintomas não motores precoces (Doorn et al., 2014; Scheperjans et al., 2015). Em sequência, a doença progride para núcleos superiores do tronco cerebral e para a substância negra, provocando os sintomas motores conhecidos da DP (Moustafa et al., 2016; Fahn, 2003; Jankovic, 2008). E por fim, alcança o córtex cerebral, contribuindo para os sintomas mais avançados da doença como os déficits cognitivos e demência (Braak et al., 2003; Park & Stacy, 2009; Rana et al., 2015; Aarsland, Zaccai & Brayne, 2005; Aarsland & Kurz, 2010).

Além do comprometimento dopaminérgico, estudos apontam que a disfunção do sistema noradrenérgico desempenha um papel crucial na progressão da DP, influenciando uma gama de sintomas não motores, bem como dos sintomas motores (Sampaio et al., 2020; Pozzi et al., 2023; Paredez-Rodriguez et al., 2020; Titova et al., 2017). Este sistema é composto por neurônios que utilizam a noradrenalina como neurotransmissor, e assim



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

como a dopamina, é uma monoamina da família das catecolaminas, as quais são derivadas da tirosina (Nagatsu, Toshiharu & Udenfriend, 1964; Gibson & Wurtman, 1978; Paredez-Rodriguez et al., 2020). Além disso, esses neurônios enviam projeções para várias regiões cerebrais envolvidas na regulação do humor, atenção, resposta ao estresse e diversas funções autonômicas (LeWitt, 2012; Paredez-Rodriguez et al., 2020). Dessa forma, danos nas projeções noradrenérgicas, causadas por diferentes fatores, incluindo deposição proteica como sugerido por Braak, resulta no aparecimento de diferentes sintomas e na progressão da DP (Paredez-Rodriguez et al., 2020).

Na DP, a ativação de células gliais, microglias e astrócitos, pode aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, gerando um quadro neuroinflamatório contribuindo para a neurodegeneração dopaminérgica e para a progressão da doença (Kam et al., 2020; Kwon & Koh, 2020). Por outro lado, tem sido observado que a modulação do sistema noradrenérgico, através do aumento da disponibilidade da noradrenalina ou modulação dos receptores adrenérgicos, pode apresentar efeito neuroprotetor através da diminuição da resposta inflamatória na via dopaminérgica (Yssel et al., 2018; Ryan et al., 2013; O'Neill; Harkin, 2018; Paredez-Rodriguez et al., 2020).

Nesse contexto, estudos mostram que o uso crônico de fármacos agonistas dos β 2AR estão associados a um risco reduzido para o desenvolvimento da DP enquanto o uso de fármacos antagonistas dos β 2AR estão associados a um risco aumentado para a doença (Hopfner et al., 2020; Chen et al., 2021; Scherzer, Riise & Locascio, 2020). Além disso, a modulação desses receptores pode regular a expressão da α -sinucleína (Mittal et al., 2017;) e reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias promovendo um efeito neuroprotetor (Ryan et al., 2013; O'Neill; Harkin, 2018). No entanto, Qian et al. (2009) mostra que a ativação dos β 2AR pode induzir neurotoxicidade dopaminérgica, através da ativação glial por via dependente de ERK/proteína quinase-A (Qian et al., 2009). Posteriormente, outro estudo do mesmo autor revela que doses extremamente baixas de salmeterol, um agonista de longa duração dos β 2AR, conferem ação neuroprotetora ao inibir a ativação microglial por uma via dependente de β 2AR/ β -arrestina2, mas independente de cAMP/PKA (Qian et al., 2011). Dessa forma, são necessários estudos que esclareçam a relação entre os agonistas dos β 2AR e a progressão da DP.

Devido a DP não apresentar uma etiologia definida e se manifestar, principalmente, na forma esporádica, com uma grande variedade de mecanismos fisiopatológicos, são



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

necessários estudos que possam esclarecer esses mecanismos e ajudem a desenvolver novas estratégias terapêuticas que impeçam a progressão da doença. Nesse sentido, estudos em modelos animais que possam representar as características fisiopatológicas da DP têm proporcionado grandes avanços na compreensão desses mecanismos e no desenvolvimento de novas substâncias com potencial neuroprotetor (Li et al., 2023; Song, Peng & Zhu, 2021; Silva-Martins et al., 2021; Brandão et al., 2017).

Entre os modelos animais utilizados para o estudo da progressividade dos sintomas e das características fisiopatológicas da DP, o modelo farmacológico induzido por reserpina tem se destacado (Cunha et al., 2022; Fadanni et al., 2023; da Cruz Guedes et al., 2023). A reserpina é um alcaloide indólico natural, extraído da *Rauwolfia serpentina* que em alguns casos pode apresentar substâncias com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti-mutagênicas (Ramu et al., 2021). No entanto, inicialmente, a reserpina foi utilizada para o controle da hipertensão e tratamento da esquizofrenia, porém após observação dos sintomas colaterais, foi visto que o tratamento prolongado desencadear sintomas semelhantes aos da DP nos pacientes hipertensivos (Lee et al., 2015; Li et al., 2022). Logo, esse fármaco tornou-se uma valiosa ferramenta para a indução do parkinsonismo em modelos animais. No sistema nervoso central, a reserpina inibe o transportador vesicular de monoaminas (VMAT2) impedido que os neurotransmissores monoaminérgicos, como a dopamina, noradrenalina e serotonina, sejam transportados para dentro das vesículas e liberados na fenda sináptica, o que provoca ao surgimento progressivo de sintomas motores e não motores semelhantes à DP (Leão et al., 2015; Wang et al., 2023).

Os estudos mostram que o modelo animal induzido por reserpina é um importante modelo para simular a característica progressiva do parkinsonismo, bem como por representar, claramente, sintomas não motores em estágios iniciais e sintomas motores em estágios avançados do parkinsonismo (Santos et al., 2013; Lins et al., 2018; Leal et al., 2019). Além disso, a reserpina está envolvida em mecanismos que podem levar a danos celulares, como sua capacidade de inibir o fluxo autofágico, levando ao acúmulo de α -sinucleína nos autofagossomos (Lee et al., 2015), aumento do estresse oxidativo (Fernandes et al., 2012; Leão et al., 2017) e ao aumento na liberação de fatores pró-inflamatórios que podem levar à neurodegeneração dopaminérgica (Cunha et al., 2022) e à progressão do parkinsonismo. Dessa forma, esse modelo animal tem sido eficaz para a



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados a DP e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que a retardem a progressão da doença.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral:

Avaliar o efeito da administração crônica de salbutamol sobre alterações neuroquímicas em um modelo de parkinsonismo induzido por reserpina.

3.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar o efeito do tratamento com salbutamol na imunorreatividade para tirosina hidroxilase em um modelo animal de parkinsonismo induzido por reserpina;
- Avaliar o efeito do tratamento com salbutamol na imunorreatividade para GFAP em um modelo animal de parkinsonismo induzido por reserpina.

4. Metodologia

4.1. Animais

Foram utilizados 28 ratos, com quatro meses de idade, com peso de aproximadamente 250g, da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*, provenientes do biotério setorial do departamento de fisiologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Os animais foram alojados aleatoriamente em número de 4 animais, em gaiolas plásticas (33 x 40 x 17 cm), sob ventilação e temperatura controladas (22 ± 2 °C), com ciclo claro/escuro de 12h/12h e acesso livre à água e comida. Os animais utilizados neste estudo foram tratados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Lei brasileira para o uso de animais em pesquisas (Lei Arouca 11.794 de 8 de outubro de 2008) e todos os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEUA/UFS), sob o protocolo de nº 6294030423. Todos os esforços foram realizados para minimizar o número de animais usados e o seu sofrimento.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

4.2. Drogas

A reserpina (RES) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 0,1 mg/kg foi dissolvida em ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, BR) 99,7% (30 μ L) e diluída em água destilada (30 mL). O veículo consiste na mesma quantidade de ácido acético e água destilada usados na solução de reserpina.

O salbutamol (5 mg/kg), agonista seletivo β 2-adrenérgico, foi dissolvido em solução salina 0,9 mg/ml. Por fim, o cloridrato de cetamina (Ketamina®, Agener União) 100 mg/kg e o Cloridrato de xilazina (Calmium®, Agener União) 10 mg/kg, foram utilizados para anestesia dos animais.

4.3. Delineamento Experimental

Para este experimento foram utilizados 28 animais, ratos da linhagem *Wistar*, com 4 meses de idade, os quais foram submetidos ao tratamento crônico com solução salbutamol (5 mg/kg) ou veículo, por via subcutânea (s.c), diariamente durante 75 dias. Nos últimos 30 dias, metade dos animais tratados com salbutamol ou veículo foram induzidos ao parkinsonismo com uma injeção s.c. de reserpina (0,1 mg/kg) a cada 48 horas, no total de 15 injeções, formando os grupos (1) CTR, controle, que recebeu apenas as soluções veículos (n = 7); (2) SALB, tratado diariamente com salbutamol (n = 7); (3) RES, que recebeu a solução de reserpina (n = 7); e (4) RES-SALB, tratado com salbutamol e reserpina (n = 7). No último dia do experimento, os animais foram anestesiados e sacrificados por perfusão transcardíaca, os encéfalos foram coletados e processados para serem submetidos a técnica de imuno-histoquímica.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

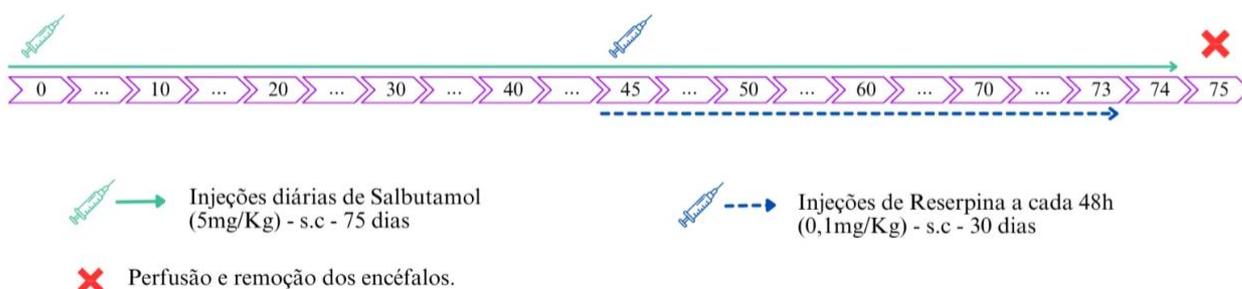


Figura 1: Desenho esquemático do delineamento do experimento.

4.4. Perfusão e processamento dos encéfalos

Após o período de injeções, no último dia do experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de cetamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) intraperitoneal. Com o animal completamente anestesiado e imobilizado, foi realizado um acesso, seccionando a pele e partes moles, a cavidade torácica. Após a exposição da cavidade abdominal, foi realizada uma incisão no diafragma para exposição do coração.

Os animais foram perfundidos intracardiacamente com tampão fosfato de sódio (TFS; pH 7,4) para a lavagem dos vasos, por 10 minutos e, posteriormente, com paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato (TF; pH 7,4; 100 mM), por 20 minutos, para fixação do tecido. Após a perfusão, os encéfalos foram removidos e mergulhados em uma solução fixadora de sacarose 30% e mantidos a temperatura de 4°C. Após a perfusão dos animais, as carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no biotério do Departamento de Fisiologia da UFS para posterior recolhimento durante a coleta de lixo especializada.

Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o hospital universitário para descarte junto ao material do hospital. Os encéfalos foram levados a um criostato de deslizamento (Leica, EUA) onde foram congelados à -20°C para obtenção de secções coronais de 50 µm, que foram distribuídas sequencialmente em 4 compartimentos, em um meio líquido contendo solução anticongelante. Cada um desses compartimentos corresponde a 1 de 4 secções, de maneira que a distância entre uma



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

secção e a seguinte seja de aproximadamente 250 μm . Estes cortes foram armazenados em uma solução anticongelante à base de etilenoglicol e TF e posteriormente conservados a uma temperatura de 4 °C até as reações de imuno-histoquímica

4.5. Análise histológica do tecido

4.5.1. Imuno-histoquímica

Após os encéfalos serem cortados em secções com espessura de 50 μm , as secções dos tecidos foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica a temperatura ambiente (22-25°C). Os tecidos foram lavados em TF 0,1 M (4 vezes de 5 minutos, sob agitação automática), e em seguida previamente tratados com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,3% e TF por 20 minutos, para inativação da peroxidase endógena.

Em seguida, os tecidos foram lavados em TF 0,1 M (4 vezes de 5 minutos, sob agitação automática) para retirar o excesso de H_2O_2 e foram lavados em leite desnatado 5% e TF durante 15 minutos, para evitar ligações inespecíficas do anticorpo primário, e ao retirá-los do leite foram lavados em TF por 5 minutos, em seguida encubados em anticorpos primários, todos produzidos em coelho, policlonais, anti-tirosina hidroxilase (TH) (#AB152 Millipore/Sigma, EUA, 1:3000), anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Millipore, Billerica, MA, United States, 1: 1000); diluídos em TF contendo Triton-X 100 a 52 0,4% (ICN Biomedicals), e soro normal de cabra (Sigma Chemical Company) a 2% durante 24 horas (22 °C). Na sequência os tecidos foram lavados em TF 0,1 M (4 vezes de 5 minutos) e depois encubados em anticorpo secundário biotilado anti-coelho (sc2004 Santa Cruz Biotechnology, EUA, 1:1000), diluído em TF contendo TritonX 100 a 0,4%, por 2 horas. Após o anticorpo secundário, as secções passaram por lavagem em TF (4 vezes de 5 minutos) e encubação durante 2 horas no complexo avidina biotina (ABC – avidin biotin complex, Elite kit, Vector Labs, Burlingame, EUA). Em seguida os tecidos foram lavados em TF 0,1 M (4 vezes de 5 minutos) e depois os tecidos foram colocados em contato com o cromógeno, a diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA) a 2,5% diluída em TF (0,1 M/pH 7,4) e 0,01% de H_2O_2 para o processo de revelação.

4.5.2. Aquisição das imagens

Após a imuno-histoquímica as secções foram montadas em lâminas previamente



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

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

4.5.3. Contagem das células

Para cada animal foram feitas imagens dos cortes em aumento de 100x (objetiva de 10x), e observada a presença ou ausência de células imunorreativas nos tecidos. A contagem das células foi realizada em 4 secções obtidas em cada animal (5 a 7 animais por grupo) e o número de células para cada animal correspondeu à média entre as 4 secções analisadas. Foram analisadas as seguintes áreas: SNpc e área tegmentar ventral (VTA). Todas as células imunorreativas a TH nas áreas de interesse foram contadas utilizando o software Image J (versão 1.6.0, NIH) e a delimitação da área foi realizada com base no atlas de Paxinos e Watson (2007). As contagens foram realizadas “as cegas”, de forma que o experimentador não sabia a que grupo de tratamento pertencia cada imagem a ser analisada. Os valores para cada animal foram normalizados pela média do grupo controle.

4.5.4. Avaliação da densitometria óptica relativa (DOR)

Para a análise da DOR as imagens foram obtidas em um mesmo momento, submetidas a uma mesma intensidade de luz, sem passar por qualquer modificação de brilho e contraste, uma vez que os valores em pixels encontrados em cada imagem correspondem a uma intensidade maior ou menor de marcação de determinada substância no tecido analisado. Cada animal foi representado por 4 imagens consecutivas para cada área: estriado dorsal e substância negra reticulada (SNr), as quais foram analisadas utilizando o software Image J (versão 1.6.0, NIH). Na mesma imagem também foi selecionado um campo de igual tamanho para uma área controle, com pouca ou quase nenhuma marcação no tecido. O número médio de pixels calculados nos campos de interesse foi subtraído do número de pixels da área controle no mesmo tecido. Assim



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

como na contagem de células, os valores para cada animal foram normalizados pela média do grupo controle.

4.6. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os quais apresentaram distribuição normal o que permitiu a escolha de testes paramétricos para análise dos dados. Em linhas gerais, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste LSD de Fisher. Os dados foram expressos como média mais ou menos o erro padrão da média (\pm E.P.M.) e foram considerados significativos os valores com $p > 0,05$. Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Graphpad Prism versão 8.0.

5. Resultados e Discussões

5.1. Imuno-histoquímica para Tirosina Hidroxilase (TH)

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa para o número de células imunorreativas a TH na SNpc [$F(3,16) = 3,550$; $p = 0,0384$] e VTA [$F(3,16) = 15,15$; $p < 0,0001$] entre os grupos experimentais. O pós-teste de Fisher LSD revelou uma redução significativa no número de células imunorreativas a TH na SNpc no grupo RES quando comparado ao grupo CTR ($p = 0,0112$) e ao grupo RES-SALB ($p = 0,0443$), já na VTA, houve uma redução no número de células TH+ no grupo RES e no grupo RES-SALB quando comparados ao CTR ($p < 0,0001$ e $p = 0,0247$, respectivamente), contudo a redução vista no grupo RES-SALB foi menos acentuada que no grupo RES, havendo diferença estatística na comparação entre eles ($p = 0,0006$), Figura 2A e B; e Figura 3.

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativa na DOR para imunorreatividade a TH no estriado dorsal [$F(3,16) = 6,779$; $p = 0,0037$]. O pós-teste de Fisher LSD mostrou uma redução significativa na DOR para imunorreatividade a TH no grupo RES quando comparado ao grupo CTR ($p = 0,0299$) e ao grupo RES-SALB ($p = 0,0042$), Figura 2C e Figura 3.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

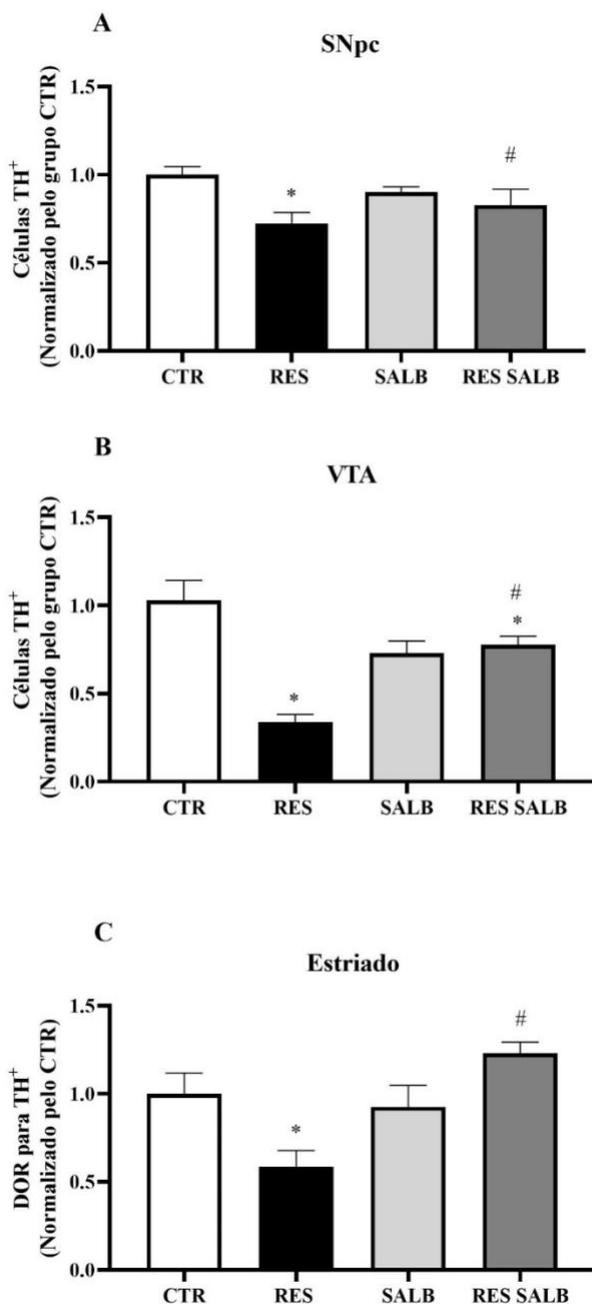


Figura 2: Efeito do tratamento com Salbutamol (5 mg/kg) no número de células e densidade óptica relativa (DOR) em regiões dopaminérgicas em um modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Em A e B, o grupo RES apresentou uma diminuição significativa no número de células imunorreativas a TH na SNpc e VTA comparado aos grupos CTR e RES-SALB. Em C, O grupo RES apresentou uma redução significativa na DOR para TH no estriado comparado aos grupos CTR e RES-SALB. Os valores foram expressos como média \pm E. P. M.. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo CTR; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo RES. (ANOVA de uma via seguidas pelo pós-teste LSD de Fisher). Controle (CTR); reserpina (RES); salbutamol (SALB); e reserpina-salbutamol (RES-SALB).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

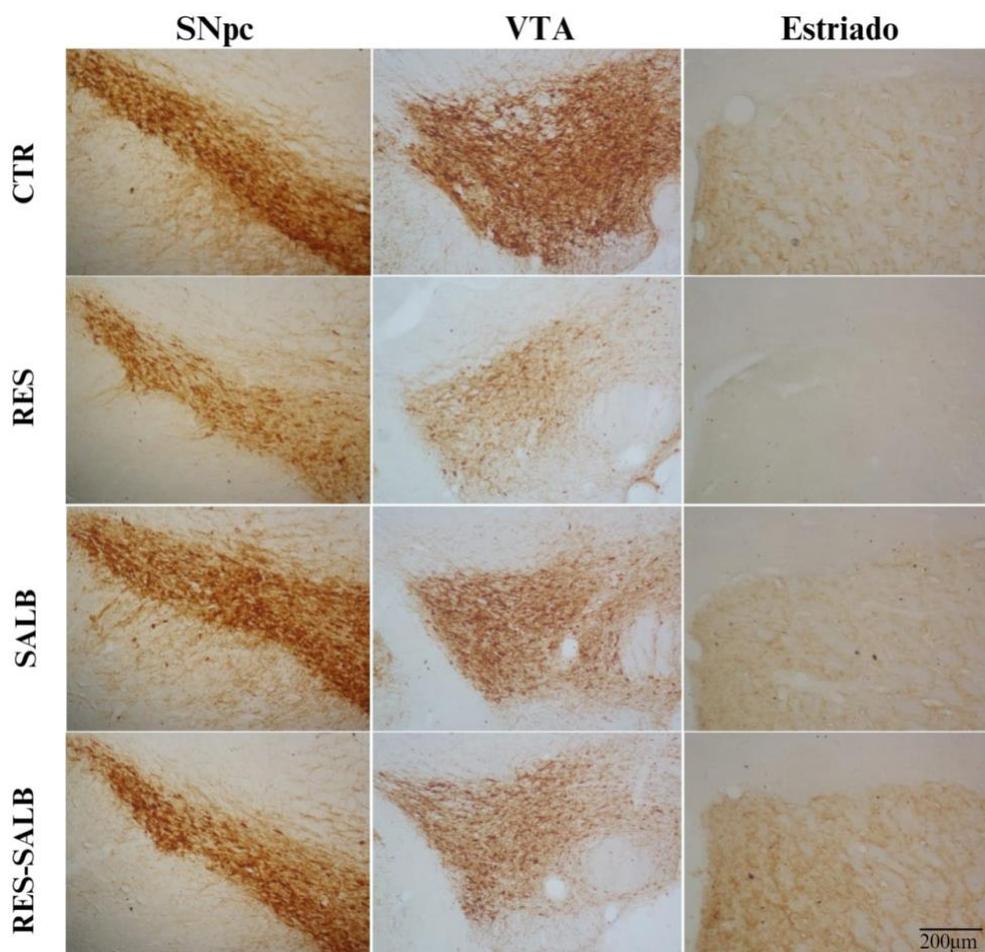


Figura 3: Imunorreatividade para Tirosina Hidroxilase (TH): Imagem representativa da marcação para TH nas áreas SNpc, Estriado e VTA. Controle (CTR); reserpina (RES); salbutamol (SALB); e reserpina-salbutamol (RES-SALB).

A TH, identificada pela primeira vez em células catecolaminérgicas, é uma enzima que atua na conversão da tirosina em L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), no início da via de síntese da dopamina e noradrenalina e adrenalina (Nagatsu et al., 2023; Nagatsu, Toshiharu & Udenfriend, 1964). Desde então, essa enzima é utilizada como biomarcador para identificar as projeções dopaminérgicas nas regiões encefálicas relacionadas a DP.

Como observado em outros estudos, a injeção de baixas doses de RES provoca uma diminuição no número de células e na DOR para TH, indicando que a RES provoca danos em células dopaminérgicas, na SNpc e VTA, levando a uma depleção de dopamina no estriado semelhante ao observado na DP (Santos et al., 2013; Swanson, 1982). Por outro lado, observamos que o tratamento crônico com SALB impediu os danos provocados pela RES na via dopaminérgica, como relatado em estudos realizados com outros agonistas seletivos para os β 2AR (O'Neill et al., 2020; Mittal et al., 2017). Isso



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

sugere que o efeito neuroprotetor promovido pelo SALB e outros agonistas dos β 2AR pode ser importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a DP.

5.2. Imuno-histoquímica para GFAP

A ANOVA de uma via mostrou diferença significativo na DOR na imunorreatividade para GFAP na SNr [F (3, 24) = 3,303; p = 0,0374] e no estriado dorsal [F (3, 24) = 6,900; p = 0,0016]. O pós-teste de Fisher LSD mostrou uma diminuição significativa na DOR da imunorreatividade para GFAP no grupo RES quando comparado ao grupo RES-SALB (p = 0,0044) na SNr, Figura 4A e Figura 5, e um aumento significativo da DOR para GFAP no grupo RES quando comparado ao grupo CTR e ao grupo RES-SALB (p = 0,0019 e p = 0,0044, respectivamente) no estriado dorsal, Figura 4B e Figura 5.

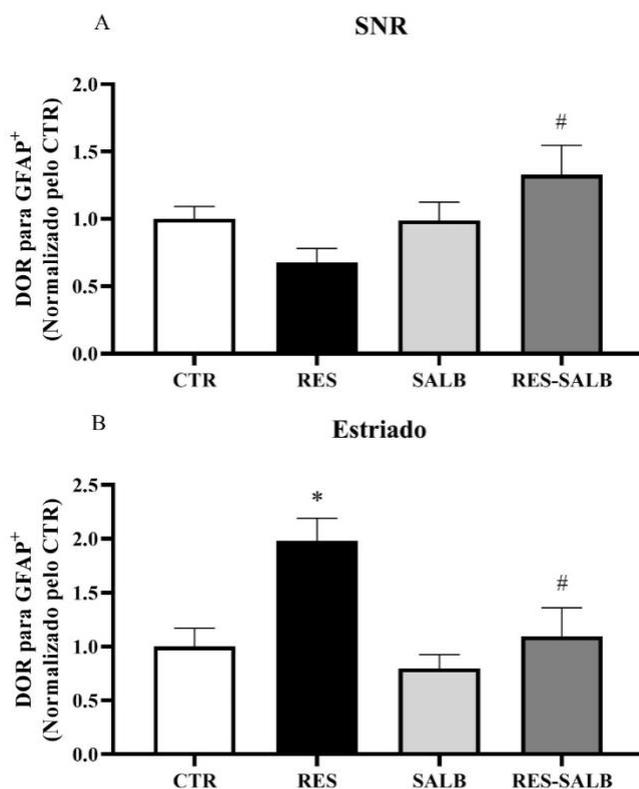


Figura 4: Efeito do tratamento com Salbutamol (5 mg/kg) na densidade óptica relativa (DOR) para GFAP na substância negra reticulada (SNr) e estriado dorsal em um modelo de parkinsonismo induzido por reserpina (0,1 mg/kg). Em A, o grupo RES apresentou uma diminuição significativa da DOR para GFAP comparado ao RES-SALB na SNr. Em B, o grupo RES apresentou um aumento significativo da DOR para GFAP comparado ao grupo CTR, no estriado dorsal. Controle (CTR); reserpina (RES); salbutamol (SALB); e reserpina-salbutamol (RES-SALB).



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

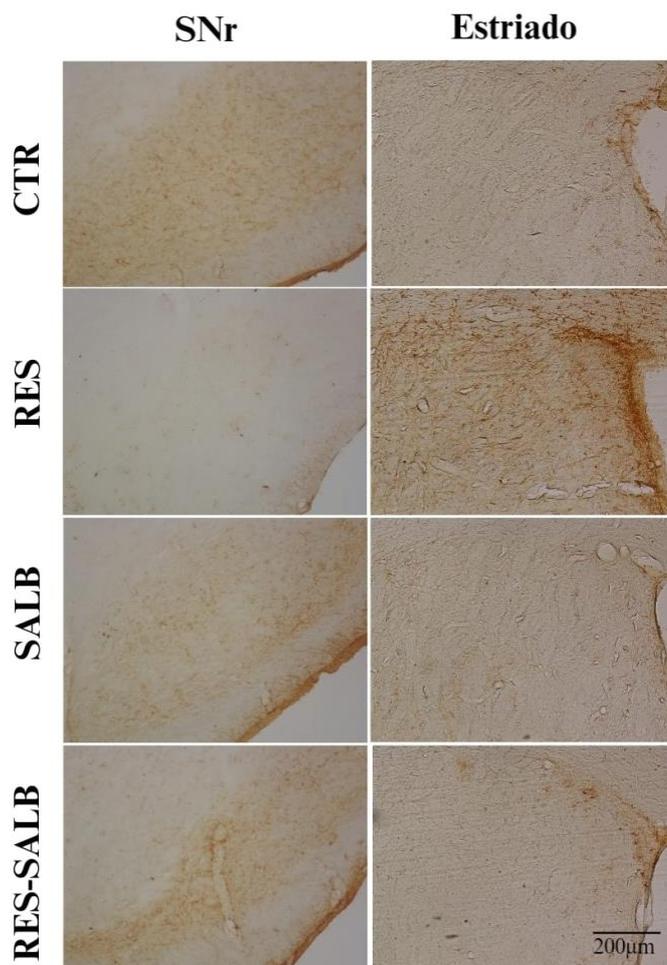


Figura 5: Imunorreatividade para GFAP: Imagem representativa da imunorreatividade para GFAP na SNr e no estriado dorsal. Controle (CTR); reserpina (RES); salbutamol (SALB); e reserpina-salbutamol (RES-SALB).

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP), é uma proteína de filamentos intermediários componente do citoesqueleto citoplasmático, expressa principalmente em astrócitos, células da glia abundantes no sistema nervoso central (Messing & Brenner, 2020). Os astrócitos são essenciais para o metabolismo cerebral, transporte de nutrientes e estabilização sináptica nas redes neuronais, e são importantes biomarcadores do sistema nervoso central (Lotankar; Prabhavalkar, Bhatt, 2017). Na fisiopatologia da DP, os astrócitos desempenham um papel fundamental na manutenção da barreira hematoencefálica, na modulação de fatores neuroinflamatórios (Preininger & Kaufer, 2022; Chiareli et al., 2021) e na preservação a função de mitocôndrias através da transmitofagia, que envolve a remoção de mitocôndrias neuronais danificadas, ou possivelmente fornecendo mitocôndrias saudáveis. Como tem sido observado em estudos



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

recentes que a troca mitocondrial entre astrócitos e neurônios pode mitigar danos neuronais (Bantle et al., 2021; Verkhatsky et al., 2023).

Tem sido demonstrado que danos neuronais podem promover a ativação astrocitária, o que pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e reduzir a síntese de agentes antioxidantes, o que pode potencializar os danos neuronais (Verkhatsky et al., 2023). Em nossos resultados, observamos a RES provocou uma leve redução da DOR para GFAP na SNr e um aumento significativo no estriado, corroborando com a hipótese do dano retrógrado (Leal et al., 2019b), enquanto que o grupo que foi tratado com salbutamol e reserpina teve um aumento na densidade na SNr e uma redução no estriado, sugerindo um processo inflamatório, nossa hipótese é de que seja um processo em estágio resolutivo, corroborando outros estudos com agonistas dos β 2AR (O'Neill et al., 2020; Torrente et al., 2023).

Segundo Cunha et al. (2022), a RES aumenta a imunorreatividade para o GFAP a partir da 10ª injeção de RES (Cunha et al., 2022), o que seria um momento crítico dos sintomas motores observados nesse modelo de parkinsonismo. Além disso, Leal et al. (2019b) relatou que os danos neuronais causados pela RES podem estar associados a uma disfunção axonal retrograda (Leal et al., 2019b), o que explicaria um maior aspecto inflamatório e ativação astrocitária no estriado dorsal. No entanto, pela ausência da quantificação de citocinas não é possível afirmar se essas células estavam atuando em um estágio pró-inflamatório ou pró-resolutivo, com a liberação de mediadores inflamatórios ou anti-inflamatórios, respectivamente.

6. Conclusões

No presente trabalho observamos que o tratamento crônico com salbutamol apresenta um efeito neuroprotetor por impedir a redução de tirosina hidroxilase e o aumento de GFAP induzido por reserpina. Sugerindo que o efeito neuroprotetor pode estar associado a uma ação anti-inflamatória relacionada à modulação das células gliais. No entanto, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos neuroprotetores associados à modulação dos β 2AR e a progressão da DP.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

7. Perspectivas

Para trabalhos futuros, temos como perspectivas, avaliar o efeito do salbutamol:

- 1) Em diferentes estágios do parkinsonismo por reserpina;
- 2) Na morfologia e mobilização dos astrócitos e microglias; e
- 3) Na liberação de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias;

Referências bibliográficas

- AARSLAND, D.; KURZ, M. W. The Epidemiology of Dementia Associated with Parkinson's Disease. **Brain Pathology**, v. 20, n. 3, p. 633–639, 12 maio 2010.
- AARSLAND, D.; ZACCAI, J.; BRAYNE, C. A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 20, n. 10, p. 1255–1263, 22 out. 2005.
- BANTLE, C. M. et al. Mitochondrial Dysfunction in Astrocytes: A Role in Parkinson's Disease? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, 7 jan. 2021.
- BEITZ, J. M. Parkinson s disease a review. **Frontiers in Bioscience**, v. S6, n. 1, p. S415, 2014.
- BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10291, p. 2284–2303, jun. 2021.
- BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, mar. 2003.
- BRANDÃO, L. E. M. et al. *Passiflora cincinnata* Extract Delays the Development of Motor Signs and Prevents Dopaminergic Loss in a Mice Model of Parkinson's Disease. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, n. 1, jan. 2017.
- CHEN, C.-L. et al. Association between β 2-Adrenoreceptor Medications and Risk of Parkinson's Disease: A Meta-Analysis. **Medicina**, v. 57, n. 10, p. 1006, 24 set. 2021.
- CHIA, S. J.; TAN, E.-K.; CHAO, Y.-X. Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2464, 2 abr. 2020.
- CHIARELI, R. A. et al. The Role of Astrocytes in the Neurorepair Process. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 25 maio 2021.
- CUNHA, D. M. G. et al. Neuroinflammation in early, late and recovery stages in a progressive parkinsonism model in rats. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, 26 ago. 2022.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

DA CRUZ GUEDES, E. et al. Cannabidiol Recovers Dopaminergic Neuronal Damage Induced by Reserpine or α -synuclein in *Caenorhabditis elegans*. **Neurochemical Research**, v. 48, n. 8, p. 2390–2405, 25 ago. 2023.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, set. 2003.

DE VIRGILIO, A. et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, n. 10, p. 1005–1011, out. 2016.

DOORN, K. J. et al. Increased Amoeboid Microglial Density in the Olfactory Bulb of Parkinson's and Alzheimer's Patients. **Brain Pathology**, v. 24, n. 2, p. 152–165, 28 mar. 2014.

FADANNI, G. P. et al. Genetic effects in a progressive model of parkinsonism induced by reserpine. **Psychopharmacology**, v. 240, n. 5, p. 1131–1142, 24 maio 2023.

FAHN, S. Description of Parkinson's Disease as a Clinical Syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 991, n. 1, p. 1–14, 24 jun. 2003.

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, maio 2012.

GIBSON, C. J.; WURTMAN, R. J. Physiological control of brain norepinephrine synthesis by brain tyrosine concentration. **Life Sciences**, v. 22, n. 16, p. 1399–1405, abr. 1978.

GOEDERT, M.; COMPSTON, A. Parkinson's disease — the story of an eponym. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 1, p. 57–62, 8 jan. 2018.

HOPFNER, F. et al. β -adrenoreceptors and the risk of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 19, n. 3, p. 247–254, mar. 2020.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368–376, 1 abr. 2008.

KAM, T.-I. et al. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 144, p. 105028, out. 2020.

KWON, H. S.; KOH, S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. **Translational Neurodegeneration**, v. 9, n. 1, p. 42, 26 dez. 2020.

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, p. 213–223, mar. 2019b.

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



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

LEÃO, A. H. F. F. et al. Molecular, Neurochemical, and Behavioral Hallmarks of Reserpine as a Model for Parkinson's Disease: New Perspectives to a Long-Standing Model. **Brain Pathology**, v. 25, n. 4, p. 377–390, 22 jul. 2015.

LEÃO, A. H. F. F. et al. Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) Are Resistant to a Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease: Differences in Motor Behavior, Tyrosine Hydroxylase and α -Synuclein Expression. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, 27 mar. 2017.

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

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055–2066, jun. 2009.

LEWITT, P. A. Norepinephrine: the next therapeutics frontier for Parkinson's disease. **Translational Neurodegeneration**, v. 1, n. 1, p. 4, 13 dez. 2012.

LI, Q. et al. Artemisinin Confers Neuroprotection against 6-OHDA-Induced Neuronal Injury In Vitro and In Vivo through Activation of the ERK1/2 Pathway. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5527, 20 jul. 2023.

LI, Y. et al. Preclinical reserpine models recapitulating motor and non-motor features of Parkinson's disease: Roles of epigenetic upregulation of alpha-synuclein and autophagy impairment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 12 out. 2022.

LIMA, A. C. et al. Female Rats Are Resistant to Cognitive, Motor and Dopaminergic Deficits in the Reserpine-Induced Progressive Model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 13, 25 out. 2021.

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, maio 2018.

LOTANKAR, S.; PRABHAVALKAR, K. S.; BHATT, L. K. Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 5, p. 585–597, 21 out. 2017.

MESSING, A.; BRENNER, M. GFAP at 50. **ASN Neuro**, v. 12, p. 175909142094968, 18 jan. 2020.

MITTAL, S. et al. β 2-Adrenoreceptor is a regulator of the α -synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. **Science**, v. 357, n. 6354, p. 891–898, set. 2017.

MOUSTAFA, A. A. et al. Motor symptoms in Parkinson's disease: A unified framework. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 68, p. 727–740, set. 2016.

MURUETA-GOYENA, A. et al. Contribution of the GABAergic System to Non-Motor Manifestations in Premotor and Early Stages of Parkinson's Disease. **Frontiers in**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Pharmacology, v. 10, 30 out. 2019.

NAGATSU, T. et al. The role of tyrosine hydroxylase as a key player in neuromelanin synthesis and the association of neuromelanin with Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 130, n. 5, p. 611–625, 20 maio 2023.

NAGATSU, T.; LEVITT, M.; UDENFRIEND, S. Tyrosine Hydroxylase. The Initial Step In Norepinephrine Biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 9, p. 2910–2917, set. 1964.

NIRANJAN, R. The Role of Inflammatory and Oxidative Stress Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease: Focus on Astrocytes. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 28–38, 20 fev. 2014.

O'NEILL, E. et al. Pharmacological targeting of β_2 -adrenoceptors is neuroprotective in the LPS inflammatory rat model of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 2, p. 282–297, 12 jan. 2020.

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

OU, Z. et al. Global Trends in the Incidence, Prevalence, and Years Lived With Disability of Parkinson's Disease in 204 Countries/Territories From 1990 to 2019. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 7 dez. 2021.

PAREDEZ-RODRIGUEZ, E. et al. The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 8 abr. 2020.

PARK, A.; STACY, M. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 256, n. S3, p. 293–298, 27 ago. 2009.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223–236, maio 2002.

POZZI, N. G. et al. Brain Noradrenergic Innervation Supports the Development of Parkinson's Tremor: A Study in a Reserpinized Rat Model. **Cells**, v. 12, n. 21, p. 2529, 27 out. 2023.

PREININGER, M. K.; KAUFER, D. Blood–Brain Barrier Dysfunction and Astrocyte Senescence as Reciprocal Drivers of Neuropathology in Aging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6217, 1 jun. 2022.

QIAN, L. et al. β_2 Adrenergic receptor activation induces microglial NADPH oxidase activation and dopaminergic neurotoxicity through an ERK-dependent/protein kinase A-independent pathway. **Glia**, v. 57, n. 15, p. 1600–1609, 15 nov. 2009.

QIAN, L. et al. β_2 -Adrenergic Receptor Activation Prevents Rodent Dopaminergic Neurotoxicity by Inhibiting Microglia via a Novel Signaling Pathway. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 7, p. 4443–4454, 1 abr. 2011.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

- RAMU, A. K. et al. Reserpine inhibits DNA repair, cell proliferation, invasion and induces apoptosis in oral carcinogenesis via modulation of TGF- β signaling. **Life Sciences**, v. 264, p. 118730, jan. 2021.
- RANA, A. Q. et al. Parkinson's disease: a review of non-motor symptoms. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 15, n. 5, p. 549–562, 4 maio 2015.
- REICH, S. G.; SAVITT, J. M. Parkinson's Disease. **Medical Clinics of North America**, v. 103, n. 2, p. 337–350, mar. 2019.
- ROSTAMI, J. et al. Human Astrocytes Transfer Aggregated Alpha-Synuclein via Tunneling Nanotubes. **The Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 49, p. 11835–11853, 6 dez. 2017.
- RYAN, K. J. et al. Stimulation of central β 2-adrenoceptors suppresses NF κ B activity in rat brain: A role for I κ B. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 5, p. 368–378, nov. 2013.
- SAMII, A.; NUTT, J. G.; RANSOM, B. R. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1783–1793, maio 2004.
- SAMPAIO, T. B. et al. Role of Prefrontal Cortex on Recognition Memory Deficits in Rats following 6-OHDA-Induced *Locus Coeruleus* Lesion. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2020, p. 1–10, 11 jul. 2020.
- 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, set. 2013.
- SCHEPERJANS, F. et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. **Movement Disorders**, v. 30, n. 3, p. 350–358, 5 mar. 2015.
- SCHERZER, C. R.; RIISE, T.; LOCASCIO, J. J. Reader response: Use of β 2-adrenoceptor agonist and antagonist drugs and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 94, n. 20, p. 898–899, 19 maio 2020.
- SILVA-MARTINS, S. et al. Myrtenol complexed with β -cyclodextrin ameliorates behavioural deficits and reduces oxidative stress in the reserpine-induced animal model of Parkinsonism. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 48, n. 11, p. 1488–1499, 28 nov. 2021.
- SONG, Q.; PENG, S.; ZHU, X. Baicalein protects against MPP⁺/MPTP-induced neurotoxicity by ameliorating oxidative stress in SH-SY5Y cells and mouse model of Parkinson's disease. **NeuroToxicology**, v. 87, p. 188–194, dez. 2021.
- SOUZA, M. F. et al. Deltamethrin Intranasal administration induces memory, emotional and tyrosine hydroxylase immunoreactivity alterations in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 142, p. 297–303, set. 2018.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

SWANSON, L. W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 9, n. 1–6, p. 321–353, jul. 1982.

TITOVA, N. et al. Parkinson's: a syndrome rather than a disease? **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 907–914, 27 ago. 2017.

TITOVA, N.; CHAUDHURI, K. R. Non-motor Parkinson disease: new concepts and personalised management. **Medical Journal of Australia**, v. 208, n. 9, p. 404–409, 21 maio 2018.

TORRENTE, D. et al. Opposing effects of β -2 and β -1 adrenergic receptor signaling on neuroinflammation and dopaminergic neuron survival in α -synuclein-mediated neurotoxicity. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 1, p. 56, 2 mar. 2023.

TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901–905, 1 ago. 2017.

VERKHRATSKY, A. et al. Astrocytes in human central nervous system diseases: a frontier for new therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 396, 13 out. 2023.

WANG, Y. et al. Transport and inhibition mechanism for VMAT2-mediated synaptic loading of monoamines. 2023.

WICKREMARATCHI, M. M. et al. The motor phenotype of Parkinson's disease in relation to age at onset. **Movement Disorders**, v. 26, n. 3, p. 457–463, 15 fev. 2011.

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

8. Outras atividades

Dentre as atividades necessárias para realização do projeto, foram realizadas buscas e leitura de artigos científicos, em inglês e português, em periódicos como PUBMED, CAPES e Scielo para embasamento científico e metodológico de todas as etapas do projeto, bem como para interpretação dos dados a serem coletados e para produção do relatório final.

Como previsto no cronograma do plano de trabalho, ao longo desse período desenvolvi várias atividades e aprendi diversas técnicas que serão necessárias para a realização dos experimentos, como:



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**

- Manejo de Animais: Realizei procedimentos experimentais em ratos da linhagem Wistar, como imobilização, administração de drogas e preparação para testes comportamentais;
- Contribuí para a manutenção do biotério, realizando transferências de animais entre caixas durante os processos de limpeza;
- Técnica de Imuno-histoquímica e montagem de lâminas: estudei e treinei os processos teóricos e práticos de cada fase da técnica de imuno-histoquímica, bem como da montagem de lâminas permanentes, fases necessárias na observação microscópica de tecidos marcados por corantes ou substâncias fluorescentes. Técnica utilizada na identificação visual de proteínas específicas, contribuindo para uma interpretação precisa dos resultados.

Técnicas de laboratório:

- Manuseio da bomba peristáltica para administrar soluções de forma controlada e precisa durante procedimentos experimentais;
- Preparação de soluções para perfusão, envolvendo cálculos químicos específicos para garantir dosagem exata;
- Manuseio do microscópio para visualizar amostras de tecidos.

Participação em outros projetos desenvolvido pelo grupo de pesquisa:

- Contribuí para outros projetos do laboratório, avaliando o efeito de agonistas e antagonistas β -adrenérgico na predisposição à doença de Parkinson;
- Participação em reuniões semanais realizadas pelo grupo de pesquisa para discussão artigos e projetos científicos.

Estudos adicionais:

- Realizei estudos sobre os aspectos fisiopatológicos associados à doença de Parkinson e dediquei tempo à leitura de artigos científicos para ampliar o conhecimento sobre a área.

Participação de eventos:

- Participei da IX SEMAC 2023, e assisti os minicursos que tratam sobre “Mente



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
em Foco: Explorando a Neurobiologia da Memória e Ansiedade”

- Participei da IX SEBITA 2024 – Semana da Biologia de Itabaiana-SE, e assisti os minicursos que tratam sobre “Autismo além dos rótulos: Explorando fundamentos fisiológicos e comportamentais para promover inclusão e aceitação da diversidade” e “Explorando os sentidos: Uma jornada sensorial”.

Premiação:

- Esse trabalho foi apresentado e premiado com Menção Honrosa na IX SEBITA 2024.